



Academia de Ciencias Matemáticas,  
Físico-Químicas y Naturales de Granada

**NUTRICIÓN PROTEICA Y CRECIMIENTO EN PECES.**

**ASPECTOS REGULADORES**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN

COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

**ILMO. SR. D.**

**MANUEL DE LA HIGUERA GONZÁLEZ**

GRANADA, 2009



Academia de Ciencias Matemáticas,  
Físico-Químicas y Naturales de Granada

**NUTRICIÓN PROTEICA Y CRECIMIENTO EN PECES.  
ASPECTOS REGULADORES**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN  
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

**ILMO. SR. D.**  
**MANUEL DE LA HIGUERA GONZÁLEZ**  
GRANADA, 2009

**NUTRICIÓN PROTEICA Y  
CRECIMIENTO EN PECES.  
ASPECTOS REGULADORES**

## **NUTRICIÓN PROTEICA Y CRECIMIENTO EN PECES.**

### **ASPECTOS REGULADORES**

**MANUEL DE LA HIGUERA GONZÁLEZ**

Excelentísimo Señor Presidente.  
Excelentísimos e ilustrísimos señores.  
Señoras, señores:

Doy gracias a esta Academia por el honor que me hace al aceptar mi candidatura y proponerme como miembro de esta Institución de manera unánime. Confieso desde la humildad que he tenido dudas de merecerlo, pero también debo manifestar que no vengo solo, sino arropado con la enseñanza y el ejemplo de mis maestros y el apoyo continuo de mis colaboradores. Para mi este acto es también un homenaje a todos los que, de alguna manera, en casa o en el trabajo, han caminado conmigo a lo largo de los años compartiendo vivencias y haciendo realidad algunas ilusiones.

Siempre viví en un entorno próximo a la Universidad, en el que me educé bajo un modelo basado en una actitud personal de rigor, responsabilidad y respeto al

conocimiento y a las personas. Al mismo tiempo, tener tan a mano una amplia y variada biblioteca hizo que, tempranamente, arraigaran en mí aficiones como la Literatura y el Arte. Sin embargo, quizás por una ampliación de horizontes, no seguí el camino de las humanidades y opté por la investigación científica aunque, eso sí, siempre compartida con el placer por la Literatura y una cierta dedicación a la vivencia contemplativa y práctica del Arte.

Ficción, creatividad y ciencia. De estos campos opté, a los dieciséis años y sin especial entusiasmo, por la ciencia, y lo hice movido por el afán de novedad y las posibilidades de futuro que me decían que la Biología tenía en aquel momento. Con los años me entusiasmó la mecánica de la investigación, el proceso de encontrar respuesta a un planteamiento, el hecho de descubrir el tesoro de una verdad con el plano del conocimiento y la brújula de la intuición.

La imaginación, una habilidad que, junto a la intuición, puede ser útil para transitar por los caminos de la ciencia, siempre que se reconozca su vinculación al mundo de la subjetividad, es necesaria también para perderse en los terrenos de la ficción, de la literatura, otra afición que ocupa mis horas de forma cotidiana.

Por último, quiero confesar también una vocación creadora que está en un plano diferente de la actitud descubridora, pero que comparte el objetivo de obtener un resultado que está oculto para la ciencia o es nuevo para la creación. No es casualidad, pero sí fruto de la libertad

que da y que encierran la ficción, la creatividad y la ciencia, que estas inquietudes las comparta con mis hijos, cuya actividad profesional se enmarca en cada uno de estos tres campos.

Tras licenciarme en Biología, con un expediente en el que solo destacan mis preferencias, me incorporé al Departamento Interfacultativo de Fisiología Animal en el que, bajo la dirección del Profesor Varela, me inicié en la investigación. El traslado de Don Gregorio a Madrid me dejó en las buenas manos del Profesor Murillo, con el que realicé mi tesis doctoral y aprendí no sólo estilo y método de hacer investigación, sino el gusto por el trabajo concienzudo y la satisfacción de compartir un buen ambiente de trabajo en equipo. El golpe por la pérdida violenta de Aurelio Murillo me alcanzó en Escocia disfrutando de una beca posdoctoral bajo la dirección del Prof. Cowey, el gran especialista europeo en nutrición y metabolismo de peces, con el que tuve la suerte de trabajar en el Institute of Marine Biochemistry de Aberdeen (G.B.). De esa orfandad me rescató Don Gregorio, que me ofreció un hueco a su lado en Madrid, en donde, con su orientación y cariño, realicé mi carrera académica hasta mi traslado a Granada como catedrático. Me faltan palabras para agradecer el trato preferente, el apoyo y estímulo continuos, las confidencias del maestro.

Mi regreso a Granada me impuso la tarea de empezar desde cero a organizar un equipo que sería pionero en el campo de la nutrición de los peces. En la Facultad de Ciencias solo había espacio que llenar, los primeros libros los recibimos con ilusión; más tarde fueron llegan-

do revistas, los primeros proyectos, aparatos, etc. La actitud emprendedora de esos primeros años, y el afán por abordar el mayor número de objetivos dentro de nuestra especialidad, en un momento en el que participábamos en el diseño de los primeros planes nacionales de acuicultura, planteamos a las autoridades locales la creación de un centro en la costa. Por su situación junto al mar, el castillo de Carchuna, una fortaleza de la época de Carlos III, era un lugar idóneo para ubicar el proyecto y se consiguieron fondos para la restauración del edificio, cuyos planos incluían ya las instalaciones necesarias; sin embargo, no tuvimos habilidad suficiente para despertar el interés de nuestra propia institución, fundamental para la consecución de ayudas a proyectos concretos, o quizás fue consecuencia de nuestra actitud, poco dada al ruego o a la insistencia. Creemos que los logros del equipo en estos años no solo habrían mantenido la calidad que ostentan, sino que se habrían ampliado a especies marinas, sin tener que haber buscado para ello la colaboración, a veces incómoda y dependiente, con otros centros y empresas del país. En cualquier caso, los resultados del grupo son fruto de la ilusión y el trabajo de todos los miembros del equipo a lo largo de muchos años compartidos. Sin ellos poco tendría para responder por mí y avalar mi candidatura ante esta Academia. Si he procurado citar resultados del grupo en este discurso es, precisamente, para rendir homenaje a mis compañeros. A ellos mi agradecimiento y amistad perennes.

En último término, aunque por consideración protocolaria, quiero dejar constancia del papel determinante que ha jugado el apoyo continuo de mi familia a lo largo

de mi actividad profesional. Todos y cada uno de ellos, desde que tomé la decisión de dedicarme a la Biología hasta este momento, me han inducido el estado de motivación necesario para afrontar la carrera universitaria con dedicación y sin forzar apenas la voluntad. De ellos, y en especial de los más próximos, son también los éxitos cosechados. A todos, estén o no ya a mi lado, los llevo siempre en el corazón.

La nutrición de los peces ha sido, desde los puntos de vista básico y aplicado, el objeto de las investigaciones de nuestro equipo desde su origen. El desarrollo de la acuicultura ha venido demandando el diseño de dietas ajustadas a las necesidades específicas de cada especie que se pretenda cultivar. La dieta supone más de la mitad de los costes de producción, y la proteína de la fórmula es el componente que se incluye en mayor proporción, más caro y de una disponibilidad relativa. Nos ha interesado, por tanto, optimizar la utilización de la proteína para crecimiento, minimizando su utilización para otros fines. También ha sido objeto de nuestras investigaciones la valoración nutritiva de fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado, cuya disponibilidad y precio amenaza el desarrollo de la acuicultura intensiva. La menor calidad de las fuentes proteicas vegetales hace necesario el empleo de tratamientos tecnológicos adecuados y la suplementación con los aminoácidos esenciales (AAEE) en que son deficitarias. Hemos desarrollado formas de suplementación para mejorar la disponibilidad de los aminoácidos suplementados y asegurar así un patrón aminoacídico adecuado para crecimiento. Esta estrategia nos ha permitido también sugerir una sobrevalora-

ción de las necesidades de AAEE, por la forma en que se han determinado, que hace aconsejable su revisión, sobre todo en especies de aguas templadas o sin estómago regulador del tránsito digestivo.

Por último, distintas circunstancias ambientales y nutritivas, que influyen sobre la velocidad de crecimiento, las hemos valorado a nivel de recambio proteico, un proceso continuo de síntesis y degradación proteica directamente relacionado con el crecimiento. El predominio de la síntesis determina la retención de proteína para crecimiento, así que la inhibición del proceso de degradación sería una forma alternativa de favorecer el crecimiento, aspecto que hemos valorado al añadir ácido maslínico a la dieta, un posible inhibidor de las proteasas implicadas en la movilización proteica que se encuentra en la capa cérica de la aceituna y las hojas del olivo. La línea de aplicaciones del ácido maslínico es muy amplia y de gran interés no solo en nutrición animal, sino en sanidad, higiene y cosmética, lo que nos ha llevado a participar en patentes internacionales de aplicación y, también, en una sociedad industrial para producir este compuesto.

Nuestro grupo también se ha ocupado de otros aspectos de la nutrición y el metabolismo de los peces que incluyen respuestas del metabolismo intermediario a variaciones en la composición de la dieta, actividad metabólica y de crecimiento en líneas de trucha y dorada seleccionadas por su baja o alta respuesta al estrés, utilización nutritiva del aporte cualitativo y cuantitativo de lípidos a la dieta, importancia del cinc en la síntesis proteica y otros procesos de crecimiento y capacidad anti-

oxidante, papel de las vitaminas A y E y de la actividad de los mecanismos antioxidantes en condiciones de estrés crónico por alta densidad de animales y del contenido en HUFAn3 de la dieta, ingesta voluntaria de alimento y desarrollo de un dispositivo computerizado para valorarla. También hemos colaborado con empresas para el desarrollo de dietas específicas para el cultivo del esturión y el lenguado. Finalmente, hemos registrado una serie de patentes de aplicación al desarrollo de dietas, forma de dispensación de alimento y empleo del ácido maslínico como estimulante del crecimiento.

El papel de la nutrición proteica en los procesos de crecimiento de los peces ha sido el tema que he elegido para que la institución que me acoge tenga una idea más organizada de lo que ha sido la línea de investigación de mayor interés para nuestro grupo y, además, porque me permite utilizar los resultados obtenidos por el equipo como medio y excusa para hacerlo partícipe de este acto.

### **La proteína y la energía de la dieta para crecimiento**

Una definición suficientemente amplia de crecimiento podría ser “el aumento de tamaño o del número de células a lo largo del tiempo, con la connotación importante de experimentar un balance positivo de energía”. El crecimiento es también el flujo de precursores carbonados hacia la formación de macromoléculas y su organización en forma de estructuras celulares. El crecimiento no necesariamente tiene que ir acompañado de

diferenciación tisular. Como tal, esta definición no incluye la continua renovación tisular, como la de la piel o de la mucosa intestinal, y no considera el recambio de los constituyentes asociados al crecimiento.

El crecimiento es un proceso complejo, regulado a través de mecanismos fisiológicos que pueden variar en función del tejido y la fase de desarrollo. El crecimiento incluye la división celular, para multiplicar el número total de células de un organismo, y la síntesis proteica y de otras macromoléculas necesarias para construir la estructura celular y el material extracelular del organismo. El control de la división celular y de la síntesis de macromoléculas suele ser independiente. El crecimiento tiene lugar a través de dos procesos distintos, cada uno de los cuales tiene sus propios patrones de desarrollo: crecimiento por proliferación celular o hiperplasia y crecimiento por expansión celular o hipertrofia. El resultado final del crecimiento es consecuencia, básicamente, de la interacción entre el fondo genético de la especie y las condiciones ambientales en las que se desarrolla, incluyendo en estas últimas la disponibilidad de alimento. Entre estos dos extremos hay toda una serie de mecanismos fisiológicos (nerviosos y endocrinos) que aseguran las respuestas necesarias para obtener la energía y los elementos estructurales y reguladores (nutrientes) que contiene el alimento y su utilización para crecimiento. Tal vez la nutrición sea el factor determinante del crecimiento más importante después de la herencia. La deficiencia de nutrientes esenciales, que son aquellos que el organismo no puede sintetizar, ocasiona trastornos importantes del crecimiento, por lo que se hace necesario un co-

nocimiento, lo más preciso posible, de las necesidades cuantitativas de cada uno de ellos para la formulación y posterior fabricación de dietas ajustadas a las necesidades para un crecimiento óptimo. De los nutrientes esenciales (aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales) me limitaré a considerar los aminoácidos (AAs) por ser aquellos compuestos de los que están constituidas las proteínas, que son la base estructural del crecimiento.

Las necesidades nutritivas de los peces son similares a las de los animales terrestres. Se necesita una cierta cantidad de proteína para aportar un adecuado balance de AAEE, indispensable para asegurar el ritmo de crecimiento y una gran variedad de funciones metabólicas y reguladoras fundamentales. Los lípidos son fuente de energía y ácidos grasos esenciales, y se necesitan para la absorción de las vitaminas liposolubles, la estructura de las membranas y la síntesis de compuestos reguladores y hormonas. Las vitaminas y los minerales de la dieta son esenciales para asegurar el mantenimiento de funciones de las que depende también el estado de salud y el crecimiento. Los hidratos de carbono no son nutrientes esenciales aunque, según la especie, pueden ser utilizados en cantidades relevantes como fuente de energía y contribuir así, junto a los lípidos, a optimizar la utilización de los aminoácidos para crecimiento.

Hay, sin embargo, importantes diferencias entre los peces y vertebrados terrestres de interés ganadero. Los peces necesitan mucha menos energía (40kJ/kg/día) para el mantenimiento de sus funciones que los homeotermos (300kJ/kg/día), lo que les hace energéticamente

mas eficientes. Esto significa que un pez que consume una dieta normal podrá dedicar un promedio del 85% de la energía digestible para crecimiento, mientras que un homeotermo del mismo peso dedicaría del 30 al 50%. Esa alta eficiencia energética se debe, sobre todo, a que los peces invierten poca energía en mantenerse y desplazarse por el agua, no han de mantener una temperatura constante y gastan muy poca energía en transformar metabolitos tóxicos, como el amoníaco, en formas menos tóxicas, como la urea o el ácido úrico, ya que aproximadamente un 85% del amoníaco se excreta pasivamente por las branquias a un coste despreciable.

Si hemos aceptado que el crecimiento del organismo corresponde al desarrollo de una estructura multi-proteica, cuyas unidades son los AAs encadenados en una secuencia específica establecida genéticamente, es fácil deducir la trascendencia nutritiva que tiene la proteína de la dieta como aporte de las unidades estructurales con las que construir el organismo. La dieta debe aportar la mínima cantidad de proteína para mantener la máxima capacidad de crecimiento, de acuerdo con el concepto de necesidades nutritivas, y aportar todos los AAs necesarios para la síntesis proteica y otras necesidades funcionales. Las necesidades de proteína de los peces oscilan entre el 35 y 55% de la dieta, según la especie y otras circunstancias como la edad, condiciones ambientales y aporte energético de la dieta. Estos porcentajes pueden inducir a pensar que los peces necesitan mayor cantidad de proteína que otros vertebrados de interés económico, pero son consecuencia de sus menores necesidades energéticas respecto de los homeotermos ya que, en

términos absolutos, no se observan diferencias importantes. En el mismo sentido, se expresan los índices de retención o eficacia proteica: muy similares entre peces y homeotermos terrestres; sin embargo, los índices de conversión del alimento son una media de tres veces mejores en el caso de los peces, precisamente por tener una más alta eficiencia energética o, lo que es lo mismo, menores necesidades calóricas.

Kim et al. (1991) llevaron a cabo una serie de experimentos en los que demostraban que las necesidades de proteína de la trucha no son más del 25%, lo que provocó sorpresa entre los especialistas. Esa dieta del 25% de proteína suministraba los AAEE en cantidades suficientes para cubrir necesidades junto con una mezcla de AAnEE equivalente a un 10% de proteína; en realidad, era una dieta del 35% de proteína. Los AAnEE no fueron considerados, por tanto, como parte de la proteína. También hay que tener en cuenta, para entender el planteamiento, que la retención de proteína para crecimiento es del orden del 30-40% de los AAs de la dieta, por lo que una fracción importante de la proteína de la dieta es utilizada para la producción de energía. De hecho, se ha propuesto alguna vez la idea de expresar las necesidades de proteína en términos de energía (g de proteína/MJ). Los experimentos de Kim y su equipo también suscitan la cuestión, que analizaré más ampliamente después, de la trascendencia de observar un adecuado balance aminoacídico en la dieta, al menos en términos tan poco concretos como la relación AAEE /AAnEE. En este sentido, Wang y Fuller (1989) habían observado en cerdos, que si se varía esta relación para dietas del mismo contenido en

proteína, se puede resentir el crecimiento y dan como valores óptimos las relaciones 50/50-57/43; proporciones mayores de AAnEE disminuyen la retención proteica. En la dorada se han observado resultados parecidos, ya que la disminución de esta relación (mayor proporción de AAnEE) induce un aumento del catabolismo aminoacídico y, por consiguiente, de la eliminación postprandial de amoniaco, mientras que la mayor proporción de AAEE estimula la retención corporal de proteína (Gómez-Requeni et al., 2003)

Ante los posibles destinos metabólicos de los AAs (mantenimiento, crecimiento, gluconeogénesis y energía), parece obvia la necesidad práctica de mantener crecimientos máximos minimizando, al mismo tiempo, el destino energético y gluconeogénico de los AAs. Este planteamiento supone optimizar la relación proteína/energía (P/E) de la dieta con un aporte adecuado de lípidos e hidratos de carbono. En consecuencia, optimizar la relación P/E supone un paso importante para una definición precisa de las necesidades totales de proteína. Un ejemplo de los pasos que llevarían a establecer una adecuada relación proteína/energía lo tenemos en una serie de ensayos realizados por nuestro grupo en la anguila europea (García Gallego et al., 1993; Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993).

Los peces, en general, utilizan mal los hidratos de carbono como fuente de energía, especialmente los carnívoros más estrictos, en comparación con la utilización de los lípidos y las proteínas. No obstante, las necesidades de glucosa de algunos tejidos, y su cierta acción de

ahorro de proteína, hacen aconsejable su inclusión en la dieta hasta determinados niveles que en algunas especies, como la anguila, alcanzan concentraciones importantes (Sanz et al., 1993). Además, la inclusión de hidratos de carbono en la dieta reduce el uso gluconeogénico de los AAs (Cowey et al, 1977; de la Higuera y Cárdenas, 1985), mejorando la disponibilidad de estos para crecimiento. La mejor utilización de los lípidos hace que sean la fuente energética alternativa de elección en la formulación de dietas para peces, ya que aumentan las tasas de conversión del alimento, así como los índices de retención proteica para crecimiento (de la Higuera et al., 1977; García-Gallego et al., 1993; Vergara et al., 1996; Schuchardt et al., 2008) y, paralelamente, producen una menor excreción de amoniaco (García-Gallego et al., 1981) y un menor consumo de oxígeno (Cho et al., 1982), lo que es una ventaja en condiciones de cultivo intensivo y motivo de que llamásemos a estas dietas ricas en grasa “piensos de verano” ya que, en condiciones de mayor temperatura y menor renovación del agua de los estanques, un pienso que además de mejorar los índices de producción disminuyera el consumo de oxígeno y la eliminación de amoniaco suponía, realmente, una gran ventaja.

Hay que indicar aquí, aunque brevemente, unas consideraciones generales respecto a la relación P/E, como son su variabilidad en función de una serie de circunstancias (edad, tamaño y régimen de producción, entre otras causas), que existe, dentro de ciertos límites, una relación inversa entre rentabilidad y relación P/E y, por último, que, al regular los peces su ingesta calórica, el

concepto de la relación P/E debe restringirse a dietas adecuadas en proteína y energía, ya que una baja relación P/E puede hacer que los animales se sacion antes de ingerir suficiente cantidad de proteína para crecimiento.

### **Descripción del crecimiento**

El peso y la longitud corporal son los parámetros más sencillos empleados en la descripción del crecimiento, entendidos como cambios en función del tiempo. Ambos parámetros definen el factor de condición, o índice de nutrición, un índice que expresa el crecimiento proporcionado de los peces, aunque también puede ser utilizado para identificar subpoblaciones de una especie; de hecho, cada especie tiene un rango característico de valores para este índice que reflejan su conformación corporal. Especies como los salmónidos tienen cuerpos estilizados y, por tanto, un factor de condición bajo en comparación con especies más gruesas como la carpa. Este parámetro también se usa en acuicultura como índice del grado de engrasamiento, es indicativo de cambios en el estado nutritivo, puede verse afectado por las condiciones ambientales y advierte de cambios en la forma corporal que pueden producirse, por ejemplo, con la maduración sexual. Cuando las proporciones corporales permanecen constantes, el crecimiento se define como isométrico y el peso (P) del pez es función cúbica de su longitud (L):

$$IN = (P \cdot L^{-3}) \cdot 100$$

Cuando el crecimiento de una parte del animal es diferente de otra, el crecimiento se considera alométrico y, en el cálculo del índice de nutrición, el peso no es ya función cúbica de la longitud, sino que la potencia es distinta de 3.

Hay otros índices de interés práctico que sirven para valorar la conversión del alimento y su incorporación a las estructuras que crecen; sin embargo, el crecimiento de los vertebrados se entiende generalmente como la incorporación de proteína a lo largo del tiempo. En el caso concreto de los peces, el crecimiento debe dar como resultado ejemplares más grandes, más magros y de mayor talla. Un pez de 100 g que gane 1 g de lípidos es improbable que cambie en longitud, y su ganancia de peso entrará dentro del ruido estadístico, aunque el pez haya incrementado su contenido energético.

La migración de las distintas especies de salmón pone de manifiesto hasta qué punto puede ser excesiva la simplificación del proceso a una relación lineal, sin incluir consideraciones de balance energético. Estas especies realizan migraciones anoréxicas, para el desove, durante cientos de kilómetros. Los peces entran en el río con un peso y longitud determinados, a menudo con las gónadas no desarrolladas. En el caso del salmón rosa (*O. gorbuscha*) las carcasas pesan más que cuando los peces entran en el río y los machos, que experimentan una redistribución de los lípidos, cambian algo su forma corporal. ¿Han crecido estos peces? El factor de condición antes mencionado falla al dar cuenta de un proceso de crecimiento en el que se han reemplazado los componentes

estructurales por agua. Hay una redistribución de las reservas, captación de agua, un desarrollo gonadal de hasta el 30% del peso corporal y, todo esto, va asociado a un gasto considerable de energía que se invierte en la migración, el desove y el mantenimiento de las funciones vitales.

Hay también otros parámetros que suelen ser valorados para describir el crecimiento de los peces, como los cambios que tienen lugar en la microestructura de los otolitos, la incorporación de AA radioactivos a las escamas o al músculo, la retención de nitrógeno, el contenido tisular o corporal de ADN y ARN, así como la relación ARN/ADN. El interés de la relación ARN/ADN reside en el hecho de que la síntesis proteica dependiente de transcripción se correlaciona positivamente con la actividad ribosómica y el aumento en los niveles intracelulares de ARN, mientras que el contenido total de ADN no sufre cambios, o son poco marcados, por lo que sirve de punto de referencia. Más recientemente se valora la captación corporal y tisular de fenilalanina marcada en distintas condiciones de edad, alimentación, composición de la dieta, etc., en las que nuestro equipo ha participado activamente con contribuciones que oportunamente se citarán.

Es fácil notar que un organismo ha crecido por su cambio de talla o de peso y, de hecho, a largo plazo, son medidas precisas del crecimiento; sin embargo, cuando se trata de analizar, a corto plazo, las influencias sobre los mecanismos íntimos del crecimiento se recurre a la valoración de la síntesis y el recambio proteico tisular y,

más concreta y específicamente en el caso de los peces, el acumulo de proteína muscular.

Las proteínas, al igual que el resto de los constituyentes celulares, están sujetas a un recambio que se expresa metabólicamente en un proceso dinámico de síntesis y degradación continuas. Este proceso asegura el control de la masa total de proteínas, tanto estructurales como de enzimas del metabolismo intermediario. Las velocidades fraccionarias de síntesis ( $K_S$ ) y degradación ( $K_D$ ) expresan la proporción diaria de AAs que se incorpora o moviliza de la masa proteica tisular, desde o hacia el *pool* intracelular de AAs libres. La relación entre velocidad de crecimiento ( $K_G$ ) y velocidad de síntesis ( $K_S$ ) es un índice de la eficacia del proceso (ERP) de incorporación de la proteína sintetizada a las estructuras o depósitos proteicos titulares.

Dado que la mayor parte del ARN celular corresponde al ARN ribosómico (85%), la capacidad de síntesis ( $C_S$ ), expresada como la relación ARN/proteína, se puede considerar indicativa del número celular de ribosomas y, por tanto, de la capacidad de un tejido para la síntesis proteica. Por otra parte, la relación entre velocidad y capacidad de síntesis proteica nos da información sobre la eficacia de la traducción o del proceso de síntesis ( $K_{RNA}$ ) al reflejar la cantidad de proteína sintetizada por unidad de ARN. Además, el contenido celular de ADN permite conocer la cantidad de proteína sintetizada por célula ( $K_{DNA}$ ) y se calcula como el producto de  $K_S$  por la relación proteína/ADN.

Para determinar la naturaleza del crecimiento tisular, se utiliza la cantidad total de ADN como grado de hiperplasia y la relación proteína/ADN como índice del grado de hipertrofia. Nuestros estudios en el músculo blanco de la trucha (Peragón et al. 2001) han puesto de manifiesto la existencia de dos fases en el desarrollo de esta especie, una primera (entre 7 y 65 g) de crecimiento rápido en la que se produce un fuerte incremento de hasta tres veces en el tamaño de la unidad celular (hipertrofia) y una segunda fase, de crecimiento lento en el tamaño de la unidad de ADN, en individuos de hasta 420 g. Esta segunda fase coincide con un aumento de hasta 4,5 veces en el número de núcleos (hiperplasia) y se caracteriza por el reclutamiento fibrilar en el tejido muscular.

