

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Producción Animal



**TESIS DOCTORAL**

**Repercusiones sobre el bienestar y la calidad de la carne del  
manejo previo sacrificio de la trucha arcoíris**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Rubén Bermejo Poza**

Directores

**Jesús de la Fuente Vázquez**  
**Morris Villarroel Robinson**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



**REPERCUSIONES SOBRE EL BIENESTAR Y  
LA CALIDAD DE LA CARNE DEL MANEJO  
PREVIO SACRIFICIO DE LA TRUCHA  
ARCOÍRIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Rubén Bermejo Poza**

Bajo la dirección de los Doctores:

Jesús De la Fuente Vázquez

Morris Villarroel Robinson

**Madrid, 2016**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**REPERCUSIONES SOBRE EL BIENESTAR Y  
LA CALIDAD DE LA CARNE DEL MANEJO  
PREVIO SACRIFICIO DE LA TRUCHA  
ARCOÍRIS**

**Rubén Bermejo Poza**

**Madrid, Septiembre, 2016**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**REPERCUSIONES SOBRE EL BIENESTAR Y  
LA CALIDAD DE LA CARNE DEL MANEJO  
PREVIO SACRIFICIO DE LA TRUCHA  
ARCOÍRIS**

**Memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria**

**Rubén Bermejo Poza para optar al grado**

**de Doctor en Veterinaria**

**Madrid, Septiembre, 2016**



**D. Jesús De la Fuente Vázquez**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Producción Animal de la Universidad Complutense de Madrid, y **D. Morris Villarroel Robinson**, Profesor Titular Interino del Departamento de Producción Agraria de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid,

**CERTIFICAN:** Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Repercusiones sobre el bienestar y la calidad de la carne del manejo previo sacrificio de la trucha arcoíris”, del que es autor el Licenciado en Veterinaria **D. Rubén Bermejo Poza**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Para que conste, firman la presente en Madrid, Septiembre, 2016.

Fdo.: Jesús De la Fuente Vázquez

Fdo.: Morris Villarroel Robinson



“Cuando sabes lo que quieres, y lo quieres lo suficiente, encontrarás la forma de conseguirlo”

**Jim Rohn**



# **AGRADECIMIENTOS**

---



## AGRADECIMIENTOS

Finalmente ha llegado el momento de escribir estas páginas después de tanto tiempo. Al terminar con un trabajo tan extenso como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable pensar en todas las horas que he empleado en ello, lo que lleva a menudo a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo y participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas de un modo u otro para terminar con este proyecto. Por ello, es un placer para mí poder utilizar estas líneas, sin normas ni rigurosa redacción científica, para ser justo y consecuente con todas aquellas personas que han sumado su granito de arena a esta gran montaña.

A mis directores, los Dres. Jesús De la Fuente Vázquez y Morris Villarroel Robinson. A Jesús por ser el primero en confiar en mí hace ya mucho tiempo cuando sólo era un alumno interno en el departamento y por todos estos años en los que no ha dejado de enseñarme a ser un mejor investigador, y por supuesto por siempre buscar la forma de sacar tiempo para hacerme correcciones aunque fuera a altas horas de la noche o en sus vacaciones. A Morris por introducirme en el mundo de la acuicultura y enseñarme a ser más organizado en el trabajo, por buscarme siempre congresos a los que asistir para mejorar mis capacidades de presentación en público y mi perfil internacional, y por nuestras largas conversaciones a la hora de escribir artículos que me han permitido mejorar muchísimo mi redacción científica desde que empecé con esta tesis doctoral.

Al resto de personas del Departamento de Producción Animal y de la Facultad de Veterinaria de la UCM que me han ayudado en este proceso, en especial a las Dras. Elisabeth González de Chávarri, Sara Lauzurica y Concepción Pérez. A Elisabeth por su gran capacidad de razonamiento y de redacción y por ahorrarnos mucho tiempo en los muestreos al eviscerar y coger muestras más rápido que ninguno del grupo. A Sara por ser la mente fría a la hora de diseñar las pruebas y haber evitado que nos pasáramos días enteros cogiendo muestras, además por dejarme conocerla y reírme tantas veces con su humor. A Concha por ser tan cercana y hacerme sentir siempre como en casa en el departamento o en los muestreos, siempre pendiente de llevar comida para todos y de dejarlo todo limpio con su “servicio de limpieza”.

A la Dra. María Teresa Díaz, por leerse a fondo esta tesis doctoral sin ser parte de mis directores y sugerirme cambios que han hecho este trabajo mucho más completo.

A la Universidad Complutense de Madrid, y en especial a todas las personas que forman parte de la Facultad de Veterinaria, lugar que se ha convertido en mi segundo hogar por todos los años que he pasado aquí formándome y después trabajando.

A la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la UPM, por enseñarme otra visión de la producción animal diferente y por dejarme un huequito en la sala de becarios de los campos de prácticas para trabajar estos años.

A la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de la UPM por dejarme su piscifactoría para la realización de algunas de las pruebas que componen esta tesis doctoral y, en especial, al encargado de estas instalaciones, el Dr. Fernando Torrent, por estar disponible siempre para nosotros y por las conversaciones tan interesantes que hemos tenido sobre la acuicultura.

Al futuro Dr. Jorge López-Tello, que empezamos en esto juntos y vamos a acabar con muy pocos meses de diferencia, por ser la persona clave durante todo el doctorado que siempre ha estado ahí en los buenos y en los malos momentos cuando le he necesitado y que nunca me ha dejado tirar la toalla, por todas las risas que nos hemos echado en los numerosos días de trabajo hasta altas horas, por tu ayuda con mi nulo talento con el PowerPoint,... Podría escribir muchas cosas más pero me quedaría corto, así que solamente decir que para mí eres un hermano más y que espero seguir viendo muchos años como te conviertes en un gran investigador, de lo cual no tengo ninguna duda, ya que estoy seguro al decir que eres la persona más válida para la investigación de todas con las que me he cruzado en estos años.

A Raquel Angulo, por ser una amiga incondicional que siempre saca una sonrisa ante cualquier problema. Gracias por tu apoyo constante y por aguantarme y darme conversación siempre aunque haya tenido un mal día. Aunque acabemos en sitios distintos del mapa estoy seguro que siempre te voy a tener a mi lado por mucha distancia que haya.

A Javier Mota, mi “bro” y el mejor clínico veterinario de Edimburgo, por demostrarme que aunque estando lejos se puede mantener una gran amistad, ayudándome siempre que lo he necesitado o llamando simplemente para echar unas risas. Gracias por no dejar nunca de animarme con el doctorado y por esas notas de voz de cinco minutos que me mandas cuando sales de la clínica y que siempre me hacen reír a carcajadas.

A Carlos Diezma, orgulloso habitante de Los Yébenes, por ayudarme en el laboratorio cuando empezaba con el doctorado durante el máster y por ser un buen amigo desde entonces.

A Sara Arribas, por ser uno de mis mayores apoyos en este último año de doctorado en el que has pasado a ser de una compañera de trabajo a una gran amiga.

A Ana Sánchez, por los buenos ratos que nos hemos echado estos últimos meses comiendo juntos. Te he descubierto tarde aun siendo de mi promoción pero me alegro muchísimo de haberte conocido mejor. No me olvido tampoco de More, el gato más guapo de toda la UCM!

A Cristina Pérez y Elisabeth Apeleo, compañeras de largos días en el laboratorio. A Cris por enseñarme su forma de trabajar en el laboratorio, gracias a ti he aprendido como se trabaja bien entre pipetas y matraces. A Eli por enseñarme a relativizar los problemas y por nuestros domingos de cañas y montaditos.

Al resto de mis amigos, los que nos vemos siempre que podemos de cena en cena, a las dos Beas, Angy, Celia, Álex y Fran. En especial a Beatriz Escribano, que nunca dice que no a ningún plan y es de las mejores compañeras de viaje que puedo tener, y a Angélica Torti, la Torti para mí, por nuestras largas conversaciones en las que es imposible aguantar la risa y sus continuos ánimos con la tesis.

A mi pequeña manada de perretes, Lucas y Yako, por estar siempre dispuestos a alegrarme el día al llegar a casa y quitarme el estrés.

A mis padres, Cristina y Manolo, y hermanos, Estefanía y Manu, por haberme ayudado y apoyado en todo momento y por animarme constantemente, así como al resto de mi familia, tías y abuela, por su gran apoyo y comprensión. Sin vosotros no habría sido posible escribir esta tesis.

Finalmente agradezco a todas las personas que directa o indirectamente me hayan ayudado en la realización de esta tesis doctoral y que debido a mi mala memoria se me hayan podido olvidar. A todos, muchas gracias.

# ÍNDICE

---



<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1. IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA.....	19
2.1.1. <i>Situación de la acuicultura en el mundo</i> .....	19
2.1.2. <i>La acuicultura en España</i> .....	21
2.1.3. <i>La trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)</i> .....	22
2.1.3.1. Situación de la producción acuícola.....	22
2.1.3.2. Sistema de producción.....	23
2.2. RESPUESTA DE ESTRÉS EN PECES TELEÓSTEOS .....	24
2.3. MANEJO PRE-SACRIFICIO .....	27
2.3.1. <i>Ayuno</i> .....	28
2.3.1.1. Grados día de ayuno .....	29
2.3.1.2. Frecuencia de alimentación.....	32
2.4. BIENESTAR ANIMAL Y SU VALORACIÓN .....	34
2.4.1. <i>Bienestar animal</i> .....	34
2.4.2. <i>Medida del bienestar animal</i> .....	37
2.4.2.1. Parámetros biométricos.....	37
2.4.2.2. Parámetros hematológicos .....	39
2.4.2.3. Parámetros metabólicos .....	47
2.5. CALIDAD DE CARNE .....	50
2.5.1. Rigor mortis.....	54
2.5.2. <i>pH muscular</i> .....	56
2.5.3. <i>Capacidad de retención de agua</i> .....	56
2.5.4. <i>Color del músculo y piel</i> .....	57
2.5.5. <i>Oxidación lipídica</i> .....	58
2.5.6. <i>Ácidos grasos</i> .....	59
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
3.1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO .....	65
3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES .....	66
3.2.1. <i>Experimento 1</i> .....	66
3.2.2. <i>Experimento 2</i> .....	67
3.2.3. <i>Experimento 3</i> .....	69
3.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	72
3.3.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	72
3.3.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	73
3.3.2.1. Cortisol .....	74
3.3.2.2. Glucosa.....	74
3.3.2.3. Lactato .....	75
3.3.2.4. Triglicéridos.....	76
3.3.2.5. Lactato deshidrogenasa (LDH) .....	77
3.3.2.6. Creatin fosfoquinasa (CPK).....	77
3.3.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	78
3.3.3.1. Glucógeno hepático y muscular.....	78
3.3.3.2. Ratio IMP/ATP .....	79

