

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRÓNOMICA I DEL
MEDI NATURAL



EFFECTO DE LA TRIPLOIDÍA Y EL PIENSO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA DEL SALMÓN ATLÁNTICO

Trabajo fin de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y
del Medio Rural

Alumna: Andrea Merí Martí

Tutora: Silvia Martínez Llorens

Cotutor: David Sánchez Peñaranda

Curso académico: 2018-2019

Valencia, Noviembre de 2018



EFFECTO DE LA TRIPLOIDÍA Y EL PIENSO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA DEL SALMÓN ATLÁNTICO

RESUMEN

Tanto la maduración sexual previa al despesque como los escapes tienen un impacto significativo sobre la sostenibilidad económica y ambiental de la producción del salmón atlántico (*Salmo salar L.*). El inicio de la maduración sexual durante el engorde disminuye el crecimiento debido a que parte de la energía obtenida del alimento es utilizada para el desarrollo gonadal, además de suponer también una disminución de la calidad de la carne. Por otro lado, los escapes accidentales de piscifactoría pueden afectar a las poblaciones naturales, influyendo tanto ecológicamente como genéticamente. La producción de peces estériles mediante la creación de individuos triploides se ha considerado una opción para el control reproductivo y la contención genética en la acuicultura del salmón atlántico. Como en el caso de otras especies estériles producidos artificialmente, poco se sabe sobre los requerimientos nutricionales del salmón triploide. Identificar las condiciones óptimas para la producción de triploides es de alta importancia, así como lo es la caracterización de las consecuencias fisiológicas y morfológicas de la triploidía en la fisiología digestiva. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar los efectos que produce la triploidía en el salmón atlántico (*Salmo salar L.*) sobre la actividad biológica de las enzimas digestivas. Además, se ha evaluado si la alimentación puede compensar posibles déficits digestivos producidos por la triploidía. Con este fin, peces diploides y triploides fueron alimentados con una dieta estándar y una experimental, en la cual el 45 % de la harina de pescado fue sustituida por proteínas hidrolizadas. El estudio se realizó en la Estación de Investigación Acuícola de Kårvika (Tromsø, Noruega), desde el inicio de la alimentación hasta la fase de esmoltificación. Cada mes (a excepción de los primeros meses, que fueron dos veces) se sacrificaron cinco peces por tanque para la determinación de la actividad digestiva de la pepsina, tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa y proteasa alcalina total. Además, se determinó la actividad de la pepsina al pH gástrico medido en los muestreos de octubre y noviembre. Los análisis mostraron que a nivel de ploidía la actividad enzimática digestiva fue similar, a excepción de la actividad de la fosfatasa alcalina, que registró mayores niveles en peces triploides. Por otro lado, la dieta experimental alteró la actividad enzimática de las proteasas pancreáticas y la fosfatasa alcalina, pero sin diferencias entre ploidías. Finalmente, la dieta experimental no fue suficiente para compensar los déficits fisiológicos provocados por la triploidía, por lo que la búsqueda de dietas alternativas, que respondan a la fisiología digestiva de los salmones triploides, son necesarios para la viabilidad de esta herramienta biotecnológica en la producción acuícola.

Palabras clave: Salmón, enzimas, triploidía, diploidía.

Alumna: Andrea Merí Martí

Tutora Académica: Silvia Martínez Llorens

Cotutor: David Sánchez Peñaranda

Valencia, Noviembre de 2018

EFFECT OF TRIPLOIDY AND DIET IN THE DIGESTIVE ENZYMATIC ACTIVITY OF ATLANTIC SALMON

ABSTRACT

Both sexual maturation prior to fishing and escapes have a significant impact on the economic and environmental sustainability of the Atlantic salmon production (*Salmo salar L.*). The onset of sexual maturation during fattening decreases the growth because part of the energy obtained from the diet is used for gonadal development, in addition to also supposing a decrease in the quality of the meat. On the other hand, accidental escapes from fish farms can affect natural populations, influencing both ecologically and genetically. The production of sterile fish by the creation of triploid individuals has been considered an option for reproductive control and genetic containment in Atlantic salmon aquaculture. As in the case of other sterile artificially produced species, little is known about the nutritional requirements of triploid salmon. Identifying the optimal conditions to produce triploids is of great importance, as is the characterization of the physiological and morphological consequences of triploidy in digestive physiology. Therefore, the objective of this work has been to study the effects produced by triploidy in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) on the biological activity of digestive enzymes. In addition, it has been evaluated whether the diet can compensate for possible digestive deficits produced by the triploidy. To this end, diploid and triploid fish were fed a standard and an experimental diet, in which 45 % of the fish meal was replaced by hydrolysed proteins. The study was conducted at the Kårvika Aquaculture Research Station (Tromsø, Norway), from the start of feeding until the phase of smoltification. Each month (except for the first months, which were twice), five fish were sacrificed per tank for the determination of the digestive activity of pepsin, trypsin, chymotrypsin, alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase and total alkaline protease. In addition, the activity of pepsin was determined at gastric pH measured in the October and November sampling. The analysis showed that at the level of ploidy the digestive enzymatic activity was similar, except for the activity of alkaline phosphatase, which registered higher levels in triploid fish. On the other hand, the experimental diet altered the enzymatic activity of pancreatic proteases and alkaline phosphatase, but without differences between ploidies. Finally, the experimental diet was not enough to compensate for the physiological deficits caused by the triploidy, so the search for alternative diets, which respond to the digestive physiology of the triploid salmon, are necessary for the viability of this biotechnological tool in the production aquaculture.

Key words: Salmon, enzymes, triploid, diploid.

Alumna: Andrea Merí Martí

Tutora Académica: Silvia Martínez Llorens

Cotutor: David Sánchez Peñaranda

Valencia, November of 2018

EFFECTE DE LA TRIPLOÏDIA Y LA DIETA EN L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DIGESTIVA DEL SALMÓ ATLÀNTIC

RESUM

Tant la maduració sexual prèvia al despesque com les fugues tenen un impacte significatiu sobre la sostenibilitat econòmica i ambiental de la producció del salmó atlàntic (*Salmo salar L.*). L'inici de la maduració sexual durant l'engreixament disminueix el creixement a causa de que part de l'energia obtinguda de l'aliment és utilitzada per al desenvolupament gonadal, a més de suposar també una disminució de la qualitat de la carn. D'altra banda, les fugues accidentals de piscifactories poden afectar les poblacions naturals, influint tant ecològicament com genèticament. La producció de peixos estèrils mitjançant la creació d'individus triploides, s'ha considerat una opció per al control reproductiu i la contenció genètica en l'aqüicultura del salmó atlàntic. Com en el cas d'altres espècies estèrils produïts artificialment, poc se sap sobre els requeriments nutricionals del salmó triploide. Identificar les condicions òptimes per a la producció de triploides és d'alta importància, així com ho és la caracterització de les conseqüències fisiològiques i morfològiques de la triploïdia en la fisiologia digestiva. Per això, l'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar els efectes que produeix la triploïdia en el salmó atlàntic (*Salmo salar L.*) sobre l'activitat biològica dels enzims digestius. A més, s'ha avaluat si l'alimentació pot compensar possibles dèficits digestius produïts per la triploïdia. Amb aquesta finalitat, peixos diploides i triploides van ser alimentats amb una dieta estàndard i una experimental, en la qual el 45 % de la farina de peix va ser substituïda per proteïnes hidrolitzades. L'estudi es va realitzar a l'Estació d'Investigació Aqüícola de Kårvika (Tromsø, Noruega), des de l'inici de l'alimentació fins a la fase de esmoltificació. Cada mes (a excepció dels primers mesos, que van ser dues vegades) es van sacrificar cinc peixos per tanc per a la determinació de l'activitat digestiva de la pepsina, tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa i proteasa alcalina total. A més, es va determinar l'activitat de la pepsina al pH gàstric mesurat en els mostres d'octubre i novembre. Els anàlisis van mostrar que a nivell de ploïdia l'activitat enzimàtica digestiva va ser similar, a excepció de l'activitat de la fosfatasa alcalina, que va registrar majors nivells en peixos triploides. D'altra banda, la dieta experimental va alterar l'activitat enzimàtica de les proteases pancreàtiques i la fosfatasa alcalina, però sense diferències entre ploïdies. Finalment, la dieta experimental no va ser suficient per compensar els dèficits fisiològics provocats per la triploïdia, de manera que la recerca de dietes alternatives, que responguin a la fisiologia digestiva dels salmons triploides, són necessaris per a la viabilitat d'aquesta eina biotecnològica en la producció aqüícola.

Paraules clau: Salmó, enzims, triploïdia, diploïdia.

Alumna: Andrea Merí Martí

Tutora Acadèmica: Silvia Martínez Llorens

Cotutor: David Sánchez Peñaranda

València, Novembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar, a mis tutores, Silvia y David, por ser pacientes conmigo, darme la oportunidad de participar en este trabajo y ayudarme en mi formación, tanto académica como profesional.

También quiero agradecer a mi familia por todo su apoyo incondicional, animarme en este proceso, estar siempre a mi lado, y sobre todo por ser ellos los que han hecho posible que haya llegado a donde estoy ahora. Agradecer a Felip por ser mi respaldo y haber cambiado mi vida. Y, por último, agradecer a mis amigos por su apoyo, sobre todo a Carol por animarme y ayudarme en esta trayectoria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DEL SALMÓN _____	2
1.2. PRODUCCIÓN DE PECES TRIPLOIDES _____	5
1.3. CAMBIOS ASOCIADOS A LA TRIPLOIDÍA _____	6
1.4. LA DIGESTIÓN EN LOS PECES _____	8
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. ANIMALES _____	16
3.2. PRUEBAS _____	18
3.3. TOMA Y EXTRACCIÓN DE ENZIMAS DEL TEJIDO _____	19
3.4. DETERMINACIÓN DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS _____	20
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	22
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIÓN.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo biológico del salmón (Fuente: Orrego, 2015).	1
Figura 1.2. Suministro de salmónidos cultivados, en rojo, y silvestres, en azul (Fuente: MARINE HARVEST, 2016).	2
Figura 1.3. Ciclo de producción del <i>Salmo salar</i> L. (Fuente: FAO, 2018c).	3
Figura 1.4. Riesgos medioambientales (Fuente: Medina, 2018).	4
Figura 1.5. Gametogénesis masculina (A) y femenina (B) en diploide (Fuente modificada: BIOLOGIA Y GEOLOGIA, 2018).	8
Figura 1.6. Esquema del tracto digestivo de un pez (Fuente: Zamora y Rubio, 2009).	9
Figura 1.7. Diferencias entre un pez carnívoro y un pez herbívoro (Fuente: BIOINNOVA, 2018).	10
Figura 3.1. Distribución de los peces en grupos según su ploidía y alimentación.	16
Figura 3.2. El tracto gastrointestinal completo del salmón del Atlántico dividido en diferentes partes.	19
Figura 4.1. Actividad de la pepsina (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidas en cada punto de muestreo (ver Tabla 3.2). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).	23
Figura 4.2. Actividad de proteasa alcalina total (TAP), tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (ALP) (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), <i>Salmo salar</i> L., alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidas en cada punto de muestreo (ver Tabla 3.2). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).	25
Figura 4.3. Actividad total de proteasa alcalina (TAP), tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (ALP) (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), <i>Salmo salar</i> L., alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidos en los dos últimos puntos de muestreo (ver Tabla 3.2: 35 y 38 sdía). Se consideraron cuatro secciones intestinales: ciegos pilóricos (CP), intestino anterior (IA), intestino medio (IM) e intestino distal (ID). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales enzimas digestivas secretadas por los peces (Fuente: Zamora y Rubio, 2009.).....	12
Tabla 3.1. Formulación y composición química de las dietas (G. Reisen, Skretting AS).....	17
Tabla 3.2. Intervalo de muestreo y nomenclatura de las diferentes etapas desde la eclosión hasta el final del período de experimentación.	18
Tabla 3.3. Tabla de muestras recibidas de Nofima (Tromsø, Noruega) en la UPV.....	20
Tabla 3.4. Recta patrón.	21
Tabla 4.1. Cambios en el pH gástrico (\pm SE) a las 35 y 38 semanas después de la alimentación en los cuatro grupos de peces experimentales considerados.....	23

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- **E:** estómago
- **CP:** ciego pilórico
- **IP:** intestino proximal
- **IA:** intestino anterior
- **IM:** intestino medio
- **ID:** intestino distal
- **STD:** dieta estándar con proteína hidrolizada de pescado
- **HFM:** dieta experimental
- **OGMs:** organismos genéticamente modificados
- **TAP:** proteasa alcalina total
- **ALP:** fosfatasa alcalina
- **LAP:** leucina aminopeptidasa
- **CCK:** colecistoquinina
- **dd:** grados día
- **sdía:** semanas después del inicio de la alimentación
- **2n:** diploides
- **3n:** triploides

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*), nativo de noruega, es un pez carnívoro de la familia de los salmónidos (*Salmonidae*). Es eurihalino, es decir, es un animal acuático capaz de vivir en aguas que poseen un amplio rango de salinidad. Además, es considerado un pez anádromo y bentopelágico. El salmón adulto migra desde el mar a ríos de agua dulce para desovar, y de los huevos emergen los alevines, de unos 2 cm, los cuales se alimentan del saco vitelino durante 4-5 semanas hasta que empiezan a alimentarse, y pasan a llamarse “fry”. Al año cambian de color, adquiriendo a ambos lados unas marcas distintivas y pasándose a llamar “parrs”. Dependiendo de la temperatura del río y de la comida disponible, los “parrs” viven en agua dulce entre 2-5 años. Cuando éstos alcanzan una longitud de 18-25 cm, adquieren un color plateado y empiezan la adaptación a la vida en agua salada, pasándose a llamarse “smolt”. Después de 1-3 años en el mar vuelven a los ríos, si es el primer año se les llama “grilse” (maduración precoz), y si es el segundo o posteriores “salmón” (Figura 1.1).