Como la velocidad de crecimiento es un criterio fisiológico por el que se establecen las necesidades nutritivas, es importante obtener altas tasas de crecimiento con las dietas empleadas en los ensayos para la determinación de necesidades o la valoración nutritiva de una dieta. Las tasas de crecimiento deben ser comparables con las obtenidas para dietas de alta calidad usadas como referencia. Para asegurar este planteamiento y valorar el proceso de crecimiento es necesario disponer de modelos adecuados. Desde el punto de vista aplicado, la tasa de producción se mide por la ganancia de peso, o el aumento de talla, y el crecimiento se expresa como porcentaje de incremento de peso/longitud, o como tasa de crecimiento específico cuando se considera el incremento de biomasa, como función lineal del tiempo, en periodos cortos. Para muchas especies el crecimiento es aproximadamente lineal a lo largo de un ciclo de producción,

donde los peces se crían desde que son alevines hasta que alcanzan el tamaño comercial antes de que se inicie la maduración sexual y la velocidad de crecimiento disminuya significativamente. Para periodos mas largos no se debe admitir que el crecimiento sea lineal y se debe emplear un modelo exponencial:

$$P = P_0 e^{kt} \quad \text{o} \quad L = L_0 e^{kt}$$

siendo P/L y P<sub>0</sub>/L<sub>0</sub> el peso y longitud final e inicial durante un tiempo (t) expresado en días, que tampoco se ajusta bien en la mayoría de los casos, y donde k corresponde a la tasa de crecimiento instantáneo o específico:

$$G = (\ln P - \ln P_0) \cdot t^{-1}$$

En la práctica, G multiplicado por 100 expresa la tasa de crecimiento específico en porcentaje diario:

$$G = (\ln P - \ln P_0) \cdot t^{-1} \cdot 100$$

El mejor ajuste propuesto para la tasa de crecimiento específico corresponde a una función potencial en la que el ritmo de crecimiento específico (G) se relaciona con el peso corporal de acuerdo con la siguiente función alométrica:

$$G = a \cdot P^b \quad \text{o} \quad G = a \cdot L^b$$

donde a es una constante (la velocidad de crecimiento de un pez de 1g), P es el peso corporal, L la longitud de los animales y b el exponente del peso/longitud o pendiente

(para la mayoría de los peces en el rango -0.35 a -0.45). Al relacionar la velocidad de crecimiento con el peso, para distintas edades de la trucha, hemos observado una clara alometría negativa entre ambas variables, tanto para el animal completo como para el músculo, obteniendo en ambos casos valores muy similares para la pendiente (b) y en la zona inferior del rango antes mencionado (Pera-gón, 1993).

La integración de la función anterior expresa, según Guillaume et al. (2002), la tasa de crecimiento específico de acuerdo con la relación:

$$G = [P^{1-b} - P_0^{1-b} / (1-b) \cdot t] \cdot 100$$

Con el inconveniente de que hay que determinar b mediante ajustes y que, según especie y estado fisiológico, tiene un valor que oscila entre 0,5 y 0,9. Más recientemente se ha propuesto el índice de crecimiento diario (ICD) que deriva de un modelo más simple, en el que el crecimiento se supone proporcional al peso corporal, cuando b=2/3 y a temperatura constante, y así:

$$ICD = (P_f^{1/3} - P_i^{1/3}) \cdot t^{-1} \cdot 100$$

Este índice permite mejores comparaciones entre grupos experimentales, ya que varía poco para pesos comprendidos entre 1g y varios Kg. En todos los casos se podrían emplear los datos de longitud o talla en vez del peso, aunque este último parámetro es el más habitualmente empleado.

A pesar de esta relación teórica, los peces no crecen con un patrón constante, y sorprenden las interacciones entre condiciones ambientales y dieta, con intervalos de crecimiento en peso que alternan con un rápido crecimiento lineal y, a veces, con la imposición de ritmos anuales o estacionales de crecimiento. Así, por ejemplo, aunque la temperatura influya sobre el consumo de oxígeno, la ingesta y utilización del alimento, el ritmo metabólico, etc., el aumento de temperatura no necesariamente se traduce en un crecimiento más rápido; los peces pueden rehusar ingerir alimento, incluso en condiciones “óptimas” o en ausencia de competidores. Igualmente, la relación entre velocidad de crecimiento y temperatura puede estar en función de la disponibilidad de alimento, presentando los peces una temperatura óptima de crecimiento, más baja si se mantienen con una ración menor que la máxima posible. No obstante, se han desarrollado modelos predictivos para describir, dentro de ciertos límites, las relaciones del crecimiento con la temperatura, disponibilidad de alimento, digestibilidad, composición de la dieta, etc. Pocos de estos modelos incluyen una aproximación calórica.

Hay muchos modelos disponibles para los piscicultores que ayudan a planificar la producción y prever resultados y rentabilidad. La capacidad para predecir el ritmo de crecimiento tiene un destacado valor estratégico para los acuicultores. Con propósitos prácticos, el crecimiento de los peces, en determinadas condiciones de cultivo, puede ser calculado en función de la cantidad de alimento consumido y los índices de conversión del ali-

mento. El crecimiento se calcula, en función del tiempo (día o semana), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$P_1 = P_0 + (P_0 \cdot R)/IC$$

$P_1$  y  $P_0$  son los pesos final (una semana, por ejemplo) e inicial,  $R$  la ración suministrada durante esa semana e  $IC$  el índice de conversión del alimento (alimento ingerido/incremento de peso). La ganancia de peso puede ser calculada para semanas sucesivas y así, para la segunda semana, el peso sería:

$$P_2 = P_1 + (P_1 \cdot R)/IC$$

Puesto que los dos factores principales que afectan al crecimiento son la temperatura y el tamaño de los peces, estos deben ser tenidos en cuenta en los modelos predictivos.

Como parte de sus estrategias de crecimiento, los peces pueden presentar una respuesta de crecimiento compensatorio consistente en una fase de crecimiento acelerado, cuando se restablecen condiciones favorables, después de un periodo de depresión del crecimiento por circunstancias diversas. Los peces pueden crecer más rápido de lo esperado después de un periodo de ayuno o de restricción de alimento, o de haber ingerido una dieta deficiente en un nutriente esencial, o de haber estado en condiciones ambientales desfavorables como temperatura subóptima, salinidad alterada o menor disponibilidad de oxígeno (Alí et al., 2003, Wright et al., 2007). Los peces compensan la pérdida de crecimiento alcanzando rápi-

damente a los especímenes que hubieran estado creciendo normalmente, y esta respuesta puede ser parcial, completa o, incluso, sobrecompensatoria, aunque este último caso sólo se ha logrado cuando los ciclos de deficiencia y saciedad son forzados. El aumento en la eficiencia del crecimiento se ha analizado mediante modelos que representan distintas hipótesis fisiológicas, analizando los resultados obtenidos en experimentos de ingesta variable respecto a controles de alimentación estable. (Skalski et al., 2005).

La respuesta compensatoria por realimentación la hemos estudiado en la trucha tras un periodo prolongado de ayuno (70 días). Durante este periodo de ayuno todos los parámetros relacionados con el recambio proteico y la eficacia de la síntesis de proteína para crecimiento se redujeron de 4 a 8 veces con importantes pérdidas de proteína corporal y una eficacia de la retención proteica que pasó del 98% al -215%. La valoración del recambio proteico muscular a los 9 días de retroalimentación puso de manifiesto un aumento de cinco veces en la velocidad de síntesis proteica ( $K_S$ ) y de siete veces en la eficacia del proceso ( $K_{RNA}$ ), mientras que la retención proteica para crecimiento se igualó con la del grupo control. No se llegó a producir una respuesta sobrecompensatoria, probablemente por ser 9 días poco tiempo para que la respuesta endocrina llegara a estimular los mecanismos de crecimiento por encima de los correspondientes a la edad de los animales en estos ensayos (Peragón et al.,). La respuesta endocrina parece estar protagonizada por el IGF-I y la insulina, cuyos niveles plasmáticos disminuyen durante el ayuno (Gómez-Requeni et al., 2004, Montserrat,

et al., 2007b) para aumentar notablemente con la realimentación (Navarro et al., 2004, Montserrat, et al., 2007b).

Más recientemente se ha observado respuesta compensatoria a una dieta de terminación, llamada así por utilizarse para redondear la calidad y composición final de la producción por inclusión de aceite de pescado, cuando previamente se emplearon aceites vegetales en el cultivo de una especie de bacalao (Turchini et al., 2007). Los autores consideran estos resultados como la primera demostración de una compensación de crecimiento por restablecimiento de niveles adecuados de un nutriente esencial. De hecho, esta situación nutritiva previa estaría en el límite de una malnutrición por deficiencia de ácidos grasos esenciales, de tal forma que al aumentar su disponibilidad, en la dieta de finalización del proceso de producción, se induce la respuesta compensatoria. Entre los resultados no publicados del grupo (Expósito, 1999) tenemos registrada, precisamente, una respuesta sobrecompensatoria cuando la trucha pasa de un estado de deficiencia de cinc (dieta con 2 ppm de Zn), oligoelemento esencial involucrado en los mecanismos básicos del crecimiento, a ingerir una dieta con niveles adecuados de este micronutriente (26 ppm). La velocidad de síntesis proteica ( $K_S$ ), reducida un 60% por la deficiencia, aumentó un 127% después de 30 días de ingerir la dieta normal; la capacidad de síntesis ( $C_S$ ) y la tasa de crecimiento instantáneo también aumentaron, respecto a la dieta control, un 50 y 60% respectivamente.

El crecimiento compensatorio, cuando se induce por privación de alimento, se relaciona con la disminución en las reservas de lípidos corporales de tal forma que, además de la recuperación del crecimiento, el crecimiento compensatorio sería una respuesta para restaurar niveles adecuados de lípidos. Como parte de la respuesta es consecuencia de una mayor ingesta, se ha relacionado la pérdida de reservas lipídicas con la menor liberación de leptina, un inhibidor de la ingesta de alimento que se produce en el tejido adiposo, aunque no se descarta también la participación del neuropeptido Y o la galanina como inductores de apetito. Por otra parte, el papel del sistema endocrino no está claro en la inducción de la hiperfagia asociada a la respuesta compensatoria, siendo la hormona del crecimiento (GH) y factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF) los principales candidatos a mediar la respuesta endocrina.

El crecimiento es, en gran parte, consecuencia de la síntesis proteica y, por tanto, este proceso se nos presenta como la mejor expresión final del crecimiento. El proceso consiste en la incorporación secuencial de los AAs a la cadena de proteína que se está sintetizando, esa secuencia es específica, ya que está determinada genéticamente y, por tanto, no permite la posibilidad de sustitución de unos AAs por otros. Si, como consecuencia de la composición de la dieta, las cantidad disponible de alguno(s) de ellos está por debajo de la correspondiente a la de la proteína que se sintetiza, se limitará la velocidad y la eficiencia del proceso de síntesis y a ese AA se le denomina limitante.

Son 20 los aminoácidos (AAs) que comúnmente se encuentran formando parte de las proteínas y hay muchos más que raramente se encuentran en ellas. Todos los AAs incluidos en proteínas, con la excepción de la glicina, tienen un átomo de carbono ópticamente activo al que los grupos amino y carboxilo se unen. En la amplia mayoría de los casos es el isómero L la forma que tiene importancia metabólica y nutricional. El principal papel de los AAs en todos los organismos vivos es ser la unidad o monómero para la síntesis de proteínas. Por supuesto, los AAs tienen muchos otros usos como la producción de energía y glucosa, son precursores de importantes compuestos biológicos y desempeñan papeles funcionales específicos de diversa índole.

Todos los aminoácidos empleados en la síntesis de proteínas deben estar en la forma L, aunque las formas D también se dan en la naturaleza como, por ejemplo, en las paredes bacterianas. A menudo las fórmulas comerciales son suplementadas con AAs cristalizados, por lo que es importante predecir la utilización de las formas racémicas. Los D-AAs pueden ser catabolizados por D-AA-oxidasas para dar los correspondientes cetoácidos que, normalmente, son transaminados al isómero L del AA. Al no haber transaminasas para lisina y treonina en los tejidos animales, los isómeros D de estos aa no tienen utilidad nutritiva. En otras ocasiones, el cetoácido es rápidamente catabolizado, con lo que se reduce su posibilidad de ser transaminado para formar su correspondiente isómero L. Probablemente la competencia entre oxidación irreversible y transaminación del cetoácido es la razón por la que otros isómeros D no son fácilmente trans-

formados en su forma L. Habría que investigar las posibilidades de las formas D para los peces, ya que, por ejemplo, en el pollo hay formas D equivalentes (metionina, fenilalanina, leucina, prolina) a la L; las hay con una capacidad del 50% (valina) y, también, con poco o ningún valor nutritivo (triptófano, histidina, isoleucina, lisina, treonina, arginina).

El metabolismo de los aminoácidos ha sido ampliamente revisado en muchas ocasiones y desde distintos puntos de vista, pero aquí solamente abordaremos algunos aspectos concretos que nos ayuden a entender las variaciones que se producen en sus necesidades nutritivas y las diferentes respuestas que, a los aminoácidos de la dieta, surgen entre especies o grupos de animales.

Los llamados aminoácidos no esenciales (AA-nEE) son aquellos que pueden ser sintetizados *de novo* por el organismo, a partir de sus  $\alpha$ -cetoácidos o por transaminación de otros aminoácidos y, por tanto, no necesariamente deben estar en la dieta. El ácido glutámico, por ejemplo, juega un papel central al estar implicado en la síntesis de la mayor parte de los AAnEE, como precursor o como dador de grupos amino. Los AAnEE son, en su mayor parte, sintetizados en cantidades suficientes por transaminación de intermediarios de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. No obstante, para su síntesis se necesita que haya grupos amino disponibles, que normalmente proceden de los AA de la dieta. Animales alimentados con dietas limitantes, por su contenido en grupos amino, pueden recuperar su tasa de crecimen-

to si a la dieta se añade un suplemento de nitrógeno no proteico.

Por otra parte, los aminoácidos esenciales o indispensables son aquellos que el animal no puede sintetizar en cantidades suficientes, para cubrir necesidades funcionales y de crecimiento y, obligatoriamente, deben ingerirlos con la dieta. Las necesidades cualitativas de distintas especies animales son muy parecidas. Las variaciones entre especies o grupos animales son consecuencia de pequeñas diferencias en su metabolismo. Por ejemplo, las aves y, en menor proporción los peces teleósteos, que no tienen un ciclo de la urea activo, necesitan arginina en su dieta. Mamíferos, en las fases más activas de crecimiento, también necesitan arginina en la dieta, no porque no tengan un ciclo de la urea activo, sino porque la mayor parte de la arginina sintetizada es catabolizada por la arginasa hepática asociada al ciclo de la urea y, en consecuencia, no se libera suficiente arginina a la sangre para el rápido crecimiento de los tejidos extrahepáticos. Esta situación es mucho más marcada en carnívoros estrictos, como el gato, que pueden llegar a un envenenamiento por amoniaco, a menos que se suministre arginina u ornitina en la dieta, ya que tiene una capacidad limitada para sintetizar ornitina a partir de glutamato (Baker y Czarnecki-Maulden, 1991). El pollo también necesita prolina, un aminoácido no esencial para otros animales, debido a su capacidad limitada para sintetizarla a partir de glutámico (Boorman y Lewis, 1971).

Con frecuencia, la metionina es el primer aminoácido limitante del crecimiento. Una proporción signi-

ficativa de la Metionina de la dieta es empleada en la formación de cisteína a través de una vía de transulfuración. Es por ello que en las recomendaciones dietarias a menudo se asocian ambos AAs. Es muy importante tener en cuenta que la transformación no es reversible, por lo que es esencial el aporte de metionina en la dieta. Otros ejemplos clásicos de la nutrición aminoacídica, donde las relaciones producto-precursor deben ser tenidas en cuenta, incluyen: fenilalanina-tirosina, cisteína-tirosina y carnosina-histidina.

### **Necesidades de aminoácidos**

Los AAs son necesarios para la realización de una serie de funciones como la renovación de pérdidas inevitables (pérdidas cutáneas, descamación intestinal, modificación inevitable de AAs, excreción branquial y urinaria de AAs no modificados químicamente, etc.), utilización obligatoria en la síntesis de compuestos no proteicos, catabolismo y la retención proteica corporal que caracteriza al crecimiento. Algunas de estas funciones, aunque fisiológicamente esenciales, solo requieren cantidades ínfimas de AAs y constituyen una pérdida despreciable de las necesidades totales. La síntesis proteica y la oxidación de AAs para producción de energía, en cambio, representan la porción mayoritaria de las necesidades totales en organismos en crecimiento activo. La retención proteica, la diferencia entre la síntesis y la degradación de proteínas titulares, representa un 30-40% del destino global de los AAs de la dieta. Las necesidades relativas para crecimiento y mantenimiento dependen,

claramente, de la tasa de crecimiento, así, en individuos jóvenes que crecen rápidamente, el crecimiento constituye la mayor parte de las necesidades aminoacídicas.

La mayor parte de la proteína que se deposita en los tejidos con el crecimiento consiste en relativamente grandes cantidades de un pequeño conjunto de proteínas, tales como miosina, actina, colágeno, etc. Aunque, indudablemente, existen diferencias interespecíficas para estas proteínas, son, sin embargo, moléculas cuya secuencia aminoacídica se ha conservado muy bien a lo largo de la evolución, de tal forma que sólo hay pequeñas diferencias en la composición de AAs. De hecho, la proteína corporal de diferentes especies de peces difiere poco en su composición y, consecuentemente, las necesidades de AAEE para crecimiento era de esperar que no difirieran mucho.

Las necesidades de mantenimiento se definen, generalmente, como la cantidad de nitrógeno (proteína/AAs) que debe ser incluida en la dieta para mantener un balance cero, o lo que es lo mismo, el aporte de nitrógeno con el alimento es igual a la suma de las pérdidas de nitrógeno para mantener un contenido corporal constante (Fuller, 1994). Estas pérdidas obligatorias son el resultado neto de una serie de procesos que demandan un aporte continuo de AAs y que persisten a lo largo de la vida de un animal, independientemente del crecimiento o de la reproducción y que, en su conjunto, equivalen a las necesidades de mantenimiento. Entre esos procesos está el mantenimiento de la integridad de las barreras corporales (piel, branquias, pulmones, digestivo) y de las se-

creciones que previenen la invasión de patógenos, la respuesta inmune y otros aspectos de los mecanismos de defensa como la síntesis de glutatión y taurina. Entre las funciones metabólicas que suponen un gasto de AAs están la formación de purinas (glicina, glutamina), poliaminas y compuestos metilados (metionina), catecolaminas (fenilalanina), hormonas tiroideas (tirosina), carnitina (lisina), creatina (arginina, glicina), histamina (histidina), taurina (cisteína), serotonina (triptófano), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (glutámico). También hay un uso directo de AAs como neurotransmisores (glutámico, glicina, aspártico, alanita, etc.) o para la síntesis de neurotransmisores, neuromoduladores y otras sustancias reguladoras como el óxido nítrico. Otros aspectos reguladores incluyen el papel que recientemente se atribuye a la arginina en la regulación de la respuesta inmune o, a través de la formación de óxido nítrico, en la actividad de los macrófagos y adhesión y activación de linfocitos. Merece también una consideración especial la glutamina, un AA muy concentrado en la musculatura esquelética que parece jugar un papel destacado en la regulación del recambio proteico muscular y, por tanto, en los depósitos de proteína muscular que caracterizan al crecimiento.

Hay dos aspectos que quiero destacar en relación al gasto obligatorio de AAs con fines de mantenimiento: Los productos finales del metabolismo de algunos AAs son importantes intermediarios en el mantenimiento de una serie de funciones fisiológicas, sin relación directa con el metabolismo proteico y, también, que los precursores para la síntesis de estos compuestos pueden ser AAnEE como el glutamato, o esenciales condicionados

como la arginina, la glicina y la cisteína. El estudio de otros destinos metabólicos de los AAs distintos de la síntesis proteica marcará, seguramente, el futuro de la investigación sobre la nutrición aminoacídica, en la que se deberá obtener información cuantitativa importante sobre el impacto del uso de los AAs, su implicación en procesos específicos y, finalmente, llegar a tener un mayor conocimiento de la regulación del balance entre síntesis corporal de AAs y su aporte en la dieta.

Las necesidades de proteína son la suma de las necesidades de AAEE y un aporte nitrogenado normalmente en forma de aminoácidos no esenciales (AAnEE). La esencialidad de un aminoácido se puede establecer mediante métodos directos, consistentes en ver el efecto que la supresión del AA tiene sobre el crecimiento. Los métodos indirectos consideran como criterio de esencialidad el que no pueden ser sintetizados por el organismo en cantidades adecuadas; así, tras la administración de una fuente carbonada marcada, como  $C^{14}$ -glucosa, aquellos AAs sin radioactividad significativa se identifican como esenciales. Los resultados de estos métodos indican que los AAEE para los peces son, con la excepción de arginina e histidina que no son esenciales para otros vertebrados, los mismos identificados para la mayoría de las especies: arginina, histidina, isoleucina, leucina, valina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y triptófano.

Los AAEE deben estar presentes en la dieta, en las cantidades requeridas por el animal, para sustentar un crecimiento óptimo. Son esenciales porque el organismo no puede sintetizarlos en cantidad suficiente, bien porque

los  $\alpha$ -cetoácidos correspondientes no están presentes y no pueden ser sintetizados, o bien porque no pueden ser objeto de aminación o transaminación. Se les podría clasificar dentro de tres categorías:

- Los estrictamente indispensables porque no pueden ser sintetizados a partir de algún metabolito intermediario por ausencia de las transaminasas necesarias. Esto ocurre con la lisina y la treonina que son, por tanto, los únicos AAs absolutamente indispensables.

- Aquellos que pueden ser sintetizados por transaminación, pero a una velocidad insuficiente para cubrir necesidades, fundamentalmente por carencia de sustrato. A este grupo pertenecen: leucina, valina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y metionina.

- Los que pueden ser sintetizados en el metabolismo intermediario, pero a una velocidad insuficiente para cubrir su demanda. Este es el caso de la histidina y la arginina. Esta última, por ejemplo, puede ser formada a partir de glutamato, a través de una vía metabólica que implica derivados N-acetilados o a partir del ciclo de la urea.

- No es habitual incluir un cuarto grupo de AAEE, por dependencia bioquímica, que incluye a la cisteína y a la tirosina. Se trata de dos AAs que los animales pueden sintetizar pero solamente a partir de otro que es esencial: la cistina a partir de la metionina y la tirosina de la fenilalanina. Desde el punto de vista nutritivo, estos

AAs deberían ser considerados esenciales, ya que su síntesis depende de precursores que son esenciales.

La cuantificación de las necesidades de cada uno de los AAEE es fundamental, tanto para valorar la calidad primaria o composición en AAs, de posibles fuentes proteicas a incluir en una dieta, como para formular dietas ajustadas a las necesidades para el crecimiento óptimo de una determinada especie. Para cuantificar dichas necesidades se preparan dietas con una base proteica (proteína + mezcla aminoacídica o proteína deficiente) a la que se adicionan cantidades crecientes del AA en cuestión y se ensayan para obtener curvas dosis-respuesta relativas al crecimiento de los animales. Otros métodos alternativos se basan en la determinación de la utilización metabólica o de las concentraciones plasmáticas del AA en cuestión (Walton et al., 1986; Sierra, 1995) para cada concentración del AA en la dieta; aspectos que no son siempre válidos para todos ellos, de ahí que sea aconsejable evaluar siempre los efectos sobre el crecimiento.

Las necesidades cuantitativas de AAEE se han determinado tradicionalmente mediante pruebas dosis-respuesta, siendo la dosis el nivel del AA en la dieta y la respuesta la ganancia de peso, la conversión del alimento y, en algunas ocasiones, el nivel plasmático o la oxidación del AA. Desafortunadamente, las dietas normalmente empleadas, que contienen altas proporciones de AAs libres, inducen índices de crecimiento inferiores a los que se obtienen con dietas formuladas con proteínas intactas de la misma composición. El retraso de la absorción de los AAs libres de la dieta, al protegerlos con una cubierta

proteica, mejoraría su utilización para crecimiento, por lo que esta técnica puede ser aplicada a la evaluación de necesidades de AAs, donde se requieren altas tasas decrecimiento. Con este planteamiento, Cho *et al.* (1992) reevaluaron las necesidades de arginina de la trucha, usando dietas en las que la mezcla de AAs se mezclaba con agar disuelto. Los resultados indicaron que el nivel de necesidades era del orden de los determinados por otros autores y el procedimiento clásico. Nuestro grupo (resultados no publicados) ha demostrado que la encapsulación del AA suplementado no sólo reduce las necesidades cuantitativas de este en la dorada, determinadas frente a dietas con metionina libre e independientemente del método de cálculo empleado, sino que inducía un marcado efecto positivo sobre el crecimiento y la conversión del alimento. Estos resultados sostienen nuestra hipótesis de que una mala utilización de los AAs libres de la dieta puede haber sobreestimado las necesidades aminoacídicas, al menos en aquellas especies de peces en las que la absorción del AA libre es más rápida, bien por no tener un estómago regulador del paso de la digesta o por tener preferencias térmicas más altas, en las que los procesos metabólicos y de transporte están acelerados respecto a las especies de aguas frías. Esta puede ser la causa principal de las diferencias encontradas por el equipo de Cho en la trucha (15° C de temperatura óptima) y los resultados de nuestro grupo con la dorada (22° C para máximo crecimiento). Los resultados de nuestro grupo, en cualquier caso, apoyan la recomendación de proteger los AAs, empleados en la suplementación de fuentes proteicas deficientes, con cubiertas que retrasen su absorción y, en consecuencia, mejorar significativamente

la calidad proteica de la dieta, al menos en especies de aguas cálidas.