3.3.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	80
3.3.4.1. <i>Rigor mortis</i> .....	80
3.3.4.2. <i>pH muscular</i> .....	80
3.3.4.3. <i>Capacidad de retención de agua</i> .....	81
3.3.4.4. <i>Color</i> .....	82
3.3.4.5. <i>Oxidación lipídica (TBARs)</i> .....	82
3.3.4.6. <i>Ácidos grasos</i> .....	84
3.4. <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	86
3.4.1. <i>Aspectos generales</i> .....	86
3.4.2. <i>Experimento 1</i> .....	87
3.4.3. <i>Experimento 2</i> .....	88
3.4.4. <i>Experimento 3</i> .....	88
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
CAPÍTULO I: EFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE .....	93
4.1.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	95
4.1.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	97
4.1.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	98
4.1.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	99
CAPÍTULO II: REDUCCIÓN DEL EFECTO DEL AYUNO PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y CALIDAD DE LA CARNE .....	103
4.2.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	104
4.2.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	106
4.2.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	109
4.2.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	112
CAPÍTULO III: EFECTO DEL AYUNO Y DEL DESPESQUE PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE .....	117
4.3.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	119
4.3.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	120
4.3.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	123
4.3.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	125
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>137</b>
CAPÍTULO I: EFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE .....	139
5.1.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	141
5.1.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	142
5.1.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	145
5.1.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	145
5.1.5. <i>Conclusiones parciales</i> .....	146
CAPÍTULO II: REDUCCIÓN DEL EFECTO DEL AYUNO PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y CALIDAD DE LA CARNE .....	147
5.2.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	149
5.2.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	150
5.2.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	152
5.2.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	153
5.2.5. <i>Conclusiones parciales</i> .....	155

CAPÍTULO III: EFECTO DEL AYUNO Y DEL DESPESQUE PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE .....	157
5.3.1. <i>Parámetros biométricos</i> .....	159
5.3.2. <i>Parámetros hematológicos</i> .....	160
5.3.3. <i>Parámetros metabólicos</i> .....	162
5.3.4. <i>Parámetros de calidad de canal y de carne</i> .....	163
5.3.5. <i>Conclusiones parciales</i> .....	167
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>175</b>
<b>ANEXO I: ABREVIATURAS.....</b>	<b>207</b>
<b>ANEXO II: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....</b>	<b>213</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1.</b> Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2013 (Adaptado de APROMAR, 2015) .....	<b>20</b>
<b>FIGURA 2.2.</b> Distribución porcentual de la producción de acuicultura mundial en el año 2013 (Extraído de datos de la FAO).....	<b>20</b>
<b>FIGURA 2.3.</b> Producción acuícola en España desde 1950 a 2013 (Extraído de datos de la FAO).....	<b>21</b>
<b>FIGURA 2.4.</b> Producción acuícola de trucha arcoíris en España desde 1950 a 2013 (Extraído de datos de la FAO).....	<b>22</b>
<b>FIGURA 2.5.</b> Ciclo de producción intensiva de la trucha arcoíris (FAO, 2012b).....	<b>23</b>
<b>FIGURA 2.6.</b> Efectos generales de la respuesta de estrés (Elaboración propia a partir de Barton e Iwama, 1991).....	<b>25</b>
<b>FIGURA 2.7.</b> Desarrollo de la respuesta primaria de estrés en peces .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 2.8.</b> Distribución de receptores del dolor en la trucha arcoíris (Sneddon <i>et al.</i> , 2003) .....	<b>36</b>
<b>FIGURA 2.9.</b> Efecto del cortisol sobre el incremento de triglicéridos, lactato y glucosa en sangre .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 2.10.</b> Efectos metabólicos del cortisol en los peces (Adaptado de Mommsen <i>et al.</i> , 1999).....	<b>42</b>
<b>FIGURA 2.11.</b> Diferencia funcional del glucógeno hepático y muscular .....	<b>47</b>
<b>FIGURA 2.12.</b> Degradación <i>post-mortem</i> del ATP en el músculo de los peces (Adaptado de Gill, 1992) .....	<b>49</b>
<b>FIGURA 2.13.</b> Procesos bioquímicos en peces durante la fase <i>post-mortem</i> y principales indicadores de calidad de carne (Adaptado de Poli <i>et al.</i> , 2005).....	<b>52</b>
<b>FIGURA 2.14.</b> Metabolismo anaeróbico y aeróbico del glucógeno muscular en peces (Adaptado de Huss, 1995).....	<b>53</b>
<b>FIGURA 2.15.</b> Evolución del <i>rigor mortis</i> en peces en función de la concentración de creatina fosfato (CP), ATP y ácido láctico.....	<b>55</b>
<b>FIGURA 2.16.</b> Rutas de biosíntesis en peces de ácidos grasos C20 y C22 a partir de ácidos grasos precursores C18 n-9, C18 n-6 y C18 n-3 (Adaptado de Tocher, 2003).....	<b>60</b>
<b>FIGURA 3.1.</b> Instalaciones utilizadas para el desarrollo de los experimentos. A) Experimento 2 en la piscifactoría Naturix (Guadalajara, España). B) Experimentos 1 y 3 en la piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid (Madrid, España)...	<b>66</b>
<b>FIGURA 3.2.</b> Diseño experimental del Experimento 1. Grupos experimentales y número de peces en cada uno.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 3.3.</b> Diseño experimental del Experimento 2. A) Grupos experimentales y número de peces en cada uno. B) Cronograma de la prueba indicando los días que fueron alimentados los peces de cada grupo y los días de sacrificio (S) a dos y nueve días de ayuno .....	<b>69</b>
<b>FIGURA 3.4.</b> Diseño experimental del Experimento 3. Grupos experimentales y número de peces en cada uno.....	<b>70</b>
<b>FIGURA 3.5.</b> Medición del peso (A) y la longitud corporal o estándar (B).....	<b>72</b>
<b>FIGURA 3.6.</b> Evisceración de la trucha arcoíris señalando mediante flechas la localización del hígado, gónadas, aparato digestivo y bazo .....	<b>73</b>
<b>FIGURA 3.7.</b> Extracción de muestras de sangre de la vena caudal.....	<b>73</b>
<b>FIGURA 3.8.</b> Medición del ángulo del <i>rigor mortis</i> .....	<b>80</b>

<b>FIGURA 3.9.</b> Medición del pH muscular .....	<b>81</b>
<b>FIGURA 3.10.</b> Determinación de la capacidad de retención de agua. A) Muestras del músculo de la trucha sobre el papel de filtro. B) Placas de metacrilato presionando la carne. C) Áreas resultantes de la muestra y del agua liberada .....	<b>81</b>
<b>FIGURA 3.11.</b> A) Formación del malondialdehído (MDA) a partir de los radicales peroxilo del ácido graso C18:3; B) Formación del cromóforo a partir de ácido 2-tiobarbitúrico y MDA (Adaptado de Laguerre <i>et al.</i> , 2007) .....	<b>83</b>
<b>FIGURA 3.12.</b> Escala de color de los patrones para la determinación de TBARs y color obtenido por las muestras.....	<b>83</b>
<b>FIGURA 4.1.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio .....	<b>95</b>
<b>FIGURA 4.3.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de cortisol, glucosa y lactato con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio.....	<b>97</b>
<b>FIGURA 4.4.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de triglicéridos y de la actividad enzimática de la creatin fosfoquinasa con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio.....	<b>98</b>
<b>FIGURA 4.5.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color del hígado (L*, C* y h*) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio .....	<b>99</b>
<b>FIGURA 4.6.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del establecimiento del <i>rigor mortis</i> (4 y 24 horas <i>post-mortem</i> ) y ph muscular (0 horas <i>post-mortem</i> ) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio .....	<b>100</b>
<b>FIGURA 4.7.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de la piel (L*, C* y h*) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio.....	<b>101</b>
<b>FIGURA 4.8.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) .....	<b>104</b>
<b>FIGURA 4.9.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del índice digestivo-somático, contenido estomacal y rendimiento canal en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) .....	<b>105</b>
<b>FIGURA 4.10.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del índice hepatosomático en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>106</b>
<b>FIGURA 4.11.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de las concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) .....	<b>107</b>
<b>FIGURA 4.12.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de las concentraciones plasmáticas de lactato y triglicéridos en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>108</b>
<b>FIGURA 4.13.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de las actividades plasmáticas de las enzimas lactato deshidrogenasa y creatin fosfoquinasa en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>109</b>
<b>FIGURA 4.14.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración de glucógeno hepático en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>109</b>

<b>FIGURA 4.15.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de las agallas (L*, C* y h*) en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>111</b>
<b>FIGURA 4.16.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la capacidad de retención de agua del músculo en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) .....	<b>114</b>
<b>FIGURA 4.17.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de la piel (L*, C* y h*) en las diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA).....	<b>115</b>
<b>FIGURA 4.18.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio y el coeficiente de condición corporal para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D).....	<b>119</b>
<b>FIGURA 4.19.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D).....	<b>120</b>
<b>FIGURA 4.20.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de cortisol, glucosa y lactato para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) .....	<b>121</b>
<b>FIGURA 4.22.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del glucógeno hepático para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) .....	<b>123</b>
<b>FIGURA 4.23.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros relacionados con el color (L*, C* y h*) del hígado para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) .....	<b>125</b>
<b>FIGURA 4.24.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los niveles de TBARs en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) .....	<b>128</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 2.1.</b> Comparativa de días y grados día de ayuno (calculados aproximadamente con la temperatura media de cada estudio) en diferentes especies de peces .....	<b>31</b>
<b>TABLA 3.1.</b> Parámetros medios iniciales (media $\pm$ error estándar) en cada uno de los tres experimentos .....	<b>71</b>
<b>TABLA 3.2.</b> Resumen de las medidas y análisis realizados en cada uno de los tres experimentos.....	<b>71</b>
<b>TABLA 3.3.</b> Abreviaturas de los modelos estadísticos empleados en los distintos experimentos .....	<b>87</b>
<b>TABLA 4.1.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración de glucógeno muscular (GM, mg/g) y del ratio imp/atp (I/A) en los diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA), grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) y horas <i>post-mortem</i> (HP).....	<b>110</b>
<b>TABLA 4.2.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los distintos parámetros estudiados relacionados con la calidad de la canal y de la carne ( <i>rigor mortis</i> , RM, °; pH muscular y color del músculo: L*, C* y h*) en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA), grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) y horas <i>post-mortem</i> (HP) .....	<b>113</b>
<b>TABLA 4.3.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del glucógeno muscular (GM, mg/g) y ratio imp/atp (I/A) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 y 48 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>124</b>
<b>TABLA 4.4.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del establecimiento del <i>rigor mortis</i> (RM, °) en distintas horas <i>post-mortem</i> (0, 5, 24 y 48 horas) y las diferencias entre estos tiempos (Dif, °) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D).....	<b>126</b>
<b>TABLA 4.5.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas de los distintos parámetros estudiados relacionados con la calidad de la carne (pH muscular y color del músculo: L*, C* y h*) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) en distintas horas <i>post-mortem</i> (pH: 0 y 48 horas; Color músculo: 0 y 24 horas) .....	<b>128</b>
<b>TABLA 4.6.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos saturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>130</b>
<b>TABLA 4.7.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>131</b>
<b>TABLA 4.8.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>132</b>
<b>TABLA 4.9.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos saturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>134</b>
<b>TABLA 4.10.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>135</b>
<b>TABLA 4.11.</b> Medias ( $\pm$ error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas <i>post-mortem</i> .....	<b>136</b>



## **RESUMEN**

---



## RESUMEN

La acuicultura es un sistema de producción animal en continuo crecimiento, llegando a superar a la producción de la pesca en los últimos años. Dentro de la producción acuícola, el cultivo de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es el tercero más importante a nivel mundial. Sin embargo, el bienestar animal y la calidad de la carne, íntimamente ligados entre sí, han cobrado una mayor importancia en acuicultura tanto en los productores como en los consumidores, siendo necesaria una investigación mayor en estos temas. El manejo previo a la fase final del ciclo de producción va a incluir una serie de prácticas que generan una respuesta de estrés en los peces y si esta respuesta es suficientemente alta puede llegar a afectar negativamente a su bienestar y, consecuentemente, la calidad de la carne va a ser peor. Dos de las prácticas más comunes en esta fase son el ayuno pre-sacrificio, para asegurar un vaciado completo del aparato digestivo que nos reduzca los posibles problemas de contaminación de la canal durante el eviscerado de los peces, y el despesque, que permite extraer los peces de los tanques o jaulas donde están alojados para su sacrificio y posterior procesado. Tanto el ayuno como el despesque son prácticas que no se pueden evitar pero podemos intentar reducir la respuesta de estrés que generan modificando su duración o utilizando técnicas que permitan a los peces adaptarse mejor a estos estímulos estresantes, como puede ser la modificación de las frecuencias de alimentación en el último mes de engorde para una mejor adaptación al ayuno pre-sacrificio.