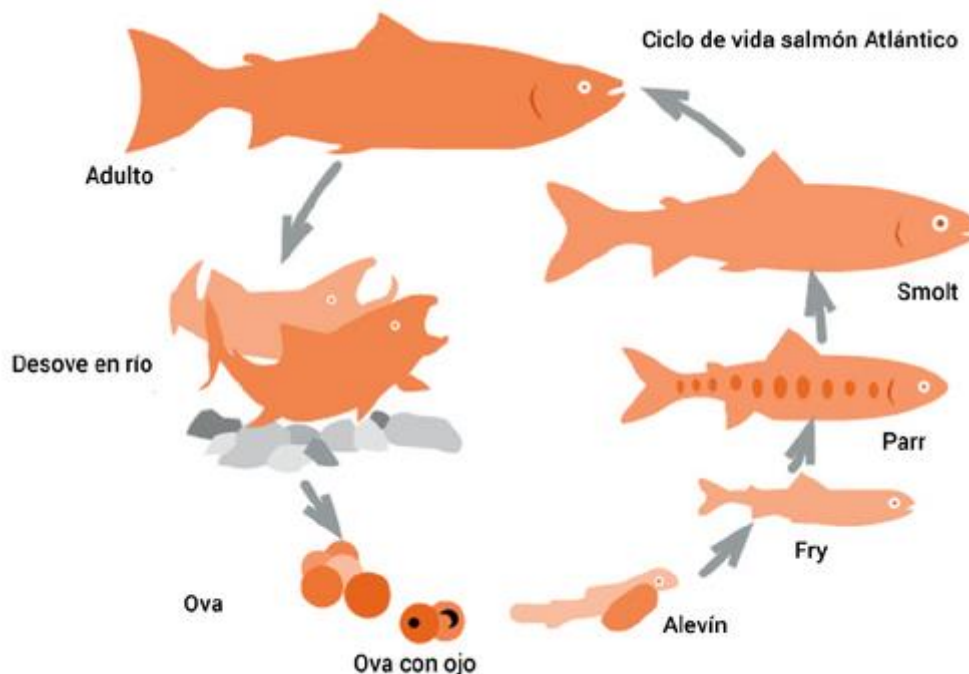


Figura 1.1. Ciclo biológico del salmón (Fuente: Orrego, 2015).

El *Salmo salar L.* silvestre se mueve en el mar por aguas que se encuentran entre los 4 y 12 °C, pero pueden llegar a sobrevivir, en periodos breves, en temperaturas mínimas de -7 °C y máximas de 27,8 °C. En el mar, su hábitat se encuentra entre 0 a 200 m, aunque la media está entre 10 a 23 m. Su distribución geográfica se localiza en el norte del océano Atlántico, el océano Ártico, el mar Báltico, el mar Mediterráneo y el mar Negro. (FAO, 2018a)

1.1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN DEL SALMÓN

En la década de los 70s se inició la producción intensiva de salmón atlántico en Noruega, llegando a ser una de las industrias más importantes de las costas noruegas, según la FAO (2018b). Todo ello fue posible gracias a la introducción de jaulas marinas (plataformas cuadradas construidas de acero y conectadas juntas, o en anillos circulares de plástico), demostrando que el engorde en este sistema resultaba ser más seguro y obteniendo mejores condiciones ambientales que las técnicas utilizadas hasta entonces, tanques en tierra o la utilización de redes o mallas.

En los últimos años, la producción del salmón en acuicultura ha aumentado considerablemente, alcanzando el 60 % de la producción. Las capturas de salmón salvaje rondan entre 700.000 y 1.000.000 toneladas, un volumen sensiblemente inferior a la producción en piscifactoría. Como ejemplo en 2015 las capturas de salmón salvaje fueron de unas 880.000 toneladas mientras la producción acuícola fue de 2.200.000 toneladas (MARINE HARVEST, 2016).

En la siguiente figura (Figura 1.2) se muestra la comparación de la producción del salmón silvestre y la del salmón de piscifactorías hasta el 2015:

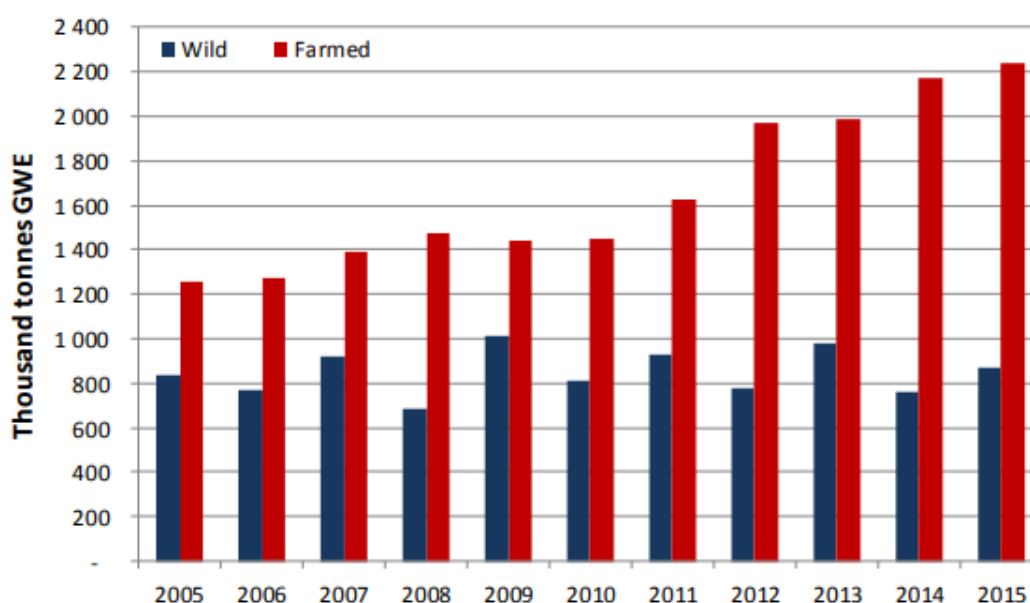


Figura 1.2. Suministro de salmónidos cultivados, en rojo, y silvestres, en azul (Fuente: MARINE HARVEST, 2016).

La localización de las piscifactorías, necesitan unas condiciones ambientales concretas, como son temperaturas del agua entre 8 y 14 °C, encontrarse en zonas protegidas como por ejemplo son los fiordos y unas condiciones de calidad del agua (O₂, pH, CO₂, salinidad, alcalinidad, conductividad, residuos nitrogenados, etc.) que favorezcan el crecimiento óptimo del animal. Hoy en día, las localizaciones que reúnen estas características se encuentran en países como Noruega, Canadá y Escocia, aunque actualmente empiezan a aparecer altas producciones de salmón en Nueva Zelanda, Islandia, Irlanda, Australia.

Su producción está basada en el ciclo biológico del salmón, llegando hasta la edad de 3 años, como se observa en la figura 1.3. Primero, se seleccionan los reproductores y son transferidos a tanques o a jaulas de agua dulce, en otoño. Más tarde, se procede a la extracción de gametos entre octubre-enero y una vez fertilizados los huevos, se incuban y posteriormente eclosionan surgiendo los alevines. Estos son alimentados con piensos formulados, que con el fotoperiodo adecuado para cada etapa del desarrollo van creciendo, pasando por sus diferentes etapas (Fry, Parr, y Smolt) hasta alcanzar la esmoltificación (agosto). Cuando el pez (Smolt) es capaz de sobrevivir en agua salada (enero), con un peso entre 40 y 120 g, se trasladan a jaulas en el mar donde engordarán durante 2 años hasta alcanzar un tamaño mínimo de 2 kg. Posteriormente, se seleccionarán los reproductores para el próximo ciclo, y el resto de los peces se despescarán para su venta (FAO, 2018c).

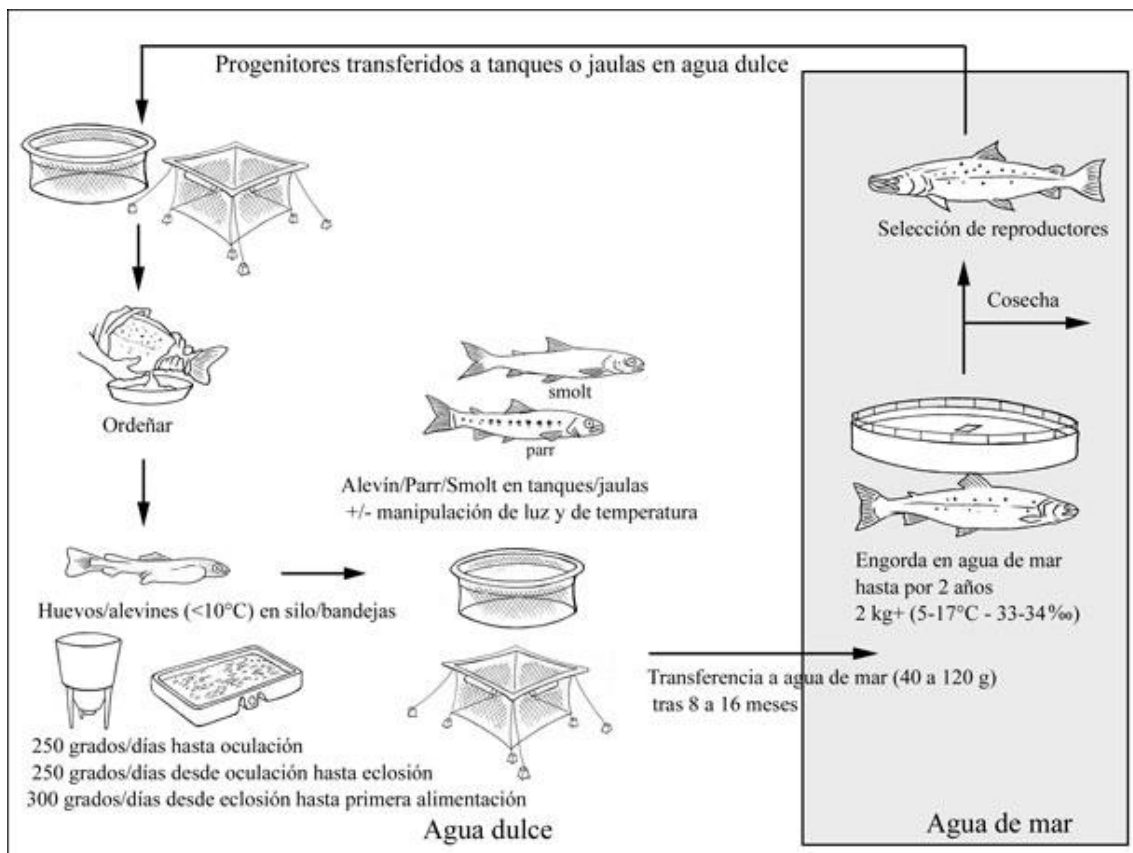


Figura 1.3. Ciclo de producción del *Salmo salar* L. (Fuente: FAO, 2018c).

Las necesidades y la demanda del salmón van en aumento, por lo que la pesca del salmón silvestre ya no es viable debido a la sobreexplotación, actualmente existente de los caladeros. Por ello, las piscifactorías son una alternativa necesaria para mantener las existencias del salmón salvaje, así como la biodiversidad del océano.

Por otro lado, existen diversas preocupaciones de impacto ambiental por la producción intensiva (Figura 1.4), ya que no consigue ser totalmente sostenible. Algunos problemas medioambientales son la contaminación por nutrientes de los sistemas acuáticos, la contaminación química por el uso de tratamientos químicos en las instalaciones, o el efecto sobre los peces silvestres por el escape de individuos. Por otro lado, los piensos utilizados en la alimentación necesitan la inclusión de harinas y aceites de pescado, por lo que requiere el

consumo de pescado para la producción de pescado, afectando negativamente a la sostenibilidad del sistema (FAO, 2018c).

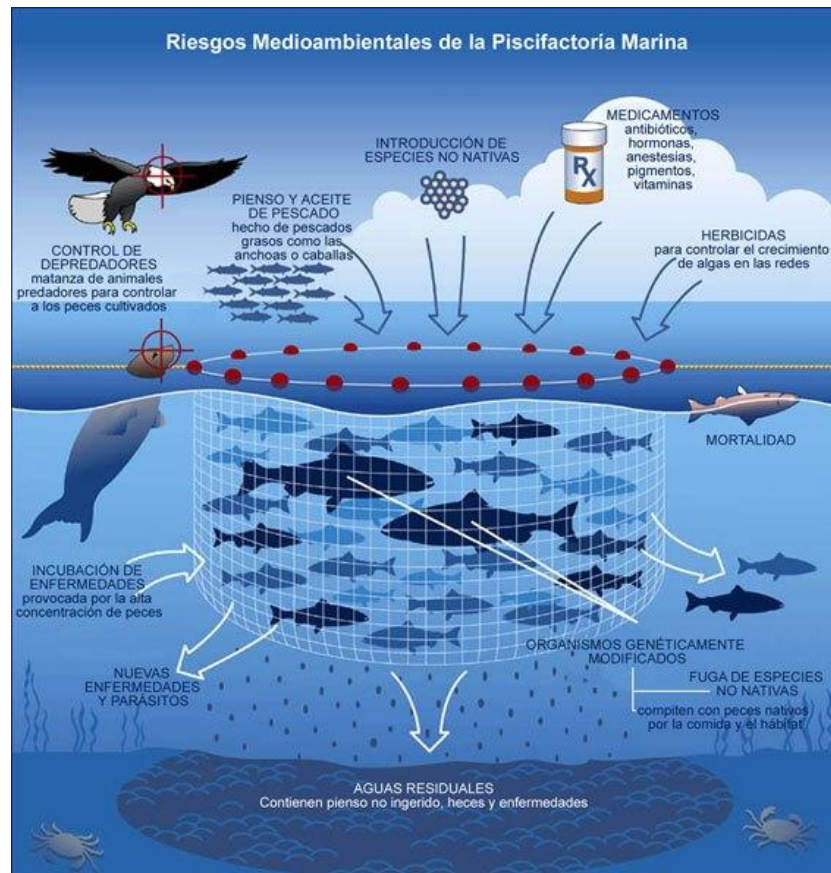


Figura 1.4. Riesgos medioambientales (Fuente: Medina, 2018).