Más recientemente, Marcouli *et al.* (2004), tratando de desarrollar una dieta experimental para la valoración posterior de las necesidades de AAEE de la dorada, no obtuvieron diferencias en el crecimiento de doradas alimentadas, a 25° C, con una dieta a base de harina de pescado o con una dieta que contenía un 55% de una mezcla de AA libres, cuya composición representa el patrón corporal de AAEE de la dorada. Cuando la dieta a base de AAs libres fue empleada en la determinación de las necesidades de lisina (Marcouli *et al.*, 2006), las tasas de crecimiento y los índices de retención proteica para crecimiento se mantuvieron dentro de los valores control previamente observados, siempre que las necesidades de lisina estén cubiertas. Estos resultados nos plantean un hecho importante que hay que tener en cuenta y es que no es lo mismo emplear mezclas amplias y completas de AAEE, que pueden no dar lugar a cambios significativos en el patrón de AAs disponible para síntesis, que suplementar proteínas deficientes con alguno o algunos AAEE que puedan dar lugar a claras asincronías entre la absorción de AAs libres y proteicos. Sin embargo, también debe haber un factor de especie, ya que cuando se valoran las posibilidades de sustitución de proteína por AAs libres, con el objeto de desarrollar dietas adecuadas para valorar las necesidades de AAEE en el rodaballo, las posibilidades de sustitución no superan el 20% sin que se afecte el crecimiento y la eficacia en la utilización del alimento (Peres y Oliva-Teles, 2005); además, hay que subrayar que los ensayos con esta especie se desarrollaron a 18° C.

La determinación de necesidades, a partir de curvas dosis-respuesta, ha sido habitualmente llevada a cabo con datos de crecimiento y mediante el modelo de Almquist, también denominado análisis de la "línea quebrada" (Baker *et al.*, 1971), que establece las necesidades como la mínima dosis para una respuesta máxima. Estudios posteriores han demostrado que la relación entre la ingesta y la ganancia de peso no es lineal, sino más bien una función exponencial (Finke *et al.*, 1987), y que el uso de modelos no lineales (logísticos o de cinética de saturación) es lo recomendable (Cowey, 1994), asumiendo que la respuesta de un animal a un nutriente esencial es una función continua que tiende a ser asintótica. Con este tipo de función, los requerimientos cuantitativos de un AA se han definido como la dosis para alcanzar el 95% de la respuesta máxima (Gahl *et al.*, 1991; Cowey, 1992) o como la correspondiente al punto de inflexión (primera derivada máxima) de la función (Dabrowski, 1981; Thebault *et al.*, 1985).

De una manera general, y a título orientativo, si los AA son la base de la síntesis proteica y el músculo representa un alto porcentaje de la proteína corporal, el contenido en AAEE del músculo debe aproximarse bastante al patrón de AA requerido. Se ha observado que el crecimiento y los índices de conversión mejoran cuando las dietas se suplementan con AAEE para simular el patrón aminoacídico de la proteína muscular, corporal o la del huevo de la especie. También se ha observado que las necesidades de AAEE de algunas especies se correlacionan muy bien con el patrón de AAEE de la proteína cor-

poral, pero también hay excepciones. Parece, por tanto, razonable que este tipo de información se utilice para el diseño de dietas que se empleen en el inicio del cultivo o la investigación con nuevas especies cuyas necesidades todavía no se hayan determinado. No obstante, siempre será recomendable determinar las necesidades individuales específicas de cada AA para una más precisa formulación de dietas diseñadas para cada especie.

Además de la simulación directa del patrón aminoacídico corporal o muscular para formular dietas específicas, se ha empleado la relación  $(AAE/AAEE + \text{cisteína} + \text{tirosina}) \cdot 1000$ , en la suplementación de dietas experimentales para distintas especies de salmón, con notable éxito en la mejora del crecimiento y conversión del alimento. La suplementación que simula el patrón corporal de AAs de la especie da mejores resultados que los patrones de AAs del huevo de la especie o de una harina de pescado de alta calidad. En otros casos, el patrón de AAEE del músculo o del animal completo se aproxima más a las necesidades de AAEE, cubiertas por una dieta a base de harina de pescado, que el patrón correspondiente al saco vitelino de la especie (Gurure *et al.*, 2007).

Un método que podría suponer una aproximación útil al patrón óptimo de AAEE en la dieta y que no llegó a ser aceptado plenamente, por una serie de razones, es la determinación de necesidades a partir de las cantidades de AAs retenidas por animales que son alimentados con proteínas, teóricamente, de alta calidad. Entre los inconvenientes del método de Ogino (1980) están el olvido aparente de que hay unas necesidades de mantenimiento

y el hecho de que la retención proteica óptima para peces en crecimiento está alrededor del 30-40%.

El concepto de proteína ideal está basado en la idea de que debe existir una correlación directa entre el patrón aminoacídico corporal y las necesidades de AAEE de un animal. Se ha sugerido que, puesto que la lisina es normalmente el primer AA limitante en la mayoría de las fuentes proteicas, las necesidades del resto de AAEE pueden expresarse en forma relativa a las necesidades de lisina. Así, si se conocen las necesidades de lisina y la composición corporal en AAs del animal, se pueden establecer las necesidades para los distintos AAEE en relación a las de lisina. La comparación con las necesidades determinadas de forma convencional da, para el bagre, unos resultados sorprendentemente similares (Wilson, 1994). Una alternativa rápida y barata para evaluar las necesidades de nuevas especies sería, de probarse nuevamente la fiabilidad de este método, determinar la composición corporal de AAs y las necesidades de lisina para calcular las necesidades de los otros AAEE.

Se ha sugerido que el factor más importante que condiciona la eficiencia de la utilización de la proteína para crecimiento es un adecuado patrón aminoacídico. De acuerdo con la “ley de mínimos” de Liebig, el bajo aporte de un AAE inhibirá la respuesta a aquellos que se encuentran en cantidades adecuadas. Si la proteína de la dieta cubre exactamente las necesidades de un animal para cada uno de los AAEE, nos aproximamos al concepto de proteína ideal. La proteína ideal se puede también definir como aquella en la que todos los AAs son facto-

res limitantes primarios. Ese patrón ideal que, en último término, es el que tiene que estar disponible en los lugares de síntesis proteica, se puede decir que es específico de especie, ya que la secuencia de síntesis está condicionada genéticamente y es determinante de la eficiencia del proceso, ya que las proporciones entre los distintos AAs se supone que son las óptimas. Con estos planteamientos es oportuno abogar aquí por la aplicación del método de Wang y Fuller (1989) para establecer el perfil de la proteína ideal de la dieta. Wang y Fuller desarrollaron este método para establecer el patrón aminoacídico más adecuado para el cerdo en crecimiento, y pensamos que su aplicación a los peces puede ser muy útil. El método se basa en el concepto de que la retención de nitrógeno de un animal no se afecta por la reducción en la dieta del contenido en un AA que no es limitante. La reducción del contenido de cada AAE se hace en la fracción libre de este AA en la dieta. Los cambios en la retención proteica que se producen por la reducción del contenido de cada AAE se utilizan para calcular un perfil ideal de AAEE en el que cada AAE es igualmente limitante. En un experimento con estos fines, la reducción del AAE limitante primario produce la menor retención de proteína. Si la reducción de un AAE no afecta a la retención proteica, la cantidad retirada estaría, por tanto, en exceso respecto al primer AAE limitante. Si la disminución del contenido de un AAE produce un crecimiento intermedio entre los dos anteriores, la proporción en exceso es interpolada proporcionalmente a la disminución de la ganancia proteica.

Para la aplicación de este método a los peces de interés en acuicultura hay que asegurarse estrategias del tipo de las mencionadas (encapsulación o envoltura proteica para los AAs libres de la dieta, frecuencia de alimentación, etc.) para obtener altas tasas de crecimiento con dietas que contienen AAs libres, no proteicos. La trucha, con mayor capacidad para utilizar los AAs libres de la dieta, como hemos comentado, podría ser la especie más adecuada para aplicar este método. En especies agástricas, sin estómago regulador del paso, o que se cultiven en aguas templadas, el retraso de la absorción de los AAs libres o una mayor frecuencia de alimentación, como aclararemos más adelante, serían aspectos indispensables a tener en cuenta para aplicar esta metodología. Otro requisito que se deduce del procedimiento experimental es la medida precisa de la retención proteica en ensayos cuidadosamente diseñados y en aquellas etapas de mayor crecimiento activo de la especie en estudio.

Hay un método que, utilizando el mismo tipo de dietas que se emplean en los ensayos de crecimiento, se basa en la acumulación del AAE en plasma, sangre o músculo cuando su concentración en la dieta excede a su utilización metabólica. El cambio brusco en la concentración plasmática de un AAE, cuando su concentración en la dieta excede el nivel de necesidades, marca un punto de inflexión en la relación dosis-respuesta que corresponde a las necesidades del AAE en estudio. Esta técnica ha sido útil para confirmar las necesidades de aminoácidos, de tal forma que los puntos de inflexión para ambas respuestas, crecimiento y acúmulo del AAE en plasma, coinciden para la misma concentración del AAE en la

dieta. Sin embargo, esta coincidencia solo se presenta para algunos AA. Por ejemplo, de los diez AAEE para el bagre sólo cuatro (lisina, treonina, histidina y metionina) de las determinaciones en plasma fueron útiles para confirmar los resultados de los ensayos de crecimiento (Wilson, 1994). La metionina plasmática ha confirmado las necesidades para crecimiento en la lubina (Thebault, et al., 1985) y la dorada (Sierra, 1995). Sin embargo, los niveles plasmáticos de arginina y triptófano no confirmaron las necesidades para crecimiento en la trucha y, de los diez esenciales, solo las concentraciones musculares de lisina, treonina e isoleucina pudieron confirmar los resultados de crecimiento (Wilson, 1994). De lo anterior se deduce que no es un método fiable si se emplea en ensayos en los que no se valora el crecimiento de los animales.

El aumento en la oxidación de un AA, a medida que su disponibilidad excede las demandas del anabolismo proteico, ha sido a menudo utilizado para valorar las necesidades de ese AA en animales de granja de gran tamaño. Kim et al. (1983) determinaron en cerdos las necesidades de metionina usando  $C^{14}$ -fenilalanina como aminoácido de referencia. A concentraciones de metionina por debajo de las necesidades de mantenimiento la proteína es movilizad para contrarrestar la deficiencia de este AA, provocando al mismo tiempo un exceso de otros AAs como la fenilalanina. A medida que se aumentaba la disponibilidad de metionina en la dieta, la síntesis proteica también aumentaba, reduciéndose, al mismo tiempo, el exceso de fenilalanina y, por tanto, la oxidación de este AA. En consecuencia, haciendo un segui-

miento de la oxidación del AA de referencia, se puede determinar el punto de inflexión que marca las necesidades de metionina. Estos métodos se pueden considerar como complementarios de los estudios de crecimiento, ya que por sí solos pueden ser inadecuados.

El perfil de la proteína ideal es, globalmente, reflejo de la composición en AAs de las proteínas depositadas en el organismo, pero esta correspondencia no es perfecta y está en función de una serie de circunstancias como el estado fisiológico, distribución entre compartimentos corporales, factores ambientales, etc. Por otra parte, la importante contribución de ciertos AAs a diferentes procesos metabólicos altera ese perfil teórico de la proteína ideal para mantenimiento y crecimiento. A modo de reflexión sobre este extremo, baste decir que, en los mamíferos, la composición en AAs de la proteína de la leche es marcadamente diferente de la composición corporal en AAs, lo que sugiere que parte de los AAs de la leche están involucrados en funciones completamente separadas de su papel como precursores de proteína corporal.

Adicionalmente, cuando se trata de ajustar la proteína de la dieta a las necesidades y disponibilidad de AAEE, hay que tener en cuenta un aspecto práctico de notable interés, cuando se trata de ajustar la dieta a las necesidades de la especie, que es la capacidad de sustitución parcial de un AA por uno no-esencial. Este efecto es, sobre todo, consecuencia metabólica de que el segundo se sintetiza a partir del primero, como es el caso de los azufrados metionina y cistina y de los aromáticos fenilalanina y tirosina.

La capacidad de sustitución de metionina por cistina oscila entre el 40 y 60%, según la especie, mientras que la tirosina sustituye a la fenilalanina en torno a un 40-50%. Además, el posible efecto tóxico de altas concentraciones de tirosina en la dieta, demostrado en animales terrestres, no se ha detectado en el bagre, el único pez en el que se ha buscado y que no excluye el que pueda provocarse en otras especies.

La evidencia experimental en otros animales apunta a la posible existencia de antagonismos entre arginina y lisina, consistentes en que un exceso de lisina provoca un retraso en el crecimiento, que se restaura por adición de arginina y que, por otra parte, un exceso de arginina induce detención del crecimiento en dietas limitantes en lisina. Este antagonismo sobre el crecimiento no se ha demostrado ni en el bagre ni en la trucha, las dos únicas especies en las que se ha investigado esta relación. Los antagonismos entre AAs de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), estudiados en salmónidos, son probablemente consecuencia de la competencia por los sistemas de transporte, de tal forma que aquel o aquellos que se encuentren en mayor proporción se adueñarán del sistema de transporte, reduciendo las posibilidades de absorción o disponibilidad celular de aquellos que estuvieran en menor proporción; de hecho, este antagonismo entre este grupo de AAs se refleja directamente en sus concentraciones plasmáticas. Los antagonismos obligan a observar proporciones adecuadas entre AAs para asegurar la disponibilidad simultánea de cantidades adecuadas en los lugares de síntesis proteica.

También hay que tener en cuenta que los procesos tecnológicos pueden alterar la disponibilidad o integridad de algunos AAEE. Son bien conocidas las alteraciones en la disponibilidad de lisina y triptófano o la oxidación de la metionina. Además, y de una manera muy general, hay que tener en cuenta que la disponibilidad de AAEE va a depender también de factores adicionales que implican al animal, como la edad, el estado fisiológico, la cantidad y frecuencia de la ingesta o la utilización digestiva de la proteína, lo que nos lleva a considerar la influencia del olor, sabor, textura, factores antinutritivos, procesos tecnológicos, velocidad de paso, interacción entre nutrientes, etcétera, como factores que, interaccionando o no, pueden condicionar la disponibilidad cuantitativa de AAEE. Por último, la relación del animal con su ambiente señala otros factores que, al influir sobre la disponibilidad cuantitativa y temporal de AAs, como son la temperatura, la salinidad, el fotoperiodo y las condiciones de cultivo, pueden llegar a modificar las necesidades cuantitativas de estos nutrientes.

### **La proteína de la dieta condiciona el patrón de aminoácidos para crecimiento**

La disponibilidad cuantitativa y cualitativa de AAs para crecimiento depende, en primer lugar, de la aceptabilidad del alimento y, en un segundo paso, de la utilización digestiva de la proteína de la dieta, sobre la que influyen toda una serie de circunstancias (composición de la dieta, tipo de proteína, procesos tecnológicos que puedan afectarla positiva o negativamente, condiciones

ambientales, ritmo de alimentación, etc.). El resultado de la digestión y de los procesos de absorción subsiguientes, en los que puede haber interacciones y competencias entre AAs, es un patrón postprandial de AAs cuya composición en relación a las necesidades del animal condicionará la eficiencia de su utilización para crecimiento. El tiempo durante el cual permanece disponible un patrón aminoacídico adecuado puede ser también un factor importante, con posibilidad de ser influido a través de una modificación de los ritmos y raciones de alimentación, asociada o no a la manipulación del resultado de los procesos digestivos. No es aventurado decir que la calidad de una determinada fuente proteica no solo depende de su composición en AAs y digestibilidad, sino que la calidad puede ser considerada como el grado en que el patrón postprandial que genera coincide con el ideal para la síntesis de proteínas, y que esa coincidencia se mantenga el mayor tiempo posible.

Los índices químicos de calidad proteica sólo son orientativos, ya que no tienen en cuenta la palatabilidad de la fuente proteica ni la biodisponibilidad postprandial de los AAs que contiene y, además, frecuentemente no se correlacionan con el valor biológico de esa proteína (porcentaje de proteína retenida de la absorbida). Estos índices son útiles para calificar y catalogar las diferentes fuentes proteicas que pueden formar parte de la fórmula. Entre los más empleados están el cómputo químico o *chemical score*, que es la relación entre el porcentaje del AA limitante y el contenido porcentual del mismo AA en la proteína de huevo u otra proteína de referencia, la relación entre cada AA y el total de AAEE, el total de

AAEE, porcentaje de AAEE en la proteína, la relación entre total de AAEE y total de AAnEE. Un índice más complejo y afín a los planteamientos de balance o patrón aminoacídico que estamos haciendo, en relación a la síntesis de proteínas, es el balance de aminoácidos esenciales según la expresión:

$$BAAEE = \sqrt[10]{\frac{100a}{a_r} \times \frac{100b}{b_r} \times \dots \times \frac{100j}{j_r}}$$

donde a, b, ... j son porcentajes de AAEE (o relaciones AAEE / total AAEE) en la proteína problema o, incluso, en el plasma de los peces alimentados con esa proteína problema; a<sub>r</sub>, b<sub>r</sub>, ... j<sub>r</sub> son los correspondientes AAEE en la proteína de huevo, o cualquier otra proteína de referencia a la que se da el valor 100, o en plasma de animales que ingieren la proteína de referencia.

Como ya he comentado al referirme a las necesidades de AAEE, si los AAs son las unidades estructurales del crecimiento, y el músculo representa un alto porcentaje de la proteína corporal, el contenido en AAEE del músculo, o del animal completo, debe aproximarse bastante al patrón de AA requerido. De hecho, el crecimiento mejora cuando las dietas se suplementan con AAEE para simular el patrón aminoacídico de la proteína muscular, corporal o la del huevo de la especie. Por otra parte, el contenido corporal y las necesidades de AAEE resultan muy parecidas al comparar distintas especies. Todo esto encierra la idea de presentar las harinas de pescado como la fuente proteica

de mayor calidad para el diseño de dietas para peces. Sin embargo, el aumento de la demanda y del precio de las harinas de pescado, junto al progresivo agotamiento de los caladeros, ha provocado la valoración de fuentes proteicas vegetales para su inclusión en dietas para peces. A esta línea de investigación ha dedicado la atención nuestro grupo durante años y, como en otros aspectos de la nutrición de los peces, nos adelantamos a su consideración como objetivo prioritario en los planes de investigación nacionales y europeos. La inclusión parcial de proteínas vegetales en dietas para peces es en gran parte responsable de que la producción anual de harinas de pescado se haya estabilizado en 6-7 millones de toneladas, mientras que la acuicultura sigue creciendo a un ritmo anual del 10% (SOFIA, 2007). Realmente, hasta que no se logre una adecuada suplementación con AAEE y/u otras técnicas contribuyan a mejorar la calidad nutritiva de las proteínas vegetales, y se resuelva también la sustitución de los aceites de pescado como aporte de ácidos grasos esenciales para las especies marinas (HUFAn3), la dependencia de las harinas de pescado seguirá siendo alta y limitante de la producción piscícola.

Entre los criterios que hay que observar para la selección de una materia prima como fuente proteica está su contenido en proteína, aceptabilidad en función del sabor y otras características organolépticas, digestibilidad, ausencia de factores antinutritivos y y patrón aminoacídico (ver de la Higuera y Cardenete, 1993). En último término, la disponibilidad postprandial de un patrón aminoacídico, más o menos próximo a ese patrón ideal para una mayor eficiencia del proceso de

síntesis proteica, será determinante de la calidad y posibilidades de una proteína o conjunto de proteínas para ser una alternativa a las harinas de pescado. Es precisamente ese patrón postprandial de AAs, de qué depende y cómo mejorarlo, o cómo condiciona una respuesta hormonal de crecimiento, lo que será el objeto de próximos párrafos.

La primera evaluación nutritiva que hicimos, de una nueva fuente proteica, se centró en la levadura *Hansenula anomala*, crecida sobre etanol de síntesis y desarrollada en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ya que presentaba un elevado contenido proteico y una composición adecuada en AAs. La poca disponibilidad inicial de esta fuente hizo que se ensayara como única fuente proteica de la dieta, lo que resultó muy útil para poner de manifiesto la calidad nutritiva de su proteína y su utilización para crecimiento (de la Higuera et al., 1981); sin embargo, su alto contenido en ácidos nucleicos provocó alteraciones en el metabolismo nitrogenado (Sánchez-Muniz et al., 1983), con depósitos de ácido úrico en riñón y alteraciones en la formación y estructura de los glóbulos rojos (Sánchez-Muniz et al., 1982).

Las contribuciones del grupo se han extendido a una serie de fuentes de proteína de distinto origen, fundamentalmente vegetal, cuyas posibilidades de inclusión se han probado en dietas para cuatro especies de peces (anguila, carpa, dorada y trucha arco-iris), con resultados muy variados. En la trucha hemos valorado la sustitución de proteína de harina de pescado por una

variada serie de proteínas de origen vegetal, incluidas individualmente en la fórmula junto a la harina de pescado. La utilización nutritiva de las proteínas de gluten de maíz, altramuz, soja, patata, girasol y algodón se compararon a niveles de sustitución de hasta el 40% de la proteína de pescado (Moyano et al., 1991, 1992a; Morales et al., 1994; Sanz et al., 1994), sin tener que ser suplementadas con los AAEE más limitantes, con resultados muy positivos salvo para la proteína de patata que fue mal aceptada por los animales, probablemente por contener solanina, un alcaloide que, a pequeñas concentraciones (400 mg/Kg), es detectado por los salmónidos produciéndoles rechazo. Cuando se combinan algunas de estas fuentes, hasta llegar a la sustitución total de la proteína de harina de pescado en la dieta, se hace necesaria la suplementación con metionina, como AA más limitante, y los mejores resultados fueron de un 75% de la tasa de crecimiento de los animales control y, en algún caso, una retención proteica igual a los alimentados con una dieta a base de harina de pescado; por otra parte, las combinaciones más favorables, desde el punto de vista aplicado, se obtuvieron para una sustitución del 70% de la proteína de pescado (Moyano et al., 1992b) por una mezcla de proteína de altramuz, gluten de maíz y patata. En todos los casos se consideró el patrón aminoacídico al formular las dietas de tal forma que no difiriera significativamente del control. Las diferencias obtenidas sugieren que el patrón postprandial para la síntesis proteica se habría desviado del óptimo, induciendo el catabolismo de los AAs que excedieran el nivel marcado por los más

limitantes, en combinación o no con el tiempo en que ese patrón aminoacídico estuviera disponible.

Además de la aceptabilidad y alguna deficiencia de AAEE, algunas fuentes proteicas pueden contener factores antinutritivos, con efectos variados sobre los animales, que pueden ser destruidos o eliminados mediante tratamientos adecuados (Francis et al., 2001). El caso más conocido es el de la soja por contener toda una serie de sustancias antinutritivas que se eliminan fácilmente, en determinadas condiciones de temperatura y vapor de agua. Otra leguminosa, con posibilidades de inclusión en las dietas para peces por su alto contenido proteico, es el altramuz dulce, que no parece contener sustancias antinutritivas y, de hecho, tratamientos similares a los de la soja no mejoran su calidad nutritiva, que permite sustituciones del 30% de la harina de pescado sin alterar la retención proteica para crecimiento en la trucha (de la Higuera et al., 1988).

La relación entre calidad proteica de la dieta, valorada en función del patrón aminoacídico que aporta, y recambio proteico muscular, retención proteica y crecimiento la hemos estudiado en la anguila europea, incluyendo en el diseño experimental distintos grados de calidad proteica y la suplementación aminoacídica como recurso para optimizar el patrón de una proteína deficiente. Los resultados pusieron de manifiesto una estrecha correlación entre tasa de crecimiento e índice de AAEE de la dieta, calculado este en relación a las necesidades de AAEE de la anguila japonesa, lo que, por otra parte, permite hacer una estimación de las necesidades de AAEE ligeramente por encima de las de la especie japonesa. La

suplementación de la proteína de girasol con determinados aminoácidos (lisina, metionina, histidina y treonina) llegó a producir tasas de crecimiento y utilización nutritiva iguales a las obtenidas con la dieta a base de proteína de pescado (García Gallego et al., 1998; de la Higuera et al., 1999), lo que pone de manifiesto las posibilidades de una adecuada suplementación para síntesis proteica y crecimiento, aspecto sobre el que volveremos más adelante.

La valoración de nuevas fuentes proteicas, fundamentalmente de origen vegetal, se ha reactivado en el último decenio con el nuevo impulso que ha adquirido su consideración de tema prioritario para el desarrollo de la acuicultura. Además de ampliar estudios en salmónidos (Watanabe et al., 1998; de Francesco et al., 2004; Santigosa et al., 2008), esta línea de investigación se ha ido extendiendo a especies cuyo interés por su cultivo ha quedado plenamente establecido: lubina (Oliva-Teles y Goncalves, 2001; Kaushik et al., 2004), dorada (Gómez-Requeni et al., 2004, de Francesco et al., 2007), bacalao (Hansen et al., 2007), rodaballo (Burel et al., 2000), tilapia (El-Saidy y Gaber, 2003), entre otras.