Así pues, en la presente tesis doctoral se estudiaron las repercusiones del ayuno y despesque previo al sacrificio en la truchas arcoíris tanto sobre el bienestar animal como sobre la calidad de la carne, buscando a la vez la manera de minimizar la respuesta de estrés generada por el ayuno pre-sacrificio mediante distintas frecuencias de alimentación en el último mes de engorde.

Se realizaron tres experimentos para alcanzar estos objetivos, utilizando un total de 564 truchas arcoíris. En el experimento 1 (180 truchas) los peces se sometieron a distintos tiempos de ayuno pre-sacrificio de 3, 4, 5, 6, 7 y 9 días (17,2 grados día-°C d; 22,3 °C d; 28,6 °C d; 35,3 °C d; 41,8 °C d y 55,3 °C d, respectivamente) para determinar el periodo óptimo de ayuno pre-sacrificio en la trucha arcoíris, el cual produzca el menor efecto posible sobre el bienestar animal y la calidad de la carne y la canal. En el experimento 2 (240 truchas) se sometieron a los peces a distintas

frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (diaria, una vez cada dos días o una vez cada cuatro días) y a 2 o 9 días de ayuno (24,3 °C d o 102 °C d, respectivamente) con el fin de determinar si es posible reducir la respuesta de estrés generada por el ayuno pre-sacrificio adaptando a los peces a diferentes frecuencias de alimentación y con ello obtener una mejor calidad de la carne y la canal. Finalmente, en el experimento 3 (144 truchas) se valoró el efecto combinado de un ayuno pre-sacrificio de 7 días (135,6 °C d) junto con el efecto del despesque, situación que fue simulada mediante la persecución de los peces durante 20 min en sus tanques utilizando salabardos.

En los tres experimentos se valoraron una serie de parámetros biométricos (peso sacrificio, crecimiento relativo, coeficiente de condición corporal, contenido estomacal, índice somático del digestivo, índice hepatosomático y rendimiento canal), hematológicos (concentración plasmática de cortisol, glucosa, lactato, triglicéridos y enzimas lactato deshidrogenasa y creatin fosfoquinasa), metabólicos (glucógeno hepático y muscular, ratio IMP/ATP y color del hígado y agallas) y de calidad de canal y de carne (evolución del *rigor mortis*, pH muscular, color de piel y músculo, capacidad de retención de agua, oxidación lipídica y composición del músculo en ácidos grasos). Con estos parámetros obtenidos se pudo valorar el bienestar animal y la calidad de la canal y de la carne en los animales utilizados en los experimentos.

En el experimento 1 se observó que un incremento de los grados día de ayuno produjo una disminución del peso al sacrificio, contenido estomacal, índice somático del digestivo e índice hepatosomático. Los indicadores hematológicos de respuesta de estrés tales como las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa y enzima creatin fosfoquinasa también disminuyeron con el incremento de los grados día de ayuno. De forma contraria, el rendimiento canal y el pH muscular se vieron incrementados con los grados día de ayuno. Por otro lado, un ayuno de 3 (17,2 °C d) o 4 días (22,3 °C d) provocó un incremento de los niveles de cortisol plasmático en las truchas que disminuyeron al aumentar los grados día de ayuno a la vez que las reservas corporales disminuían como se pudo observar en los valores de glucosa plasmáticos e índice hepatosomático.

Los resultados más destacados en el experimento 2 fueron primeramente un crecimiento relativo mayor en los peces alimentados una vez cada dos días y sometidos

a 2 días de ayuno pre-sacrificio (24,3 °C d) respecto al resto de los grupos. La concentración plasmática de cortisol fue similar entre grados día de ayuno en los peces alimentados de forma diaria y una vez cada cuatro días, mientras que en los alimentados una vez cada dos días fue menor a los 2 días de ayuno que a los 9 días (102 °C d), con concentraciones similares de glucosa entre grados día de ayuno. El glucógeno hepático fue mayor a los 2 días de ayuno que a los 9 días excepto en los peces alimentados una vez cada cuatro días, en los cuales la concentración se mantuvo similar entre grados día de ayuno. Finalmente, respecto a la calidad de la carne y la canal, lo más destacado fue un mayor pH muscular en todos los grupos a los 9 días de ayuno y un establecimiento del *rigor mortis* más temprano en el grupo alimentado una vez cada cuatro días a los 9 días de ayuno respecto a los ayunados durante 2 días.

En el experimento 3, el ayuno de 7 días (135,6 °C d) produjo una disminución de los parámetros biométricos, de la concentración plasmática de triglicéridos, del glucógeno hepático y de la luminosidad del hígado. Además afectó en gran medida a la composición en ácidos grasos del músculo, siendo este efecto mayor en los ácidos grasos monoinsaturados y mayor en los poliinsaturados. Por otro lado, el principal efecto del despesque fue un incremento significativo de los niveles de cortisol, glucosa y lactato plasmáticos, así como de la luminosidad del hígado.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral permiten obtener una serie de conclusiones respecto a los objetivos planteados. El periodo óptimo de ayuno pre-sacrificio en la trucha arcoíris se encuentra en un rango de grados día de 17,2-22,3 °C d, ya que nos va a asegurar un vaciado total del aparato digestivo y una menor respuesta de estrés que va a implicar una mejor calidad de la carne. Además, esta respuesta de estrés generada por el ayuno pre-sacrificio se puede reducir aún más mediante la modificación de la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde. En concreto, una frecuencia de alimentación de una vez cada dos días provoca una adaptación en los peces a periodos cortos de ayuno y es capaz de disminuir la respuesta de estrés generada por un ayuno de 2 días (24,3 °C d), permitiendo a los productores acuícolas proporcionar un mejor bienestar animal a los peces y, por tanto, una mejor calidad de su carne. Por último, se confirma el despesque como un gran estímulo estresante para los peces durante el manejo pre-sacrificio, por lo que se recomienda reducir el tiempo de captura a lo mínimo posible.



## **SUMMARY**

---



## SUMMARY

Aquaculture is an animal production system that has undergone continuous growth, exceeding fisheries production in recent years. Within aquaculture production, rainbow trout farming (*Oncorhynchus mykiss*) is the third most important worldwide and is highly developed. However, animal welfare and flesh quality, which are closely linked, have become more important to both aquaculture producers and consumers, so it is necessary to focus research on these issues. Pre-slaughter management includes a number of practices that generate a stress response in fish and if this response is high enough, it may affect fish welfare negatively and consequently flesh quality is going to be worse. Two of the most common practices in this phase are pre-slaughter fasting, ensuring a complete emptying of the digestive system while reducing potential flesh contamination problems during evisceration, and harvesting to remove fish from their raceways or cages for slaughter and subsequent processing. Neither fasting nor harvesting can be avoided but we can try to reduce the stress response that they generate by modifying their duration or using techniques that allow fish to better adapt to these stressors, such as changing feeding frequencies in the last month of fattening for a better adjustment to pre-slaughter fasting.

So, in this thesis, we studied the impact of pre-slaughter fasting and harvesting both on animal welfare and flesh quality in rainbow trout, considering ways to minimize the stress response generated by pre-slaughter fasting using different feeding frequencies in the last month fattening.

Three experiments were performed to achieve these objectives using a total of 564 rainbow trout. In experiment 1 (180 trout), fish were subjected to different periods of pre-slaughter fasting: 3, 4, 5, 6, 7 and 9 days (17.2 degree days-°C d; 22.3 °C d; 28, 6 °C d; 35.3 °C d; 41.8 °C 55.3 °C d, respectively) to determine the optimal pre-slaughter fasting period in rainbow trout, which has minimal negative effects on animal welfare and flesh quality. In experiment 2 (240 trout), fish were subjected to different feeding frequencies in the last month of fattening (daily, once every two days or once every four days) and 2 or 9 days of pre-slaughter fasting (24.3 °C d or 102 °C d, respectively) in order to determine whether it was possible to reduce the stress response generated by the pre-slaughter fasting by adapting fish to different feeding frequencies and thereby obtaining a better flesh quality. Finally, in experiment 3 (144 trout), we analysed the

combined effect of a pre-slaughter fasting of 7 days (135.6 °C d) together with the effect of harvesting, which was simulated in the pre-slaughter phase by pursuing the fish with dip nets during 20 min in their home tanks.

In all experiments, a series of biometric (slaughter weight, relative growth, condition factor, stomach content, digestive somatic index, hepatosomatic index and carcass yield), hematologic (plasma cortisol, glucose, lactate, triglycerides and lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase enzymes) metabolic (liver and muscle glycogen, IMP/ATP ratio and liver and gills color) and flesh quality parameters (*rigor mortis*, muscle pH, skin and muscle color, water holding capacity, lipid oxidation and muscle composition in fatty acids) were assessed to determine animal welfare and flesh quality.

In Experiment 1, it was observed that increasing degree days of fasting produced a decrease in slaughter weight, stomach content, digestive somatic index and hepatosomatic index. Hematologic parameters of stress response such as plasma concentrations of cortisol, glucose and creatine phosphokinase enzyme also decreased with increasing degree days of fasting. On the contrary, carcass yield and muscle pH increased with degree days of fasting. On the other hand, a pre-slaughter fasting of 3 (17.2 °C d) or 4 days (22.3 °C d) caused an increase in plasma cortisol levels in rainbow trout and after 5 days (28,6 °C d) it began to decrease, as well as body reserves, as did plasma glucose values and the hepatosomatic index.