El impacto más importante en la acuicultura es el escape de los peces, un ejemplo se encuentra en la industria acuícola chilena. Los escapes pueden llegar hasta al 1,5 % de la biomasa producida. Los peces criados de forma intensiva son mayores en tamaño que los silvestres, lo que les supone una ventaja reproductiva sobre los salvajes. Esta ventaja, repercute sobre la población del salmón silvestre, ya que la descendencia de salmones de piscifactoría presenta una mayor mortalidad de las crías. Otro efecto a considerar es la competencia por la alimentación. Los peces criados en cautividad están bajo condiciones de hacinamiento, lo que los hace agresivos y, además, tienen una mayor demanda de proteína, suponiendo una alteración en la cadena trófica del ecosistema. Finalmente, los peces de granja son más sensibles a las enfermedades, por lo que, al cruzarse con la especie salvaje, la descendencia tiene una menor resistencia a enfermedades (FUNDACIÓN TERRAM, 2004).

Por otra parte, la maduración sexual precoz de los salmones supone un problema, que actualmente afecta a la rentabilidad de la producción. La maduración en el *Salmo salar* L. es bastante compleja, varía en edad y tamaño, ya que se adapta a los diversos entornos en los que se encuentra. El salmón silvestre se beneficia de esta adaptación, pero en la industria acuícola supone pérdidas económicas. La maduración precoz disminuye el crecimiento y la eficiencia de conversión alimenticia, la calidad de la carne, y provoca una mayor susceptibilidad a enfermedades. Actualmente se han desarrollado diversas estrategias para reducir el problema,

como el control del fotoperiodo, mejora genética o la inducción a la triploidía (Good y Davidson, 2016).

1.2. PRODUCCIÓN DE PECES TRIPLOIDES

La poliploidía es el fenómeno por el cual se produce un incremento de la dotación genómica, debido a la presencia de tres o más complementos cromosómicos. La triploidía es el tipo de poliploidía más utilizada en acuicultura y consiste en la presencia de una dotación de 3n cromosomas en lugar de 2n de las células diploides, habituales en la mayoría de los peces teleósteos.

Los principales inconvenientes que se enfrenta actualmente la acuicultura están relacionados con la maduración gonadal, que ocurre a costa del crecimiento somático, y son la reducción en la tasa de crecimiento, y la disminución de la calidad de la carne (Alcántar-Vázquez, 2016). La menor tasa de crecimiento es debido a que un 20-30 % de peces en cautividad, a partir de 1 año de edad y con un peso menor a 1 kg, inician una maduración sexual temprana (Taranger et al., 2010), con lo que la energía ingerida en lugar de dirigirse al crecimiento se destina mayoritariamente a la maduración de las gónadas (Thorpe, 2004). Por otro lado, la menor calidad de la carne se debe a que la maduración temprana induce cambios en la reserva de grasa y, por tanto, cambios en el perfil de ácidos grasos, llegando a obtener una concentración de lípidos mucho mayor en los peces precoces (11,2 %) con una diferencia a los tardíos del 4,2 %, lo que acaba afectando a las propiedades organolépticas de la carne (Johnston et al., 2000).

Los peces triploides se presentan como una solución a la maduración temprana en cautividad, ya que son animales estériles a causa de un mal emparejamiento cromosómico y una mala alineación de los cromosomas homólogos en el proceso de formación y desarrollo de los gametos (Alcántar-Vázquez, 2016). Estudios de índices de crecimiento, entre diploides y triploides, han registrado mejores resultados para los individuos triploides (Tiway et al., 2004). También se ha observado una mayor supervivencia, un ejemplo es el estudio comparativo entre ploidías en el rodaballo, presentando una supervivencia del 91,9 % en diploides y 100 % en triploides (Cal et al., 2006). La calidad de la carne también se ve beneficiada por este tipo de ploidía, ya que según el grado de ploidía influye negativamente en las condiciones organolépticas del producto resultante y en procesos de transformación industrial. Por otro lado, son la solución más eficaz a los problemas de escape de los peces en las piscifactorías, reduciendo sustancialmente el impacto genético negativo sobre las poblaciones de peces silvestres. Por estos motivos, los triploides tienen un gran potencial en explotación, y por ello, es necesario investigar sobre los procesos genéticos y fisiológicos que los caracterizan.

En la acuicultura se han desarrollado técnicas para alterar el número de cromosomas, y así inducir la triploidía. Los procedimientos pueden ser tanto físicos como químicos.

Tratamientos físicos:

- La presión hidrostática: Se trata de un procedimiento bastante efectivo, ya que todos los huevos reciben un tratamiento uniforme, pero solo se puede aplicar a

la vez a un reducido volumen de huevos (Alcántar-Vázquez, 2016). Dentro de una cámara de presión, los huevos se someten a una presión de entre 7.000 y 10.000 lb/in² durante 3-10 min (dependiendo de especie; Hussain et al., 1993).

- Choque de temperatura: Mediante un shock térmico con altas temperaturas (26-36 °C) o bajas (-1-12 °C), dependiendo de la temperatura a la que este el cultivo. La temperatura inhibe la formación de microfilamentos y microtúbulos, deteniendo la división celular y por tanto la división meiótica (Alcántar-Vázquez, 2016).

Tratamientos químicos:

- Colchicina: Es un alcaloide que inhibe, de forma reversible, la división celular mediante la paralización de la polimerización de los microtúbulos.
- Citocalcina B: Es un antibiótico tóxico procedente del hongo *Helminthosporium dematioideum* que inhibe la polimerización de la actina necesaria para la formación del cuerpo polar.
- 6-dimetilaminopurina (6-DMAP): Inhibe la rotación del huso en la división y la expulsión del corpúsculo polar.
- Óxido nítrico: Modifica, de forma reversible, el ciclo celular.
- Cafeína: Inhibe la segunda división meiótica.

Actualmente, el método más rentable para la producción de peces triploides es el choque térmico, ya que no requiere instalaciones con un alto precio y se puede aplicar a un gran volumen de huevos.

En apariencia los peces triploides y diploides son similares, por lo que se han desarrollado técnicas para identificarlos basadas en el aumento de la dotación genética, del tamaño de la célula o del núcleo. Hoy en día, la más fiable es la citometría de flujo, identificando de forma precisa entre células sanguíneas triploides y diploides. No obstante, la más utilizada, si no se dispone de las anteriores, es la medición nuclear y celular de eritrocitos para su identificación (Alcántar-Vázquez, 2016).

1.3. CAMBIOS ASOCIADOS A LA TRIPLOIDÍA

La triploidía produce cambios tanto a nivel fisiológico como morfológico (Zamani et al., 2006). Las células triploides son mucho más grandes debido al aumento del volumen del citoplasma como respuesta al aumento de la dotación cromosómica. En cambio, un aumento en el volumen de las células no implica un aumento de su organismo, ya que el tamaño corporal y de los órganos de los triploides son similares a los de los peces diploides, como consecuencia de una reducción en el número de células (Alcántar-Vázquez, 2016). Una cantidad de células menor conlleva a una disminución del consumo de oxígeno (Benfey y Biron, 2000), y por tanto una temperatura metabólica óptima inferior a la de los diploides. Por ello, presentan una menor tolerancia a altas temperaturas (Alcántar-Vázquez, 2016).

También los requisitos nutricionales se encuentran alterados, presentando diferencias en el crecimiento (Carter et al., 1994) y en la respuesta al estrés (Benfey y Biron, 2000). El aumento de tamaño de las células implica que los triploides tienen eritrocitos (glóbulos rojos) más grandes, provocando una disminución de su número para conseguir un mismo nivel de hematocrito que los diploides. Además, este aumento provoca una reducción del área superficial de los eritrocitos en comparación al volumen, haciendo que esta área sea menor para el intercambio gaseoso.

Se ha demostrado que los peces triploides en situaciones de estrés ambiental, como cambios de temperatura y de oxígeno, tienen una mortalidad más elevada en relación con los diploides. Ya que a elevadas temperaturas la capacidad de utilización de las vías metabólicas anaerobias se ven comprometidas. No obstante, en el salmón atlántico expuesto a estrés no se demostraron diferencias significativas en relación con la capacidad de captación de oxígeno, ni en la respuesta hematológica.

El crecimiento es más lento en los peces triploides, las células de mayor tamaño presentan un área superficial menor en relación con su volumen. Este crecimiento lento se manifiesta principalmente en los primeros periodos del desarrollo, al afectar tanto a la división mitótica como al transporte a través de membrana. Sin embargo, durante la maduración sexual registran mejores tasas de crecimiento que los diploides, ya que la poca energía destinada al crecimiento no gonadal es mejor aprovechada, presentando mejores tasas de conversión.

El desarrollo de las gónadas (Figura 1.5), también muestran diferencias. Las espermatogonias (células masculinas que se diferenciarán hasta formar los espermatozoides) y las ovogonias (células femeninas que se diferenciarán hasta formar los óvulos) son las únicas células que se dividen por meiosis. La triploidía, durante la meiosis I, provoca un error en el movimiento y la unión de los cromosomas homólogos, provocando que los peces triploides sean estériles. Los machos tienen un mayor desarrollo gonadal que las hembras, siendo fisiológicamente fértiles, pero genéticamente estériles, ya que el desarrollo de las gónadas y el nivel de andrógenos pueden llegar a ser similares a los registrados en diploides. Además, pueden llegar a producir espermatozoides funcionales, pero aneuploides (estériles), produciendo embriones que no subsisten a la eclosión. Las hembras son estériles completamente, ya que los ovarios permanecen en la etapa primaria de desarrollo por la baja concentración de gonadotropinas y otros esteroides sexuales. Además, la evolución de los ovocitos se ve afectada por una meiosis temprana (Alcántar-Vázquez, 2016).

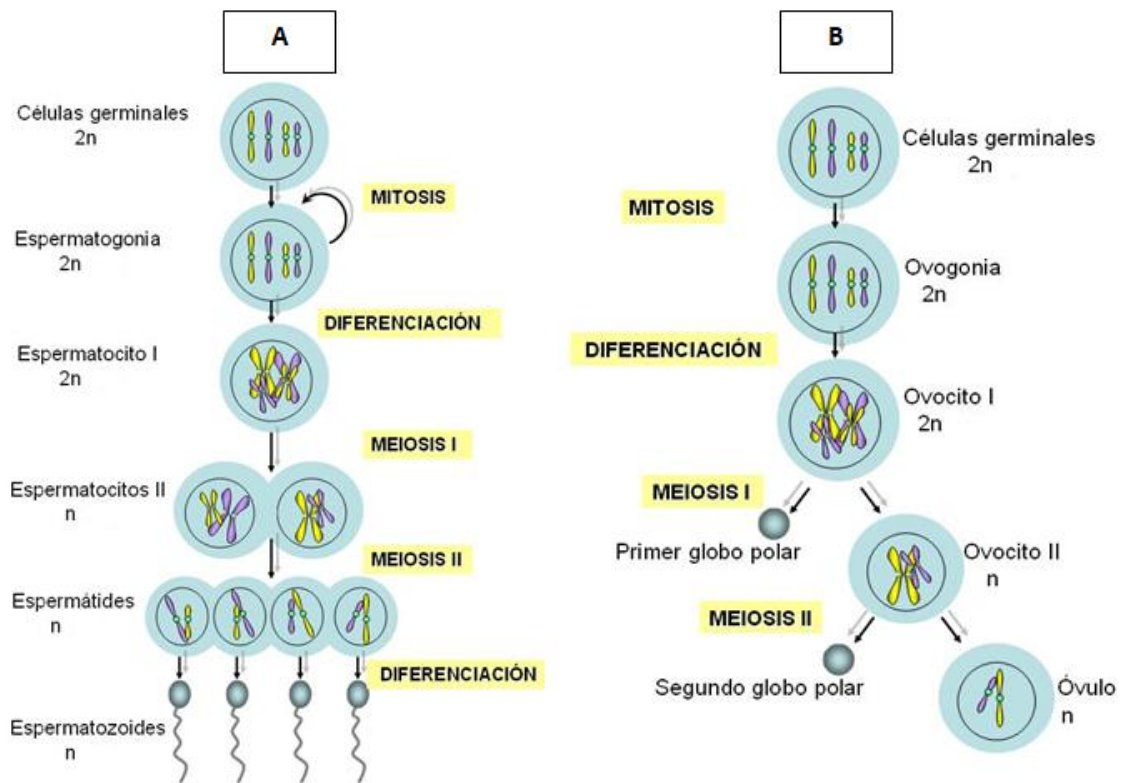


Figura 1.5. Gametogénesis masculina (A) y femenina (B) en diploide (Fuente modificada: BIOLOGIA Y GEOLOGIA, 2018).

Respecto a la fisiología digestiva de los individuos triploides, en la actualidad, no hay numerosos estudios. Se ha observado que los individuos triploides de bacalao atlántico (*Gadus morhua*), tienen un menor número de ciegos pilóricos, además de un intestino más corto y un mayor número de células caliciformes que los diploides (Peruzzi et al., 2013). Estudios en salmón, muestran una longitud intestinal como número de ciegos inferior (Peruzzi et al., 2015). También se ha observado modificaciones en la microbiota intestinal de intestinos triploides (Cantas et al., 2011), lo que puede llegar a afectar la digestión, la absorción o el transporte de nutrientes (Liu et al., 2014), la eficiencia de la alimentación (Sunde et al., 2001) y por lo tanto, al crecimiento o la salud de los peces triploides. Se han realizado estudios que demuestran que los requerimientos de fósforo e histidina en los triploides son más elevados (Taylor et al., 2014; Sambraus et al., 2017). Por todo ello, se hace necesaria la utilización de una dieta nutricional distinta a la de los diploides.

1.4. LA DIGESTIÓN EN LOS PECES

El crecimiento de los peces se ve altamente relacionado con su alimentación, y esta depende tanto de la anatomía como de la funcionalidad del sistema digestivo.

Los peces según su alimentación se clasifican principalmente en carnívoros, herbívoros y omnívoros. Los carnívoros son animales que se alimentan de peces más pequeños y animales invertebrados, como gusanos, insectos, moluscos o crustáceos. Los herbívoros son aquellos que

se alimentan de plantas y algas, es decir, de alimentos de origen vegetal. Y los omnívoros son peces oportunistas, se alimentan tanto de animales como de vegetales.