La diferente utilización nutritiva, de diferentes fuentes proteicas, está determinada por la disponibilidad postprandial de AAs más que por su digestibilidad. Si la formulación de una serie de dietas se ajusta, como es habitual, a las necesidades de AAs, las diferencias en las tasas de crecimiento que se obtengan, para ingestas similares, serían debidas a variaciones en la utilización digestiva de la proteína, diferencias en las tasas y tiempos de absorción de AAs y distintos patrones postprandiales de

AAs, como ocurre, por ejemplo, al comparar dietas de la misma composición en AAs, pero incluidos en la fórmula como proteínas completas o, parcialmente, en forma de AAs libres, aspecto que también se discutirá más adelante. En realidad, a nivel digestivo, el factor más limitante de la utilización de los AAs no es la digestión proteica sino, sobre todo, el ritmo y cuantía de la absorción de los AAs, como claramente se manifiesta en aquellas circunstancias en que la dieta contiene AAs libres.

La digestión proteica depende no sólo de las características del substrato (calidad de la proteína), sino de factores como especie, edad, condiciones ambientales, regulación de los procesos digestivos dependientes, a su vez, de la frecuencia y cantidad de ingesta, etc. En relación al régimen de alimentación, hay que decir que la actividad proteolítica media es mayor en las especies carnívoras que en las herbívoras, de tal forma que la longitud del digestivo se correlaciona negativamente con la actividad proteolítica. En consecuencia, la menor actividad proteolítica de los herbívoros se compensa con un digestivo más largo y una alimentación más frecuente. Estas diferencias pueden tener importantes consecuencias prácticas, al tratar de asegurar un patrón aminoacídico adecuado para el crecimiento, cuando se comparan dietas con proteínas de distinta velocidad de digestión o la dieta contiene proteínas con tasas de digestión y/o absorción diferentes. Se ha sugerido que las diferencias en los sectores de absorción de AAs individuales y en la eficiencia del proceso dependen del tipo de proteína, fundamentalmente de su composición y estructura primaria (Ash, 1985).

La absorción de los AAs tiene lugar mediante mecanismos de transporte asistido (difusión facilitada, transporte activo), más o menos específicos de determinados grupos de AAs. Los sistemas de transporte se caracterizan por ser saturables y presentar inhibición competitiva. Como ejemplo de interacción, el transporte de L-leucina puede estar competitivamente inhibido por la presencia de altas concentraciones de L-valina y L-metionina, pero las altas concentraciones de L-valina no reducen la captación intestinal de L-metionina, lo que, por otra parte, puso de manifiesto la existencia de un segundo mecanismo de transporte para la L-metionina. También se ha observado que un pequeño exceso de leucina puede causar una deficiencia aparente de isoleucina, por competencia por el sistema de transporte.

Se ha dicho que la calidad proteica de la dieta está relacionada con el patrón aminoacídico tisular que ofrece para la síntesis de proteínas. Una correlación dieta-tejidos se ha encontrado en los peces, fundamentalmente entre dieta y sangre (Wilson *et al.*, 1985; Ogata, 1986). Cuando se consideran los AAEE de plasma y músculo, los AAs aromáticos, los azufrados y los de cadena ramificada parecen ser los que más estrechamente reflejan la composición aminoacídica de la dieta. Un extenso estudio, acerca de las disponibilidades de AAs que condicionan distintas fuentes proteicas en el bagre, demostró que la disponibilidad de diferentes AAs variaba de unas fuentes a otras; como cabría esperar, los resultados también demostraron una cierta concordancia entre digestibilidad de las fuentes y disponibilidad de AAs (Wilson *et al.*, 1981).

Proteínas de origen diferente, pero con un patrón aminoacídico similar, pueden tener un valor biológico (porcentaje de proteína retenida respecto de la absorbida) distinto. La cantidad de proteína ingerida puede también alterar el patrón de AAs absorbido, a un tiempo determinado. Rerat y Jung (1988) observaron en cerdos que el patrón de AAEE se alteraba respecto al ingerido, al aumentar la ingesta de harina de pescado, con el resultado de un enriquecimiento (lisina, arginina, serina, prolina) o depleción (aminoácidos de cadena ramificada, histidina) de la mezcla absorbida. Las diferentes composiciones aminoacídicas de distintas fuentes proteicas y/o la acción de enzimas digestivos, sobre diferentes secuencias o estructuras conformacionales de proteínas con una composición similar en AAs, puede determinar una diferente secuencia en la liberación y posterior absorción de los AAs dando, finalmente, diferentes patrones de AAs disponibles para crecimiento.

Los desbalances de AAs han interesado tradicionalmente por su efecto depresor del crecimiento. Sin embargo, asociado con la disminución del crecimiento, se produce una marcada reducción de la ingesta. El efecto puede provocarse en pocas horas en la rata y es parcialmente responsable de la disminución del crecimiento. En los peces, el desbalance más simple, como es el asociado a la deficiencia de un AA, induce una reducción significativa de la ingesta, que va mejorando a medida que se adiciona el AA a la dieta, hasta alcanzar un máximo cuando la concentración del AA limitante llega a cubrir las necesidades (de la Higuera, 2001).

Alteraciones en la preferencia por una dieta son también características de un desbalance aminoacídico. Así, cuando se ofrece elección entre dietas, la rata opta por la dieta equilibrada, pero lo que es más destacable es que el animal selecciona una dieta libre de proteína incapaz de sostener el crecimiento frente a una dieta desequilibrada, aunque le permita crecer algo (Leung y Rogers, 1987). Se ha observado que, en pocas horas, las concentraciones del AA limitante disminuyen en plasma y músculo, al ser retenido por el hígado, mientras que el resto de los AA se acumulan, lo que acelera el desequilibrio. Por otra parte, la concentración del AA limitante disminuye más rápidamente en cerebro que en plasma, lo que debe ser la señal para modificar la ingesta o la elección de alimento (Leung y Rogers, 1987), aunque el mecanismo íntimo permanece oscuro. No obstante, se han delimitado en la rata las áreas del sistema nervioso central sensibles al desbalance aminoacídico: el cortex prepiriforme anterior, la amígdala y ciertas regiones del hipocampo y el septum (Leung y Rogers, 1987). En particular, la sensibilidad del cortex prepiriforme ha sido estudiada por el grupo de Beverly, quienes han demostrado que la preferencia por una dieta libre de proteína, frente a otra desequilibrada, podía revertirse si el AA limitante se inyecta directamente en esta zona cerebral (Beverly et al, 1991). Estudios comparables no han sido realizados en animales de granja.

## **Los aminoácidos libres de la dieta como causa de desbalance postprandial**

Dejando aparte los casos concretos de toxicidad por exceso de un determinado AA, los antagonismos entre AAs y los desbalances postprandiales por competencia entre AAs por los sistemas de transporte, creo importante dedicar atención a las alteraciones que pueda sufrir el patrón aminoacídico postprandial cuando la proteína de la dieta necesita ser suplementada con AAEE para cubrir necesidades o corregir desproporciones entre AAs. Las posibilidades de empleo de fuentes proteicas vegetales para sustituir parcial o totalmente a la proteína de las harinas de pescado, con independencia de la aplicación de tecnologías para eliminar sustancias antinutritivas y concentrar proteína para formular dietas del 40-50% de proteína, reside, sobre todo, en el desarrollo de estrategias de suplementación que aseguren que el patrón aminoacídico óptimo o ideal de la dieta que se formule se mantenga el mayor tiempo posible y en las cantidades adecuadas, tras los procesos digestivos, para optimizar los procesos de síntesis y retención proteica para crecimiento.

Es bien sabido que el crecimiento, de peces alimentados con dietas en las que parte de la proteína ha sido reemplazada por AAs libres, es generalmente inferior al que se obtiene con dietas proteicas de la misma composición. Esta respuesta ha sido observada en varias especies, siendo especialmente marcada en las agástricas y de aguas templadas. Estos resultados han sido atribuidos a diferencias en los tiempos de absorción de los diferentes AAs (Murai *et al.*, 1987; Cowey y Walton, 1988; Zarate et

al., 1999), que son más cortos y provocan, por tanto, mayores niveles plasmáticos para aquellos que están como tales AAs libres en la dieta. Estas tempranas y agudas concentraciones plasmáticas conducen a un catabolismo aumentado (Cowey y Walton, 1988) o, como se ha demostrado en la carpa, el exceso de AAs es excretado directamente por orina (Murai *et al.*, 1984). Al igual que las dietas a base de AAs libres, la suplementación de proteínas con AAEE libres generalmente no llega a producir los índices de crecimiento que se obtienen con dietas a base de proteínas completas (Garzón, 1995; Sierra, 1995; Gómez-Requeni et al., 2004).

Para asegurar la presencia simultánea, en los lugares de síntesis proteica, de los AAs libres y proteicos de la dieta, se proponen dos alternativas posibles: retrasar la absorción de AAs individuales o incrementar la frecuencia de alimentación para homogeneizar la disponibilidad de AAs de ingestas sucesivas. El retraso de la captación de los AAs libres suplementados puede ser conseguido mediante recubrimiento o encapsulación con diferentes materiales. Otra posibilidad es la incorporación de los AAs a la proteína dietaria mediante la llamada reacción plasteínica, que es un proceso catalizado por proteinasas mediante el cual se incorporan AAEE a una proteína mediante enlace covalente, produciendo, como resultado, una plasteína insoluble en agua y altamente enriquecida con AAEE (Teshima *et al.*, 1992). Una tercera posibilidad, para la que no existe un apoyo experimental suficiente, es el empleo de dipéptidos para suplementar dietas, como pusieron de manifiesto Dabrowski et al. (2003) al alimentar alevines de trucha arco-iris con dietas a

base, casi exclusivamente, de AAs libres o de dipéptidos; sin embargo, la suplementación con arginina, en forma de AA o de dipéptido con otros AA, no produjo diferencias en el crecimiento del pacu (Tesser et al., 2005), especie sudamericana de aguas templadas.

Una mayor frecuencia de alimentación permitiría que el pico de absorción de los AAs proteicos de una comida coincidiera con el de los AAs libres de la siguiente. Esta solución fue demostrada por Yamada *et al.* (1981b), quienes mejoraron el crecimiento de la carpa, al alimentarla con una dieta a base de AAs libres, aunque a una mayor frecuencia. La relación entre frecuencia de alimentación, evacuación gástrica y absorción de AAs, y sus efectos sobre el crecimiento, han sido observados también en el bagre cuyo crecimiento mejora al aumentar la frecuencia de ingestión de una dieta con AAs libres (Zarate et al., 1999) Este efecto positivo de la frecuencia de alimentación debe ser más evidente en especies agástricas de aguas templadas, como carpa y tilapia, o con estómagos reguladores y de aguas templadas como la dorada, que en las de aguas frías como la trucha, si se tienen en cuenta los tiempos medios de absorción para AAs libres/proteicos: 2.5/4.5 horas en la carpa (Plakas *et al.*, 1980), 2/4 h en tilapia (Yamada *et al.*, 1982), 2/8 h en dorada (Sierra, 1995) y 12/24-36 en trucha (Yamada *et al.*, 1981a).

En lo que respecta a especies de aguas templadas, el aumento de la frecuencia de alimentación induce, hasta ciertos niveles, un aumento de la ganancia de peso. Tung y Shiau (1991) obtuvieron una mejora de los índices de conversión de tilapias alimentadas con la misma ración

diaria administrada en 6 partes iguales, en relación a la misma ración distribuida en dos tomas. La influencia positiva de una mayor frecuencia, en especies de aguas templadas, debe estar relacionada con la mayor velocidad de vaciamiento gástrico, y de la digestión en general, al aumentar la temperatura (Zarate et al., 1999). Además, las especies agástricas se caracterizan por una mayor frecuencia de alimentación, en parte para compensar la baja densidad nutritiva de la mayoría de su alimento natural.

Para asegurar que los AA libres estén en fase con los proteicos en los lugares de síntesis, se sugiere, como ya he comentado, aumentar la frecuencia de alimentación. De hecho, los sistemas de producción modernos emplean alimentación *ad libitum*, que, al inducir una mayor frecuencia de alimentación, pueden reducir significativamente los problemas de una baja utilización de los AAEE libres suplementados. Al mismo tiempo, la disponibilidad continua de alimento, que los peces obtienen voluntariamente pulsando una palanca, se ha observado que mejora los índices de conversión y utilización nutritiva, probablemente por ajustarse la alimentación a ritmos endógenos naturales y momentos del día en los que el organismo está fisiológicamente más preparado para una mejor utilización de los nutrientes. Hemos comprobado este planteamiento en la dorada mediante el uso de dispensadores de alimento “a demanda”, y también hemos observado que la suplementación con metionina libre, de una dieta a base de proteína de soja, alarga las fases de ingesta voluntaria de

forma equivalente a un aumento de la frecuencia (Sánchez-Muros et al., 2003).

La relación entre la frecuencia de alimentación y el crecimiento, cuando los peces ingieren una dieta con alta proporción de AAs libres (30% proteína + 15 % AAs libres), la hemos estudiado en la trucha a nivel de recambio proteico en hígado y músculo blanco (Peragón et al., 1992). Los resultados pusieron de manifiesto claras diferencias en los mecanismos de control del crecimiento en ambos tejidos, puestos también de manifiesto por otros grupos en circunstancias nutritivas y ambientales diferentes. La dieta a base de AAs libres aumentó significativamente la velocidad fraccional de síntesis proteica ( $K_S$ ) en el hígado, mientras que apenas la modificó en el músculo. Por otra parte, la  $K_S$  aumentó en ambos tejidos a la mayor frecuencia de alimentación con la dieta control, mientras que para la dieta 30+15, el aumento con la frecuencia de alimentación fue menor en hígado y no se modificó en el músculo. Al igual que en el hígado, en el músculo, que es el tejido que mejor representa el crecimiento en estos animales, la capacidad de síntesis proteica ( $C_S$ ) y la eficiencia del proceso ( $K_{RNA}$ ) también aumentaron notablemente cuando la dieta 30+15 se suministró con mayor frecuencia. Estos resultados, aunque requieren un mayor soporte experimental, apoyan el planteamiento de que una mayor frecuencia de alimentación tiende a homogeneizar y prolongar en el tiempo un patrón aminoacídico más próximo al ideal para favorecer una mayor retención proteica para crecimiento.

El retraso en la captación intestinal de los AAs libres de la dieta, mediante protección o encapsulación con cubiertas de determinada composición, mejora la utilización de la proteína de la dieta con fines de crecimiento, por lo que esta tecnología debería ser aplicada tanto para evaluar necesidades de AAes, como para la suplementación de fuentes proteicas deficitarias. Los posibles efectos positivos deben manifestarse más claramente en especies de aguas templadas y/o agástricas (Garzón, 1995; Sierra, 1995), que presentan una mayor diferencia de tiempo entre la absorción de los AAs libres y proteicos y, en consecuencia, presentan menores índices de crecimiento que las especies de aguas frías (Kim *et al.*, 1991) cuando son alimentadas con este tipo de dietas. Los altos índices de crecimiento y retención proteica, obtenidos en truchas alimentadas con dietas de AAs libres, sostienen la afirmación de que las especies de aguas frías y estómago regulador utilizan con mayor eficiencia los AAs libres de una dieta que las especies de aguas templadas, tengan o no estómago regulador.

Para valorar la influencia de la temperatura sobre la utilización de una dieta a base de proteína de gluten de maíz, suplementada con lisina libre o encapsulada, llevamos a cabo un ensayo en el que se determinaron una serie de parámetros relacionados con la síntesis y retención proteica para crecimiento, a 18 y 25°C. Los resultados pusieron de manifiesto que a 25°C, temperatura óptima para la carpa, los animales crecen más para cualquiera de las dietas ensayadas. La suplementación con lisina mejoró el crecimiento en todos los casos, siendo mucho más marcado el efecto cuando la lisina está encapsulada y, por

tanto, se retrasa su absorción para hacerla coincidir con la de los AAs procedentes de la digestión proteica (de la Higuera et al., 1998). Al mantener una ingesta similar para todos los grupos experimentales, la mejora de los índices de crecimiento y conversión del alimento hay que atribuirlos a la mayor velocidad ( $K_S$ ) y eficiencia de la síntesis ( $K_{RNA}$ ), así como a la mejor eficiencia de la retención proteica para crecimiento a 25 °C, respuesta que, en gran parte, debe estar mediada por mecanismos de regulación del crecimiento que comentaremos más adelante. Recientemente, Zhou et al. (2007) han repetido este planteamiento en la carpa, aunque suplementando con lisina una dieta a base de gluten de arroz, obteniendo también una mejora significativa del crecimiento y retención proteica cuando la lisina está recubierta con un compuesto que no citan.

Los AAs encapsulados empleados en la suplementación de fuentes proteicas alternativas experimentan un retraso en su absorción y condicionan una mejora significativa de la ganancia de peso y utilización de la proteína dietaria, en relación a la misma dieta suplementada con AAs libres (Garzón, 1995; Sierra, 1995). Los AAs cuyas concentraciones exceden las del patrón óptimo para síntesis proteica son catabolizados, reduciéndose su disponibilidad para crecimiento. La encapsulación, al retrasar la absorción del AA suplementado, mejora el patrón disponible y, consecuentemente, el rendimiento de la proteína de la dieta. De hecho, la suplementación con AAs encapsulados estimula la síntesis proteica muscular, respecto a la misma dieta suplementada con AAs libres, como ha demostrado

nuestro grupo en carpa (Garzón, 1995) y dorada (Sierra, 1995).

Los resultados de Garzón (1995) y Sierra (1995) demuestran que la síntesis proteica muscular es sensible a la calidad proteica, en términos de disponibilidad postprandial de AAs. Además de las correlaciones existentes entre AAs de dieta y tejidos, Murai *et al.* (1986), encontraron correlación entre patrón de AAs en plasma y crecimiento. Nuestro grupo ha venido demostrando la relación entre deficiencia de un AAE y las velocidades de recambio proteico, en hígado y músculo de diferentes especies (de la Higuera et al., 1999; Garzón, 1995; Sierra, 1995), así como la influencia de la suplementación de la dieta con AAEE libres o encapsulados. Los resultados obtenidos son prometedores, en relación a la posibilidad de ajustar la disponibilidad postprandial de AAs al patrón óptimo de síntesis y retención proteica para crecimiento, una posibilidad estratégicamente importante en cuanto a ampliar la lista de posibles fuentes proteicas alternativas. Modular la disponibilidad postprandial de AAs, haciendo uso de diferentes técnicas de encapsulación, se presenta como una alternativa altamente versátil, asociada a modificaciones físicas y químicas de la cubierta. Al mismo tiempo, una mejor utilización de la proteína de la dieta, no sólo tendría el beneficio de una mayor tasa de crecimiento, sino que también tendría repercusiones medioambientales, al reducir la eliminación de excretas nitrogenadas.

Una adecuada combinación de las estrategias antes comentadas abre un amplio abanico de posibilidades de controlar los tiempos de absorción y de disponibilidad

postprandial de AAs. Junto a diversas estrategias de alimentación (dispensación de alimento programada o a demanda) podría emplearse, para cada especie y situación ambiental y nutritiva, una gran variedad de estrategias de suplementación (cubiertas o capsulas de diferente composición y grosor, plasteinas, etc). Además, como han apuntado recientemente Ambardekar et al. (2009), también hay que tener en cuenta el tipo de proteína que se combina con los suplementos aminoacídicos de la dieta, ya que fuentes proteicas diferentes pueden tener tiempos de utilización digestiva distintos; de hecho, la eficacia de los suplementos aminoacídicos mejora cuando la utilización digestiva de la proteína es más rápida.

### **Destino metabólico de los aminoácidos. El impulso anabólico**

Todo exceso de AAs es catabolizado, bien porque el *pool* total de AAs disponible exceda la capacidad de síntesis proteica (p.e. cuando la concentración de proteína en la dieta excede las necesidades del animal), o bien por la ingestión de una proteína de baja calidad, cuyo patrón aminoacídico, al diferir del ideal u óptimo para crecimiento, presente un exceso de todos aquellos AAs que sobrepasen la concentración que marca el AA más limitante y, consecuentemente, son catabolizados. Quizás se entiendan mejor las consecuencias de un desajuste en el patrón aminoacídico si comentamos aquí otro método de valoración de las necesidades aminoacídicas, basado en la reducción de tal desajuste, que se ha denominado también método de oxidación indirecta. Consiste este proce-

dimiento en medir el catabolismo de un segundo AAEE (AA2), distinto del que se pretenden valorar sus necesidades (AA1), y cuya concentración en la dieta es la variable del diseño experimental. En estas condiciones, el desequilibrio aminoacídico, a nivel de síntesis proteica, se traduce en un catabolismo aumentado del AA-2 cuando la concentración del AA1 en la dieta es inferior a las necesidades y, a medida que la concentración de AA1 en la dieta aumenta, el catabolismo de AA2 va disminuyendo hasta que se estabiliza cuando las necesidades llegan a cubrirse.

Por otra parte, los valores de  $K_m$ , concentración de sustrato a la que la velocidad del enzima es semi-máxima, de los enzimas involucrados en el catabolismo de los AAs son mayores y, por tanto, con menor afinidad por el sustrato que la de los enzimas que activan aminoácidos (aminoacil-sintetasas) para la síntesis proteica; por ejemplo la  $K_m$  para la treonina de la serina-treonina dehidratasa es de  $8.4$  a  $13 \times 10^{-3}$  M y la  $K_m$  para la treonil-ARNt sintetasa es de  $4.3 \times 10^{-6}$  M (Kang-Lee y Harper, 1978). Dicho de otro modo: Las concentraciones titulares de AAs tienden a ser más altas que las correspondientes a la  $K_m$  de las aminoacil-sintetasas y más bajas que los valores de  $K_m$  de los enzimas del catabolismo aminoacídico. Por tanto, cuando los niveles titulares de AAs se incrementan (p. e. con altas ingestas de proteína) las aminoacil-sintetasas han alcanzado una cinética de orden cero y la síntesis proteica presenta valores máximos (Lied y Braaten, 1984). Por otra parte, los enzimas responsables del catabolismo de AAs presentan una cinética de primer orden con actividades directamente rela-

cionadas con las concentraciones de sustrato. Este diferente comportamiento, de ambos tipos de enzimas, significa que, a bajas concentraciones de sustrato, la síntesis proteica tiene preferencia, y a medida que las concentraciones de sustrato crecen, el catabolismo de los AAs aumenta automáticamente. Esto es lo que ocurre al alimentar peces con dietas de elevado contenido proteico o alta relación proteína/energía y con dietas de baja calidad proteica, cuando las disponibilidades de todos o algunos AAs exceden la capacidad del proceso de síntesis. Este fenómeno es especialmente trascendente para la mayoría de los AAs llamados esenciales, lo que asegura que, cuando el aporte de AA es bajo, la síntesis de proteínas corporales tenga preferencia.

La capacidad de un animal para conservar AAEE a expensas de los AAnEE implica una considerable adaptabilidad metabólica a cambios en la ingesta. Si hay o no cierto grado de especificidad, con respecto a cuales aminoácidos son oxidados, es una cuestión que no está cerrada. Por ejemplo, parecen existir mecanismos cinéticos a nivel de sustrato que tenderían a conservar AAEE a costa de los AAnEE. No es probable, sin embargo, que haya marcadas diferencias entre especies, aunque también se podría decir que las diferencias en necesidades surgen por una diferente capacidad de control para la oxidación de determinados AAs.

El amonio es el principal producto de excreción del metabolismo nitrogenado en los peces, hasta un 90% del total de metabolitos excretados, y la cuantía de su eliminación está directamente relacionada con la canti-

dad y calidad de la proteína ingerida. Desde varios puntos de vista (nutritivo, económico, medio ambiental) interesa reducir al mínimo el catabolismo de los AAs y su excreción asociada de productos nitrogenados y, al mismo tiempo, optimizar el destino de los AAs con fines estructurales. A ello va a contribuir, para una misma especie, una adecuada relación proteína/energía y el empleo de proteínas de alta digestibilidad y con un balance o patrón aminoacídico óptimo para síntesis de proteínas, y también, aunque en menor grado, las condiciones ambientales y el régimen de alimentación. En algunos países, como Noruega, la legislación ha ido haciéndose progresivamente más exigente, a través de normas de calidad y composición de las dietas, para asegurar un mínimo de elementos contaminantes y evitar o retrasar el deterioro de los fondos en los fiordos.

Como hemos comentado, en términos de balance aminoacídico, las proteínas de baja calidad inducen altas tasas de excreción de amoníaco ya que, a lo largo del periodo postprandial, hay excedentes de AAs que no se incorporan a la proteína por haber AAEE que limitan el proceso. A medida que el patrón se mejora, por reducción del efecto limitante de algunos AAEE, la retención proteica aumentará junto a la reducción de excretas nitrogenadas. Esta situación la hemos planteado antes, en términos extremos, al considerar la inclusión de AAs libres en la dieta, al menos para algunas especies y condiciones de cultivo.

El catabolismo de aa y la síntesis proteica son dos procesos que están muy relacionados. La hipótesis del

*anabolic drive* – o impulso anabólico - lanzada por Millward y Rivers (1988) sugiere que, antes de que un exceso de AAs induzca su propio catabolismo, ese exceso ejerce un efecto anabólico transitorio sobre la retención de proteína. Los autores sugieren que hay ventajas en consumir un exceso de AAEE por encima de los niveles de necesidades. Aunque la hipótesis se lanzó para establecer de una forma más precisa las necesidades de la especie humana, también sugiere que un animal con alta velocidad de síntesis proteica tiene también altas tasas de catabolismo aminoacídico y, por tanto, de excreción de nitrógeno.