The most significant result in experiment 2 was the higher relative growth in fish fed once every two days and subjected to 2 days of pre-slaughter fasting (24.3 °C d). Plasma cortisol concentration was similar between degree days of fasting in fish fed daily or once every four days, while fish fed once every two days presented lower plasma cortisol at 2 days of fasting than 9 days (102 °C d), with similar glucose concentrations between degree days of fasting. Liver glycogen was higher after 2 days of fasting than 9 days, except in once every four days fed fish, in which case the liver glycogen remained similar between degree days of fasting. Finally, regarding flesh quality, muscle pH was higher in all groups after 9 days of fasting and *rigor mortis* set in sooner in fish fed once every four days at 9 days of fasting.

In experiment 3, a 7 day pre-slaughter fasting (135.6 °C d) resulted in a decrease of all biometric parameters measurements, plasma triglycerides, liver glycogen and liver brightness. It also greatly affected the fatty acid composition of muscle, with this effect being higher in monounsaturated fatty acids than polyunsaturated ones. Furthermore, the main effect of harvesting was a significant increase in plasma cortisol levels, glucose and lactate, and liver brightness.

The results obtained in this thesis suggest series of conclusions. The optimum period of pre-slaughter fasting in rainbow trout is in a range of 17.2 to 22.3 degree days, since that ensures a complete emptying of the digestive system and a lower stress response, which will lead to improved flesh quality. In addition, the stress response generated by pre-slaughter fasting can be reduced by changing the feeding frequency in the last month of fattening. Specifically, feeding on alternate days seems to allow fish to adapt to short periods of fasting decreasing the stress response generated by a 2 day fast (24.3 °C d), improving fish welfare and flesh quality. Finally, harvesting during pre-slaughter handling was confirmed as a major stressor for fish, so the duration of capture time should be minimized.



# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

---



## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día, la población mundial se enfrenta a varios retos y entre ellos uno de los más importantes es satisfacer las necesidades de alimentación para una población en continuo crecimiento. La pesca y la acuicultura juegan un papel muy importante en paliar el hambre mundial, promover la salud y reducir la pobreza (FAO, 2014). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en los últimos 50 años, se ha dado un crecimiento de los productos pesqueros para consumo humano mayor que el de la población mundial, esperándose que en los próximos 10 años la producción total de pesca y acuicultura supere a la de la carne de vacuno, porcino y pollos de carne (FAO, 2012a). Mientras que la pesca es un recurso finito y sometido a niveles de explotación cada vez más altos, el desarrollo de la acuicultura permite una fuente alternativa de suministros pesqueros. Por todo lo anterior, la acuicultura ha sido señalada por la FAO como la actividad económica que permitirá la conservación de los recursos pesqueros y al mismo tiempo satisfacer el auge de la demanda mundial de alimentos (FAO, 2010, 2011, 2014).

Dentro de la producción acuícola, el cultivo de especies de salmónidos como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se encuentra estandarizado desde hace tiempo pero actualmente el bienestar animal y la calidad de la carne, íntimamente ligados entre sí, han cobrado una mayor importancia tanto en los productores como en los consumidores, por lo que es necesaria más investigación en este campo.

La Organización Internacional para la Salud Animal (siglas en francés, OIE) supone que el manejo pre-sacrificio implica situaciones de estrés inevitables para los peces. Sin embargo, uno de los puntos críticos para la obtención de un producto rentable y óptimo en calidad es el manejo pre-sacrificio. Este manejo en la producción de trucha arcoíris incluye un periodo de ayuno y un despesque de los peces previo al aturdimiento que conlleva un ejercicio en los animales, sin embargo, son muy escasos los conocimientos de los efectos de estos procesos sobre el bienestar animal y sobre todo sobre la calidad de la carne.

Así pues, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el **estudio de las repercusiones del ayuno y despesque previo al sacrificio en la truchas arcoíris, tanto sobre el bienestar animal como sobre la calidad de la carne**

Para llevar a cabo dicho objetivo general se han planteado una serie de objetivos más concretos que han sido desarrollados en las tres pruebas experimentales de las que se compone esta memoria:

1. Determinar el efecto de distintos tiempos de ayuno pre-sacrificio, basados en grados-día ( $^{\circ}\text{C d}$ ), sobre la respuesta de estrés y la calidad de la carne.
2. Reducir el efecto del ayuno pre-sacrificio sobre la respuesta de estrés y la calidad de la carne mediante la utilización de distintas estrategias alimentarias en el último mes de engorde.
3. Evaluar el efecto del despesque pre-sacrificio en los peces sobre su respuesta de estrés y la calidad de la carne.

A partir de los resultados obtenidos se sugerirán y recomendarán los procedimientos y prácticas más adecuadas para obtener un producto de alta calidad sin que el bienestar animal se vea altamente comprometido, buscando optimizar los protocolos de manejo pre-sacrificio en la especie más importante de la acuicultura continental en España.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



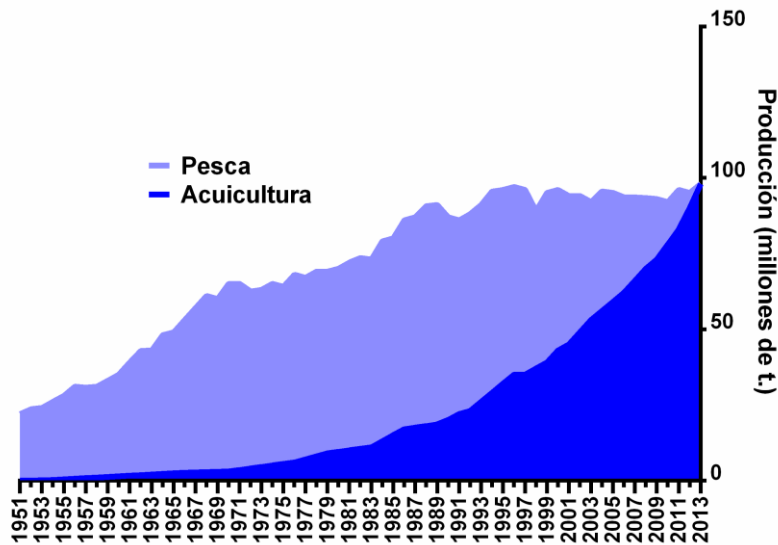
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importancia de la acuicultura

#### 2.1.1. *Situación de la acuicultura en el mundo*

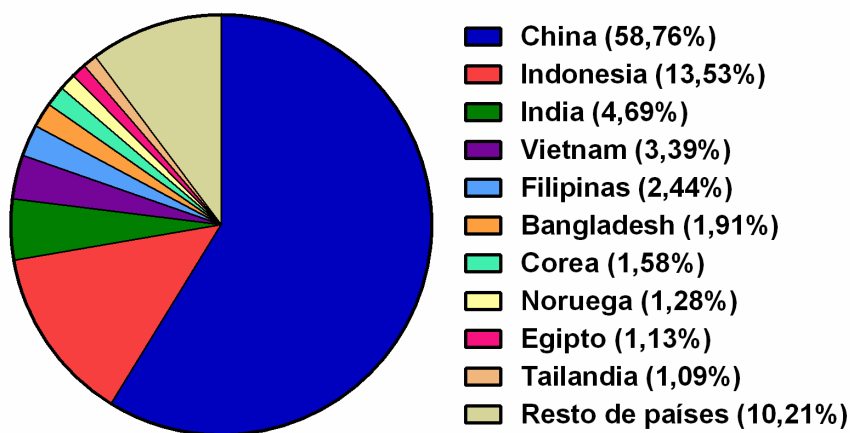
La FAO define la acuicultura como: “Cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica por un lado la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y por el otro la propiedad individual o empresarial del stock cultivado” (Haylor y Bland, 2001).

El suministro de productos de origen acuático para la población mundial viene de la pesca y de la acuicultura, pero la acuicultura no es sólo un complemento de la pesca, sino que es la ganadería con mayor proyección de futuro. Tiene a su favor que el 70% de la superficie del planeta es agua, que no requiere del consumo de agua dulce, que los animales acuáticos son convertidores más eficientes de su alimento que los vertebrados terrestres y que sus tasas de reproducción son varios órdenes de magnitud superiores a los de los vertebrados terrestres (APROMAR, 2015). La pesca junto con la acuicultura suministró a la población mundial un total de 191 millones de t de pescado en 2013, de las cuales 93,8 t provinieron de la pesca (49%) y las 97,2 t restantes de la acuicultura (51%), siendo en este año la primera vez que la producción de la acuicultura superó a la de la pesca tras su continuo crecimiento en los últimos 50 años (Figura 2.1). En un futuro más lejano, la acuicultura será la manera más común de aprovisionamiento de productos acuáticos para la mayor parte de la humanidad, como ocurre hoy con la ganadería terrestre frente a la caza, siendo estimado que en el año 2030 la acuicultura supondrá el 65% de toda la producción de pescado (FAO, 2014).



**Figura 2.1.** Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2013 (Adaptado de APROMAR, 2015)

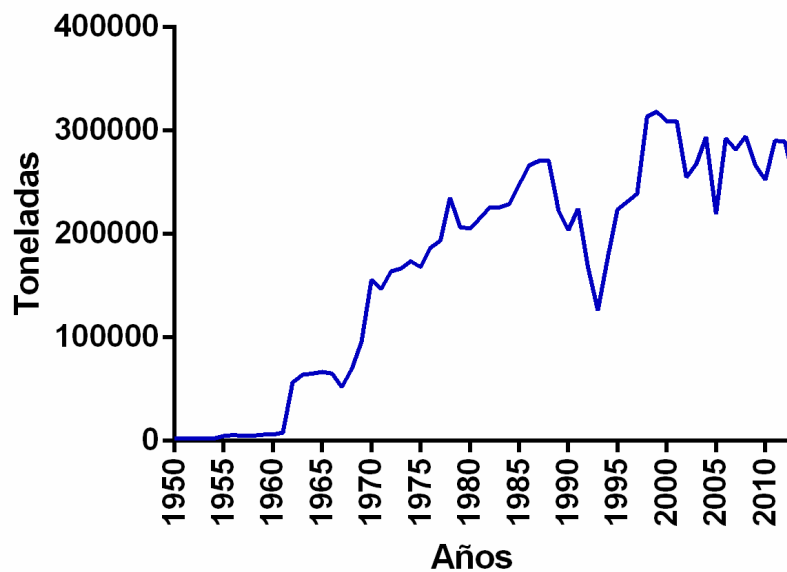
China sigue siendo el primer e indiscutible país productor mundial de acuicultura, con 57,1 millones de t de producción acuícola en 2013, un 5,9% superior a la de 2012. En 2013, las diez principales naciones productoras de acuicultura (Figura 2.2) produjeron 87,3 millones de t, que representa casi el 90% de la producción acuícola mundial, destacando el fuerte crecimiento observado durante 2013 en Indonesia (algas, tilapia, carpas y langostinos) e India (carpas y langostinos), que incrementaron su producción en un 37% y un 8,1%, respectivamente. En relación con el valor económico de la producción mundial de acuicultura, su cuantía superó en 2013 los 125.814 millones de euros en su primera venta.