Generalmente, el aparato digestivo posee forma de tubo que se inicia en la boca y termina en el ano, diferenciándose 4 zonas a lo largo de su recorrido (Figura 1.6): la cavidad bucofaríngea, el digestivo anterior, el digestivo medio y el digestivo posterior. La cavidad bucofaríngea está compuesta por la boca, las branquias y la faringe. El digestivo anterior está formado por el esófago, estómago y píloro. El digestivo medio son los ciegos pilóricos, e intestino. Y el digestivo posterior está compuesto por el recto y ano. También aparecen 2 glándulas asociadas al aparato digestivo: el páncreas y el hígado.

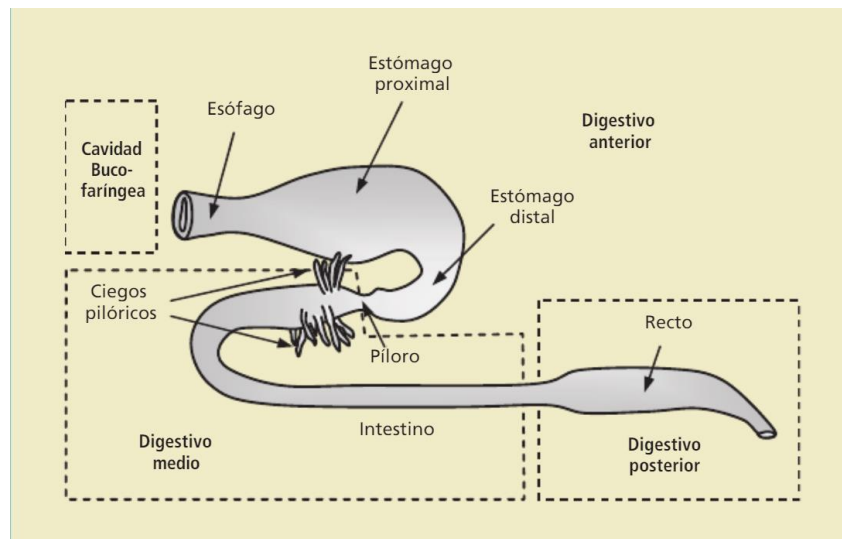


Figura 1.6. Esquema del tracto digestivo de un pez (Fuente: Zamora y Rubio, 2009).

Los peces herbívoros suelen poseer unas branquiespinas finas y abundantes, encontrándose a ambos lados del esófago y dirigiendo el alimento hacia el tubo digestivo. El hocico corto, romo y con una dentadura muy densa con bordes tipo segador, raspador, excavador e incluso de cepillo. Algunas familias herbívoras están provistas de bolsillos faríngeos, en los cuales almacenan algas durante la ingesta, para su posterior trituración antes de la deglución. Las branquiespinas en carnívoros son de mediano tamaño y pueden estar recubiertas por pequeños dientes. También existe gran variabilidad en la forma, tamaño y posición de la boca, dependiendo del tipo de dieta. Encontrándose mandíbulas extensibles, bocas estrechas provistas de dientes largos y curvos, mandíbulas bucales o mandíbulas faríngeas poderosas (Zamora y Rubio, 2009).

La digestión se lleva a cabo a lo largo del tubo digestivo, su longitud influye en la digestión y absorción del alimento. Los carnívoros presentan un estómago relativamente grande y un intestino, relativamente corto (Figura 1.7), siendo la longitud intestinal menor que la longitud del pez. Por otro lado, los herbívoros tienen un estómago corto y un intestino largo (Figura 1.7), siendo la longitud intestinal varias veces la longitud del pez. Finalmente, los omnívoros presentan una situación intermedia, con una longitud intestinal correspondiente a dos o tres veces la longitud pez.

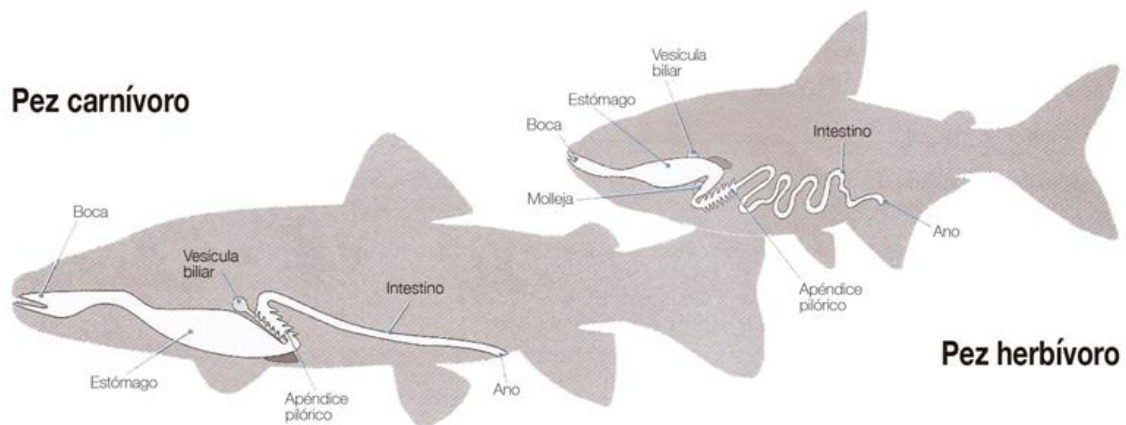


Figura 1.7. Diferencias entre un pez carnívoro y un pez herbívoro (Fuente: BIOINNOVA, 2018).

En peces carnívoros, como el salmón, su tracto digestivo al ser relativamente más corto que los herbívoros, disminuye el tiempo de acción de la fermentación digestiva. En cambio, presentan un gran desarrollo de la superficie intestinal con una gran carga de enzimas proteolíticas, lo que aumenta el rendimiento digestivo. Las actividades de amilasas, en este tipo de peces son poco frecuentes, sin embargo, en herbívoros son más relevantes. Por ello, la relación amilasa/tripsina-quimotripsina es un buen indicador de la alimentación natural en los peces (Hidalgo y Alliot, 1987).

El proceso digestivo se inicia en la cavidad bucofaríngea, encargándose de la captación del agua y del alimento a través de una coordinación compleja entre las mandíbulas, el techo de la boca, los arcos branquiales y el opérculo. El alimento es atrapado y triturado a través de la boca y, posteriormente, se procede a su ingestión, pasando a través del esófago hacia el estómago (Zamora y Rubio, 2009). El estómago es el lugar de almacenamiento y mezclado de los alimentos, es donde se inicia la digestión química debido a sus secreciones, tanto ácidas como enzimáticas. Se encuentra recubierto por células que secretan ácido clorhídrico (HCl). El fluido gástrico permanece a pH neutro en ayunas, pero la ingestión de alimento provoca la secreción de HCl, haciendo que el pH se encuentre entre 2 y 5 aproximadamente. Además, la distensión del estómago estimula la secreción gástrica. Es importante tener en cuenta, sobre todo en peces de agua dulce, que el poder tampón del alimento y su pH puede influir sobre la eficacia de la digestión gástrica en función de la magnitud del pH óptimo para la actividad de las enzimas secretadas en el estómago (Hidalgo y Alliot, 1987). En la digestión realizada en el estómago tiene lugar una importante actividad enzimática proteolítica, gracias a la acción de proteasas secretadas por las células glandulares del estómago. La proteasa más importante es la pepsina (Tabla 1.1), se secreta en forma de pepsinógeno (forma inactiva) y es activada por la presencia de un medio ácido (HCl). La pepsina es una endopeptidasa que hidroliza enlaces peptídicos produciendo peptonas y polipéptidos. En algunos peces se ha detectado la presencia de actividad enzimática de naturaleza no proteolítica, como la quitinasa, que rompen el exoesqueleto de crustáceos para facilitar la posterior digestión intestinal o evitar un posible bloqueo del tracto digestivo (Zamora y Rubio, 2009), y la alfa-amilasa (Hidalgo y Alliot, 1987), de origen pancreático, encargada de estimular la secreción de péptido gastrointestinal y de enteroglucagón.

Los ciegos pilóricos o apéndices pilóricos son divertículos terminales en la parte anterior del intestino. Tienen la misma estructura, contenido enzimático y funciones que el intestino, constituyendo un recurso para incrementar la superficie digestiva y absorptiva. En el intestino se produce la mayor parte de la digestión química y la absorción de los nutrientes. La absorción de los lípidos tiene lugar, primordialmente, en el intestino anterior y primera porción del intestino medio, mientras que la absorción de las proteínas se realiza en la porción distal del intestino medio. El intestino distal tiene poca capacidad de absorción y desempeña un papel esencial en la absorción selectiva de iones minerales y, por tanto, en la osmorregulación. Los procesos químicos del intestino se producen gracias a diferentes enzimas secretadas a través de la pared intestinal y de las glándulas anejas (páncreas e hígado).

La bilis procede del hígado y se acumula en la vesícula biliar, facilita la digestión de los lípidos, gracias a la acción de las lipasas, mediante el aporte de sales biliares y compuestos tensoactivos, capaces de emulsionar los lípidos. También regula el pH del intestino, porque el intestino anterior es prácticamente neutro, mientras que en el intestino posterior es alcalino (Zamora y Rubio, 2009). En algunas especies de teleosteos la bilis contiene enzimas como la tripsina, la amilasa, la lipasa, etc.; procedentes del tejido pancreático intrahepático (Hidalgo y Alliot, 1987).

El páncreas produce gran variedad de enzimas capaces de digerir proteínas (proteasas), carbohidratos (glucosidasas) y lípidos (lipasas; Tabla 1.1). Las proteasas (tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa) son secretadas por el páncreas en forma de zimógenos, formas inactivas, que son activados en el interior del intestino mediante la acción de la enteroquinasa, una enzima secretada por la pared intestinal, y la tripsina, evitando el ataque a tejidos propios antes de su liberación. Las más importantes son la tripsina y la quimotripsina. La tripsina es una endopeptidasa (ataca las uniones internas que se sitúan a lo largo de las cadenas polipeptídicas) que se secreta en forma de tripsinógeno y posteriormente es activado a tripsina en el interior del lumen intestinal por la acción de una enteroquinasa. Su pH óptimo para su actividad es ligeramente básico, pH 8-9 dependiendo de la especie y su temperatura óptima es entre 30-40 °C, temperaturas ligeramente superiores la inactivan rápidamente. Su función como activador enzimático hace de la tripsina una enzima clave en la digestión de las proteínas. La quimotripsina se origina por acción de la tripsina, sobre el quimotripsinógeno, se trata de una endopeptidasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que están implicados la tirosina, el triptófano y la fenilalanina. Casi siempre está asociada a la tripsina.

En la pared intestinal, la secreción más importante es la aminopeptidasa (Tabla 1.1). Se produce en las células del borde del cepillo del epitelio intestinal, y se trata de unas exopeptidasas, que hidrolizan el extremo amino-terminal produciendo aminoácidos libres que son absorbidos por la pared intestinal (Zamora y Rubio, 2009). Las secreciones digestivas se ven reguladas a lo largo del tubo digestivo. La secreción gástrica se inicia por la ingesta del alimento y la distensión del estómago. Por otro lado, la colecistoquinina (CCK) estimula la secreción de enzimas por parte del páncreas y la contracción de la vesícula biliar provocando la liberación de la bilis vesicular en el intestino anterior. La secretina estimula la producción del fluido pancreático acuoso rico en bicarbonato e incrementa la producción de bilis por los hepatocitos (Hidalgo y Alliot, 1987).

Tabla 1.1. Principales enzimas digestivas secretadas por los peces (Fuente: Zamora y Rubio, 2009).

Aa, aminoácidos; FFA, ácidos grasos libres; MG, monoglicéridos; Pánc., páncreas; FD, microbiota digestiva. (1) Especies que ingieren usualmente insectos y crustáceos; (2) Especies que consumen usualmente vegetales.

	Enzima	Substrato	Origen	Hidroliza uniones	Órgano	Producto	Especie
Proteasas	Pepsina	Proteínas	Estómago	Internas NH ₂	Estómago	Péptidos	Con estómago
	Tripsina	Proteínas/péptidos	Páncreas	Internas C-Arg/Lys	Intestino	Péptidos	Todas
	Quimotripsina	Proteínas/péptidos	Páncreas	Internas C-AA aromáticos	Intestino	Péptidos	Todas
	Elastasa	Proteínas	Páncreas	Internas AA alifáticos	Intestino	Péptidos	Carnívoras
	Colagenasa	Proteínas	Páncreas	Internas	Intestino	Péptidos	Carnívoras
Peptidasas	Carboxipeptidasa A	Proteínas/péptidos	Páncreas	Externas AA	Intestino	Péptidos/Aa	Todas
	Carboxipeptidasa B	Proteínas/péptidos	Páncreas	Externas Arg/Lys	Intestino	Péptidos/Aa	Todas
	Aminopeptidasa	Proteínas/péptidos	Intestino	Externas N-terminal	Intestino	Péptidos/Aa	Todas
	Di-/Tripeptidasas	Di-/tripéptidos	Intestino	Externas N-terminal	Intestino	Aa	Todas
Lipasas	Pancreática	Triacilglicéridos	Páncreas	Externas glicerol-éster	Intestino	FFA, β-MG	Todas
	No específica	Triacilglicéridos	Páncreas	Ext/Int. Éster-carboxilo	Intestino	FFA	Todas
	Esterasas	Ésteres	Páncreas	Externas/Internas	Intestino	FFA, alcoholes	Todas
	Fosfolipasas	Fosfolípidos	Intestino	Internas Éster-acilo	Intestino	FFA	Todas
Glucosidasas	Amilasa	Almidón	Páncreas	Interna α1→4	Intestino	Disacáridos	Todas
	Quitinasa	Quitina	Pánc./FD	Interna β1→4	Intestino	N-acetil-glucosamina	(1)
	Celulasa	Celulosa	FD	Interna β1→4	Intestino	Monosacáridos	(2)
	Disacaridasas	Disacáridos	Intestino	Variable	Intestino	Monosacáridos	Todas

La actividad de las enzimas digestivas es dependiente de varios factores que condicionan la digestión del alimento. Los regímenes de alimentación en peces juveniles afectan a las actividades enzimáticas proteolíticas y amilásicas. La temperatura influye sobre las proteasas y el tránsito intestinal. En cambio, las especies acuáticas poseen comportamientos alimentarios que varían con la estación, la iluminación y la naturaleza de las presas disponibles, pudiendo interferir con la acción de la temperatura y la actividad de las enzimas.