Gran parte del aumento en el consumo de oxígeno que sigue a la ingestión de alimento en los peces se cree que es debida al flujo metabólico de los AAs y al recambio proteico (Houlihan, 1991), y va asociada a un aumento en la excreción de amoníaco procedente de la oxidación de los AAs. Este aumento postprandial del metabolismo se ha denominado acción dinámica específica del alimento (SDA) y su relación directa con la ración de alimento ha sido observada en varias especies de peces. Una de las hipótesis de trabajo para dar respuesta al significado de la SDA sugiere que el flujo de los AAs ingeridos hacia los tejidos produce un aumento de su oxidación y, también, de la síntesis proteica. Datos de diferentes experimentos permiten plantear cuáles son los efectos fisiológicos que se inducen en las 24h que siguen a la ingesta de alimento: la síntesis proteica aumenta y presenta dos picos de actividad, a las 6 y a las 18 horas. Parte de la explicación a estos resultados puede estar en que los tejidos tienen diferentes patrones temporales de síntesis

proteica; por ejemplo, la hepática precede a la muscular. Se producen también unos pequeños aumentos de consumo de oxígeno y excreción de amoníaco que no están sincronizados y que plantean dudas sobre el grado de sincronización de los efectos fisiológicos tras la ingesta de alimento.

Después de un ayuno corto, de varios días, la comida induce un estímulo postprandial de la síntesis de proteínas en todos los tejidos. Un aumento de la síntesis proteica muscular fue detectado nueve horas después de la comida en el salmón (Fauconneau, 1989). Estos y otros resultados posteriores han puesto de manifiesto que el aumento postprandial del consumo de oxígeno va acompañado de una estimulación de la síntesis proteica - lo que hemos llamado impulso anabólico - a nivel de todo el organismo, y que los distintos tejidos reaccionan de manera diferente en tiempo e intensidad de la respuesta anabólica (Houlihan, 1991).

Una investigación más profunda y detallada acerca de la influencia de la dieta sobre el aumento postprandial del consumo de oxígeno, o acción dinámica específica de los alimentos, es necesaria, ya que aportaría un punto de vista útil para determinar el valor nutritivo de la dieta y algunas necesidades concretas (proteína y energía, sobre todo) del animal. Los estudios en mamíferos pusieron de manifiesto que la ingesta de proteína puede ser el factor principal responsable del aumento postprandial del consumo de oxígeno, mientras que la grasa y los hidratos de carbono tendrían poca influencia. Los datos sobre la influencia de la composición de la dieta sobre el

consumo postprandial de oxígeno son escasos y controvertidos. Los resultados para algunas especies, tanto marinas como dulceacuícolas, son cualitativamente similares a los de mamíferos, mientras que, en otras especies, la composición de la dieta no afecta el consumo de oxígeno. En el bagre, por ejemplo, variaciones sustanciales de la relación proteína/carbohidratos de la dieta no modifican el impulso anabólico (Fu et al., 2005), probablemente por las diferencias en el metabolismo intermediario de ambos componentes y en el tipo de productos nitrogenados excretados. Sin embargo, esas diferencias entre especies pueden ser debidas al diseño y formulación de las dietas, así como a la calidad y tratamientos tecnológicos de sus componentes. En este sentido, estudios posteriores en el bagre (Fu et al., 2007), en los que se emplearon macronutrientes purificados introducidos en segmentos de intestino de carpa, para obtener una ingesta normal, en vez del tipo habitual de dietas, dieron resultados diferentes para los tres macronutrientes: un mayor consumo de oxígeno para la proteína, valores intermedios para los lípidos y casi nulo el consumo correspondiente a los hidratos de carbono, una vez que se descuenta el correspondiente al segmento intestinal vacío. Esta técnica puede ser útil para valorar, a través de la influencia de distintos tipos de macronutrientes (almidón, glucosa, aminoácidos libres, proteínas, ácidos grasos) sobre el consumo de oxígeno, la utilización y necesidades de nutrientes en diferentes condiciones ambientales y de composición de la dieta.

La regulación nutritiva de la retención proteica muscular debe constituir una parte importante del impul-

so anabólico en todas las especies, sobre todo en los peces cuya musculatura esquelética supone un 60% del peso corporal. Estudios en el bacalao han demostrado que una mayor ingesta y velocidad de crecimiento muscular están asociados con una mayor velocidad de síntesis y degradación de proteínas (Houlihan et al., 1988). En otras palabras, hay aumentos anabólicos de la proteólisis muscular que acompañan a la estimulación de la síntesis proteica que conlleva el crecimiento, aspecto bien documentado en roedores y otras especies. Este fenómeno de aceleración del recambio proteico muscular con un crecimiento más rápido también se ha demostrado al comparar peces de distinta edad (Peragón et al., 2001). La estimulación nutritiva del crecimiento muscular debe suponer una estimulación de la síntesis proteica suficiente, no sólo para la formación de proteína nueva, sino también para reemplazar la proteína movilizada con la mayor actividad proteolítica de un recambio más activo.

He comentado anteriormente la correlación positiva que existe entre consumo de oxígeno y síntesis proteica. Una aproximación al coste energético de la síntesis proteica es representar la síntesis proteica frente al consumo de oxígeno y usar los valores de la pendiente como índice del coste energético. Sin embargo, raramente se han determinado ambos en el mismo experimento; no obstante, datos de experimentos simultáneos o paralelos sugieren una estrecha relación entre síntesis y consumo de oxígeno en peces e invertebrados acuáticos (Houlihan, 1991). Las estimaciones del coste energético de la síntesis proteica por análisis de correlación dan valores más altos de los basados en la estequiometría mínima para la

formación del enlace peptídico (Waterlow, 1984). Los costes más altos obtenidos por análisis de regresión se han explicado generalmente sobre la base de que otros procesos metabólicos, íntimamente relacionados con la síntesis de proteínas, están incluidos en los coeficientes de correlación.

Otra forma de aproximarse a la estimación del coste calórico de la síntesis proteica es inhibir la síntesis y medir la disminución progresiva de la síntesis y el consumo de oxígeno. Al usar la cicloheximida para inhibir la síntesis proteica en hepatocitos de trucha se obtuvo una disminución del 75% en el consumo de oxígeno con una reducción paralela de la síntesis proteica del 87% (Houlihan, 1991). La cicloheximida ha sido empleada para dar pruebas evidentes de que la acción dinámica específica de los alimentos (SDA) es debida a un impulso de la síntesis proteica en los peces. Los estudios *in vitro* no aportan datos fiables a la valoración del coste energético de la síntesis proteica corporal, ya que los distintos tipos celulares tienen proporciones diferentes de su metabolismo aerobio dedicadas a la síntesis de proteínas. Algunos investigadores apuntan la posibilidad de que el gasto calórico disminuya con el aumento de la velocidad de síntesis proteica y el aumento de la temperatura. Con estas incertidumbres, la mayoría de los investigadores prefieren usar los mínimos gastos de formación de enlaces peptídicos. Las diferentes determinaciones dan, por ejemplo en el bacalao en crecimiento activo, un rango del 24-42% del consumo de oxígeno que se invierte en la síntesis de proteínas (Houlihan et al., 1988). Desafortunadamente, las estimaciones del gasto calórico del proceso de síntesis

proteica no se han continuado en peces en los últimos años, y sólo se dispone de estudios de balance energético en cuanto al uso y retención de la energía de la dieta aplicados a la producción piscícola.

### **El recambio proteico en la valoración del crecimiento**

El crecimiento proteico es el resultado de dos procesos opuestos que operan de manera continua a nivel tisular: la síntesis y la degradación de proteínas. Esta actividad de recambio proteico parece necesaria para contribuir al mantenimiento de un patrón aminoacídico adecuado, a partir de un pool más amplio, que es el resultado de la suma de los AAs de la dieta y los procedentes del proceso de degradación o movilización proteica. Cuando predomina la síntesis sobre la degradación, el animal crece, pero si es mayor la tasa de movilización, entonces el animal pierde peso. La retención proteica que tendría lugar en una situación en la que predomine la síntesis dependerá, por tanto, del aporte cuantitativo y cualitativo de proteína (aminoácidos) con la ingesta de alimento.

El crecimiento proteico se relaciona con la cantidad de proteína ingerida a través de la estimulación de la síntesis proteica y de la eficiencia en la retención de la proteína sintetizada, de ahí el interés en relacionar síntesis y retención proteica con la ingesta de alimento (Carter et al., 1993a, b; McCarthy et al., 1994). La ingesta de alimento, al estimular la síntesis de ARN, facilita parte del mecanismo de síntesis proteica, dando lugar a un crecimiento neto, siempre que las velocidades de síntesis

sean superiores a las de degradación de proteína. Puesto que la retención proteica para crecimiento es la diferencia entre las tasas de síntesis y de degradación, las diferencias de crecimiento entre peces que ingieren la misma cantidad de alimento pueden ser debidas a diferencias cuantitativas entre estos dos procesos. De hecho, la mejor utilización de la proteína de la dieta para crecimiento parece estar más relacionada con una menor tasa de degradación proteica que con mayores tasas de síntesis, según McCarthy et al. (1994).

Como he comentado en algún momento, uno de los compuestos celulares, que habitualmente se cuantifica al valorar el crecimiento, es el ARN. Generalmente se expresa como la relación ARN/proteína por su buena correlación con la síntesis proteica, hasta tal punto que a esta relación se le denomina capacidad de síntesis proteica (Sugden y Fuller, 1991), ya que la mayor parte del ARN (un 85%) celular es ribosómico. De manera similar, la relación ARN/ADN ha sido también muy utilizada como medida indirecta del crecimiento tisular. El contenido celular de ADN es relativamente constante (quizás no tanto en músculo con células multinucleadas), mientras que el contenido de ARN varía con la velocidad de síntesis proteica.

Un estudio llevado a cabo con juveniles de bacalao sirve para ilustrar los párrafos anteriores. La ingesta individual de los animales fue controlada rigurosamente y se observó que la cantidad de alimento ingerido se correlacionaba positivamente con la relación ARN/proteína, la tasa de crecimiento y las velocidades

fraccionales de síntesis y degradación proteica (Houlihan et al. 1988, 1989). En el salmón del Atlántico se obtuvieron unos resultados muy similares y se observó, además, que la concentración de ARN, y por tanto el número de ribosomas, se correlacionaba más estrechamente con la ingesta que la actividad ribosómica (gramos de proteína sintetizada por gramo de ARN y por día) (Carter et al. 1993b). En carpa (Carter et al. 1993a) y trucha arco-iris (McCarthy et al. 1994) se repitieron resultados similares.

La composición de la dieta, como es lógico, influye sobre la síntesis proteica y el crecimiento. El aumento del nivel proteico de la dieta se correlaciona con un aumento de la síntesis y de la degradación de proteínas (recambio proteico). Sin embargo, cuando los peces se alimentan con dietas de bajo contenido proteico, puede producirse un aumento del recambio proteico, más marcado en el hígado, probablemente debido a un mayor reciclaje de los AAs, que son movilizados por proteólisis para mantener la síntesis de proteínas (Carter et al., 2001). Nuestros estudios sobre la influencia de la cantidad y calidad de la proteína de la dieta sobre el recambio proteico y el crecimiento están de acuerdo con los resultados obtenidos en mamíferos, observándose claras diferencias en la respuesta del hígado y del músculo (Pera-gón et al., 1994) La falta de influencia del contenido proteico de la dieta sobre el recambio proteico hepático refleja el hecho de que la fracción del recambio proteico, dedicada a mantener las funciones metabólicas de este tejido, es más importante que la asociada con la retención de proteína para crecimiento; de hecho, la tasa de recambio es mucho mayor en hígado que en músculo. Por otra

parte, las velocidades de síntesis ( $K_S$ ) y movilización ( $K_D$ ) tienden a aumentar en el hígado de los peces que ingieren menor proporción de proteína, mientras que el músculo se comporta de manera opuesta, y la eficacia de la retención de proteína (EPR) disminuye en hígado, mientras que se mantiene en el músculo blanco. Además, el músculo, como tejido protagonista del crecimiento de los peces, responde a una disminución del contenido proteico de la dieta disminuyendo su tasa de crecimiento, que es consecuencia de la disminución de la velocidad fraccional ( $K_S$ ), capacidad ( $C_S$ ) y eficiencia ( $K_{RNA}$ ) de la síntesis proteica, así como de la cantidad de proteína sintetizada por unidad celular ( $K_{DNA}$ ).

La calidad de la proteína de la dieta influye de manera similar a la de la cantidad de proteína. La mejor calidad supone la disponibilidad postprandial de un patrón aminoacídico más adecuado para la síntesis y, por tanto, similar al de una dieta control ajustada a las necesidades del animal; mientras que la peor calidad suministra un patrón aminoacídico que, en términos cuantitativos, corresponde a una dieta de bajo contenido proteico. También para la calidad, el hígado y el músculo blanco de la anguila, presentan un comportamiento diferente; así, las tasas de recambio proteico ( $K_S$  y  $K_D$ ) aumentan en hígado en respuesta a una peor calidad proteica, mientras que en el músculo blanco se establece una relación directa entre calidad proteica, recambio y crecimiento (de la Higuera et al., 1999). Además, la mejora de la calidad proteica y, por tanto, del patrón aminoacídico postprandial, por adición de aquellos AAEE en que esa proteína es más limitante, confirma esta conclusión, ya que se es-

timula la velocidad ( $K_S$ ) y capacidad ( $C_S$ ) de síntesis proteica, así como la retención de proteína para crecimiento.

### **Aspectos reguladores del crecimiento muscular**

En la regulación del crecimiento están implicadas una serie de hormonas, cuya valoración y efectos generales se conocen, mientras que los mecanismos de acción, la regulación de su síntesis y liberación, así como la capacidad de unión a receptores y el control del número de estos, necesitan estudios más amplios y profundos. Factores exógenos como la dieta y las condiciones ambientales van a modular la respuesta endocrina, aunque todavía estamos lejos de conocer los mejores efectos que, sobre el crecimiento, pueden ejercer estos factores con la mediación hormonal. Las hormonas que están más directamente implicadas en la regulación del crecimiento son la hormona del crecimiento, los péptidos IGF-I e IGF-II de la familia de la insulina, la insulina, las hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ) y los glucocorticoides (cortisol, fundamentalmente), además de las hormonas hipotalámicas e hipofisarias que regulan la producción de las anteriores y otras que, indirectamente, pueden alterar la liberación o acción de las principales protagonistas ya citadas.

La hormona del crecimiento (GH) juega un papel central en el crecimiento de los vertebrados. La GH es un péptido de cadena simple producido y almacenado por las células de la hipófisis anterior. Junto a otras hormonas hipofisarias (prolactina-PRJ, somatotolactina-SL) y placentarias (lactógeno placentario- PL), pertenece a la

familia GH/prolactina, caracterizada por una secuencia similar y probablemente un origen evolutivo común. Analizando la estructura génica de GH, PRL y SL de vertebrados no mamíferos, Chen et al. (1994) lanzaron una hipótesis de trabajo sobre el origen funcional de esta familia de pépticos, considerando la osmorregulación como el objetivo central de una proteína putativa ancestral. Involucrada en la distribución intracelular de metabolitos en condiciones cambiantes, es secundario que la GH optimizó su función promotora del crecimiento, mientras, al menos en los peces, retenía parcialmente características osmorreguladoras ancestrales. En los salmónidos actuales las dos funciones son entidades únicas, puesto que la capacidad osmorreguladora de la GH es ampliamente independiente de sus funciones promotoras del crecimiento. En la mayoría de los peces, la GH tiene 187 o 188 restos de AAs. El gen y su secuencia estructural para GH han sido descritos para casi treinta especies.

La regulación de la secreción de GH es multifactorial. Numerosos principios inhibidores y activadores influyen sobre la secreción y transcripción del gen de la GH. Los más potentes estímulos de la liberación de GH son el neuropéptido Y (NPY), la hormona hipotalámica liberadora de GH (GHRH) y la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH); mientras que el factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SRIF, somatostatina-14) es el principal inhibidor de la liberación de la hormona. El SRIF interfiere con la acción de la GH a nivel hepático, donde inhibe la producción de IGF-I, al mismo tiempo que aumenta la producción de proteínas fijadoras de IGF.

La liberación de GH en los teleósteos, al igual que en mamíferos, sigue un ritmo intrínseco. La carpa exhibe un pulso simple o de alta frecuencia, o dos pulsos de secreción de GH separados por intervalos de 2-6 h. Del mismo modo, la trucha presenta fluctuaciones episódicas y asíncronas en los niveles plasmáticos de GH. Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio acerca de un ritmo paralelo en la síntesis proteica tisular de los peces, mientras que hace tiempo que se publicó para la rata. En relación con los ritmos diarios de secreción, no se debe ignorar la existencia de variaciones diarias en la sensibilidad tisular a la acción de las hormonas, que está asociada al reciclaje de receptores y otras variables. Otro factor a tener en cuenta es la vida media de la hormona, que varía entre especies y circunstancias fisiológicas.

En peces, como en otros vertebrados, las concentraciones plasmáticas de GH cambian con el estado fisiológico. Sorprendentemente, los peces sometidos a ayuno tienen concentraciones más altas de GH que los que han sido alimentados. El estrés suave de corta duración altera el delicado balance entre GH y cortisol, aumentando los niveles de cortisol y reduciendo los de GH, tanto en peces en ayuno como en los alimentados (Farbridge y Leatherland, 1992; Pickering et al., 1991). Por el contrario, en situación de estrés crónico por hacinamiento en truchas alimentadas, aumentan los niveles de GH asociados a una fuerte correlación con el cortisol (Pickering et al., 1991). En la transferencia prematura del salmón *O. kisutch* al agua salada, los individuos crecen poco, pero al devolverlos al agua dulce recuperan una tasa de crecimiento

normal. Esos salmones inadaptados presentan niveles plasmáticos elevados de GH, pero resistentes a la acción hormonal, al reducirse el número de receptores hepáticos a la GH y la expresión hepática de IGF-I (Duan et al., 1995), situación similar a la que tiene lugar en la diabetes humana.

Los niveles plasmáticos de GH no parecen ser buenos indicadores de la tasa de crecimiento en la trucha (Gómez et al., 1996), en contraste con la fuerte correlación positiva entre  $T_3$  y crecimiento que se ha registrado en esta especie (Gómez et al., 1997). La trucha, que crece activamente, tiene un hiposomatotropismo crónico con picos de secreción episódicos y asíncronos (Gómez et al., 1996). Además, no se han podido demostrar cambios significativos en los niveles circulantes de GH a lo largo de la edad de la trucha. Por el contrario, la dorada, entre 1 y 3 años, experimenta una progresiva disminución de la velocidad de crecimiento, asociada a la disminución de GH circulante así como de GH y RNAm-GH hipofisarios (Martí-Palanca, 1996). De nuevo, ponemos énfasis en la especificidad de especie a la hora de sacar conclusiones funcionales de amplia aplicación al grupo de los peces.

Considerando que tantos procesos dinámicos interdependientes tienen lugar simultáneamente, es obvio que las células tienen que integrar el mensaje y responder de la mejor forma posible a los cambios en la concentración de hormonas, y no tanto a la concentración de una hormona dada. Esto es precisamente lo que se ha observado en mamíferos donde la frecuencia y amplitud de la secreción de GH son determinantes para establecer la

respuesta a la hormona. Además, hay que contar con las fluctuaciones en el número de receptores para GH, cuya abundancia y expresión están bajo un control por retroalimentación mediado por GH. Un tercer nivel de control dinámico está presente a través de una proteína fijadora de GH (GHBP), un producto del gen GHR, que corresponde al lado extracelular del receptor. Como otras proteínas plasmáticas fijadoras de hormona, se considera a la GHBP como un reservorio que contribuye a reducir su eliminación de la circulación. Los receptores para GH, al igual que en mamíferos, están ya presentes, aunque en escaso número, en las primeras etapas de la vida postnatal, según se ha demostrado en varias especies de peces, aumentando mucho el número y la distribución extrahepática en etapas posteriores (Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999).

Muchas de las acciones mitogénicas de la GH están mediadas por IGF-I, un péptido muy bien conservado a lo largo de los vertebrados y perteneciente a la superfamilia de péptidos de la insulina. La transcripción de los genes del IGF-I se ha encontrado en todos los tejidos de peces analizados, con respuesta a GH restringida a hígado y branquias, lo que sugiere que en otros tejidos tiene funciones autocrinas o paracrinas. El factor IGF-I se expresa en el desarrollo embrionario de los mamíferos, contribuyendo con una fuerte estimulación de la proliferación celular. En los peces, donde también actúa durante el desarrollo embrionario, la transcripción del IGF-I se localiza en todos los tejidos de las fases juveniles, para ir disminuyendo progresivamente a medida que el pez crece. Es importante subrayar que los dos transcriptores de-

tectados en hígado son sensibles a la GH, mientras que los tejidos extrahepáticos no parecen ser sensibles a la hormona. Los efectos mitogénicos del IGF-I están mediados por un receptor, perteneciente a la familia tirosina-kinasa de receptores de factor de crecimiento, bastante relacionado con el receptor de insulina. En músculo, corazón, ovario y cerebro de peces los receptores del IGF-I son más abundantes y más específicos que los de insulina, una situación bastante diferente de la de mamíferos adultos, que tienen un número relativamente más alto de receptores para insulina, al mismo tiempo que presentan resistencia parcial al IGF-I. Por tanto, los peces adultos se parecen a los mamíferos jóvenes y la sensibilidad preferencial al IGF-I explicaría el crecimiento continuo de los peces.

Las dianas metabólicas de la GH son difíciles de establecer. Inicialmente se creía que los efectos de la GH estaban mediados por IGF-I exclusivamente, cuya síntesis tiene lugar en el hígado en respuesta a GH. A lo largo de los últimos años se ha acumulado suficiente evidencia de que la GH tiene multitud de acciones directas y que la síntesis de IGF-I se produce también en tejidos extrahepáticos que sugieren funciones paracrinas o autocrinas. Se ha postulado que GH e IGF-I actúan en concierto para estimular el crecimiento postnatal, la GH iniciando la diferenciación celular y el IGF-I mediando la expansión clonal. Así, la administración de IGF-I a ratas hipofisectomizadas induce un potente efecto transitorio sobre el crecimiento; mientras que la combinación de GH e IGF-I produce efectos sinérgicos que no se aprecian con los

tratamientos individuales (Fielder et al., 1996). Este tipo de acción dual y sinérgica, aunque *in vitro*, se ha observado también en un pez teleosteo (Cheng y Chen, 1995). Efectos independientes, por administración de una u otra hormona, se han observado en varias especies de peces. En el caso de la GH, la experiencia es tan amplia que, incluso, es posible predecir el resultado de crecimiento en función de la fuente de hormona, dosis, condiciones ambientales, raza, etc. (ver revisión de Le Bail et al., 1993).

Al contrario que el efecto directo de la GH sobre los tejidos en crecimiento, el efecto sistémico, mediado por IGF-I, se influye bastante por la situación nutritiva y ambiental de los animales, por lo que la valoración de la cantidad de receptores para GH y de los niveles circulantes de GH e IGFs son un instrumento útil para hacer un seguimiento del estado nutritivo y de la tasa de crecimiento. Así, por ejemplo, se ha observado insensibilidad a GH en situaciones asociadas a un aumento de la relación catabolismo/anabolismo (Ross y Chef, 1995), como es el caso del ayuno o de la restricción proteico-calórica, en que la combinación de altos niveles de GH con bajas concentraciones de IGF-I e insulina favorece la lipólisis y aumenta la disponibilidad de ácidos grasos en los tejidos periféricos. El aumento de los niveles de GH sugiere que la síntesis y liberación de IGF-I hepático se ve afectada por la privación de alimento, mientras que el RNAm de la IGF-I extrahepática, así como el de la IGF-II hepática y periférica, parecen ser refractarios a la GH y a la manipulación nutricional (Perez-Sánchez y Le Bail, 1999). La influencia del ayuno o la malnutrición sobre el

eje GH-hígado se relaciona con la ausencia de nutrientes concretos o, indirectamente, con los cambios hormonales inducidos por el estado nutritivo. En este sentido, hay que tener en cuenta que los niveles de insulina y hormonas tiroideas se afectan mucho por el estado nutritivo y, además, se necesitan para la correcta expresión de los receptores y la transducción de la GH. La insulina, por ejemplo, potencia *in vitro* la acción estimulante de la GH sobre la transcripción del IGF-I; así, los bajos niveles circulantes de insulina, en situación de ayuno o malnutrición, no favorecen la transmisión de la señal GH a la maquinaria hepática de síntesis de IGF-I, a pesar de los altos niveles plasmáticos de GH (Plisetskaya et al., 1994), siendo el mecanismo adaptativo, al menos en la dorada, la disminución del número de receptores hepáticos para GH (Pérez-Sánchez et al., 1995). Sin embargo, este efecto también se ha detectado en peces alimentados con una ración elevada, o con dietas desequilibradas, lo que hace pensar en que esa resistencia a la GH, para altas concentraciones circulantes de hormona, representaría una respuesta adaptativa a esas dos situaciones extremas: aumentar la disponibilidad de sustratos energéticos en malnutrición o prevenir depósitos excesivos de grasa en peces alimentados activamente.

En relación con lo anterior, algunos autores han planteado la posibilidad de reducir la ingesta cuando se alimenten peces con dietas ricas en lípidos, para evitar una situación endocrina desfavorable. No obstante, también hay que tener en cuenta que los peces regulan su ingesta calórica (de la Higuera, 2001) dentro de ciertos límites y, además, si se restringe la ingesta, puede que el

aporte proteico llegue a ser insuficiente para mantener altas tasas de crecimiento. También es verdad que una alta relación energía/proteína en la dieta puede hacer que los animales, al regular su ingesta, dejen de comer antes de haber ingerido suficiente cantidad de proteína. No obstante, hay abundante bibliografía sobre la mejora de la retención proteica y otros índices de utilización nutritiva cuando determinadas especies, como los salmónidos, en fases de crecimiento rápido, son alimentados con dietas ricas en grasa y, por tanto, con una baja relación proteína/energía. En otras especies, como la dorada, el aumento de la energía de la dieta requiere una reducción de la ración para mantener una retención proteica e índices de conversión aceptables. Es importante subrayar que la especie de pez es determinante en la respuesta metabólica y endocrina a la composición de la dieta y que esta afirmación es válida para especies próximas, tanto por su interés comercial, como por su área de cultivo. En este sentido, mientras una dieta de un 17% de lípidos produce depósitos corporales de un 40% en lubina y dorada, el dentón acumula la mitad de ese porcentaje (Efthimiou et al., 1994).