**Figura 2.2.** Distribución porcentual de la producción de acuicultura mundial en el año 2013 (Extraído de datos de la FAO)

### 2.1.2. La acuicultura en España

España ocupa el puesto 21 en la producción acuícola mundial, con 249.240 t producidas en 2013, un 16% menos que en el año 2012, pero dentro de la Unión Europea es el primer productor en términos de acuicultura, incluyendo las plantas acuáticas. La mayor producción se alcanzó a finales de la década de los 90 (318.469 t, Figura 2.3). La mayoría de esta producción es marina (234.367 t), pero los peces sólo representan 42.363 t de esta producción. Actualmente, las especies de peces marinos cultivados a nivel comercial incluyen: dorada (*Sparus aurata*, 16.335 t), lubina (*Dicentrarchus labrax*, 14.455 t), rodaballo (*Psetta maxima*, 6.787 t) y corvina (*Argyrosomus regius*, 557 t). Otras especies marinas con una menor producción en España son la anguila (*Anguilla anguilla*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), lenguado común (*Solea solea*), atún rojo (*Thunnus thynnus*), sargo común (*Diplodus sargus*), abadejo (*Pollachius pollachius*) y salmón atlántico (*Salmo salar*).



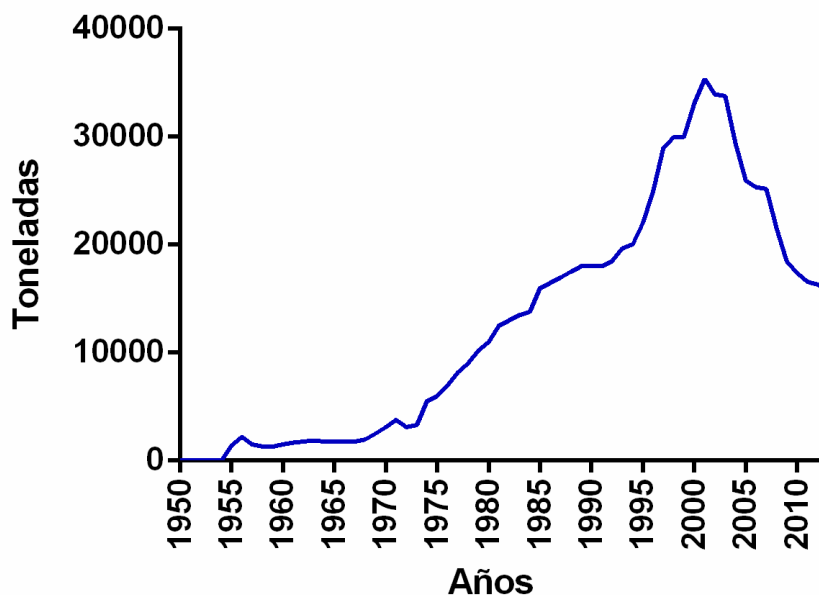
**Figura 2.3.** Producción acuícola en España desde 1950 a 2013 (Extraído de datos de la FAO)

Respecto a la acuicultura nacional de especies de agua dulce y salobre, la especie más importante es la trucha arcoíris, con un total de 14.774 t producidas en 2013, lo que representa un 5,9% de la producción acuícola nacional y un 99% de la acuicultura continental en nuestro país. También hay una producción a pequeña escala de esturión (*Acipenser naccarii*, 93 t) y tenca (*Tinca tinca*, 20,3 t).

### 2.1.3. *La trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)*

#### 2.1.3.1. *Situación de la producción acuícola*

La producción de la trucha arcoíris se ha visto incrementada desde la década de los 50, especialmente en Europa, con un pico en 2001 con 327.920 t, principalmente debido al incremento de la producción en países como Francia, Italia, Dinamarca, Alemania y España para la exportación a Noruega, donde se venden en los mercados directamente o se engordan en jaulas situadas en el mar. La producción mundial de trucha arcoíris se vio incrementada hasta 728.500 t en 2010 y a día de hoy es la tercera especie más producida en acuicultura a nivel mundial. Chile es actualmente el mayor productor con 142.681 t en 2013. En el año 2013 la producción total en Europa fue de 286.054 t, de las cuales fueron producidas un 5,6% (15.868 t) en España, donde la producción alcanzó un máximo en 2001 (35.384 t, Figura 2.4) pero se ha producido un marcado descenso de la misma desde entonces, como en el resto de especies, principalmente debido al incremento de los costes de producción, una disminución del valor comercial, la competición con otras especies y el abandono de las zonas rurales (IS-AC, 2010).



**Figura 2.4.** *Producción acuícola de trucha arcoíris en España desde 1950 a 2013 (Extraído de datos de la FAO)*

### 2.1.3.2. Sistema de producción

En la Figura 2.5 se presenta un esquema del ciclo de producción en acuicultura de la trucha arcoíris.

Primero se lleva a cabo la fertilización de los huevos, previa selección de los reproductores, mediante un método en seco, sin adición de agua. Para la extracción de los huevos es recomendable que las hembras se encuentren anestesiadas para facilitar este proceso y reducir la respuesta de estrés asociada al manejo y posibles golpes. Este proceso se realiza mediante presión desde las aletas pélvicas hasta el área ventral o por desove con aire, método que produce una menor respuesta de estrés en los peces y unos huevos más limpios y saludables. Los machos son tratados de la misma manera que las hembras, recolectando el semen en un recipiente, evitando la contaminación con agua u orina. Se recoge el semen de varios machos y se mezcla con los huevos para reducir la endogamia y asegurar una buena fertilización. También se añade agua a la mezcla para que se activen los espermios y aumente el tamaño de los huevos en un 20% al llenarse el espacio perivitelino entre cáscara y yema, un proceso que se conoce como “endurecimiento del huevo”.

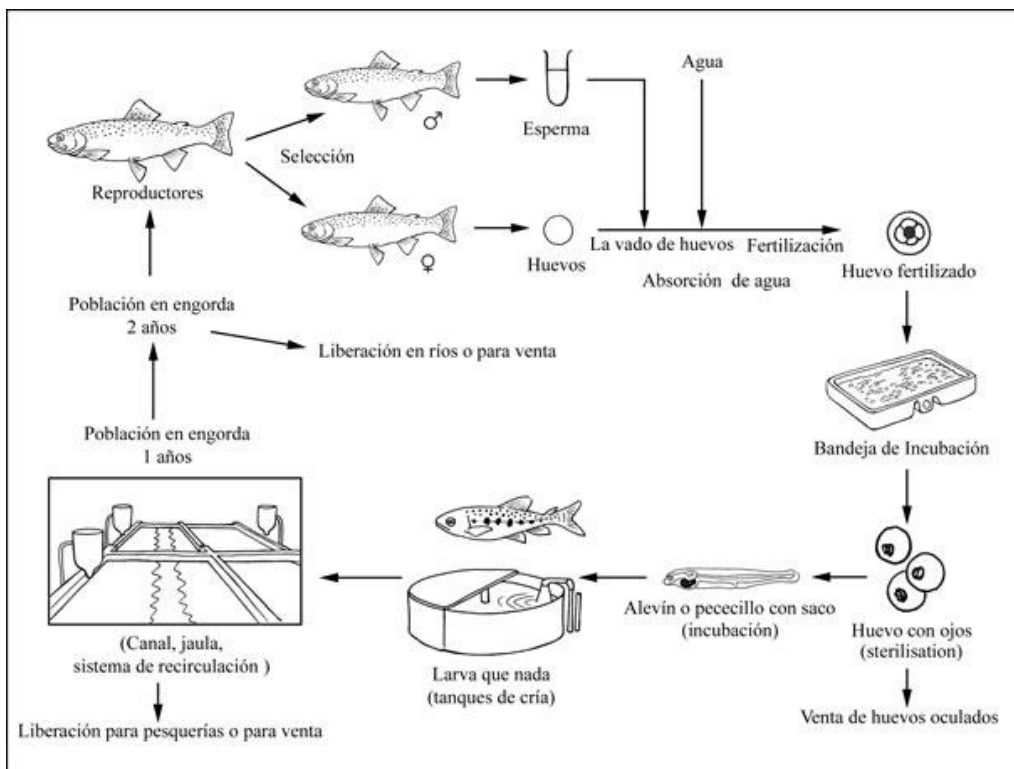


Figura 2.5. Ciclo de producción intensiva de la trucha arcoíris (FAO, 2012b)

Los huevos fertilizados son depositados en bandejas de incubación y en oscuridad hasta que se alcanza la etapa de ova con ojo. El tiempo hasta la eclosión varía dependiendo de la temperatura del agua, con una media de 370 °C d. Las truchas eclosionan con una reserva de alimento en su saco vitelino que va a durar 2-4 semanas, por lo tanto se les llama larvas o alevines con saco. Los huevos incubados separadamente en bandejas son transferidos a bateas de crianza después de eclosionar. Tras la eclosión, se remueven las bandejas y la profundidad del agua en las bateas se mantiene baja (8-10 cm) con un flujo reducido hasta que las larvas alcanzan la etapa de “nadar hacia arriba”, el saco vitelino es absorbido y comienza la búsqueda activa de alimento (10-14 días después de la eclosión).

Los alevines son criados tradicionalmente en tanques de cría, donde son alimentados con dietas iniciales, principalmente en forma de pellets, hechas de harina de pescado (80%), aceites de pescado y granos, que proporcionan el balance nutricional adecuado. Cuando los alevines alcanzan 8-10 cm de longitud se trasladan a instalaciones de engorde al aire libre. Estas pueden constar de canales delimitados, estanques de flujo abierto o jaulas. Los canales individuales y estanques tienen típicamente 2-3 m de ancho, 12-30 m de largo y 1-1,2 m de profundidad. Los canales proporcionan agua bien oxigenada, sin embargo, los peces son vulnerables a la calidad de agua externa y las temperaturas del agua ambiente influyen significativamente las tasas de crecimiento. Los alevines son sembrados en densidades de 25-50 alevines/m<sup>2</sup> para producir hasta 30 kg/m<sup>2</sup> con la alimentación y suministro de agua adecuados, aunque es posible una producción más alta. Los peces son engordados hasta tamaño comercial (30-40 cm), normalmente en 9 meses.

## 2.2. Respuesta de estrés en peces teleósteos

El concepto de estrés es un término muy amplio que se podría definir como un estado en el cual el equilibrio dinámico de los seres vivos, llamado homeostasis, es amenazado o alterado frente a un estímulo extrínseco o intrínseco denominado agente estresante (Chrousos y Gold, 1992). Los efectos producidos por los agentes estresantes son en primer lugar directos, caracterizados por modificaciones hormonales, fisiológicas, metabólicas y celulares, y generando otros efectos indirectos que afectan a la población o comunidad de la especie en cuestión, alterando las relaciones tróficas del sistema. Como se observa en la Figura 2.6, la respuesta de estrés viene dada por una

respuesta adaptativa (capacidad para poder responder a situaciones adversas) y una respuesta no adaptativa (cuando los mecanismos se fuerzan más allá de sus límites empeorando la salud) (Barton e Iwama, 1991). Cuando el agente estresante actúa en un periodo corto de tiempo (minutos u horas) produce una respuesta de estrés aguda, mientras que si por el contrario actúa durante varias horas, días e incluso semanas hablaremos de respuesta de estrés crónica (Pickering, 1998). Por tanto, podemos establecer una relación directa entre el periodo de tiempo durante el que un agente estresante está actuando y el paso de una respuesta adaptativa a no adaptativa (Pickering y Pottinger, 1995).