Las actividades enzimáticas evolucionan en cantidad y calidad desde la eclosión hasta la metamorfosis, en relación con la aparición y desarrollo de los distintos órganos digestivos. Las actividades proteolíticas asociadas a las glándulas gástricas, como la pepsina, se encuentran cuando el estómago posee una maduración funcional, es decir, cuando las larvas comienzan a alimentarse ya poseen las enzimas. Existe cierta correlación entre el nivel de las actividades enzimáticas y la velocidad de crecimiento de una especie. En larvas con aparato digestivo rudimentario a la eclosión, las capacidades digestivas pueden estar limitadas y la digestión se asegura en gran parte por las enzimas de la presa, por ello se explica el fracaso de los alimentos artificiales, que producen grandes mortalidades en larvas de peces marinos. No obstante, la adición de enzimas proteolíticas a alimentos artificiales solo produce un pequeño efecto positivo (Hidalgo y Alliot, 1987).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La acuicultura se presenta como una alternativa realista a la sobreexplotación de los recursos pesqueros, no obstante, las piscifactorías tampoco son inocuas para el medio ambiente. El posible abuso de antibióticos, antiincrustantes en los barcos, transferencia de enfermedades a animales silvestres, eutrofización de las aguas donde se cría el salmón y las posibles fugas de los peces en producción (WORLD WILDLIFE FUND, 2018), son algunos de los retos por resolver de la acuicultura del XXI.

El impacto más importante en la sostenibilidad económica de la industria del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.) es producido por la maduración sexual previa al despesque, mientras a nivel ambiental son los escapes de salmones de las jaulas. El inicio de la maduración sexual da como resultado la movilización de energía hacia la maduración de las gónadas en lugar del crecimiento corporal, además de una disminución en las propiedades organolépticas de la carne. Los triploides no son considerados organismos genéticamente modificados (OGMs), aunque aún no está legalizada su venta para el consumo. En cambio, la triploidía se presenta como la opción más segura desde un punto de vista sanitario para el control reproductivo y la contención genética del salmón del Atlántico (Peruzzi et al., 2013), ya que el desarrollo gonadal se encuentra suprimido. La no maduración sexual en las granjas durante el engorde proporciona tanto mejores tasas de crecimiento como de conversión. Además, a nivel ambiental su imposibilidad de dejar descendencia, aunque los machos sean fisiológicamente fértiles pero genéticamente estériles, impide un flujo génico hacia poblaciones silvestres e hibridaciones con otras especies. De hecho, hasta la fecha, la producción de triploides se reconoce como el método más práctico, económico y eficaz para la producción a gran escala de peces estériles (Maxime, 2008; Piferrer et al., 2009).

Sin embargo, aunque se sabe que los crecimientos son más altos que el observado para individuos diploides (Peruzzi et al., 2013), poco se sabe sobre sus requerimientos nutricionales. Actualmente, no se dispone de información clara sobre la ontogenia del sistema digestivo en triploides y sus características sobre su morfología y actividad enzimática. No obstante, se han encontrado alteraciones morfológicas y fisiológicas (Peruzzi et al., 2015) debidos a la ploidía. En previos experimentos, se han observado cambios en la actividad enzimática producidos por la triploidía relacionados, principalmente, con la eficiencia de la conversión alimenticia y el crecimiento de los peces, afectando a las tasas de digestión de nutrientes, dando como resultado diferencias en su absorción y transporte (Sunde et al., 2001). Existen distintos factores que modifican el perfil enzimático del intestino como la fuente, la calidad y la concentración de los nutrientes de la dieta (Santigosa et al., 2008), la ploidía (Zamani et al., 2006), o la edad del pez (Sahlmann et al., 2015); por ello, se considera como un indicador de la capacidad digestiva y del estado nutricional de los peces, a la actividad de las enzimas intestinales en el tracto digestivo (Engrola et al., 2007).

Teniendo en cuenta la importancia de la actividad de las enzimas digestivas en el rendimiento de los peces, y la poca o nula información sobre la fisiología digestiva en triploides, su estudio en diversas etapas de desarrollo proporcionará datos que nos ayudarán a entender el funcionamiento de su sistema digestivo, y así conseguir formular piensos específicos para su producción.

Por lo tanto, los objetivos del trabajo fueron:

1. Evaluar los cambios entre individuos diploides y triploides de salmón atlántico en cuanto a la actividad enzimática digestiva, tanto a nivel gástrico como intestinal.
2. Estudiar el efecto del pienso (uno estándar y otro experimental que incluya proteínas, hidrolizadas, más digestibles) en la capacidad digestiva del salmón atlántico.
3. Evaluar si la inclusión de proteínas más digeribles era capaz de compensar los déficits fisiológicos y morfológicos causados por la triploidía.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Los peces diploides y triploides utilizados en el presente trabajo procedían del cruce de 20 hembras y 13 machos de salmón atlántico procedentes de las empresas de cría selectiva y mejoramiento genético SalmoBreed AS y Stofnfiskur (Islandia). Cada hembra se fertilizó con esperma de uno o dos machos, el 20 de agosto del 2015, obteniendo de esta forma medios hermanos y hermanos completos. Para la obtención de peces triploides, la mitad de los huevos fertilizados de cada hembra se sometieron a un choque de presión hidrostática (TRC-APV; Aqua Pressure Vessel, TRC Hydraulics Inc., Dieppe, NB, Canadá) de 9.500 psi durante 5 min (Johnstone y Stet, 1995), 5 h después de ser fertilizados a 5 °C. En total se obtuvieron 20 grupos de huevos triploides y 20 grupos de diploides. Alrededor de 400 grados día (dd) se enviaron los huevos, entre 5.000 y 6.000 huevos/L, a la Estación de Investigación Acuícola en Tromsø (Noruega), el 4 de noviembre de 2015. Después se incubaron tanto los diploides como los triploides en bandejas de aluminio separadas (n=40) en un sistema de flujo continuo a 4,8 °C (mínimo: 3,9 °C, máximo: 5,8 °C), siguiendo los procedimientos estándar de cría. Una vez eclosionados todos los huevos (2 de diciembre de 2015) se verificó el estado de ploidía de los peces, entre 20 a 50 larvas por grupo de diploides y triploides, empleando un citómetro de flujo, siguiendo la metodología descrita por Peruzzi et al. (2007). Los resultados mostraron que 3 de los 20 grupos de triploides tenían entre 2 y 5 % de alevines diploides, y estos se introdujeron con sus equivalentes.

Una vez eclosionados los huevos y antes de empezar a alimentarse (18 de febrero de 2016), los alevines se distribuyeron en grupos con el mismo número de individuos para cada ploidía, distribuyéndose entre 12 tanques circulares interiores de 200 L (alrededor de 3.000 peces por tanque y biomasa por tanques de 620 g). Los tanques distribuidos por ploidía fueron alimentados con una dieta estándar (STD) de harina de pescado o una dieta experimental (HFM) en la cual el 45 % de la fracción de harina de pescado fue sustituida por proteína de pescado hidrolizada (Tabla 3.1; Skretting AS, Stavanger, Noruega), como se representa en la figura 3.1. Las concentraciones de fósforo en las dietas STD y HFM se analizaron (MasterLab, Boxmeer, Países Bajos) para ser de 19 g/kg y 18 g/kg, respectivamente, lo que es considerablemente superior al requerimiento de fósforo en salmón del Atlántico, 8 g fósforo por kg de dieta (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011). Se añadió un marcador inerte (itrio) al pellet más grande (3 mm) de cada dieta (10 g/kg) para estudios de digestibilidad.

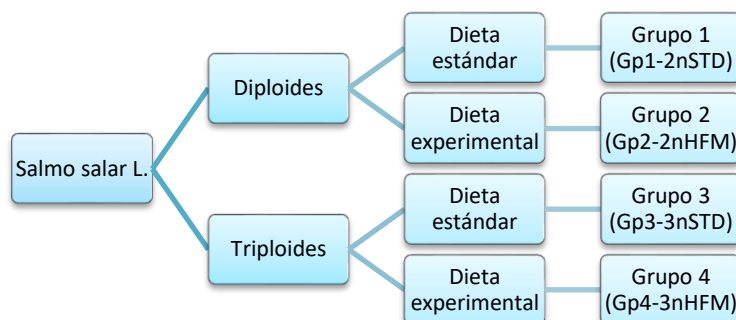


Figura 3.1. Distribución de los peces en grupos según su ploidía y alimentación.

Tabla 3.1. Formulación y composición química de las dietas (G. Reisen, Skretting AS).

SPC, concentrado de proteína de soja; CPSP, hidrolizado de harina de pescado Special-G® (SoproPêche, Boulogne-sur-Mer, Francia); ** Marcador Itrio utilizado solo en las dietas de 3,0 mm.

Nombre de la dieta	STD (Solo harina de pescado)			HFM (Con CPSP)		
	A, B, C	D	I, J, K	E, F, G	H	L, M, N
Pellet (mm)	0,5/07/1,0	1,2	1,5/2,0/3,0	0,5/0,7/1,0	1,2	1,5/2,0/3,0
Trigo	7,2	6,1	6,9	5,4	5,5	6,9
Gluten de trigo	10	10	10	10	10	10
SPC	14,4	16,7	17,9	14	16,2	16,7
NA Harina de pescado	55	55	50	30	30	27,5
CPSP Especial G - hidrolizado	0	0	0	25	25	22,5
Aceite de pescado nórdico	11	10,8	11,6	9,4	9,2	10,2
Agua/Cambio de humedad	0	0	0,4	1,6	0,9	1,5
Itrio**	0	0	0,1	0	0	0,1
Premix (minerales, Vitaminas, AA)	2,4	1,4	3	4,7	3,3	4,6
Total	100	100	100	100	100	100
Composición química (%)						
Materia seca	92,1	92,5	92,8	92,1	92,5	92,9
Proteína bruta	55,9	56,8	56,0	60,3	59,0	56,9
Grasa bruta	17,7	18,3	19,1	17,3	18,8	19,6

El suministro de alimento se realizó con alimentadores automáticos programados para suministrar entre 6 y 9 comidas diarias, siendo la cantidad suministrada siempre superior a la consumida por los animales. Al comienzo de la primera alimentación la temperatura del agua fue incrementándose gradualmente hasta 10 °C durante un período de 4 semanas. A partir de la 4ª semana, se mantuvo a 10 °C (10,0 ± 0,5 °C), excepto durante el verano (4 de julio a 2 de septiembre) cuando los peces estuvieron expuestos a la temperatura del agua ambiente (rango 9,5-12,5 °C). Los peces se transfirieron de 200 L a 500 L en tanques el 20 de mayo de 2016. Durante todo el proceso los salmones se mantuvieron con luz constante (LL), excepto el período

del 6 de septiembre al 18 de octubre, donde se usaron 12 h de luz (12L: 12D) para simular las condiciones de invierno e inducir la transformación de parr-smolt.

Por otra parte, se midió regularmente el oxígeno disuelto y el nivel de saturación en el agua de salida (> 80 %). Los peces muertos se eliminaban diariamente, procediendo a su conteo y registro de la mortalidad. Los peces completaron la transformación de parr-smolt al final del experimento el 15 de noviembre de 2016.

Los experimentos realizados se llevaron a cabo bajo las normas sobre el uso de animales de experimentación y fueron aprobados por el Comité Noruego de Ética en Experimentación Animal a través de una licencia de proyecto (Permiso ID 8180) emitido por la Autoridad Noruega de Seguridad Alimentaria (FOTS).

En la tabla 3.2 se representa el intervalo de muestreo y nomenclatura de las diferentes etapas, desde la eclosión hasta el final del período de experimentación adoptado en el estudio, dado en semanas y la edad correspondiente en grados día (dd) posteriores a la eclosión:

Tabla 3.2. Intervalo de muestreo y nomenclatura de las diferentes etapas desde la eclosión hasta el final del período de experimentación.

E, Estómago; CP, ciego pilórico; IP, intestino proximal; IM, intestino medio; ID, intestino distal; sdía, semanas después del inicio de la alimentación.

Semanas	Grados día	Muestras para enzimas digestivas
Eclosión	570 dd	Alevín entero
Comienzo de la alimentación	920 dd	Alevín entero
4 sdía	1150 dd	Tracto intestinal
9 sdía	1500 dd	Tracto intestinal
13 sdía	1800 dd	E, Intestino entero
17 sdía	2100 dd	E, Intestino entero
21 sdía	2380 dd	E, Intestino entero
27 sdía	2810 dd	E, Intestino entero
30 sdía	3020 dd	E, CP, IP, IM, ID
33 sdía	3380 dd	E, CP, IP, IM, ID
38 sdía	3670 dd	E, CP, IP, IM, ID

3.2. PRUEBAS

Las pruebas realizadas para el análisis de la actividad enzimática digestiva del salmón atlántico en función de la ploidía y la dieta fueron:

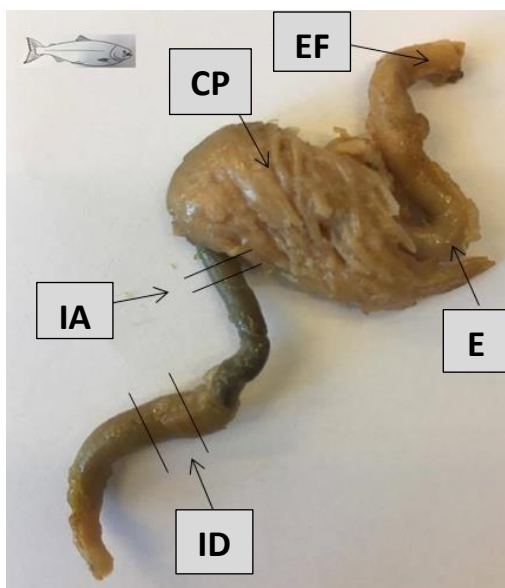
- La extracción de las enzimas del tejido (estómago/intestino).
- El análisis de Bradford en todas las muestras.
- Análisis de tripsina y quimotripsina en todos los muestreos.
- Análisis de proteasas alcalinas totales en todos los muestreos (TAP).
- Análisis de la actividad potencial de la pepsina a lo largo de todos los muestreos.
- Análisis de la actividad real de la pepsina en los muestreos de octubre y noviembre.
- Análisis de fosfatasa alcalina en todos los muestreos (ALP).
- Análisis de leucina aminopeptidasa en todos los muestreos (LAP).