Una situación especialmente interesante para analizar respuestas endocrinas relacionadas con el crecimiento es lo que se citó como crecimiento compensatorio, una aceleración del crecimiento para recuperar la talla alterada por una situación nutritiva o ambiental desfavorable (Alí et al., 2003). Su interés práctico reside en el diseño de programas de producción en los que se alternen periodos de ayuno y alimentación, cuya duración y secuencia habría que valorar. Los niveles circulantes de

GH e IGFs (Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999), así como la sensible respuesta de la insulina y hormonas tiroideas (Navarro y Gutiérrez, 1995; Power et al., 2000) son indicadores útiles de la relación entre estado nutricional y crecimiento. El ayuno reduce los niveles circulantes de insulina (Montserrat, et al., 2007b), mientras que la realimentación recupera los niveles de hormona (Navarro et al., 2004), favoreciendo procesos necesarios para el crecimiento. El IGF-I juega un papel decisivo en el desarrollo y crecimiento somático muscular de mamíferos y peces. Al igual que la insulina, los niveles plasmáticos de IGF-I se reducen con el ayuno (Gómez-Requeni et al., 2004) e, igualmente, se restauran con la realimentación (Montserrat, et al., 2007b) y cursan paralelos a la tasa de crecimiento, siendo probablemente más importante el cambio de concentración de IGF-I que la concentración absoluta (Picha et al., 2006). El número de receptores para IGF-I aumenta (Montserrat et al., 2007a), mientras que los de insulina disminuyen (Montserrat, et al., 2007b) durante el ayuno y llegan a tener un valor similar con la realimentación, lo que plantea un papel diferente de estos receptores, aunque los niveles de ambas hormonas aumentan tras la realimentación para asegurar la recuperación del crecimiento.

El eje hipófisis-hígado integra las señales endocrinas que regulan el crecimiento y la utilización de los nutrientes (Mingarro et al., 2002). El IGF-I está implicado en la retroalimentación negativa para la GH (Pérez-Sánchez et al., 1992; Weil et al., 1999), y los cambios en los niveles plasmáticos de GH son inducidos, en gran medida, en respuesta al estado nutricional (malnutrición,

desbalances), tamaño de la ración y relación proteína/energía de la dieta (Martí-Palanca et al., 1996; Company et al., 1999). En relación a buena parte de nuestros planteamientos sobre la trascendencia que tiene el patrón aminoacídico para crecimiento, no sólo el de la dieta, sino el que la dieta condiciona en los lugares de síntesis proteica, Gómez-Requeni et al. (2003) han demostrado que cambios en el patrón de AAEE y en el contenido de AAnEE pueden llegar a inducir un cierto estado de resistencia hepática a la GH, al mismo tiempo que una disminución de la tasa de crecimiento. Más recientemente, este mismo grupo de investigadores (Gómez-Requeni et al., 2004) ha detectado que la sustitución de proteína de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales (gluten de maíz, gluten de trigo, guisante, colza) induce, a partir de un 75% de sustitución, un aumento en los niveles circulantes de GH, que cursa paralelo a la disminución en las concentraciones plasmáticas de IGF-I, característico de los estados catabólicos. Aunque no encontraron cambios significativos en la capacidad de unión de GH a sus receptores, sí observaron una menor expresión de los genes que codifican la síntesis de estos receptores y de IGF-I. Los autores atribuyen los resultados endocrinos a una menor ingesta y no consideran como causa la suplementación con AAEE libres. La alteración de los patrones disponibles para síntesis, como consecuencia de la suplementación con AAs libres, sí aceptan que pueda ser responsable de la menor tasa de crecimiento.

La proteína de la dieta, más que la energía, es el principal estímulo del crecimiento muscular, provocando, directamente, un aumento del contenido de ARN y la

inhibición de la proteólisis, y ejerciendo un efecto indirecto a través del aumento de los niveles de insulina y triiodo-tironina ( $T_3$ ). La Insulina y la  $T_3$  libre estimulan mutuamente sus concentraciones e influyen sobre el recambio proteico muscular; la insulina estimulando la actividad de ARN, la  $T_3$  aumentando el contenido de ARN y ambas activando la proteólisis (Jepson et al., 1988). Por otra parte, estudios en ratas demostraron que los niveles plasmáticos de IGF-I varían mucho con la ingesta proteica (Yahya et al., 1986), y los análisis de correlación parcial entre ingesta proteica, insulina,  $T_3$  e IGF-I indican una influencia directa del nivel proteico de la dieta sobre los niveles plasmáticos de IGF-I. Además, el IGF-I parece ser mediador del impulso anabólico, con niveles circulantes influenciados por la proteína de la dieta, actuando directamente sobre la síntesis del tejido conectivo muscular. En resumen, el impulso anabólico parece conjuntar el efecto directo de los AAs con, al menos, tres hormonas anabólicas: insulina,  $T_3$  e IGF-I.

La influencia reguladora de los AAs sobre el equilibrio proteico muscular parece contar también con la mediación de glutamina. La concentración de glutamina, el AA más abundante en el músculo, es muy sensible a cualquier circunstancia que altere el recambio proteico muscular y, de hecho, la concentración de glutamina varía linealmente con la velocidad de síntesis. Muchos de los factores que afectan al transporte de glutamina (insulina, corticoesteroides, desnervación, endotoxinas) se sabe que influyen sobre la síntesis proteica muscular, lo que explica por sí misma la correlación existente entre este AA y la actividad de síntesis proteica. Por el mo-

mento, no existe suficiente información que ayude a explicar el mecanismo de acción de la glutamina, ni el papel mediador que puedan ejercer los AAs de cadena ramificada como sustratos de la síntesis de glutamina. La influencia de la glutamina se extiende a la proteólisis muscular, lo que contribuiría a explicar el aparente efecto inhibitorio de la proteína de la dieta. Asimismo, está por aclarar la posible acción reguladora de la glutamina sobre el contenido ribosómico muscular, lo que contribuiría a explicar la influencia de la proteína dietaria sobre las concentraciones de ARN. Esta interrelación podría ser explicada por la participación de IGF-I como mediador del impulso anabólico, como había sugerido Millward (1989).

La sensibilidad de la secreción de insulina en respuesta a un aumento de los niveles circulantes de AAs es bien conocida. Es también sensible a otros factores como glucosa, hormonas digestivas, inervación adrenérgica y colinérgica. Puesto que las hormonas tiroideas influyen positivamente sobre la respuesta adrenérgica de la secreción de insulina, la influencia de la  $T_3$  sobre la secreción de insulina podría usar esta vía indirecta. La influencia directa de la proteína de la dieta sobre los niveles de  $T_3$  no está bien documentada, pero podría también reflejar una respuesta nerviosa a la ingesta proteica a través de la deshalogenasa-monodesiodasa, pues al menos una de estas enzimas está bajo control adrenérgico. Por otra parte, la insulina regula la desiodación de la tiroxina ( $T_4$ ), al menos en el hígado. Sin embargo, lo que no está claro es si la insulina influye directamente sobre los niveles de  $T_3$  en relación con la estimulación del crecimiento.

El factor IGF-I aumenta la síntesis de proteína muscular en peces, medida mediante la incorporación de  $C^{14}$ -glicina. El IGF-I induce hipoaminoacidemia en peces y, por estudios con otros animales, se sabe que aumenta la captación de AAs en las células musculares. La estimulación de la síntesis es dosis-dependiente para bajas concentraciones de IGH-I y también algo dependiente del momento del día. Este péptido es progresivamente menos efectivo a concentraciones altas, probablemente por inducir una disminución del número de receptores. Un aspecto poco conocido es si la proteína de la dieta regula los niveles de IGF-I. Lo que está claro es la capacidad de la proteína de la dieta para regular la producción de GH (hormona del crecimiento), así como la regulación de la producción de IGF-I por la GH.

El mecanismo específico por el cual el IGF-I estimula el crecimiento en peso y longitud no está claro. Se ha observado, por ejemplo, que peces tratados con IGF-I tienden a manifestar un comportamiento agresivo asociado a un acceso más frecuente al alimento, lo que podría contribuir a estimular el crecimiento. La repetición del experimento, con peces separados en grupos en función del tratamiento, demostró que la estimulación del crecimiento en longitud era dependiente de los niveles de IGF-I, mientras que los cambios en peso no eran estadísticamente diferentes (McCormick et al., 1992). Debemos recordar que, en los juveniles de salmón, los periodos de crecimiento en longitud están intercalados con periodos de crecimiento en peso. De forma general, se puede decir que los tratamientos con IGF-I no parecen ser tan efica-

ces para estimular el crecimiento como el tratamiento con GH exógena, lo que apunta a que no todas las funciones de la GH están mediadas por IGF-I y que el IGF-I puede tener funciones independientes de las de la GH.

En comparación con el IGF-I, la estructura de la insulina, un péptido de 51 restos de AAs producido por las células  $\beta$  del páncreas, se ha conservado menos a lo largo de la evolución de los vertebrados (Duguay y Mommsen, 1994). Se ha descrito una cierta dicotomía en las acciones de la insulina. Por una parte están los efectos metabólicos, provocados por alteraciones en el estado de fosforilación de enzimas clave, reguladas por serina/treonina kinasas y fosfatasas. Por ahora, la verdadera naturaleza de la conexión entre los receptores de la insulina y su tirosina-kinasa, así como la serie de kinasas y fosfatasas reguladoras de actividades enzimáticas, quedan por establecer con precisión. Por otra parte, están los mecanismos de regulación metabólica que implican la transcripción génica. La hormona afecta a la velocidad de síntesis proteica en muchos tejidos, aunque controlando selectivamente la expresión de genes específicos. Estos genes cubren un amplio espectro de proteínas: enzimas del metabolismo intermediario, hormonas (p.e.: IGF-1, GH), proteínas de membrana (p.e.: transportadores de glucosa) y factores de transcripción. Las amplias funciones metabólicas de la insulina en los vertebrados, incluidos los peces (Mommsen y Plisetskaya, 1991), se conocen desde hace tiempo; sin embargo, poca atención se ha prestado a su papel en la regulación del crecimiento. La administración *in vivo* de insulina estimula el crecimiento de los peces, pero los resultados no son tan espectacu-

lares como los que se obtienen en peces transgénicos para GH y otros promotores del crecimiento (Devlin et al., 1995; Hackett, 1993). Existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de insulina y el crecimiento corporal y, también, con el número de receptores para insulina en el músculo, lo que confirma, pero no prueba, el papel central de la insulina en el control del crecimiento. En el mismo sentido, cuando se suministra insulina a peces con los islotes pancreáticos dañados, se restaura el crecimiento y la incorporación de sulfato-S<sup>35</sup> al cartílago (Kelley et al., 1993). Además, antes de que se produzca hiperglucemia por la administración de estreptozotocina, que destruye las células  $\beta$  pancreáticas, se ponen de manifiesto alteraciones en la respuesta celular al IGF-I, lo que indica que la insulina es un elemento esencial en el funcionamiento del eje GH/IGF-I en los peces.

Aunque exista un poderoso vínculo entre insulina y crecimiento y se hayan descrito en mamíferos numeroso genes que responden a la insulina, no se deben ignorar otras conexiones indirectas. Es posible que algunos efectos de la insulina estén mediados por el neuropéptido Y que se asocia con cambios en el apetito y la ingesta de alimento, aunque el neuropéptido Y puede funcionar también como un estimulante de la secreción de GH en la hipófisis.

La sensibilidad de la secreción de insulina a la ingesta de alimento, fundamentalmente a los AAEE necesarios para sostener el crecimiento del músculo esquelético, hace que la insulina juegue un papel decisivo como mediador del impulso anabólico. Lo más probable es que

la insulina active la iniciación de la traslación al activar el factor 2 de iniciación de la elongación (eIF<sub>2</sub>), posiblemente a través de la supresión de la actividad de una proteína inhibidora que fosforila el eIF<sub>2</sub> y que se acumula en ausencia de insulina. Esta acción de la insulina es especialmente notable en el rango más bajo de valores que se observan *in vivo* y, de hecho, la relación entre insulina y síntesis proteica muscular es bastante estrecha hasta valores de 25  $\mu$ u/ml, a partir de los cuales no se induce mayor actividad de síntesis.

La acción estimulante de la insulina también depende de la ausencia de factores reguladores que reducen la sensibilidad a la insulina. Los glucocorticoides son el mejor ejemplo, sus altos niveles en ayuno son mayoritariamente responsables de la respuesta catabólica, y la rápida caída que se produce con la realimentación parece ser necesaria para el máximo efecto estimulante de la insulina sobre la síntesis proteica. Como posibles mediadores de la acción de la insulina, habría que considerar también a los metabolitos del ácido araquidónico. De acuerdo con Reeds et al. (1987), los inhibidores de la ciclooxigenasa o de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que inhiben la síntesis de prostaglandinas tromboxanos y prostaciclina, inhiben *in vivo* e *in vitro* la estimulación de la síntesis proteica muscular por la insulina; sin embargo, no lo hacen una vez que la insulina ha estimulado la síntesis proteica, por lo que los metabolitos del ácido araquidónico serían mediadores de la iniciación, y no de la continuación del proceso de síntesis.

Las hormonas tiroideas se sabe que juegan un papel clave en la regulación del crecimiento y desarrollo, y la hormona activa ( $T_3$ ) se ha demostrado que estimula tanto la síntesis, como la degradación proteica. Los mecanismos por los que la  $T_3$  ejerce su influencia sobre el metabolismo proteico son poco conocidos. Puesto que hay receptores nucleares para las hormonas tiroideas, un efecto sobre la transcripción sería lo más probable y, ya que existe una correlación entre el contenido de ARN muscular y los niveles plasmáticos de  $T_3$ , la síntesis de ARN ribosómico es probablemente el mecanismo de acción básico de estas hormonas. La  $T_3$  está estrechamente relacionada con la acción del IGF-I sobre el crecimiento óseo, pero su efecto parece ser independiente, ya que la  $T_3$  influye sobre la reorganización estructural, asociada a la maduración de los núcleos de osificación, mientras que el IGF-I estimula la proliferación celular. La naturaleza y el grado de interacción entre  $T_3$  e IGF-I sobre el ARN muscular todavía están pendientes de una explicación definitiva.

Una cuestión importante, que no ha sido abordada en peces, es si la influencia de la  $T_3$  sobre la síntesis y degradación proteica puede influir sobre la velocidad de crecimiento. Influiría si la sensibilidad de la velocidad de síntesis ( $K_S$ ) fuera mayor que la de la velocidad de degradación ( $K_D$ ). Otra posibilidad es que el mayor recambio estuviera asociado a otras influencias, como insulina y/o IGF-I. La última posibilidad sería más factible, ya que, según se ha demostrado en mamíferos, el tratamiento con  $T_3$  estimula el recambio proteico y no el crecimiento.

Como conclusión de este apartado, podemos decir que el crecimiento muscular necesita, además del aporte de sustratos, una intervención reguladora (el impulso anabólico) por medio de señales derivadas de la ingesta proteica que incluyen factores metabólicos y endocrinos que, en definitiva, modulan las velocidades de síntesis y degradación y, en consecuencia, el crecimiento tisular. Parece claro que los compuestos citados (insulina,  $T_3$ , IGF-I y glutamina) tienen un papel decisivo en el impulso anabólico. Nada hemos comentado de los andrógenos y estrógenos que, aunque no estén involucrados directamente en la regulación nutritiva, sí tienen una clara influencia sobre el crecimiento muscular. También habría que mencionar la influencia del sistema nervioso simpático, favoreciendo el crecimiento muscular a través de una estimulación de la síntesis proteica, asociada a una disminución de la proteólisis, como se demuestra por la administración en la dieta de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Estos compuestos, al aumentar la termogénesis, ponen de manifiesto que la estimulación adrenérgica del impulso anabólico contribuye, al menos parcialmente, al coste energético de la retención proteica. Sin embargo, no se ha demostrado que la estimulación del crecimiento por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos se asocie con cambios en la eficiencia energética de los procesos de crecimiento, ni tampoco se sabe cuáles son los mecanismos que inducen los cambios en el recambio y retención proteica muscular.

Lo que parece claro es el papel central de la insulina mediando el impulso anabólico de la proteína de la

dieta. Dada la evidencia clara de la marcada sensibilidad de la  $K_{RNA}$  (actividad de ARN, en g de proteína sintetizada/g ARN/día) muscular a la insulina y la relación aparente entre  $T_3$  e IGF-I con la insulina, parece que la insulina puede ejercer las acciones necesarias para la coordinación de la respuesta de crecimiento inducida por la proteína de la dieta. Este mecanismo explicaría la detención del crecimiento que se produce en deficiencia de cinc, donde la incapacidad para utilizar la proteína de la dieta para crecimiento y la anorexia que se origina serían, al menos en parte, consecuencia de la incapacidad de las células  $\beta$  para secretar insulina. Los bajos niveles de IGF-I, como consecuencia de la hipoinsulinemia, serían responsables de la menor concentración y síntesis de ADN y ARN musculares que limitan la capacidad de depósito proteico muscular. La inhibición de la síntesis proteica por deficiencia de cinc la hemos observado en la trucha, así como un fuerte aumento del impulso anabólico cuando los peces vuelven a ingerir dieta con cinc (Expósito, 1999).

GH, IGF-I e insulina tienen acciones sobre el sistema nervioso y múltiples interacciones a todos los niveles: molecular (promotor, estructura génica, factores de transcripción), transducción (IRS, MAP kinasa, Ras, Raf, IP3 kinasa), receptor (expresión y número), celular (acciones paracrina-endocrinas del IGF-I, dianas celulares), tisular (abundancia de receptores, regulación), y en todo el organismo. Dentro de ciertos límites, hay que tener en cuenta también que el número de receptores musculares para IGF-I e insulina difiere entre especies con diferentes hábitos alimentarios. Parece obvio que futuros análisis

del eje GH/IGF-I deben considerar también a la insulina; estudios de regulación de ingesta en los que se tiene en cuenta el papel del neuropéptido Y y la somatostatina no deberían ignorar el papel regulador de estas tres hormonas.

La conexión entre el eje endocrino regulador del crecimiento (GH, IGFs, insulina  $T_3$  y cortisol, fundamentalmente) y la incorporación de proteína como base estructural del proceso de crecimiento es, como hemos visto, compleja, controvertida y, cuando se analizan respuestas en distintas especies, también puede resultar en algunos puntos contradictoria. Sin embargo, reuniendo resultados para condiciones ambientales parecidas, se podría concluir que la mejor incorporación de proteína al crecimiento se alcanza con bajos niveles plasmáticos de GH y cortisol, en combinación con altas concentraciones de receptores hepáticos para GH y altos niveles circulantes de IGFs, insulina y  $T_3$ . Por otra parte, si consideramos las diferencias entre aquellas especies más estudiadas, de aquellas de interés europeo, se podría decir, de acuerdo con Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999, que la  $T_3$  es un buen marcador de crecimiento para la trucha arco-iris, mientras que en otros peces, como la dorada, las concentraciones plasmáticas de GH pueden proporcionar un dato útil para valorar alteraciones nutritivas como la malnutrición o los desbalances nutritivos.

## **Manipulación del crecimiento y perspectivas para el futuro**

La capacidad de crecimiento de una especie está básicamente determinada por sus potencialidades genéticas, pero también influyen toda una serie de factores que interactúan para influir decisivamente en su control. Entre los factores exógenos que afectan al crecimiento de los peces, destacan: la disponibilidad de alimento, tamaño de la ingesta, digestibilidad de los nutrientes, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto en el agua, densidad de animales, interacciones sociales, competencia inter e intraespecífica, exposición a patógenos y calidad del agua. De hecho, cualquier variable exógena que provoque gasto de energía afectará indirectamente al uso de los recursos endógenos. Además, es importante tener en cuenta que todos estos factores que pueden influir sobre el crecimiento, lo hacen a través de una amplia variedad de procesos fisiológicos que, en último término, controlan y determinan la velocidad de crecimiento e incorporación estructural de nutrientes.

El crecimiento puede ser favorecido, o incluso estimulado, artificialmente. El rango de posibilidades va desde la optimización de las condiciones de crecimiento, hasta la manipulación genética. Las condiciones de crecimiento incluyen: las características físico-químicas del agua, composición de la dieta y comportamiento alimentario, interacciones sociales, inclusión en la dieta de sustancias estimulantes del crecimiento y estado general de salud. La manipulación genética va desde la selección artificial de especímenes con mayores potencialidades de

crecimiento y cultivo, pasando por la inducción de poblaciones de un mismo sexo, poliploides o descendientes de un solo progenitor, hasta llegar a una manipulación a nivel molecular mediante la obtención, por ejemplo, de individuos transgénicos que contienen copias múltiples de secuencias para hormona de crecimiento (GH) u otros promotores del crecimiento.

El crecimiento es uno de los rasgos que puede ser controlado por manipulación genética a través de la selección de líneas de crecimiento más rápido, preferentemente asociadas a otras características deseables, como docilidad, baja respuesta al estrés, etc. La selección de una línea parental de trucha y dorada, en función de su alta o baja respuesta al estrés, y las pruebas correspondientes con la progenie, en condiciones de estrés crónico por alta densidad, fue objeto de un proyecto de ámbito europeo con socios británicos, españoles y noruegos. Los resultados pusieron de manifiesto un aumento significativo de la tolerancia al estrés, manifestada, entre otros parámetros, por un aumento de la tasa de crecimiento y de la utilización nutritiva de la dieta (Trenzado, 2004; Trenzado et al., 2006). Este planteamiento nos aproxima, además, a la preocupación creciente por el bienestar animal, no sólo desde el punto de vista ético sino, también, por sus consecuencias sobre la producción y la calidad del producto final.

Otros parámetros que han sido seleccionados con éxito a través de programas de cría son los factores de condición y grado de engrasamiento muscular. Desafortunadamente, desde un punto de vista energético, los re-

sultados no suelen ir acompañados de una mejora en los índices de conversión y, en consecuencia, no se obtiene una reducción en el aporte de alimento rico en proteína. Por tanto, hasta que no se logre un aumento significativo de los índices de conversión, la manipulación de la velocidad de crecimiento seguirá siendo, según Mommsen (1998), “un juego de los investigadores en un mundo de sueños”.

En algunas especies de peces, los animales de un sexo pueden presentar mayores tasas de crecimiento, o maduración más tardía, que los del otro sexo. Esta circunstancia ha motivado el desarrollo de métodos endocrinos o de manipulación genética para obtener individuos de aquel sexo que presenta mayores potencialidades de producción. Así, las hembras de rodaballo o los machos de salmónidos crecen más rápidamente que los del sexo opuesto. En ciertas especies, el tratamiento con hormonas sexuales produce la inversión de sexo para la obtención de poblaciones monosexo; así, por ejemplo, los llamados neo-machos, hembras transformadas en machos por administración de hormonas masculinas, producen semen que contiene solamente cromosomas productores de hembras. En consecuencia, estos neomachos, cruzados con hembras normales, originarán poblaciones solo hembras

La poliploidia es una técnica que permite, normalmente mediante choques térmicos tras la fecundación, la obtención de individuos estériles que, al no madurar, evitan el retraso del crecimiento que la maduración sexual conlleva. La poliploidia, al dotar a las células de

un número mayor de cromosomas, pretende también potenciar mecanismos de adaptación y crecimiento en líneas seleccionadas previamente.

Mediante irradiación de los gametos se pueden conseguir descendencias de uno de los sexos (androgénesis o ginogénesis). Normalmente, tras la irradiación, se obtienen organismos haploides, que no son viables, por lo que se hace necesario someterlos a un choque térmico que los haga diploides y, por tanto, viables. Por medio de estas actuaciones se trata de reproducir de forma unilateral, sin cruzarse con otros individuos, determinados genotipos/fenotipos con un carácter favorable determinado como, por ejemplo, altas tasas de crecimiento, mayor porción comestible, resistencia a determinadas condiciones o agentes, etc.

Finalmente, se puede intentar mejorar el crecimiento de los peces mediante la introducción de ADN foráneo en el genoma del receptor, o transgénesis, que puede realizarse por microinyección, transferencia mediante vectores virales y por manipulación de células embrionarias. Actualmente se están desarrollando métodos alternativos como la electroporación (emisión de pulsos eléctricos de alto voltaje y corta duración), siendo el más novedoso la electroporación con radiofrecuencia (Hostetier et al., 2003). Uno de los problemas de la mejora genética por transgénesis es la posibilidad de alterar funciones que, como el crecimiento, dependen de múltiples genes que se expresan mediante complejas cascadas de señalización, parte de las cuales se comentarán más adelante.

La transgénesis también se está empleando para codificar la síntesis de determinados AAs. Por ejemplo, en la oveja, el crecimiento de la lana está a menudo limitado por el aporte de cisteína que, junto a la metionina, se degrada en alta proporción en el rumen. La introducción en el genoma de genes de procariotas que codifican la síntesis de cisteína, a través de la producción de los enzimas correspondientes (serina transacetilasa y O-acetil serina sulfidrasa), es una alternativa en marcha, ya que estos genes se han conseguido expresar en el ratón. Se ha sugerido también que los genes de *Escherichia coli*, para la síntesis de lisina y treonina, pueden expresarse en mamíferos. El posible éxito de esta tecnología requerirá, sin duda, una reevaluación de la respuesta de los animales de granja al aporte de AAs de la dieta.