**Figura 2.6.** Efectos generales de la respuesta de estrés (Elaboración propia a partir de Barton e Iwama, 1991)

En los peces podemos diferenciar tres etapas en la respuesta de estrés (Wedemeyer, 1996):

### Respuesta primaria

En esta fase se producen una serie de cambios endocrinos como consecuencia del estímulo de estrés (Figura 2.7). Esta respuesta neuroendocrina inmediata producida por el estímulo estresante consiste en la liberación de catecolaminas (adrenalina y

noradrenalina) desde las células cromafines de los peces, localizadas en capas, cordones o grupos aislados a lo largo de la vena cardinal y riñón cefálico constituyendo el tejido interrenal, cuyo equivalente en los mamíferos son las células adrenales (Milano *et al.*, 1997). Los niveles de catecolaminas no se miden en la práctica como indicadores de respuesta de estrés ya que son difíciles de determinar y su presencia en el torrente sanguíneo es muy limitada (Bonga, 1997).

Tras la activación de las células cromafines del tejido interrenal se activa el eje hipotálamo-pituitaria-interrenal o eje HPI (Sumpter, 1997). Este eje comienza su activación cuando una serie de neurotransmisores cerebrales provocan la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte de las neuronas que se encuentran en el hipotálamo. Este neuropéptido es transportado desde el hipotálamo a la glándula pituitaria, donde se encargará de activar la producción de hormona adrenocorticotropa (ACTH), que finalmente estimula la producción de cortisol en el tejido interrenal (Sumpter, 1997; Belanger *et al.*, 2001), lo que equivale a la corteza adrenal en los mamíferos (Okawara *et al.*, 1992). La secreción de cortisol es más lenta que la de las catecolaminas ya que, a diferencia de éstas, no se encuentra almacenado y su síntesis tiene que ir precedida de una cascada de señales hormonales como se ha explicado anteriormente. El eje HPI en salmónidos se activa en respuesta a la mayoría de agentes estresantes (contaminantes, acidificantes, hipoxia, cambios de salinidad, interacción social, manejo pre-sacrificio en acuicultura).

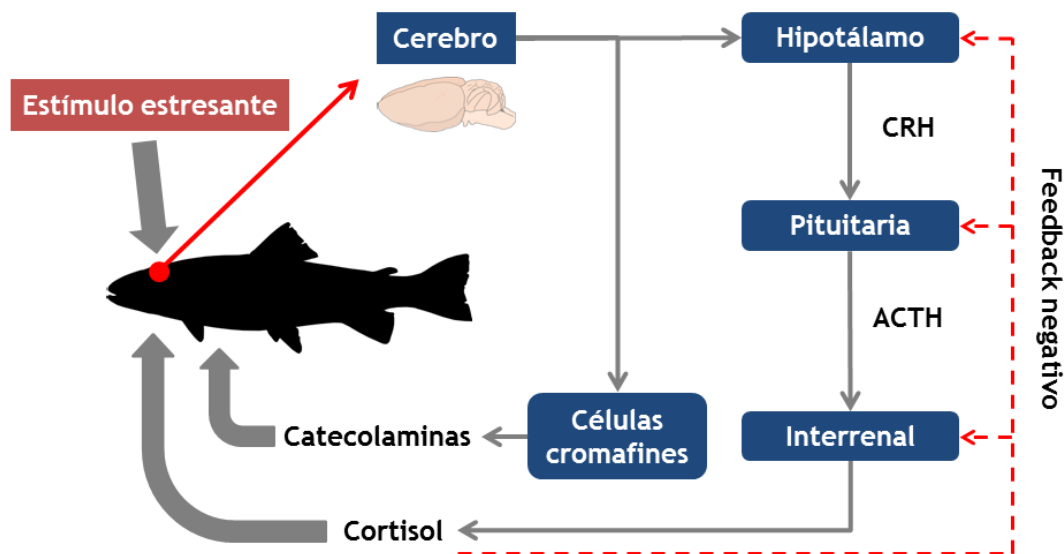


Figura 2.7. Desarrollo de la respuesta primaria de estrés en peces.

### Respuesta secundaria

En esta fase se producen una serie de cambios como consecuencia de la liberación hormonal en la fase anterior. Estos cambios ocurren a nivel fisiológico, metabólico y tisular, incluyendo, entre otros efectos, un aumento del ritmo cardíaco, una movilización de las reservas energéticas, una mayor captación de oxígeno a través de las branquias, mayor demanda de oxígeno, alteraciones del equilibrio hídrico y mineral e incremento de la glucosa en sangre vía glucogenólisis (Pickering y Pottinger, 1995). Por ello la glucosa se emplea entre otros como indicador de respuesta de estrés debido a su incremento en sangre ante un estímulo estresante (Barry *et al.*, 1993).

### Respuesta terciaria

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

## 2.3. Manejo pre-sacrificio

Actualmente, los consumidores demandan unas prácticas de manejo en acuicultura que aseguren un buen nivel de bienestar en los peces. De acuerdo con esta demanda, ha aumentado el interés de la elaboración de protocolos de manejo para salvaguardar el bienestar de los animales en las piscifactorías (López-Olmeda *et al.*, 2012). El manejo pre-sacrificio en acuicultura es importante para el bienestar de los peces (Brown *et al.*, 2010; Digre *et al.*, 2010) y, dentro de este manejo, el despesque y el sacrificio son las fases finales de cualquier ciclo de producción acuícola destinado a la obtención de alimentos para consumo humano. El objetivo principal durante estas fases es evitar las pérdidas económicas debidas a una muerte prematura o a lesiones visibles en los peces. Durante este proceso se llevan a cabo un gran número de prácticas de manejo que pueden generar una respuesta de estrés y afectar al bienestar animal. Situaciones estresantes durante el periodo *ante-mortem* puede afectar a los mecanismos fisiológicos de los animales, empeorando su crecimiento, y a los procesos bioquímicos que se producen durante la fase *post-mortem* que transforman el músculo en carne, influyendo de esta forma sobre la calidad y la

durabilidad del producto final (Azam *et al.*, 1989; Lowe *et al.*, 1993; Marx *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999).

### **2.3.1. Ayuno**

La privación de alimento o ayuno en los peces ocurre de forma habitual en las poblaciones silvestres pero también es una práctica muy utilizada en el cultivo de peces en explotaciones acuícolas. Las poblaciones silvestres se someten a periodos de restricción del alimento debido a la falta de acceso del mismo, fenómenos meteorológicos y durante ciertas fases de su ciclo reproductivo. Por otro lado, las especies cultivadas en acuicultura se someten a periodos de ayuno debido a algunas de las razones anteriormente comentadas en los animales silvestres pero además tienen que hacer frente a periodos de privación de alimento impuestos por el sistema de producción. En acuicultura se emplea el ayuno por varias razones, ya que puede mejorar los problemas de calidad del agua, reducir la respuesta de estrés debida al manejo, reducir los efectos negativos de brotes de enfermedades (Davis y Gaylord, 2011) o para inducir un crecimiento compensatorio con un periodo de realimentación tras un ayuno (Gaylord y Gatlin, 2000; Azodi *et al.*, 2015).

El ayuno de los peces antes de su transporte o sacrificio es un procedimiento común en la acuicultura. Esta práctica, a veces denominada como "purga", fue utilizada originalmente para conseguir un vaciado del intestino de los peces con el fin de reducir los residuos y el consumo de oxígeno durante el transporte (Lines y Spence, 2012). Sin embargo, ahora se reconoce cada vez más que un ayuno previo al sacrificio también mejora la calidad de la carne debido a la disminución de malos sabores (Einen y Thomassen, 1998; Palmeri *et al.*, 2009), el aumento de la firmeza (Sáez *et al.*, 2013) y la frescura durante la conservación en frío (Ginés *et al.*, 2002). El ayuno moderado nos asegura un vaciado del contenido digestivo del pez y una reducción de su actividad metabólica (Robb, 2008), sin embargo, si este es demasiado prolongado puede tener consecuencias muy negativas para el metabolismo del pez, aumentando la utilización de carbohidratos, lípidos y proteínas de diferentes órganos y aumentando la movilización de reservas (Pottinger *et al.*, 2003; Barcellos *et al.*, 2010). Por ello es fundamental diferenciar entre un ayuno a corto plazo o fisiológico, como puede ser la fase inicial de la privación de alimento durante la cual el animal moviliza las reservas disponibles y que tiene una duración media de menos de 7-10 días (Soengas *et al.*, 1996), de un ayuno

a largo plazo o inanición, como es el caso de un ayuno crónico que produce pérdida de peso y un aumento pronunciado del catabolismo proteico y lipídico. El estado metabólico del pez durante estas fases es diferente y, por tanto, el control a nivel endocrino de ambas fases difiere (Farbridge y Leatherland, 1992).

Como se ha explicado en los párrafos anteriores, el ayuno pre-sacrificio es una práctica que se hace de rutina en los sistemas de producción acuícola y genera una respuesta de estrés que podemos intentar disminuir mediante dos vías, la modificación de los grados día de duración de este ayuno o mediante técnicas de manejo que acostumbren o adapten a los peces a periodos sin alimento.

### **2.3.1.1. Grados día de ayuno**

El efecto del ayuno a corto plazo en peces que han sido alimentados de forma regular es poco conocido. Si este ayuno es prolongado puede provocar una disminución del peso vivo (Sumpter *et al.*, 1991) pero no está clara la duración del ayuno a que podemos someter a las truchas arcoíris sin que produzca un efecto negativo en ellas. En la práctica comercial se utiliza un gran rango de periodos de ayuno pre-sacrificio, normalmente mayores a los necesarios para asegurar un vaciado del aparato digestivo. Algunas organizaciones, asociaciones e investigadores han propuesto unas reglas generales respecto a la duración óptima del ayuno previo al sacrificio. De acuerdo con el Farm Animal Welfare Council (FAWC, 1996), la trucha no debería someterse a ayuno hasta las 48 horas previas a su sacrificio por temas de higiene alimentaria y bienestar animal. Sin embargo, la Humane Slaughter Association (HSA, 2005) sugiere que un ayuno de 72 horas es adecuado para completar el vaciado del aparato digestivo y minimizar los efectos adversos en el bienestar animal de los peces. La asociación Compassion in World Farming (CIWF, 2009), de acuerdo con la HSA, indica que periodos de ayuno mayores a 72 horas deberían evitarse en especies como el salmón y la trucha arcoíris, lo que concuerda con Robb (2008), que considera que no hay pruebas de que existan beneficios adicionales con un ayuno mayor de 72 horas, y con Lymbery (2002), que determinó que periodos de ayuno previos al sacrificio mayores de 48-72 horas son excesivos y probablemente perjudiciales para el bienestar animal. Sin embargo, Lines y Spence (2012) concluyeron que un ayuno de 1-5 días previo al sacrificio es poco probable que cause problemas significativos en el bienestar animal e incluso puede tener efectos beneficiosos en la calidad de la carne, aunque por lo general

tiene efectos marginales (López-Luna *et al.*, 2014). Wall (2001) no recomienda un tiempo exacto de ayuno pero subraya que debe ser lo suficientemente largo para conseguir un vaciado total del aparato digestivo. Otros autores han planteado que se requiere un ayuno a largo plazo, de más de 2 semanas, para eliminar malos sabores en los peces criados intensivamente (Einen y Thomassen, 1998; Palmeri *et al.*, 2009), sin embargo esto plantea el riesgo de pérdida de peso y disminución incontrolada en el contenido de lípidos, aunque por el contrario Nikki *et al.* (2004) no encontraron pérdidas de peso significativas en un ayuno de 14 días en trucha arcoíris.