3.3. TOMA Y EXTRACCIÓN DE ENZIMAS DEL TEJIDO

Se tomaron 5 peces por tanque en cada muestreo para determinar la actividad enzimática. Se sacrificaron a través de la inmersión en hielo, luego se pesaron y se midió la longitud de su cuerpo. Las larvas se homogenizaron enteras para la realización de ensayos enzimáticos en los alevines, hasta 4 semanas después de su primera alimentación, debido a su pequeño tamaño para su disección y la extracción del tracto digestivo. Por otro lado, los peces más grandes, a partir de unas 30 semanas después de su primera alimentación (3020 dd) hasta el final del experimento, se diseccionaron para separar el estómago (E), los ciegos pilóricos (CP), y el intestino proximal (IP), medio (IM) y distal (ID). La disección se realizó mediante un microscopio de disección en una placa de vidrio preenfriada a 0 °C. Seguidamente, antes de la extracción del estómago y posterior congelación, se midió el pH utilizando un microelectrodo de pH (Yúfera et al., 2012), empleando una punta de microelectrodo (\varnothing 660 μ m) que se insertó en pequeñas hendiduras hechas en el estómago. En el intestino se midió el pH utilizando un Fisher Scientific Accumet AE6B, medidor de pH analítico. Posteriormente, las muestras digestivas se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción.

Los extractos se prepararon con una disolución de sección de tejidos por peces enteros en agua destilada (1:10 peso: volumen) y se homogeneizaron utilizando FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Solon, Ohio, EE. UU.), con las siguientes condiciones: 6,5 m/s y 20 s. Después, se procedió a una centrifugación a 12.000 g durante 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -20 °C para su posterior análisis enzimático. Por último, la concentración de proteína soluble en extractos se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino (2 mg/mL) como patrón.





En la tabla 3.3 se representan todas las muestras recibidas, el tipo de muestra y la fecha de muestreo, y en la figura 3.2 se muestran las disecciones realizadas:



IA, Intestino anterior; ID, Intestino distal; EF, Esófago; CP, Ciegos pilóricos; E, Estómago.

Figura 3.2. El tracto gastrointestinal completo del salmón del Atlántico dividido en diferentes partes.

Tabla 3.3. Tabla de muestras recibidas de Nofima (Tromsø, Noruega) en la UPV.

Fecha de muestreo	Ejemplares	Extracción de muestras	Tratamientos
03/12/2015 17/12/2015	20/tratamiento	Peces jóvenes enteros con saco vitelino	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides • Triploides 
03/03/2016 17/03/2016	20/tratamiento	Peces jóvenes enteros	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental • Triploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental 
21/04/2016 19/05/2016	5/tanque	Intestino	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental • Triploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental 
16/06/2016	5/tanque	Intestino	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental • Triploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental 
14/07/2016 23/08/2016 13/09/2016	5/tanque	Intestino Estomago	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental • Triploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental
18/10/2016	5/tanque	Intestino anterior Intestino medio Intestino distal Ciegos pilóricos Estomago	<ul style="list-style-type: none"> • Diploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental • Triploides <ul style="list-style-type: none"> ○ Dieta control ○ Dieta experimental

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS ENZIMAS DIGESTIVAS

Los análisis de las enzimas digestivas se realizaron en el Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976) para la determinación de la concentración de proteína total (Proteína soluble) en placa de cada muestra. Primero se confeccionó la recta patrón (Tabla 3.4), utilizando la solución patrón de BSA a 2 mg/mL. A continuación, se analizó la concentración proteica en las muestras por triplicado (diluidas 1/10).

Tabla 3.4. Recta patrón.

Patrón	Vol. BSA (µL)	Vol. H ₂ O (µL)
C0	0	100
C1	20	80
C2	25	75
C3	30	70
C4	35	65
C5	40	60
C6	45	55
C7	50	50

La actividad de la pepsina se midió utilizando el método de Erlanger et al. (1961). Se utilizó hemoglobina al 0,5 % p/v como sustrato y los ensayos se llevaron a cabo tanto a pH 2,5 como a pH específico determinado en cada estómago. Una unidad de actividad se definió como 1 µg de tirosina liberada por minuto y la absorbancia medida a 280 nm.

Para determinar la actividad total de la proteasa alcalina (TAP) se utilizó el método de Walter (Walter, 1984). Primero se preparó la caseína al 1 % p/v, utilizándose como sustrato, y el buffer Tris-HCL 100 mM a pH 7,5. Se consideró que una unidad de actividad se definiera como 1 µg de tirosina liberada por minuto.

La actividad de tripsina y quimotripsina se midió utilizando el método de Erlanger et al. (1961) en placa, usando 50 mM BAPNA (N-α-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida clorhidrato) como sustrato para la tripsina y 50 mM GAPNA (N-glutaril-L-fenilalanina-p-nitroanilida) como sustrato para la quimotripsina. Se consideró que una unidad de actividad se definiera como 1 µg de p-nitroanilina liberada por minuto por tripsina o quimotripsina de sus sustratos, respectivamente.

Por último, para determinar las actividades enzimáticas para la fosfatasa alcalina (ALP) y la leucina aminopeptidasa (LAP), se raspó la mucosa de la pared intestinal con una espátula, ya que son enzimas del “borde del cepillo intestinal”. Las actividades se midieron fotométricamente con kits comerciales (SpinReact, Ref 1001250; 41240) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando p-nitrofenil fosfato y L-leucil-p-nitroanilida como sustrato, respectivamente.

La actividad enzimática se estimó en unidad de actividad enzimática (U), la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto en condiciones óptimas. Para determinar la actividad específica de cada enzima en el extracto se procedió al cálculo de dos fórmulas. La primera fue el cálculo del número de unidades de actividad enzimática por mililitro de disolución (U/mL), para posteriormente calcular el número de unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína en el extracto (U/mg proteína).

Actividad enzimática por mL del extracto:

$$U / mL = \frac{\Delta \text{ Abs} * V \text{ final reacción}}{\text{CEM} * t \text{ incubación} * V \text{ extracto}} * \text{Factor de dilución}$$

Siendo:

- Δ Abs: el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda.
- V final reacción: el volumen final de la reacción, en mL.
- CEM: el coeficiente de extinción molar del producto obtenido calculado de la recta de regresión (mL/(mg*cm)).
- t incubación: el tiempo de incubación, en min.
- V extracto: el volumen del extracto, en mL.

Actividad enzimática por proteína:

$$U/mg \text{ proteína} = \frac{U/mL}{mg \text{ proteína/mL}}$$

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el efecto de la dieta y de la ploidía sobre la actividad enzimática se realizó un análisis estadístico a través del programa *Statgraphics*, mediante el análisis del ANOVA multifactorial. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de *Levene* y la homogeneidad de las varianzas con *Shapiro-Wilk*. Para la comparación entre medias se empleó el test de *Tukey* para $p < 0,05$, y los resultados se presentaron como la media \pm error estándar.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

La actividad de la pepsina (Figura 4.1) se midió a pH 2,5. Para analizar la actividad en función del pH del estómago, fue necesario un tamaño de estómago que permitiera introducir la sonda del pH-metro, por lo que sólo fue posible realizar este análisis en los últimos muestreos, semana 35 y 38 (Tabla 4.1). Se observó que el pH gástrico en peces triploides alimentados con la dieta experimental fue significativamente más bajo ($3,3 \pm 0,245$ y $3,7 \pm 0,289$, respectivamente) ($p < 0,05$).

Tabla 4.1. Cambios en el pH gástrico (\pm SE) a las 35 y 38 semanas después del inicio de la alimentación en los cuatro grupos de peces experimentales considerados.

Los datos en la misma columna con diferentes superíndices difieren con una $p < 0,05$; SE, error estándar de la media; La capacidad del tampón (mEq / g necesario para alcanzar un pH de 3,0) dio como resultado 1,3 y 0,9 para la dieta STD y HFM respectivamente, siendo el pH inicial de las dietas 6,2 y 6,0, respectivamente.

	33 semanas después del inicio de la alimentación	38 semanas después del inicio de la alimentación
Gp1-2nSTD	4,50 ^b \pm 0,233	5,04 ^b \pm 0,278
Gp2-2nHFM	4,30 ^b \pm 0,261	5,10 ^b \pm 0,232
Gp3-3nSTD	4,14 ^b \pm 0,266	4,84 ^b \pm 0,251
Gp4-3nHFM	3,31 ^a \pm 0,245	3,69 ^a \pm 0,289

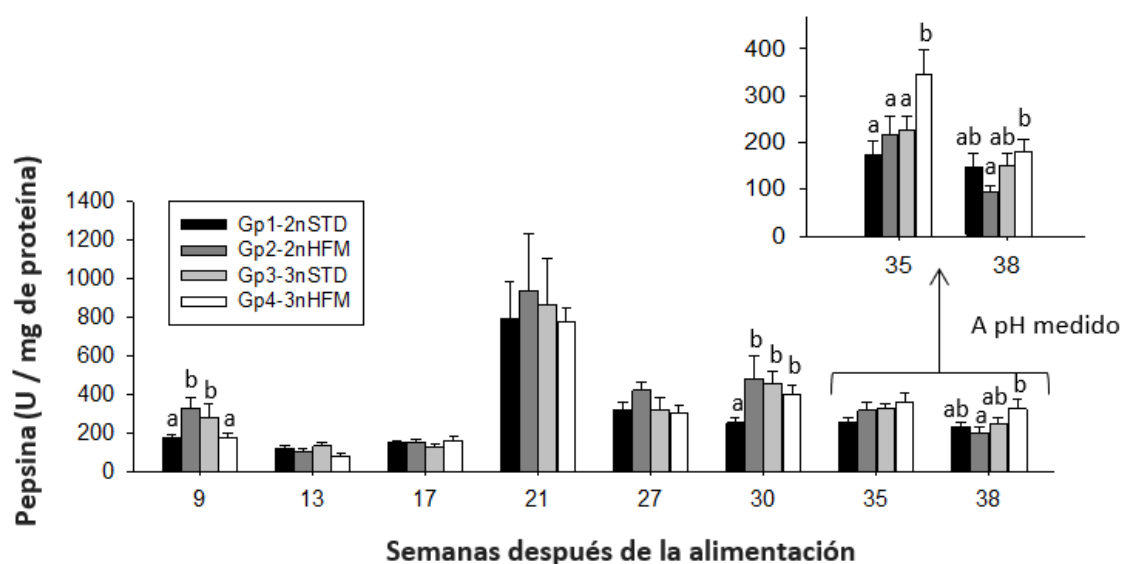


Figura 4.1. Actividad de la pepsina (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidas en cada punto de muestreo (ver Tabla 3.2). Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).

A partir de la eclosión (570 dd) se empezó a detectar la actividad de la pepsina, pero no se detectaron diferencias significativas hasta la 9 semana después de iniciar la alimentación (1500 dd), posiblemente por la baja actividad de esta enzima en los alevines. A las 9 semanas, los peces 2n alimentados con la dieta HFM y los 3n con la dieta STD registraron una mayor actividad, pero esta diferencia no volvió a observarse hasta la semana 30 donde los 2n alimentados con la dieta STD fueron los que mostraron una menor actividad, y la semana 38 donde los mayores niveles de actividad se registraron en los 3n alimentados con la dieta HFM.

La actividad de la proteasa alcalina total (TAP) y la tripsina (Figura 4.2) en los peces 2n alimentados con la dieta HFM fueron los que presentaron actividades más elevadas hasta la semana 17. En cambio, la quimotripsina, se registró su mayor actividad en la semana 9. Por otro lado, los peces 3n alimentados con la dieta HFM presentaron un aumento en la actividad TAP entre las 21 y 27 semanas, y en la tripsina a las 21 semanas. A las 38 semanas, después de la esmoltificación, se registraron los niveles más altos de TAP, tripsina y quimotripsina, en los peces 2n alimentados con la dieta STD.

La actividad de la leucina aminopeptidasa (LAP; Figura 4.2) en los peces 2n alimentados con la dieta STD se observaron los niveles más altos en la semana 21 y 38 después de iniciar la alimentación. No obstante, los 3n que se alimentaron con la dieta HFM tuvieron una actividad más elevada ($p < 0.05$) que los 2n.

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP; Figura 4.2) fue detectada desde la 13 semana hasta la 27 después de iniciar la alimentación, observándose una menor actividad en los peces 2n alimentados con la dieta STD. Mientras, que los peces 3n alimentados con la dieta STD registraron una mayor actividad que la de los peces 2n ($p < 0.01$).