Dado que los niveles circulantes de hormona de crecimiento (GH) tienen el límite que marca el genoma de la especie, una posibilidad de contrarrestar esta limitación natural es la administración exógena de GH, o lactógeno placentario aislado de placenta de mamíferos, o el empleo de factores inhibidores de somatostatina, hormona que inhibe la producción hipofisaria de GH. El tratamiento con hormona de crecimiento exógena, en mamíferos que ingieren un adecuado aporte de nutrientes, induce tejido magro con bajos depósitos de grasa. El tratamiento de animales de granja con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, como el Clenbuterol, también produce una movilización de la grasa, que se traduce en una carne más magra. En los peces se empiezan a estudiar estas posibilidades y, en cualquier caso, esta orientación hacia

mayores depósitos proteicos es probable que tenga consecuencias sobre las necesidades de AAs.

Al igual que se planteó seleccionar una línea parental de baja respuesta al estrés, en función de los niveles de cortisol, cabría también la posibilidad de seleccionar líneas de peces de acuerdo con los niveles de hormonas estimulantes del crecimiento. La  $T_3$  parece ser un buen marcador para la trucha arco-iris mientras que, en otros peces como la dorada, los niveles de plasmáticos de GH pueden ser usados para seleccionar líneas de crecimiento rápido. Otra posibilidad consiste en aumentar la producción endógena de GH a través de la introducción de los genes que la codifican. Esta alternativa ha sido empleada con éxito en el salmón. El salmón transgénico crece dos veces más rápido e ingiere menos alimento que las variedades naturales, lo que supone una mejora de los índices de conversión y, en consecuencia, la realización de ese sueño imposible del que hablaba Mommsen. Este nuevo transgénico denominado *AquAdvantage*<sup>TM</sup> podría ser autorizado para acuicultura si se demuestra que no tiene mayores capacidades de viabilidad o reproducción que los salmones naturales.

Otras hormonas que intervienen en el crecimiento, desarrollo y reproducción de peces (prolactina, somatolactina, gonadotropinas, receptores de estrógenos) han sido clonadas en diversos organismos para procurar la sobre-expresión hormonal, evitando costosos tratamientos. Como ocurre con la GH, serán necesarios importantes cambios en la reglamentación actual para su aplica-

ción a la acuicultura y, en consecuencia, para su destino al consumo humano.

Frente a estrategias que inciden en la estimulación de la síntesis proteica como mecanismo de crecimiento, nos pareció interesante la posibilidad de actuar directamente sobre el proceso de degradación proteica que cierra el ciclo continuo del recambio proteico tisular y, así, favorecer la síntesis y retención proteica. El aislamiento y purificación, por el grupo del Prof. García Granados de nuestra Universidad, del ácido maslínico (2- $\alpha$ ,3- $\beta$ -dihidroxioléin-12-en-28-oico), un triterpenoide derivado del ácido oleanólico que, entre otros efectos, inhibe la actividad de serín-proteasas celulares, nos hizo plantear la posibilidad de la citada hipótesis, como posible acción estimulante del crecimiento en los peces que ingieren una dieta normal. Los resultados fueron positivos con la trucha arco-iris y el ácido maslínico, a dosis desde 25 mg/Kg de dieta resultó ser un estimulante del crecimiento al aumentar significativamente la actividad de síntesis proteica muscular ( $K_S$ ), así como la eficiencia del proceso de síntesis proteica ( $K_{RNA}$ ) y el contenido muscular de ADN, ARN y proteína (Fernández-Navarro et al., 2008). En especies marinas como la dorada el ácido maslínico tuvo un cierto efecto estimulante del crecimiento, especialmente cuando los peces se alimentan de forma restringida (Rufino-Palomares, 2009); sin embargo, en el dentón no tuvo efecto (Hidalgo et al., 2006).

Uno de los temas estratégicos de la acuicultura, que deberá desarrollarse en un futuro inmediato, es optimizar el patrón aminoacídico postprandial y, en conse-

cuencia, la eficiencia de la síntesis proteica para crecimiento, actuando a nivel de suplementación de fuentes proteicas distintas de las harinas de pescado. Dicha suplementación debería considerar, no sólo el contenido y patrón de AAs de la dieta, como viene siendo lo habitual, sino, lo que parece más importante, el patrón aminoacídico postprandial resultante y el tiempo en que permanece disponible a concentraciones adecuadas. Cada proteína, o mezcla proteica, proporciona un determinado patrón que puede, a su vez, modificarse por la forma de suplementación que se emplee. Además, el tiempo disponible puede, hasta cierto punto, condicionarse con una adecuada estrategia alimentaria.

Dejando aparte las estrategias de dispensación de alimento, como alternativas de suplementación tenemos el recubrimiento de los AAs con cubiertas cuya composición y grosor determina los tiempos de absorción y la producción de plasteínas enriquecidas con los AAEE necesarios. Un catálogo de cubiertas y plasteínas permitiría las combinaciones oportunas, con las proteínas de la fórmula, para la obtención del patrón ideal y los mejores resultados de crecimiento. Las plasteínas son sustancias de alto peso molecular, parecidas a las proteínas, a las que se pueden incorporar AAs por procesos enzimáticos de digestión y resíntesis; el resultado es una mejora significativa del valor biológico de las proteínas suplementadas de esta forma, en relación al empleo de AAs libres como suplemento. Sorprende que no se hayan aplicado aún en la alimentación de los peces (nosotros lo intentamos buscando una colaboración especializada), ya que los resultados obtenidos con langostinos alimentados con

plasteínas de soja son realmente espectaculares (Teshima et al., 1992), al igualar los resultados obtenidos con proteínas de referencia.

Un aspecto que no hay que olvidar, por las posibilidades que tiene, es la inducción de respuestas de crecimiento compensatorio, jugando con periodos de alternativos de ingesta y ayuno. Skalski et al. (2005) sugieren que los más bajos costos de mantenimiento, acumulados durante los periodos de bajo consumo, llegarían a compensar las fases de alto consumo ya que, en el conjunto del proceso, se obtendría una más alta eficiencia de asimilación y conversión del alimento, con la consiguiente mayor rentabilidad de la producción. Además, esta estrategia puede ser también útil para las etapas finales del cultivo, en las que se pretenda modificar la composición y aceptabilidad del producto por los consumidores

Los programas de mejora continuarán en el futuro tratando de aumentar la productividad animal, por lo que será necesaria la actualización continua del conocimiento sobre la respuesta de los animales al aporte de AAs. Los avances de la biotecnología están ya suministrando métodos para aumentar la respuesta del animal a la dieta.

La mayoría de los especialistas estaría de acuerdo en que el desarrollo de la mayoría de las estrategias citadas, relacionadas con la alimentación, selección y manipulación genética, que pretenden mejorar la eficiencia en la utilización nutritiva de la dieta, la velocidad de crecimiento y la calidad del pescado, como producto final para el consumo humano, seguramente tendrá más posibili-

dades de éxito si se basa en un conocimiento detallado de la fisiología y la bioquímica de las especies de interés en acuicultura.

Muchas gracias

## Bibliografía

Ali, M., Nicieza, A. y Wootton, R.J. 2003. Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish Fish.* 4(2): 147-190.

Ambardekar, A.A., Reigh, R.C. y Willians, M.B. 2009. Absorption of amino acids from intact dietary proteins and purified amino acid supplements follows different time-courses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 291: 179-187.

Ash, R. 1985. Protein digestion and absorption. En *Feeding and Nutrition of Fish*, editado por C.B. Cowey, J.G. Bell y A.M. Mackie. Academic Press, London, pp. 69-94.

Baker, D.H. y Czarnecki-Maulden, G.L. 1991. Comparative nutrition of cats and dogs. *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 239-263.

Baker, D.H., Allen, N.K., Boomgaardt, J., Graber, G. and Norton, H.W. 1971. Quantitative aspects of D- and L-tryptophan utilization by the young pig. *J. Anim. Sci.*, 33: 42-46.

Beverly, J.L., Gietzen, D.W. y Rogers, Q.R. 1991. Threonine concentration in the prepyriform cortex has separate effects on dietary selection and intake of a threonine-imbalanced diet by rats. *J. Nutr.*, 121: 1287-1292.

Boorman, K.N. y Lewis, D. 1971. Protein Metabolism. En *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl, vol. 1*, editado por D.J. Bell. Academic Press, London, pp. 339-372.

Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Van der Geyten, S., Mol, K.A., Kühn, E.R., Quinsac, A.,

Krouti, M. y Ribailier, 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.

Carter, C., Houlihan, D.F., Kiessling, A., Médale, F. y Jobling, M. 2001. Physiological Effects of Feeding. En *Food Intake in Fish*, editado por D. Houlihan, T. Boujard y M. Jobling. Blackwell Science, Oxford, pp. 297-331.

Carter, C., Houlihan, D.F., Brechin, J. y McCarthy, I.D. 1993a. The relationship between protein intake and protein accretion, síntesis and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Can. J. Zool.*, 71: 393-400.

Carter, C., Houlihan, D.F., Buchanan, B. y Mitchell, A.I. 1993b. Protein-nitrogen flux and protein growth efficiency of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 305-315.

Cheng, C.M. y Chen, T.T. 1995. Synergism of GH and IGF-I in stimulation of sulphate uptake by teleostean branchial cartilage in vitro. *J. Endocrinol.*, 147: 67-73.

Chen, T.T., Marsh, A., Shamblott, M.J., Chan, K.M., Tang, Y.L., Cheng, C.M. y Yang, B.Y. 1994. Structure and evolution of fish growth hormona and insulina-like growth factor genes. En *Fish Physiology*, vol. XIII. *Molecular Endocrinology of Fish*, editado por N.M. Sherwood y C.L. Hew, Academia Press, San Diego, pp. 179-209.

Cho, C.Y., Slinger, S.J. y Bayley, H.S. 1982. Bioenergetics of salmonoid fishes: energy bintake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 25-41.

Cho, C.Y., Kaushik, S. and Woodward, B. 1992. Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 211-216.

Company, R., Caldach-Giner, J.A., Kaushik, S. y 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. 1992. Estimating requirements of rainbow trout. *Aquaculture*, 100: 177-189.

Cowey, C.B. 1994. Amino acid requirements of fish: A critical appraisal of present values. *Aquaculture*, 124: 1-11.

Cowey, C.B. y Walton, M.J. 1988. Studies on the uptake of (<sup>14</sup>C) amino acids derived from both dietary (<sup>14</sup>C) protein and dietary (<sup>14</sup>C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33: 293-305.

Cowey, C.B., de la Higuera, M. y Adron, J.W. 1977. The effect of diet composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 38: 385-395.

Dabrowski, K. 1981. Triptophan requirement of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Z. Tierphysiol, Tierernährg. u. Futteermittelkde.* 46: 64-71.

Dabrowski, K., Lee, K.-J. y Rinchar, J. 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J. Nutr.*, 133: 4225-4229.

de Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S.J. y Poli, B.M. 2004. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 236: 413-429.

de Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S.J., Mecatti, M. y Poli, B.M. 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquacult. Nutr.*, 13: 361-372.

de la Higuera, M. 2001. Effects of nutritional factors and feed characteristics on feed intake. En *Food Intake in Fish*, editado por D. Houlihan, T. Boujard y M. Jobling. Blackwell Science, Oxford, pp. 250-268.

de la Higuera, M. y Cárdenas, P. 1985. Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-<sup>14</sup>C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81A: 391-395.

de la Higuera, M. and Cardenete, G. 1993. La proteína en la nutrición de los peces. En *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Editado por Universitat de Barcelona. Publicacions de la Universitat de Barcelona, Barcelona, pp. 195-225.

de la Higuera, M., Murillo, A., Varela, G. y Zamora, S. 1977. The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 56: 37-41.

de la Higuera, M., Sánchez-Muniz, F.J., Mataix F.J. y Varela, G. 1981. Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed on the yeast *Hansenula anomala*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69A: 583-586.

de la Higuera, M., García-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suárez M.D. y Moyano, F.J. 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein

source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 37-50.

de la Higuera, M., Garzón, A., Hidalgo, M.C., Peragón, J., Cardenete, G. y Lupiáñez, J.A. 1998. Influence of temperature and dietary-protein supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein-turnover rates in the white muscle of carp. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 85-95.

de la Higuera, M., Akharbach, H., Hidalgo, M.C., Peragón, J., Lupiáñez, J.A. y García-Gallego, M. 1999. Liver and muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture*, 179: 203-216.

Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Du, S.J. y Hew, C.L. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 1376-1384.

Duan, C., Plisetskaya, E.M. y Dickhoff, W.W. 1992. Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology*, 136: 446-452.

Duguay, S.J. y Mommsen, T.P. 1994. Molecular aspects of pancreatic peptides. En *Fish Physiology*, Vol. XIII, editado por N.M. Sherwood y C.L. Hew. Academic Press, San Diego, pp. 225-271.

Efthimiou, S., Divanach, P. y Rosenthal, H. 1994. Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pellet moist and dry diets. *Aquat. Living Resour.*, 7: 267-275.

El-Saidy, D. y Gaber, M. 2003. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources

in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquac. Res.*, 34: 1119-1127.

Expósito, A. 1999. Disponibilidad de cinc en dietas para truchas (*Oncorhynchus mykiss*): Selección específica del alimento, distribución y recambio tisular de cinc, síntesis proteica y actividades enzimáticas cinc-dependientes. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fauconneau, B., Breque, J. y Bieller, C. 1989. Influence of feeding on protein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 79: 29-36.

Farbridge, K.J. y Leatherland, J.F. 1992. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 67-73.

Fielder, P.J., Mortensen, D.L., Mallet, P., Carlsson, L., Baxter, R.C. y Clarke, R.G. 1996. Differential long-term effects of IGF-I, GH and IGF-II plus GH at body growth and IGF-I binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 137: 1913-1920.

Finke, M.D., De Foliart, G.R. y Benevenga, N.J. 1987. Use of simultaneous curve fitting and a four parameter logistic model to evaluate the nutritional value of protein sources at growth rates of rats from maintenance to maximum gain. *J.Nutr.*, 117: 1681-1688.

Francis, G., Makkar, H.P.S. y Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199: 197-227.

Fu, S.J., Xie, X.J. y Cao, Z.D. 2005. Effect of dietary composition on specific dynamic action in southern catfish *Silurus meridionalis*. *Aquat. Res.*, 36 1384-1390.

Fu, S.J., Cao, Z.D. y Peng, J.L. 2007. Effect of purified macronutrients on specific dynamic action in carnivorous southern catfish. *Aquacult. Nutr.*, 13: 216-221.

Fuller, M.F. 1994. Amino acid requirements for maintenance, body protein accretion and reproduction. En *Amino acids in farm animal nutrition*, editado por J.P.F. d'Mello. CAB Internacional, Wallingford, UK, pp. 155-184.

Gahl, M.J., Finke, M.D., Crenshaw, T.D. and Benavenga, N.J. 1991. Use of a four parameter logistic model to evaluate the response of growing rats to ten levels of each indispensable amino acid. *J.Nutr.*, 121: 1720-1729.

García-Gallego, M., Zamora, S. y López, M.A. 1981. The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B: 457-460.

García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Suárez, M.D., Sanz, A. y de la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. II. Influence of dietary lipid level. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 171-175.

García-Gallego, M., Akharbach, H. y de la Higuera, M. 1998. Use of protein sources alternative to fish meal in diets with amino acids supplementation for the European eel (*Anguilla anguilla*). *An. Sci.*, 66: 285-292. 1998.

Garzón Fernández, A. 1995. Influencia de la encapsulación de lisina sobre la utilización nutritiva de la proteína de gluten y el recambio proteico tisular, en la trucha (*O. mykiss*) y la carpa (*C. carpio*). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Gómez, J.M., Boujard, T., Fostier, A. y Le Bail, P.Y. 1996. Characterization of growth hormone

nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 274: 171-180.

Gómez, J.M., Boujard, T., Boeuf, G., Solari, A y Le Bail, P.Y. 1997. Individual nycthemeral plasma profiles of thyroid hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation with cortisol, growth hormone and growth rate. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107: 74-83.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S y Pérez-Sánchez, J. 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, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S y Pérez-Sánchez, J. 2004. Protein growth performance, amino acid utilization and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232: 493-510.

Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. y Métailler, R. 2002. Nutrition y alimentation des poissons y crustacés. 475 pp. Editado por INRA e IFREMER París.

Gurure, R., Atkinson, J. y Moccia, R.D. 2007. Amino acid composition of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) and the prediction of dietary requirements for essential amino acids. *Aquacult. Nutr.*, 13: 266-272.

Hackett, P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish. En *Biochemistry and Molecular Biology of*

*Fishes*, Vol. 2, editado por P.W. Hochachka y T.P. Mommsen. Elsevier Science, New York, pp. 276-302.

Hansen, A.-C., Karlsen, O., Rosenlund, G., Rimbach, M. y Hemre, G.-I. 2007. Dietary plant protein utilization in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquacult. Nutr.*, 13: 200-215.

Hidalgo, M.C., Sanz, A., García-Gallego, M., Suárez, M.D. y de la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. I. Influence of dietary carbohydrate level". *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 165-169.

Houlihan, D.F. 1991. Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. En *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 7, editado por R. Gilles. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-43.

Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C. y Noble, B.S. 1988. Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, 43: 951-964.

Houlihan, D.F., Hall, S.J. y Gray, C. 1989. Effects of ration on protein turnover in cod. *Aquaculture*, 79: 103-110.

Hostetier, H.A. **et al.** 2003. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic research*, 12: 413-424.

Jepson, M.M., Bates, P.C., y Millward, D.J. 1988. The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein. *Br. J. Nutr.*, 59: 397-415.

Kang-Lee, T.A. y Harper, A.E. 1978. Threonine metabolism *in vivo*: Effect of threonine and prior induction dehydration in rats. *J. Nutr.*, 108: 163-175.

Kaushik, S.J., Covès D., Dutto, G. y 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.

Kelley, K.M., Gray, E.S., Siharath, K., Nicoll, C.S. y Bern, H.A. 1993. Experimental diabetes mellitus in a teleost fish. II. Roles of insulin, growth hormone (GH), insulin-like growth factor-I, and hepatic GH receptors in diabetic growth inhibition in the goby, *Gillichthys mirabilis*. *Endocrinology*, 132: 2696-2702.

Kim, K.I., Kayes, T.B. y Amundson, C.H. 1991. Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout. *Aquaculture*, 96: 57-67.

Le Bail, P.Y., Pérez-Sánchez, J, Yao, K. y Maise, G. 1993. Effect of GH treatment on salmonid growth: study of the variability of response. En *Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects*, editado por B. Lhlou y P. Vitiello, pp. 173-197.

Leung, P.M.B. y Rogers, Q.R. 1987. The effect of amino acids and protein on dietary choice. En *Umami: a Basic Taste*, editado por Y. Kawamura y M.R. Kare. Marcel Dekker, New York, pp. 565-610.

Lied, E. y Braaten, B. 1984. The effect of feeding and starving and different ratios of protein energy to total energy in the fed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78A: 49-52.

Marcouli, P.A., Alexis, M.N., Andriopoulou, A. e Iliopoulou-Gergudaki, J. 2004. Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquacult. Nutr.*, 10: 335-343.

Marcouli, P.A., Alexis, M.N., Andriopoulou, A. e Iliopoulou-Gergudaki, J. 2006. Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquacult. Nutr.*, 12: 25-33.

Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J. y 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.

McCarthy, I.D., Houlihan, D.F. y Cater, C.G. 1994. Individual variation in protein turnover and growth efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 257: 141-147.

McCormick, S.D., Kelley, K.M., Young, G., Nishioka, R.S. y Bern, H.A. 1992. Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor I. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 86: 398-406.

Millward, D.J. 1989. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture*, 79: 1-28.

Millward, D.J. y Rivers, J. 1988. The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42: 367-393.

Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M. y 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.

Mommsen, T.P. 1998. Growth and Metabolism. En *The Physiology of Fishes*, editado por D.H. Evans. CRC Press, New York, pp. 65-127.

Mommsen, T.P. y Plisetzkaya, E.M. 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.*, 4: 225-259.

Montserrat, N., Gabillard, J.C., J. Navarro, I. y Gutiérrez, J. 2007a. Role of insulin, insulin-like growth factors and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150: 462-472.

Montserrat, N., Gómez-Requeni, P., Belline, G., Capilla, E., Pérez-Sánchez, J. Navarro, I. y Gutiérrez, J. 2007b. Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 267: 188-198.

Morales, A.E., Cardenete, G., de la Higuera, M. y Sanz, A. 1994. Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 124: 117-126.

Moyano, F.J., Cardenete, G. y 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.

Moyano, F.J., Cardenete, G. y de la Higuera, M. 1992a. Use of two vegetable by-products as protein

sources in rainbow trout feeding. *Anim. Prod.*, 55: 277-284.

Moyano, F.J., Cardenete, G. y de la Higuera, M. 1992b. Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Living Resour.*, 5: 23-29.

Murai, T., Ogata, H., Kosutarak, P. y Arai, S. 1986. Effects of amino acid supplementation and methanol treatment on utilization of soy flour by fingerling carp. *Aquaculture*, 56: 197-206.

Murai, T., Ogata, H., Hirasawa, Y., Akiyama, T. y Nose, T. 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout forced-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1847-1859.

Navarro, I., y Gutiérrez, J. 1995. Fasting and starvation: En *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, editado por P.W. Hochachka y T.P. Mommsen, vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp. 393-434.

Navarro, I., Rojas, P., Capilla, E., Albatal, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M. y Gutiérrez, J. 2004. Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 27: 205-216.

Ogata, H. 1986. Correlations of essential amino acid patterns between the dietary protein and the blood, hepatopancreas, or skeletal muscle in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52(2): 307-312.

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

Oliva-Teles, A. y Goncalves, P. 2001. Partial replacement of fish meal by brewers yeast (*Saccharomyces*

*cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202: 269-278.

Peragón, J., Ortega-García, F., Barroso, J.B., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1992. Alterations in the fractional protein turnover rates in rainbow-trout liver and white muscle caused by an aminoacid-based diet and changes in the feeding frequency. *Toxicol. Environ. Chem.*, 36: 217-224

Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1994. Dietary protein effects on growth and fractional protein synthesis and degradation rates in liver and white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 124: 35-46.

Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33: 1227-1238.

Peres, H. y Oliva-Teles, A. 2005. The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. *Aquaculture*, 250: 755-764.

Pérez-Sánchez, J. y 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. y Le Bail, P.Y. 1992. Effects of human insulin-like growth factor on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.*, 262: 287-290.

Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, J.P. y 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.

Picha, M.E., Silverstein, J.T. y Borski, R.J. 2006. Discordant regulation of hepatic IGF-I mRNA and circulating IGF-I during compensatory growth in a teleost, the hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 147: 196-205.

Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F. y Le Bail, P.Y. 1991. Effect of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 83: 86-93.

Plakas, S.M., Tanaka, Y. y Deshimarn, O. 1980. Changes in the levels of circulating plasma free amino acids of carp (*Cyprinus carpio*) after feeding a protein and amino acid diets of similar composition. *Aquaculture*, 21: 307-322.

Plisetskaya, E., Duguay, S.J. y Duan, C. 1994. Insulin and insulin-like growth factor I in salmonids: comparison of structure, function and expresión. En *Perspectives in Comparative Endocrinology*, editado por K.G. Davey, R.E. Peter y S. Tobe, pp. 226-233.

Power, D.M., Melo, J. y Santos, C.R. 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J. Fish Biol.*, 56: 374-387.

Reeds, P.J., Palmer, R.M. y Whale, K.W.J. 1987. The role of metabolites of arachidonic acid in the physiology and pathophysiology of muscle protein metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, 15: 328-331.

Rerat, A. y Jung, J. 1988. Absorption kinetics of dietary hydrolysis products in conscious pigs given diets with different amounts of fish protein. *Br. J. Nutr.*, 60: 105-120.

Ross, R.J.M. y Chew, S.L. 1995. Acquired growth hormone resistance. *Eur. J. Endocrinol.*, 132: 655-660.

Rufino Palomares, E. 2009. Evaluación nutricional y bioquímica del ácido maslínico, triterpeno natural, sobre el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*). Caracterización cinética y proteómica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Sánchez-Muniz, F.J., de la Higuera, M. y Varela, G. 1982. Alterations of the erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by the use of *Hansenula anomala* yeast as a sole protein source. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72A: 693-696.

Sánchez-Muniz, F.J., de la Higuera, M., Muñoz-Martínez, E. y Varela, G. 1983. Influence of *Hansenula anomala* yeast intake on the liver and kidney metabolism of the trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A: 609-613.

Sánchez-Muros, M.J., Corchete, V., Suárez, M.D., Cardenote, G., Gómez-Milán, E. y de la Higuera, M. 2003. Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture*, 224: 89-103.

Santigosa, E. Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. y Gallardo, M.A. 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282: 68-74.

Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M. y de la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. III. Influence of the relative proportions of the energy yielding nutrients. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 177-182.

Sanz, A., Morales, A.E., de la Higuera, M y Cardenete, G. 1994. Sunflower meal compared with soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquaculture*, 128: 287-300.

Schuchardt, D., Vergara, J.M., Fernández-Palacios, H., Kalinowski, C.T., Hernández-Cruz, C.M., Izquierdo, M.S. y Robaina, L. 2008. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. *Aquacult. Nutr.*, 14 : 1-9.

Shamblott, M.J., Cheng, C.M., Bolt, D. y Chen, T.T. 1995. Appearance of insulin-like growth factor m RNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 6943-6946.

Sierra, M.A. 1995. La encapsulación como estrategia para establecer las necesidades de metionina y la suplementación de la proteína de soja. Consecuencias sobre el recambio proteico tisular y el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*). Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Skalski, G.T., Picha, M.E., Gillian, G.F y Borski, R.J. 2005. Variable intake, compensatory growth and increased growth efficiency in fish: Models and mechanisms. *Ecology*, 86(6), 1452-1462.