Debido a que los peces son animales ectotérmicos, los periodos de ayuno podrían afectarles de una forma menos pronunciada que a los animales endotérmicos (FSBI, 2002), y el entorno que les rodea influye en su fisiología en mayor medida. La tasa metabólica de los peces y otros animales ectotérmicos está ampliamente determinada por la temperatura ambiental de su entorno (Hazel y Prosser, 1974) y aumenta linealmente durante un rango medio de temperaturas de 17-27 °C (Sharpe y DeMichele, 1977).

En este sentido se debe tener en cuenta la temperatura del agua cuando hablamos de la duración de un ayuno en acuicultura y para ello es recomendado expresar esta duración en grados día acumulados mediante la suma de las temperaturas medias de los días que conste dicho ayuno. Aunque los grados día han sido utilizados durante décadas para describir el crecimiento y el desarrollo en las plantas (Bonhomme, 2000) e insectos (Thorup, 1963), este enfoque es menos común en la investigación acuícola, utilizándose solamente en el 5 % de todos los estudios relacionados con temperatura y crecimiento entre 1980 y 2006 (Neuheimer y Taggart, 2007). Los grados día fueron aplicados al crecimiento por primera vez por Le Cren (1958) pero no fue hasta finales de la década de 1970 que empezó a ser popular su uso en los peces (Chezik *et al.*, 2013). La European Food Safety Authority (EFSA, 2008) indica que no es posible especificar una duración máxima exacta del ayuno, ya que su impacto en el bienestar animal depende del tamaño de los peces, sus reservas lipídicas, fase del ciclo vital en que se encuentren y de la temperatura del agua. Sin embargo, la EFSA (2009) puntualiza que un ayuno prolongado de más de 50 °C d provoca la utilización de las reservas grasas de los peces y posteriormente del tejido funcional, produciendo un daño en el bienestar de los mismos. En la Tabla 2.1 se presenta el rango de días de ayuno y su equivalente en grados día (calculados aproximadamente con la temperatura media) empleado en

diversos estudios. Podemos observar que dependiendo de la especie del pez, su metabolismo es muy diferente, por lo que son capaces de someterse a rangos muy diversos de grados día de ayuno.

**Tabla 2.1.** Comparativa de días y grados día de ayuno (calculados aproximadamente con la temperatura media de cada estudio) en diferentes especies de peces

Especie	Días de ayuno	Grados día	Referencia
<b>Anguila</b> ( <i>Anguilla anguilla</i> )	20; 40; 60; 80	500; 1000; 1500; 2000	Rodríguez <i>et al.</i> , 2009
	3	24	Olsen <i>et al.</i> , 2008
	21	195,3	Kjær <i>et al.</i> , 2009
<b>Bacalao</b> ( <i>Gadus morhua</i> )	28; 42; 56; 77	358,4; 537,6; 716,8; 985,6	Hagen y Solberg, 2010
	12; 13; 45,5; 49; 62	93,6; 101,4; 354,9; 382,2; 483,6	Hanssen <i>et al.</i> , 2012
<b>Dentón común</b> ( <i>Dentex dentex</i> )	35	892,5	Pérez-Jiménez <i>et al.</i> , 2012
<b>Dorada</b> ( <i>Sparus aurata</i> )	1; 4; 8 1; 2; 3 30	20,5; 82; 164 21,1; 42,2; 63,3 657	Ginés <i>et al.</i> , 2002 Álvarez <i>et al.</i> , 2008 Bavcevic <i>et al.</i> , 2010
<b>Esturión</b> ( <i>Acipenser naccarii</i> )	2; 10; 40; 72	28; 140; 560; 1008	Furné <i>et al.</i> , 2009
<b>Fletán</b> ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	35	322	Foss <i>et al.</i> , 2009
<b>Lubina</b> ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	11; 20; 31 66; 97	220; 400; 620 1376,1; 2022,4	Caruso <i>et al.</i> , 2011 Chatzifotis <i>et al.</i> , 2011
<b>Pez gato</b> ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	14; 30; 45 21	364; 780; 1170 546	Peterson y Small, 2004 Small, 2005
<b>Salmón atlántico</b> ( <i>Salmo salar</i> )	3 35	30 374,5	Olsen <i>et al.</i> , 2002 Mørkøre <i>et al.</i> , 2008
<b>Lenguado común</b> ( <i>Solea solea</i> )	21	367,5	Costas <i>et al.</i> , 2011
<b>Tilapia</b> ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	7; 14; 28 1	203,7; 407,4; 814,8 26	Wang <i>et al.</i> , 2009 Villarroel <i>et al.</i> , 2011
<b>Trucha común</b> ( <i>Salmo trutta</i> )	60	630	Regost <i>et al.</i> , 2001
<b>Trucha arcoíris</b> ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	21 3 1; 2; 3 2; 9	210 30 19,5; 38,8; 58 24,3; 102	Blom <i>et al.</i> , 2000 Olsen <i>et al.</i> , 2005 López-Luna <i>et al.</i> , 2014 Bermejo-Poza <i>et al.</i> , 2015

### **2.3.1.2. Frecuencia de alimentación**

El crecimiento de los peces se encuentra influido por una serie de factores, incluyendo el tipo de alimento, la frecuencia de alimentación, el consumo de alimento y la habilidad para absorber nutrientes (Xie *et al.*, 2011). Entre estos factores, la frecuencia de alimentación tiene una gran importancia, ya que la supervivencia y el crecimiento de los peces están estrechamente regulados por los ritmos de alimentación a los que se encuentran sometidos (Villarroel *et al.*, 2011). Una optimización de la frecuencia de alimentación no solo mejora la eficiencia productiva mejorando el crecimiento de los peces (Biswas *et al.*, 2006), sino que también minimiza el desperdicio de alimento mejorando la calidad del agua (Villarroel *et al.*, 2011) y reduce la heterogeneidad de pesos (Biswas *et al.*, 2006). Debido a que la frecuencia de alimentación afecta a la respuesta de estrés de los peces, se debe tener una precaución especial a la hora de diseñar un régimen de alimentación en acuicultura, ya que una respuesta de estrés exacerbada conlleva una calidad de carne indeseable y una baja eficiencia productiva (Salas-Leiton *et al.*, 2010)

Se han llevado a cabo un gran número de investigaciones sobre el efecto de la frecuencia de alimentación en la respuesta de estrés en los peces (Villarroel *et al.*, 2011; Cañon Jones *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), pero es menos conocido el posible efecto de la alimentación intermitente o de pequeños periodos de ayuno en el último mes de engorde sobre la respuesta de estrés generada por el ayuno pre-sacrificio. La frecuencia de alimentación podría ser uno de los mayores factores estresantes para los peces en las explotaciones acuícolas, ya que estos se enfrentan a dietas artificiales y estrategias alimentarias que son bastante diferentes a las que siguen en su ambiente natural (Salas-Leiton *et al.*, 2010). De acuerdo a Armstrong y Schindler (2011), en la naturaleza, la mayoría de los peces carnívoros como la trucha arcoíris se alimentan una vez cada dos días debido a la disponibilidad de alimento. Esto nos sugiere que un ritmo de alimentación en días alternos podría ser aceptable fisiológicamente en el cultivo de trucha arcoíris, como es el caso del sistema de alimentación “skip a day”, utilizado de forma habitual en el engorde de pollos (Oyedeji y Atteh, 2005) y testado en otras especies de peces como la tilapia (Villarroel *et al.*, 2011). Los peces pueden adaptar su anatomía y fisiología a una alimentación intermitente, permitiéndoles ingerir una mayor cantidad de alimento cuando este se encuentra disponible (Mattila *et al.*, 2009).

Además, durante la época reproductiva, las truchas pueden ayunar durante semanas, lo que sugiere que la respuesta de estrés a diferentes periodos de ayuno podría depender de la experiencia previa del pez y del estado fisiológico del mismo.

### **2.3.2. Despesque**

Hoy en día, los productores acuícolas buscan técnicas de manejo que les permita mejorar las tasas de crecimiento de los peces y la eficiencia de producción. Sin embargo, pasa desapercibida la importancia de la captura o despesque como fase final del ciclo productivo. De forma ideal, el despesque de los peces debería ser un proceso en el cual estos son tratados con el máximo cuidado posible para minimizar la respuesta de estrés pre-sacrificio, ya que si esta respuesta es demasiado alta puede afectar a la bioquímica *post-mortem* del músculo y a sus características relacionadas con la calidad de la carne, afectando finalmente a la calidad del producto final (Thomas *et al.*, 1999; Robb y Kestin, 2002; Poli *et al.*, 2003; Poli *et al.*, 2005; Stien *et al.*, 2005)

Las condiciones de cultivo suponen el alojamiento de los peces en tanques, canales o jaulas, alterando el comportamiento natural de nadar. Este cambio de comportamiento frente al aumento de actividad física es evidente en las especies de salmónidos como el salmón atlántico o la trucha arcoíris, que están acostumbradas a flujos de agua mayores en la naturaleza, por lo que ajustan su metabolismo a esta situación productiva (Palstra y Planas, 2011). Desde un punto de vista fisiológico, al contrario que los mamíferos que responden al aumento de actividad física incrementando el uso de glucosa y ácidos grasos libres, los peces utilizan las grasas que son proporcionadas al músculo en contracción en forma de lipoproteínas que son degradadas por lipasas para la obtención de energía como combustible para ese aumento de la actividad física (Weber, 2010).

Durante algunas prácticas de manejo en las piscifactorías como el despesque de los peces, estos son sometidos a un incremento de la actividad física debido a los métodos de captura. La respuesta de estrés producida por el despesque produce una serie de cambios fisiológicos en los peces entre los que se incluyen una disminución de las reservas energéticas, acúmulo de lactato, desequilibrios ácido/base y alteraciones de la osmorregulación (Cooke y Suski, 2005). Además, la duración de esta actividad física experimentada por el pez se correlaciona de forma positiva con la magnitud del

desequilibrio fisiológico y el tiempo requerido para su recuperación (Schreer *et al.*, 2001; Suski *et al.*, 2004; Cooke y Suski, 2005). Merkin *et al.* (2010) observó que un despesque previo al sacrificio conlleva un aumento de la actividad física del pez que le genera una respuesta de estrés aumentando los niveles de cortisol y hematocrito. Sin embargo, el aumento de actividad física puede también disminuir la respuesta de estrés, como se puede observar en algunos casos con peces ejercitados con menores niveles de cortisol que los no ejercitados, reduciendo los niveles de agresión entre individuos o mediante una estimulación de la neurogénesis que conlleva una mejora de la capacidad de aprendizaje espacial (Huntingford, 2010; Palstra y Planas, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, el despesque produce una respuesta de estrés en los peces pero es también importante considerar el efecto de un ayuno previo al despesque en la respuesta de estrés generada por este último. En algunos estudios se ha observado que salmones atlánticos y truchas arcoíris ayunadas y sometidas después a un aumento de la actividad física muestran una respuesta de estrés mayor que aquellos peces no ayunados, en concreto con unas mayores concentraciones plasmáticas de cortisol y lactato (Olsen *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2005).