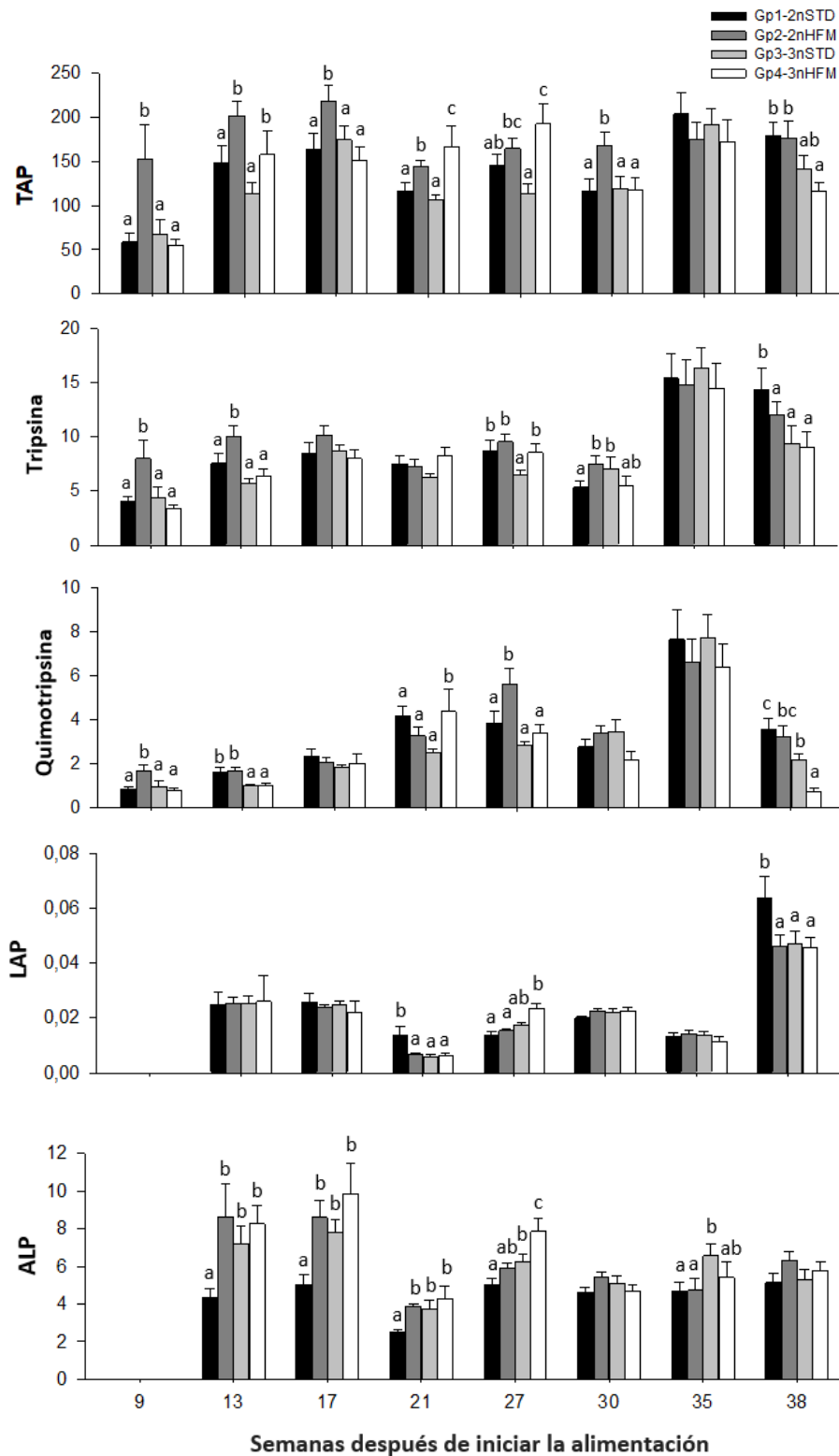


Figura 4.2. Actividad de proteasa alcalina total (TAP), tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (ALP) (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), *Salmo salar* L., alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidas en cada punto de muestreo (ver Tabla 3.2). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).

Considerando la actividad enzimática por sección digestiva (Figura 4.3) a las 35 semanas después de iniciar la alimentación, los peces alimentados con la dieta HFM presentaron los niveles más altos de actividad de TAP, tripsina, quimotripsina y LAP en el intestino medio (IM). Mientras que a las 38 semanas los que registraron los mayores niveles de actividad fueron los peces 3n en el intestino medio y los 2n alimentados con la dieta STD en los ciegos pilóricos (CP) y en el intestino distal (ID).

Por último, los peces 2n alimentados con dieta STD presentaron los niveles más bajos de actividad para la fosfatasa alcalina (ALP; Figura 4.3) en la semana 35, particularmente en los ciegos pilóricos (CP) y en el intestino anterior (IA). Mientras que en la semana 38 se registraron actividades más bajas en el intestino medio (IM).

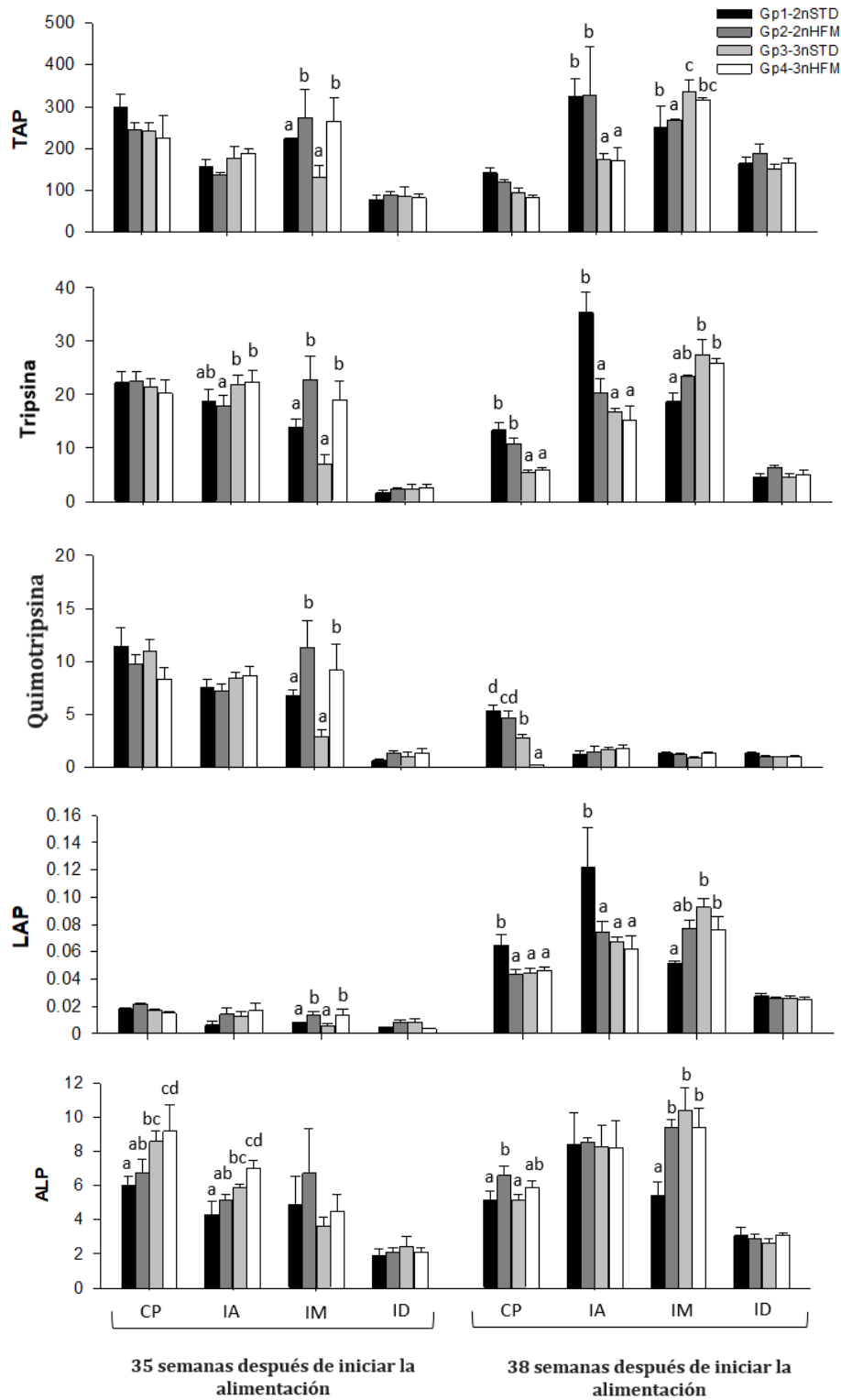


Figura 4.3. Actividad total de proteasa alcalina (TAP), tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (ALP) (expresada como U/mg de proteína) de salmón atlántico diploide (2n) y triploide (3n), *Salmo salar* L., alimentados unos con una dieta estándar (STD) y otros con una dieta experimental con proteína hidrolizada de pescado (HFM), medidos en los dos últimos puntos de muestreo (ver Tabla 3.2: 35 y 38 sda). Se consideraron cuatro secciones intestinales: ciegos pilóricos (CP), intestino anterior (IA), intestino medio (IM) e intestino distal (ID). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como medias \pm ES ($n = 3$).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las actividades enzimáticas y en particular la de la tripsina, se utilizan como indicador del desarrollo del sistema digestivo y de la actividad alimentaria en larvas. En el presente trabajo, la actividad enzimática aumentó a medida que los peces aumentaban su tamaño, hasta 4 semanas después de la alimentación inicial (1500 dd). Además, se observó un patrón similar a lo observado en previos estudios sobre ontogenia de la tripsina del salmón atlántico (Sahlmann et al., 2015), donde se observó un aumento notable entre los 96 y 144 días después de la eclosión, 4 veces mayores que los registrados 7 días posteriores a la eclosión.

Las diferencias entre peces 2n y 3n en la actividad enzimática no se detectaron durante las primeras etapas, desde la eclosión hasta las 4 semanas. Así mismo, en un estudio se comparó la capacidad digestiva de la trucha ártica (*Salvelinus alpinus L.*) en las primeras etapas de vida entre 3n y 2n (Lemieux et al., 2003), tampoco se registraron diferencias en la actividad de la tripsina entre ploidías, concluyendo que la falta de diferencias entre grupos podría ser debido a que las dietas usadas en su experimento eran adecuadas. En nuestro caso, al igual que la citada prueba, todos los peces fueron alimentados con la misma dieta hasta las 4 semanas después de comenzar la alimentación, por lo que, podemos asegurar que sólo el factor de la ploidía pudo haber influido hasta este período. Con todo ello, se podría concluir que el desarrollo intestinal inicial fue similar en los peces 3n y 2n, igual que el experimento de la trucha ártica.

En relación con el efecto de la dieta, la proteína de harina de pescado hidrolizada (HFM) parece que mejoró la actividad de la pepsina en peces 3n, y fue realmente evidente cuando se midió la pepsina a pH real del muestreo. Generalmente, la actividad de la pepsina se mide a pH 2 (Yúfera et al., 2012), debido a que su actividad óptima en diferentes peces se ha encontrado en un rango de pH 1,5 y 3,5 (Moyano et al., 1996). Los estudios realizados a un pH óptimo para la pepsina muestran una mayor presencia de zimógeno (precursor enzimático inactivo; Cox y Secor, 2010) que en su forma activa (pepsina) y, por ello, para obtener una estimación de la actividad de la pepsina más real, se realizaron análisis a pH óptimo y también a pH real medido en el estómago de cada pez muestreado. No obstante, solo los peces 3n alimentados con la dieta HFM alcanzaron un pH dentro del rango óptimo citado anteriormente. Otros estudios demostraron que el pH óptimo de la pepsina en salmón atlántico era de 3,05 y un cambio en el pH de 0,6 unidades redujo la actividad en un 10 % (Krogdahl et al., 2015), siendo muy similar en el presente trabajo donde el mismo cambio en el pH del estómago resultó en un 8.5 % de la actividad de la pepsina. La baja capacidad de amortiguación tampón de la dieta HFM, fue en concordancia con el pH del estómago inferior alcanzado por los peces alimentados con esta misma dieta, mejorando así la actividad de la pepsina.

La actividad de la proteasa alcalina total, la tripsina y la quimotripsina, a las 33 semanas después de iniciar la alimentación (3380 dd), aumentaron en los peces alimentados con la dieta de harina de pescado hidrolizada, siendo estas diferencias más marcadas en el intestino proximal y medio, debido a que la actividad de proteasa disminuía desde el intestino proximal al distal, de acuerdo con otros hallazgos en salmón atlántico (Krogdahl et al., 2015). La proteasa alcalina, la quimotripsina y la tripsina, se han encontrado actualmente en el intestino proximal de los vertebrados superiores. En estudios de salmón atlántico, el 59 % de los aminoácidos dietarios se digirieron y absorbieron en el intestino proximal (Krogdahl et al., 2001). Entre las

proteasas pancreáticas, la tripsina activa es de particular importancia, cumple la función crucial de desencadenar una cascada que activa las otras proenzimas durante el proceso de digestión (Rønnestad et al., 2013). Por todo ello, es razonable pensar que el patrón de las diferencias observadas en la tripsina entre los grupos es muy similar al observado en quimotripsina y la proteasa alcalina.

La importancia de la actividad de la tripsina proviene de que su actividad podría limitar la tasa de crecimiento en peces, como el bacalao y el salmón del Atlántico (Sunde et al., 2001), esto podría ser el factor limitante en el suministro de aminoácidos y péptidos para los procesos del crecimiento. La mejora de la digestibilidad mediante la inclusión de proteínas hidrolizadas en la dieta de los peces se ha manifestado en estudios con mamíferos, debido a la rápida absorción de péptidos cortos y aminoácidos libres que estimulan la liberación de CCK a través de la detección directa de tripsina por células de la mucosa intestinal (Nishi et al., 2001). A este hecho se le añade que la liberación de más enzimas digestivas promueve la digestión progresiva de residuos de proteínas y péptidos de alto peso molecular. En cambio, en otras especies (Cahu et al., 2004) los niveles más altos de secreción de tripsina (y los niveles más bajos de CCK) sólo se observaron en peces alimentados con el contenido dietario de hidrolizado de proteína más bajo (14 % de proteína bruta). Comparando las diferencias obtenidas en la actividad de la tripsina con el crecimiento del pez, no se observó ninguna correlación entre ellas, porque, en general, la actividad de la tripsina fue mayor en los peces alimentados con dietas HFM, excepto en el último muestreo; mientras que la inclusión dietaria de proteína hidrolizada no mostró ningún efecto positivo en el crecimiento de los peces (Peruzzi et al., 2018).