SOFIA. 2007. The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, pp. 1-180.

Sugden, P.H. y Fuller, S.J. 1991. Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.*, 273: 21-37.

Teshima, S., Kanasawa, A. y Koshio, S. 1992. Supplemental effects of methionine-enriched plastein in *Penaes japonicus* diets. *Aquaculture*, 101: 85-93.

Tesser, M.B., Terjesen, B.F., Zhang, Y., Portella, M.C. y Dabrowski, K. 2005. Free- and peptide-based dietary arginina supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquacult. Nutr.*, 11: 443-453.

Thebault, H., Alliot, E. and Pastoureaud, A. 1985. Quantitative methionine requirement of juvenile sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 50: 75-87.

Trenzado Romero, C. 2004. Respuesta de crecimiento y actividades del metabolismo intermediario, de una primera generación de truchas y doradas, seleccionadas por la intensidad de su respuesta al estrés. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

**Trenzado, C., Morales, A.E. y de la Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258: 583-593.**

Tung, P. y Shiau, S. 1991. Effects of meal frequency on growth performance of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, fed different carbohydrate diets. *Aquaculture*, 92: 343-350.

Turchini, G.M., Francis, D.S. y De Silva, S.S. 2007. Finishing diets stimulate compensatory growth:

Results of a study on Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquacult Nutr.*, 13(5): 351-360.

Vergara, J.M., Izquierdo, M. Robaina, L. y de la Higuera, M. 1996. Protein sparing effect of lipids in diets for fingerlings of gilthead sea bream. *Fish. Sci.*, 62(4): 624-628.

Walton, M.J., Cowey, C.B., Coloso, R.M. y Adron, J.W. 1986. Dietary requirement of rainbow trout for thryptophan, lisien and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiol. Biochem.*, 2: 161-169.

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

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

Waterlow, J.C. 1984. Protein turnover with special reference to man. *Quart. J. Exp. Physiol.*, 69: 409-438.

Weil, C., Carré, F., Blaise, O., Breton, B. y Le Bail, P.Y. 1999. Differential effect of insulin-like groth factor-I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormona secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology*, 140: 2054-2062.

Wilson, R.P., Robinson, E.H. y Poe, W.E. 1981. Apparent and trae availability of amino acids from common feed ingredients for channel catfish. *J. Nutr.*, 111: 923-929.

Wilson, R.P., Gatlin, D.M. y Poe, W.E. 1985. Postprandial changes in serum amino acids of channel

catfish fed diets containing different levels of protein and energy. *Aquaculture*, 49: 101-110.

Wilson, R.P. 1994. Amino acid requirements of finfish. En *Amino acids in farm animal nutrition*, editado por J.P.F. D'Mello. CAB International, Oxon, pp. 377-399.

Wilson, R.P., Allen, O.W., Robinson, E.H. y Poe, W.E. 1978. Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 108: 1595-1599.

Wright, H.A., Wootton, R.J. y Barber, I. 2007. Compensatory growth in threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) inhibited by experimental *Schistocephalus* infections. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64(5), 819-826.

Yamada, S., Simpson, K.L., Tanaka, Y. y Katayama, T. 1981a. Plasma amino acid changes in rainbow trout *Salmo gairdneri* forced-fed casein and a corresponding amino acid mixture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1035-1040.

Yamada, S., Tanaka, Y. y Katayama, T. 1981b. Feeding experiments with carp fry fed an amino acid diet by increasing the number of feedings per day. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1247-1250.

Yamada, S., Tanaka, Y., Katayama, T., Sameshima, M y Simpson, K.L. 1982. Plasma amino acid changes in *Tilapia nilotica* fed a casein and a corresponding free amino acid diet. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48: 1783-1787.

Zarate, D.D., Lovell, R.T. y Payne, M. 1999. Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquacult. Nutr.*, 5: 17-22.

Zhou, X.-Q., Zhao, C.-R. y Lin, Y. 2007. Compare the effec of diet supplementation with uncoated or coated lisine in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian). *Aquacult. Nutr.*, 13: 457-461.

CONTESTACIÓN DEL  
ILMO. SR. D. EDUARDO GARCÍA PEREGRÍN

Excmo. Sr. Presidente  
Excelentísimos e Ilustrísimos Sres. Académicos  
Señoras y señores

En primer lugar, quiero expresar mi profunda satisfacción y mi agradecimiento a esta Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada por el honor que me ha otorgado al elegirme para presentar al Prof. Manuel de la Higuera en este solemne acto de Ingreso en la misma, como nuevo Académico Numerario. Entre los motivos de esta satisfacción se encuentra el hecho de que mi relación con la enseñanza en esta Facultad comienza precisamente con la primera promoción de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, de la que el Prof. de la Higuera formaba parte. Desde aquellos lejanos años, he intentado siempre transmitir mis conocimientos bioquímicos -más pobres o más ricos, pero siempre creo que ilusionantes- a los alumnos de dicha Licenciatura, así como, con posterioridad, a los de Ciencias Químicas.

Como mandan los cánones, me corresponde por lo tanto poner de manifiesto ante este auditorio en Sesión Pública los méritos del Prof. de la Higuera que llevaron a

la Academia a proponerlo como nuevo miembro de la misma. No obstante, si pretendiera hacer una exposición detallada de ellos me prolongaría excesivamente, con un protagonismo que hoy debe recaer sólo en el nuevo Académico.

El Prof. de la Higuera nació en Granada en 1950, terminando sus estudios de Licenciatura en Ciencias Biológicas en Junio de 1972, y defendiendo su Tesis Doctoral dos años más tarde, en Septiembre de 1974. Este hecho presenta para mí algunas connotaciones dignas de mencionar. Se trataba de la primera Tesis realizada por un biólogo salido de esta Facultad y dirigida, además, por un llorado compañero al que personalmente me unían estrechos lazos de amistad -habíamos sido miembros de la misma promoción en nuestra Licenciatura- y que iba a dejarnos en un futuro muy próximo: el Prof. Murillo Tarravillo.

Recién terminada su Tesis Doctoral, nuestro nuevo Académico deja la Universidad de su Granada natal a la que volverá en 1982, ya como Catedrático. En efecto, el mismo 1974 se marcha a Escocia, como Becario, al Instituto de Bioquímica Marina de Aberdeen. Tras un año de estancia en Escocia se incorpora a la Universidad Complutense de Madrid, donde realiza gran parte de su carrera académica: Prof. Adjunto Interino en 1975, y Prof. Adjunto Numerario en 1977. Con posterioridad (1979) pasa como Prof. Agregado a la Universidad de Córdoba y como Catedrático en 1981 a la de Málaga, para volver definitivamente a Granada en 1982. Si mi memoria no me falla, se trataba del primer alumno de la

primera promoción de Ciencias Biológicas que lograba una Cátedra de Universidad, pionero de una larga lista de compañeros hoy presentes en distintas Facultades y Universidades. También merece la pena resaltar que el Prof. de la Higuera es el primer alumno de Biología formado en esta casa que ingresa en nuestra Academia.

La incorporación del Prof. de la Higuera a nuestra Facultad de Ciencias supuso la creación de un grupo de trabajo sobre Acuicultura que estaba llamado a conseguir enormes éxitos en los años siguientes. Sin ánimo de cansarles, sólo mencionaré que su producción científica se ha plasmado en la dirección de cerca de 20 Tesis Doctorales y en unas 130 publicaciones en revistas de ámbito internacional. Para ello ha contado desde 1979 con numerosos Proyectos de Investigación subvencionados por la C.A.I.C.Y.T., la C.I.C.Y.T, la Junta de Andalucía y el Programa de Agricultura y Pesca de la Comisión Europea. Muchos de estos Proyectos se han llevado a cabo en colaboración con otras Universidades españolas (Autónoma y Complutense de Madrid, Valencia, Murcia, Las Palmas de Gran Canaria) y extranjeras (Gran Bretaña y Noruega). Yo mismo tuve la oportunidad y el honor de colaborar con él en un Proyecto para estudiar las repercusiones metabólicas de distintas modificaciones introducidas en la dieta para anguilas.

Pero su labor investigadora interesó también desde el primer momento a la industria piscícola, lo cual le llevó a formalizar Convenios de Investigación con empresas del sector, como Piscifactoría Sierra Nevada, S. L. de Riofrío para estudiar diferentes dietas para el cultivo

del esturión, y con Cultivos Piscícolas Marinos S. A. (CUPIMAR) para el desarrollo de dietas para el lenguado. En este mismo sentido, quisiera destacar que el Prof. de la Higuera ha sido el representante español desde 1995 en el Comité de Gestión del Programa COST-827 para estudiar la ingesta de numerosas especies marinas y el que han participado Bélgica, Finlandia, Francia, Grecia, Islandia, Noruega, Portugal, Suecia, Reino Unido y España. Fruto también de su labor investigadora, el Prof. de la Higuera es autor de 4 patentes de invención y consultor de unas 20 revistas científicas de ámbito internacional en el campo de la Fisiología y la Nutrición, así como Experto-Asesor del Plan Nacional de I+D en el área de Acuicultura y del Comité Científico de Nutrición Animal de la Comisión Europea. La calidad de sus trabajos y su colaboración con el mundo de la industria son algunos de los aspectos que avalan la labor investigadora básica y aplicada del nuevo académico, tal como le ha sido reconocido recientemente a nivel oficial al concederle el 6º “sexenio” en el campo de la investigación.

Todos somos conscientes de la importancia que la piscicultura está adquiriendo en nuestros días, así como del papel fundamental que va a desempeñar en un futuro no muy lejano, como suministro de proteína de elevada calidad para el consumo humano. El desarrollo y la rentabilidad de la piscicultura dependen, en gran parte, de la obtención de dietas comerciales que satisfagan los requerimientos nutritivos de estos animales y sean aceptadas en cantidades adecuadas para asegurar el máximo rendimiento y la optimización de los índices de productividad. A la hora de formular una dieta artificial para peces, uno

de los principales elementos a tener en cuenta es el carácter carnívoro, más o menos estricto, que tienen la mayoría de las especies actualmente cultivadas o potencialmente cultivables a corto y medio plazo. Esta circunstancia obligó en principio a la inclusión en dichas dietas artificiales de una elevada cantidad de proteína, en orden a satisfacer los requerimientos de este tipo de nutriente en los animales acuáticos, que oscilan entre el 40 y el 55% de la dieta, dependiendo de la especie y de la fase del ciclo biológico.

La principal fuente proteica de una dieta para peces ha sido clásicamente la propia harina de pescado. Sin embargo, este producto se ha encarecido notablemente durante los últimos años debido a su fuerte demanda y a las severas restricciones impuestas en su producción. De aquí el interés mostrado por la industria en el estudio de la posible sustitución, al menos parcial, de la harina de pescado por otras fuentes proteicas más baratas cuya calidad podría mejorarse mediante tratamientos tecnológicos apropiados, incluyendo su suplementación con aminoácidos esenciales o mediante otras tecnologías adecuadas.

Una segunda posibilidad para reducir el coste del componente proteico de la dieta para peces carnívoros (y que no excluye a la anterior) se basa en la evidencia abrumadora de que la mayoría de estas especies usan una parte importante de su proteína dietaria con fines energéticos y no plásticos, como sería de esperar. Esto ha llevado a realizar numerosos intentos de sustituir parte de la proteína dietaria por una fuente energética alternativa

más barata, reduciendo los costes sin que se resienta el rendimiento. Dadas las limitaciones que muchos peces tienen para usar los glúcidos de la dieta, han sido las grasas las que han centrado la atención en este campo, habiéndose demostrado ya su eficacia hasta ciertos niveles puesto que provoca un ahorro proteico sin que se resienta el crecimiento de los animales, a la vez que constituye una fuente de suministro de ácidos grasos esenciales y de otros nutrientes indispensables como ciertas vitaminas liposolubles.

Sirvan estas sencillas consideraciones para poner de manifiesto el interés y la dificultad que acompañan a la línea de trabajo desarrollada por el Prof. de la Higuera. Aunque en su Discurso de Ingreso ha resaltado el papel de los aminoácidos como unidades estructurales del crecimiento de los peces, los temas y aspectos estudiados por el nuevo académico son mucho más amplios. Sin pretender señalar todos ellos, sí me gustaría destacar los siguientes.

1.- Sobre diversas especies ha estudiado el control de la ingesta *ad libitum*, los ritmos circadianos de la alimentación, la selección del método y la frecuencia de alimentación más idóneos, la influencia de los diferentes factores nutritivos, etc.

2.- Como fuentes alternativas a la harina de pescado ha utilizado una gran variedad de ellas tan diversas como almidón, altramuz, caseína, girasol, gluten de maíz, gluten de trigo, harina de carne, levadura, lombriz roja, patata o soja tratada (entera, desengrasada y/o concentrada).

3.- La utilización de estas fuentes ha supuesto el manejo de una compleja metodología relacionada con el empleo de distintos marcadores y la determinación de numerosas actividades enzimáticas como índices de las posibles modificaciones del metabolismo intermediario de acuerdo con el estado de desarrollo del animal. En este sentido, el Prof. de la Higuera ha estudiado:

a) la influencia de la composición de la dieta en relación con el estado de desarrollo del animal (dietas para el “destete” en el lenguado, dietas prácticas para el cultivo del esturión).

b) la influencia de la suplementación a la dieta de aminoácidos esenciales en anguila, carpa, dorada y trucha, así como de distintos tipos de grasas en anguila, etc.

c) la influencia de la edad sobre el recambio proteico hepático y muscular en trucha.

d) la influencia de la edad y del sexo sobre el contenido en ácidos grasos en esturión.

e) el efecto de la relación proteína/energía y del contenido en ácidos grasos sobre la reproducción en lubina.

f) la influencia de la composición de la dieta sobre el metabolismo intermediario de los reproductores en lubina y trucha común.

g) la influencia del grado de insaturación de los ácidos grasos sobre las actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo.

h) la selección de una línea de baja respuesta al estrés en trucha y dorada, para contribuir de esta forma al llamado “bienestar animal”.

4.- La utilización de las diferentes dietas le ha exigido el manejo y, en muchos casos, la puesta a punto

de la correspondiente tecnología para su fabricación, especialmente en el caso de una dieta inerte para el inicio de la alimentación en lenguado, las técnicas de suplementación de aminoácidos esenciales en diversas especies, el empleo de saborizantes en trucha y lenguado, etc. En cualquier caso, esta tecnología ha estado acompañada de las correspondientes pruebas de palatabilidad y del estudio de la composición corporal del animal ensayado.

5.- Como resumen de la amplitud de la investigación realizada por el Prof. de la Higuera en el campo de la acuicultura podríamos destacar la variedad de especies animales sobre las que ha investigado alguno de sus aspectos nutricionales: anguila, carpa, dentón, dorada, esturión, lenguado, lubina, trucha arco-iris y trucha común, así como en la ostra plana.

Permítaseme ahora hacer algunas consideraciones de otro tipo sobre la investigación en general y la desarrollada por el Prof. de la Higuera en concreto. A medida que van avanzando los conocimientos científicos se va haciendo más necesaria una reflexión personal que intente ponerlos al servicio del hombre. De aquí la importancia que está tomando la ética en la investigación, reclamada por la propia ciencia que tiene al hombre como sujeto, a la vez que su creador y su destinatario. Hace ya más de medio siglo, P. Teilhard de Chardin escribía: *“Hemos de decidirnos a admitir que el Hombre no está terminado todavía en la Naturaleza, no está todavía completamente creado, sino que, en nosotros y en torno a nosotros, sigue todavía en plena evolución... La investigación es la expresión misma de ese esfuerzo evolutivo, no solamente para subsistir, sino también para ser más,*

*no solamente para sobrevivir, sino para supervivir irreversiblemente”.*

El hombre tiene necesidad de conocer la verdad, tiene “hambre de verdad”. Pero la adquisición de una verdad abre, normalmente, nuevos interrogantes que nos impulsan a seguir buscando para alcanzar nuevas respuestas. Por eso el hombre trata de ir aumentando sus conocimientos a lo largo de toda su vida y a lo largo de toda la historia. Hoy día, estamos entrando en una nueva etapa de la humanidad en que la cultura y la investigación deben estar conformadas por una ética de la responsabilidad, lo que nos exige a su vez una nueva clase de humildad relacionada con la magnitud de nuestro poder. Nuestra mayor amenaza hoy día es el exceso de éxito. El actual discurso ecológico y ambiental tiene su base en el reconocimiento de la vulnerabilidad del planeta Tierra y del universo en su conjunto (la llamada macrovulnerabilidad) junto con la vulnerabilidad de cada individuo (la llamada micro-vulnerabilidad). Ambas implican el derecho a la protección y a la seguridad, tanto a escala universal como individual. Es el conjunto de la sociedad quien ha de ser sujeto de la ética de la responsabilidad.

Pero, por otra parte, la investigación ha dejado de ser en nuestros días una actividad meramente personal o privada para convertirse en una actividad institucional. En el actual momento histórico, existe una íntima relación entre la investigación, la técnica y la sociedad. El investigador se siente obligado en cierto modo a investigar lo que le pide la sociedad que sufraga sus gastos,

usando la técnica cada vez más sofisticada que se va introduciendo aprovechando los conocimientos aportados en investigaciones anteriores. Se trata de una especie de circuito que funciona en los dos sentidos y en la que los investigadores están inmersos, quieran o no quieran. Como resultado de esta relación, en la actualidad no existe un campo puramente neutro para la investigación dominado por sus propias leyes. De ahí la aparición y manejo del concepto de I+D+i (investigación + desarrollo experimental + innovación), junto con los de difusión tecnológica y transferencia de tecnología.

Pues bien, la inversión de medios económicos en investigación tiene en cuenta, cada vez más, los intereses de las empresas privadas que financian las dos terceras partes del total de la investigación en los países desarrollados. De aquí que uno de los principales problemas éticos que se plantean actualmente en este campo es que la I+D+i se suele relacionar con el afán de lucro derivado de los intereses de estas empresas, en lugar de tratar de paliar los problemas sociales que afectan más gravemente a la humanidad. Sin embargo, estimo que en su quehacer diario, el investigador no debe prescindir del mundo de los valores, puesto que todo saber implica responsabilidad moral. Desde mi punto de vista, el verdadero científico no es aquel que conoce todo lo que técnicamente puede realizarse, sino aquel que es capaz de autocensurarse y no llevar a cabo lo que sabe que es perjudicial al ser humano como persona o a la integridad del ecosistema Tierra del que forma parte el propio hombre.

La aplicación de los grandes principios de la Bioética a la actual I+D+i nos puede conducir a las siguientes consideraciones:

1.- El *principio de justicia* nos señala qué tipo de I+D+i debería ser prioritario para atender a las poblaciones más vulnerables del mundo. En el campo de la alimentación o la energía, si la I+D+i se hubiera dirigido a resolver los grandes problemas agroalimentarios, en buena parte de la población mundial habría desaparecido el problema del hambre.

2.- El *principio de no-maleficencia* se traduciría de modo resumido en evitar a la humanidad y a toda la naturaleza los posibles daños derivados del poder destructivo que muchos avances en I+D+i representan. Prueba de ello son los intensos debates éticos asociados a temas relacionados con la manipulación genética de la especie humana o de plantas y animales utilizados en la alimentación (alimentos transgénicos).

3.- El *principio de beneficencia* se podría concretar en suministrar a los países en vías de desarrollo la I+D+i que les permitiera incrementar su propio desarrollo sostenible, teniendo en cuenta su contexto cultural y social, evitando que el suministro de productos elaborados en los países del Primer Mundo, en muchos casos con materias primas de los del Tercer Mundo, contribuya a crear una mayor y permanente dependencia de la que difícilmente van a poder salir.

4.- Por último, el *principio de autonomía* nos lleva a considerar que los individuos o colectivos de los servicios derivados de una determinada I+D+i no son entes pasivos, sino sujetos protagonistas de su propio desarrollo. Se pretende así que todos los pueblos, con su

variedad de culturas, puedan determinar lo que es bueno para todos sus ciudadanos mediante un debate abierto y sereno, expresando su consentimiento antes de que otros tomen decisiones que les afecten directamente.

Pues bien, el análisis y la aplicación de los cuatro grandes principios de la Bioética al proceso de I+D+i en el campo concreto de la acuicultura desarrollado por el Prof. de la Higuera nos permite aseverar que estos principios se cumplen con una gran meticulosidad. Los resultados obtenidos durante sus años de trabajo le han permitido la mejora y abaratamiento de dietas para muy diferentes especies de peces, lo cual llevará consigo el aumento de su producción y explotación comercial. Estos conocimientos, aplicados según el *principio de justicia*, contribuirán a resolver importantes problemas de la alimentación básica en países que tienen necesidades perentorias. La creciente globalización de la I+D+i permitirá producir, distribuir y consumir bienes y servicios para todos los mercados mundiales, regidos por unas normas de ámbito universal.

El *principio de no-maleficencia* está claramente implicado en los temas de I+D+i: cuando su aplicación produce algún daño, habrá que suspenderla. No es éste el caso de la acuicultura, tal como la ha desarrollado el Prof. de la Higuera. Aquí lo que se persigue es obtener una fuente de alimentación humana cuya utilización no conlleve daño alguno para sus consumidores, evitando posibles manipulaciones que puedan afectarlos, bien por la eliminación total o la simple deficiencia de componentes esenciales para el consumo humano, bien por la adi-

ción de determinadas sustancias que, siendo positivas para el crecimiento de los peces, pudieran presentar efectos negativos a la hora de su consumo por el hombre.

En tercer lugar, teniendo en cuenta que alrededor de las tres cuartas partes de la superficie del planeta Tierra están ocupadas por el agua, hábitat en el que viven las especies animales estudiadas por el Prof. de la Higuera, los conocimientos derivados de su investigación significarán un amplio campo de aplicación a nivel mundial, por lo que tendrán beneficios muy importantes sobre el modelo de alimentación de una buena parte de la humanidad, cumpliendo así el *principio de beneficencia* antes señalado.

Por último, el desarrollo de la acuicultura se está canalizando a través de organizaciones internacionales como aquellas en que ha colaborado nuestro nuevo académico. De acuerdo con el *principio de autonomía*, dichas organizaciones deberán ir incluyendo entre sus miembros a aquellos países menos desarrollados, propiciándole los medios oportunos para una acuicultura sostenible, a pesar de las carencias que puedan presentar en otras tecnologías más avanzadas. De este modo, al tener en cuenta la voz de estos países se estará contribuyendo, al menos en parte, a evitar el aumento de las desigualdades sociales a escala universal.

En definitiva, la labor desarrollada por el Prof. de la Higuera está perfectamente conformada por una nueva ética de la responsabilidad, tal como la sociedad actual pide a sus investigadores. Hoy día no podemos afirmar

que la naturaleza es sólo un medio, como decía Kant, sino también que de algún modo se ha convertido en un fin. Kant dijo que los seres humanos somos fines y no sólo medios; ahora cabría decir que la naturaleza es fin y no sólo medio. Con lo cual resulta que la vieja imagen de representar los fines y los medios como dos clases dicotómicas que engloban, respectivamente, a personas y cosas, ya no es del todo cierta. La clase de los fines incluye a los seres humanos y a las cosas (aunque ambos sean fines de modo distinto). Y la clase de los medios incluye también a las cosas y a los seres humanos (aunque ambos sean medios de modo distinto). Las consecuencias éticas de estos nuevos planteamientos aún no han hecho más que entretenerse.

Actualmente, además del sentido de responsabilidad por lo realizado en el pasado y por nuestros comportamientos del presente, es importante también el sentido de responsabilidad de cara al futuro, anticipando las consecuencias de nuestros actos. Esto implica una ética que insista en la responsabilidad de nuestra solicitud para con los demás, pero que no se limite al campo de la relación entre dos personas o dentro de un grupo, sino que se preocupe por el futuro, que incluya a las generaciones futuras. Hans Jonas ha expresado un “nuevo imperativo categórico” que ha sustituido al clásico “imperativo categórico de Kant”: “*Obra de tal modo que los efectos de tu acción sean compatibles con la permanencia de una vida auténticamente humana en la Tierra*”. La existencia del planeta, la duración de la vida, etc. dependen cada vez más de las decisiones humanas. Por eso, es necesaria una ética que pueda servirnos de orientación ante las capaci-

dades extremas que hoy poseemos a partir del principio de responsabilidad, es decir, teniendo en cuenta los efectos de nuestras acciones sobre los demás y sobre la naturaleza para preservar la existencia de la vida humana. De la misma manera, J. Reiter presentó una especie de decálogo sobre estos temas de ética e investigación, algunos de cuyos puntos más importantes nos dicen que *“las intervenciones en la naturaleza están permitidas, pero han de realizarse con un gran sentido de responsabilidad... La libertad de investigación no es absoluta: tiene como límite el bien de la humanidad”*. Así mismo, F. Böckle escribía que *“el progreso técnico por sí mismo no puede dar un sentido a la vida ni fijar sus valores. Si el progreso científico y técnico ha de servir al hombre, es necesario que esté guiado por un espíritu de responsabilidad fundado en el respeto al hombre y a su libertad”*. La lectura de estos párrafos hace innecesario cualquier comentario sobre la importancia de un claro sentido ético en la moderna investigación biológica.

Todos estamos obligados a asegurar para nuestros descendientes una mejor calidad de vida. La investigación debe estar preñada de una verdadera ética de la responsabilidad, para lo cual los científicos debemos acostumbrarnos a mirar más allá de nuestras propias experiencias y trascender a lo que significan para toda la sociedad. Sinceramente, creo que todas estas características se dan en el Prof. de la Higuera, por lo que, en nombre de esta Academia, le doy la bienvenida con nuestra más efusiva felicitación.

Muchas gracias.