Al igual que las enzimas pancreáticas, las actividades enzimáticas intestinales del borde del cepillo intestinal son consideradas como indicadores del desarrollo de las larvas de los peces (Fernández et al., 2008). En las primeras tres partes del intestino se produce la mayor actividad de fosfatasa alcalina, alrededor del 65 % de la longitud intestinal (Smith et al., 2000). Esto coincide con los resultados de nuestro trabajo, ya que la actividad de ALP se concentró entre los ciegos pilóricos y el intestino medio. Debemos destacar que la absorción de nutrientes es más activa en las primeras regiones intestinales, no obstante, continúa a un menor ritmo en el resto del intestino (Tengjaroenkul et al., 2000), como ocurrió en este trabajo.

En el presente trabajo, los peces 3n presentaron mayor actividad de fosfatasa alcalina intestinal (ALP) que los peces diploides. La enzima fosfatasa alcalina, además de estar involucrada en los procesos digestivos y de hidrólisis de moléculas que contienen fósforo, desempeña un papel importante en la defensa de la mucosa del tracto digestivo (Fawley y Gourlay, 2016), en la regulación del pH o en la absorción de fósforo (Roubaty y Portmann, 1988). Los modelos *in vitro* e *in vivo* (Goldberg et al., 2008) demostraron que la ALP intestinal tiene la capacidad de desintoxicar el lipopolisacárido y prevenir la invasión bacteriana a través de la barrera de la mucosa intestinal. En el presente trabajo se observó una mayor actividad de ALP en los peces 3n, aunque, la mortalidad acumulada fue similar a la de los peces 2n (Peruzzi et al., 2018). Los peces alimentados con la dieta HFM obtuvieron durante su desarrollo un aumento de la actividad de ALP, esto ha podido mejorar la biodisponibilidad del fósforo, y producir un menor número de deformaciones esqueléticas (Peruzzi et al., 2018), las cuales están muy relacionadas con éste.

Por otro lado, existen contradicciones en la utilización de las dietas ricas en fósforo, el uso de estas dietas aumenta la excreción de fósforo, y por consiguiente las concentraciones de fósforo en el agua. El fósforo es un nutriente mineral limitante del crecimiento, en exceso en el agua de ríos, lagos y arroyos, origina la eutrofización, un aumento de nutrientes en el agua que provoca una proliferación de las algas y microorganismos. Más tarde mueren y se descomponen, consumiendo con ello una gran cantidad de oxígeno disuelto, dejando las aguas inhabitables para la vida acuática. Por ello, se requiere la utilización de tratamientos de aguas residuales en las piscifactorías de agua dulce (Ye et al., 2017).

CONCLUSIÓN

6. CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos, se puede concluir:

- La actividad enzimática fue similar independientemente de la ploidía, tanto a nivel estomacal como intestinal, a excepción de la actividad del ALP que registró un aumento en los peces triploides.
- El uso de una dieta experimental, con altos niveles de proteína hidrolizada, influyó en la actividad de las proteasas pancreáticas y la ALP, pero con independencia de la ploidía.
- Los cambios inducidos por la dieta experimental no fueron suficientes para compensar los déficits fisiológicos y morfológicos causados por la triploidía. No observándose una correlación entre la dieta, actividad enzimática, crecimiento y poliplodía.

Por tanto, en el actual trabajo no se ha podido garantizar un mejor desarrollo y crecimiento de los triploides utilizando una dieta con proteína más digestible. Por ello, es necesario que se sigan estudiando los peces triploides, para conseguir que la triploidía se convierta en un futuro en una herramienta que aporte beneficios tanto a nivel medio ambiental como productivo.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALCÁNTAR-VÁZQUEZ, J.P. (2016). Fisiología de los peces triploides. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44: 1-15.
- BENFEY, T.J.; BIRON, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus Fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- BIOINNOVA (2018). Diversidad del tubo digestivo, visto el 2 de octubre de 2018. <http://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/diversidad-del-tubo-digestivo/>
- BIOLOGIA Y GEOLOGIA (2018). Gametogénesis, Visto el día 20 de junio de 2018. <http://biogeo.esy.es/BG3ESO/gametogenesis.htm>
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- CAHU, C.; RØNNESTAD, I.; GRANGIER, V.; ZAMBONINO INFANTE, J.L. (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*, 238: 295-308.
- CAL, R.M.; VIDAL, S.; GÓMEZ, C.; ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, B.; MARTÍNEZ, P.; PIFERRER, F. (2006). Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251: 99-108.
- CANTAS, L.; FRASER, T.W.; FJELLDAL, P.G.; MAYER, I.; SØRUM, H. (2011). The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance. *BMC Vet. Res.*, 7: 71.
- CARTER, C.G.; MCCARTHY, I.D.; HOULIHAN, D.F.; JOHNSTONE, R.; WALSINGHAM, M.V.; MITCHELL, A.I. (1994). Food consumption, feeding behaviour, and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Can. J. Zool.*, 72: 609-617.
- COX, C.L.; SECOR, S.M. (2010). Integrated postprandial responses of the diamondback water snake, *Nerodia rhombifer*. *Physiol. Biochem. Zool.*, 83: 618-631.
- ENGROLA, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; DIAS L.; PEREIRA, R.; RIBEIRO, L.; DINIS, M.T. (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquac. Res.*, 38: 696-707.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, E. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95: 271-278.

- FAO (2018a). Salmón del Atlántico - *Salmo salar*, visto el 28 de mayo de 2018. <http://www.fao.org/fishery/affris/perfiles-de-las-especies/atlantic-salmon/salmon-del-atlantico-pagina-principal/es/>
- FAO (2018b). Visión general del sector acuícola nacional. Noruega, visto el 30 de mayo de 2018. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_norway/es
- FAO (2018c). Programa de información de especies acuáticas. *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), visto el 30 de mayo de 2018. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/es#tcNA0064
- FAWLEY, J.; GOURLAY, D. (2016). Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *J. Surg. Res.*, 202: 225-234.
- FERNÁNDEZ, I.; HONTORIA, F.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; KOTZAMANIS, Y.; ESTÉVEZ, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; GISBERT, E. (2008). Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283: 102-115.
- FUNDACIÓN TERRAM (2004). Escape de salmones: Cuando la depredación sale de sus jaulas. *Análisis de coyuntura salmonicultura* nº1. Santiago. 10 pp.
- GOLDBERG, R.F.; AUSTEN, W.G.; ZHANG, X.; MUNENE, G.; MOSTAFA, G.; BISWAS, S.; MCCORMACK, M.; EBERLIN, K.R.; NGUYEN, J.T.; TATLIDEDE, H.S.; WARREN, H.S.; NARISAWA, S.; MILLÁN, J.L.; HODIN, R.A. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105: 3551-3556.
- GOOD, C.; DAVIDSON, J. (2016). A review of factors influencing maturation of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with focus on water recirculation aquaculture system environments. *J. Wor. Aquac. Soc.*, 47: 605-632.
- HIDALGO, F.; ALLIOT, E. (1987). La digestión en los peces, en: *Nutrición en acuicultura I*. Ed. FEUGA. Madrid: 85-122.
- HUSSAIN, M.G.; PENMAN, D. J.; McANDREW, B.J.; JOHNSTONE, R. (1993). Suppression of first cleavage in the Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus* L. - a comparison of the relative effectiveness of pressure and heat shocks. *Aquaculture*, 111: 263-270.
- JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; DINGWALL, A.; MITCHELL, D.; SELKIRK, C.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. (2000). Muscle fibre density in relation to the colour and textural of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 189: 335-349.
- JOHNSTONE, R.; STET, R.J.M. (1995). The production of gynogenetic Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 819-826.
- KROGDAHL, A.; NORDRUM, S.; SØRENSEN, M.; BRUDESETH, L.; RØSJØ, C. (2001). Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of

- subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquac.Nutr.*, 5: 121-133.
- KROGDAHL, Å.; SUNDBY, A.; HOLM, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture*, 449: 27-36.
- LEMIEUX, H.; LE FRANÇOIS, N.R.; BLIER, P.U. (2003). The early ontogeny of digestive and metabolic enzyme activities in two commercial strains of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.*, 299A: 151-160.
- LIU, Z.; ZHOU, Y.; LIU, S.; ZHAO, Q.; FENG, J.; LU, S.; XIONG, G.; XIE, D.; ZHANG, J.; LIU, Y. (2014). Characterization and dietary regulation of oligopeptide transporter (PepT1) in different ploidy fishes. *Peptides*, 52: 149-156.
- MARINE HARVEST (2016). Salmon farming industry handbook 2016, visto el 14 de Junio del 2018. <http://hugin.info/209/R/2023118/751659.pdf>
- MAXIME, V. (2008). The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, 9: 67-78.
- MEDINA, A. (2018). La acuicultura no consigue ser sostenible: contaminación, biodiversidad, acuaponía..., visto el 26 de septiembre del 2018. <https://blogsostenible.wordpress.com/2018/01/07/acuicultura-piscifactoria-insostenible-contaminacion-biodiversidad-acuaponia/>
- MOYANO, F.J.; DIAZ, M.; ALARCÓN, F.J.; SARASQUETE, M.C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. Ed. The National Academies Press. Washington, D.C. 392 pp.
- NISHI, T.; HARA, H.; HIRA, T.; TOMITA, F. (2001). Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal Cells. *Exp. Biol. Med.*, 226: 1031-1036.
- ORREGO, R. (2015). Análisis del desarrollo de la producción de smolt: escenario productivo, calidad y normativa. *Salmoexpert*. Visto el 13 de junio de 2018. <https://www.salmonexpert.cl/article/an-aacute-lisis-del-desarrollo-de-la-producci-oacute-n-de-smolt-escenario-productivo-calidad-y-normativa/>
- PERUZZI, S.; HAGEN, Ø.; JOBLING, M. (2015). Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Int.*, 23: 1105-1108.
- PERUZZI, S.; JOBLING, M.; FALK-PETERSEN, I.-B.; LEIN, I.; PUVANENDRAN, V. (2013). Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 1104-1108.

- PERUZZI, S.; KETTUNEN, A.; PRIMICERIO, R.; KAURIĆ, G. (2007). Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.*, 38: 926-932.
- PERUZZI, S.; PUVANENDRAN, V.; RIESEN, G.; SEIM, R.R.; HAGEN, Ø.; MARTÍNEZ-LLORENS, S.; FALK-PETERSEN, I.B.; FERNANDES, J.M.O.; JOBLING, M. (2018). Growth and development of skeletal anomalies in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed phosphorus-rich diets with fish meal and hydrolyzed fish protein. *PLoS One*, 13: e0194340.
- PIFERRER, F.; BEAUMONT, A.; FALGUIÈRE, J.C.; FLAJSĤANS, M.; HAFFRAY, P.; COLOMBO, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293: 125-156.
- RØNNESTAD, I.; YÚFERA, M.; UEBERSCHÄR, B.; RIBEIRO, L.; SÆLE, Ø.; BOGLIONE, C. (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquac.*, 5: S59-S98.
- ROUBATY, C.; PORTMANN, P. (1988). Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate, D-glucose, and D-glucose-6-phosphate. *Pflügers Arch.*, 412: 482-490.
- SAHLMANN, C.; GU, J.; KORTNER, T.M.; LEIN, I.; KROGDAHL, Å.; BAKKE, A.M. (2015). Ontogeny of the digestive system of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and effects of soybean meal from start-feeding. *PLoSOne*, 10: e0124179.
- SAMBRAUS, F.; FJELLDAL, P.G.; REMØ, S.C.; HEVRØY, E.M.; NILSEN, T.O.; THORSEN, A.; HANSEN, T.J.; WAAGBØ, R. (2017). Water temperature and dietary histidine affect cataract formation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diploid and triploid yearling smolt. *J. Fish Dis.*, 40: 1195-1212.
- SANTIGOSA, E.; SÁNCHEZ, J.; MÉDALE, F.; KAUSHIK, S.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; 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.
- SMITH, B.J.; SMITH, S.A.; TENGGJAROENKUL, B.; LAWRENCE, T.A. (2000). Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapia Fish, *Oreochromis niloticus* L. *Cells Tissues Organs*, 166: 294-303.
- SUNDE, J.; TARANGER, G.L.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. (2001). Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 25: 335-345.
- TARANGER, G.L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R.W.; FONTAINE, P.; ZANUY, S.; FELIP, A.; WELTZIEN, F.A.; DUFOUR, S.; KARLSEN, Ø.; NORBERG, B.; ANDERSSON, E.; HANSEN, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165: 483-515

- TAYLOR, J.F.; WAAGBØ, R.; DIEZ-PADRISA, M.; CAMPBELL, P.; WALTON, J.; HUNTER, D.; MATTHEW, C.; MIGAUD, H. (2014). Adult triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) have higher dietary histidine requirements to prevent cataract development in seawater. *Aquac. Nutr.*, 21: 18-32.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T.; SMITH, S.A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 182: 317-327.
- THORPE, J.E. (2004). Life history responses of fishes to culture. *J. Fish Biol.*, 65: 263-285.
- TIWARY, B.K.; KIRUBAGARAN, R.; RAY, A.K. (2004). The biology of triploid fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 14: 391-402.
- WALTER, H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates, en: H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. VerlagChemie. Weinheim: 270-277.
- WORLD WILDLIFE FUND, 2018. Industries: Farmed Salmon, visto el 20 de junio de 2018. <https://www.worldwildlife.org/industries/farmed-salmon>
- YE, Y.; NGO, H.H.; GUO, W.; LIU, Y.; LI, J.; LIU, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; JIA, H. (2017). Insight into chemical phosphate recovery from municipal wastewater. *Sci. Total Environ.*, 576: 159-171.
- YÚFERA, M.; MOYANO, F. J.; ASTOLA, A.; POUSSÃO-FERREIRA, P.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. (2012). Acidic Digestion in a Teleost: Postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS ONE*, 7: e33687.
- ZAMANI, A.; MORADLOU ABD ALMAJID, H.; MADANI, R.; JOHARI, A.; KALBASSI, M.R.; FARHANGHI, M. (2006). Comparison of digestive enzyme activity in the stomach, pyloric caeca and intestine in diploid and triploid female of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ira. Scien. Fishe. Jour.*, 15: 29-36.
- ZAMORA, S.; RUBIO, V.C. (2009). La digestión en los peces, en: *La nutrición y la alimentación en piscicultura*. Ed. Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura. Madrid: 15-46.