## **2.4. Bienestar animal y su valoración**

### ***2.4.1. Bienestar animal***

El estudio de los animales y de la sociedad humana normalmente es considerado parte de dos ámbitos muy distintos con poco o ningún contacto entre ellos. Sin embargo, desde la domesticación, los animales de granja han sido integrados como parte de la sociedad humana y aunque la proporción de la población dedicada a la producción animal está disminuyendo en el mundo occidental, la vida de los animales de granja y de la población humana sigue entrelazada en muchos sentidos (Lund *et al.*, 2006). La preocupación por el bienestar animal de los animales de granja está basada en la creencia de que los animales son capaces de sufrir y actualmente es un tema de gran importancia para la población Europea, quienes demandan que los animales sean criados, transportados y sacrificados de la forma que menos sufrimiento les ocasione (Velarde y Dalmau, 2012).

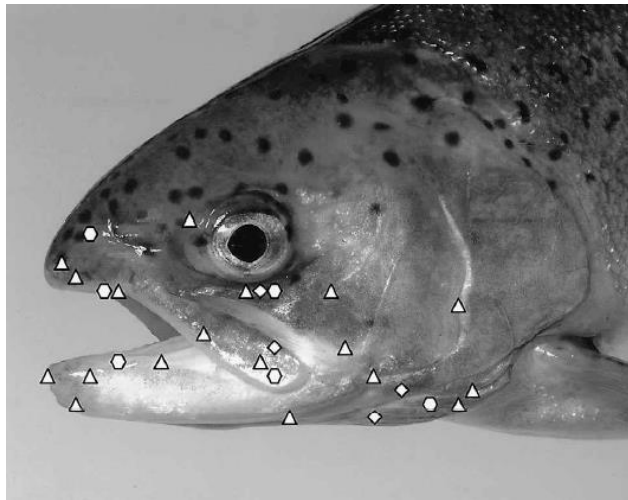
La calidad de vida de los animales de granja va a depender del cuidado humano, por lo que esto se ha convertido en un tema de creciente interés en la sociedad cobrando gran importancia el concepto de bienestar animal. Este concepto no es sencillo, ya que es difícil de cuantificar directamente y tiene implicaciones éticas y morales que pueden variar de una persona a otra. Para asegurar un enfoque objetivo, distintas asociaciones gubernamentales y no gubernamentales han elaborado una serie de directrices para distintas especies animales. Por ejemplo, la asociación Farm Animal Welfare Council (FAWC) basa sus recomendaciones en el marco de las “Cinco libertades”, que definen un estado ideal de bienestar animal en vez de niveles específicos del mismo (FAWC, 2009):

- **Libres de hambre y sed**, teniendo acceso a agua fresca y una dieta que les aporte una salud y energía plenas.
- **Libres de incomodidad**, proporcionando un entorno adecuado incluyendo cobijo y una zona cómoda de descanso.
- **Libres de dolor, lesiones y enfermedades**, mediante la prevención o el diagnóstico rápido y el tratamiento.
- **Libres para expresar un comportamiento normal**, proporcionando espacio suficiente, instalaciones adecuadas y la compañía de animales de la propia especie del animal.
- **Libres de miedo y angustia**, asegurando las condiciones y trato que eviten el sufrimiento físico y mental.

Estas libertades han tenido una gran influencia y han servido de base para la legislación y regulación del bienestar animal en la cría de mamíferos y aves y, cada vez más, en peces. Por tanto, proporcionan un marco lógico con el cual evaluar el grado o el nivel de bienestar animal (Ashley, 2007).

El bienestar animal en peces se ha empezado a estudiar más tarde que en el resto de las especies debido a que existe un debate de si estos animales son capaces de sentir dolor. Hace poco tiempo, los peces no estaban incluidos en el concepto de animales sensibles pero ahora esta situación está cambiando porque se ha demostrado que los peces son capaces de sentir dolor y sufrir. Sneddon *et al.* (2003) demostró, en truchas arcoíris, la presencia de nociceptores en la cara y el hocico (Figura 2.8). Estos receptores sensoriales responden ante estímulos potencialmente dañinos enviando

señales nerviosas a la médula espinal y al cerebro. Estudios posteriores han demostrado que los peces sienten dolor tanto reflejo como cognitivo (Sneddon, 2003). Además, estos hallazgos han sido confirmados posteriormente en otras especies como la carpa dorada (*Carassius auratus*), observando que estos peces pueden sentir dolor y que cuando se les suministra morfina desciende la ansiedad, el miedo y el estado de alerta (Nordgreen *et al.*, 2009). Los estudios mencionados anteriormente indican que es necesaria la investigación en el bienestar animal de los peces debido a que son animales capaces de sentir dolor. Rose (2002) argumenta que, como los peces tienen un cerebro distinto al nuestro carente de neocórtex, posiblemente no son conscientes de la misma forma que nosotros y aunque reaccionen ante el dolor de una forma similar a la humana, estas reacciones tendrían otras causas en los peces.



**Figura 2.8.** Distribución de receptores del dolor en la trucha arcoíris. Triángulos: polimodales; diamantes: mecanoreceptores; hexágonos: quimio-mecánicos (Sneddon *et al.*, 2003)

Debido en parte a la rápida expansión de la acuicultura a nivel mundial, el interés por el bienestar animal en los peces está aumentando cada vez más, ya que es un punto importante para la industria, no sólo por la percepción del consumidor, el marketing o la aceptación del producto, sino también a menudo por lo que respecta a la eficiencia productiva, la calidad y la cantidad del producto (FSBI, 2002). Sin embargo, en algunos puntos, existen conflictos entre el bienestar y la producción animal, ya que hay prácticas asociadas a una disminución del bienestar animal a nivel del pez individual como el transporte, el despesque o el sacrificio. Tales prácticas han sido temas de discusión en los últimos años (Lymbery, 2002; Hastein, 2004). A nivel europeo, la Directiva 98/58/CE propone unas medidas estándar para asegurar la protección de los animales destinados a la producción, aunque no hace ninguna mención

específica al caso de los peces. En 2005, el Consejo Europeo adoptó una serie de medidas relacionadas con el bienestar animal en los peces en las explotaciones acuícolas donde el ayuno previo a cualquier práctica de manejo o antes del sacrificio es recomendado para reducir el metabolismo y la excreción de residuos por parte de estos animales (Consejo Europeo, 2005). En 2008, la OIE elaboró el llamado “Código Sanitario para los Animales Acuáticos”, con una actualización del mismo en el año 2015 (OIE, 2015), en el cual centró un capítulo en el bienestar de los peces de cultivo tratando temas como el bienestar durante el transporte o aspectos relativos al aturdimiento o sacrificio de los peces. Además, en los últimos años, algunas organizaciones como FAWC o HSA han publicado distintas recomendaciones sobre el bienestar animal en los peces (FAWC, 1996; HSA, 2005).

### ***2.4.2. Medida del bienestar animal***

#### ***2.4.2.1. Parámetros biométricos***

##### **Peso vivo**

Los periodos de ayuno van a producir generalmente una reducción del peso vivo debido a la falta de alimento, ya que los peces movilizan sus reservas para el mantenimiento de las funciones vitales (Sumpter *et al.*, 1991). Sin embargo, el tiempo de ayuno en el que el peso empieza a disminuir no está claro, ya que se ha observado que ayunos a corto plazo no producen una disminución del peso vivo en trucha arcoíris, ajustando los peces su metabolismo en respuesta a la disponibilidad de alimento (Lines y Spence, 2012). Otros autores han observado que son necesarios varios días o incluso semanas de ayuno para que el peso vivo empiece a disminuir (Pottinger *et al.*, 2003: 29 días, 174 °C d), al igual que en otras especies como el pez gato, con un ayuno de 14 días (364 °C d) (Peterson y Small, 2004) o en la lubina, a partir de un ayuno de 31 días (620 °C d) (Caruso *et al.*, 2011). También hay algunas excepciones en la literatura, como es el caso de Figueiredo-Garutti *et al.* (2002), quienes encontraron una disminución significativa en el peso con tan solo 24 horas de ayuno en yatoranas (*Brycon cephalus*). Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias entre peces sometidos a ayuno respecto a otros no ayunados, como es el caso de McMillan y Houlihan (1992) y Nikki *et al.* (2004), con un ayuno de 6 (90 °C d) y 14 días (210 °C d), respectivamente, en trucha arcoíris. También cabe destacar que los

peces tienen la habilidad de crecer muy rápido tras un periodo de restricción del alimento y ha sido descrito por varios autores que peces ayunados y después realimentados alcanzan pesos similares a aquellos alimentados de forma continua (Xie *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Tian y Qin, 2003).

### **Coefficiente de condición corporal**

El coeficiente de condición corporal es un indicador del nivel o estado nutricional del pez y es un índice ampliamente utilizado en acuicultura (Bavcevic *et al.*, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2011), ya que es más preciso que el peso vivo al incluir la longitud, dando una idea del volumen del pez. En trucha arcoíris se ha observado un descenso de este coeficiente a los 3 días de ayuno-31,5 °C d (Pottinger *et al.*, 2003) y a los 7 días-98 °C d (Sumpter *et al.*, 1991), mientras que en otras especies este descenso se produce con periodos de ayuno más prolongados como 14 días-364 °C d en el caso del pez gato (Peterson y Small, 2004).

### **Peso del aparato digestivo**

El vaciado del aparato digestivo es muy importante, ya que determina el periodo de tiempo necesario que el pez debe someterse a un ayuno previo a ciertas prácticas de manejo como el transporte o el sacrificio (Wall, 2001; CIWF, 2009). La duración del periodo de ayuno necesario para que se produzca el vaciado del sistema digestivo depende de dos factores principalmente; la especie y la temperatura del agua, que a su vez tienen un efecto sobre la actividad metabólica de los peces, pero como norma general se puede esperar que este intervalo se sitúe entre 1 a 5 días desde la última ingesta de alimento (Lines y Spence, 2012). McMillan y Houlihan (1992) demostraron que el tracto digestivo en trucha arcoíris después de 2 días de ayuno solo contiene pequeñas trazas de restos de la digestión y podría considerarse vacío. En otras especies de salmónidos como el salmón atlántico, Robb (2008) afirmó que no existía beneficio alguno a partir de las 72 horas de ayuno, ya que con ese periodo de ayuno se consigue un vaciado completo del aparato digestivo, por lo que no son necesarios periodos mayores de ayuno. Sin embargo, estas recomendaciones deberían ser revisadas, ya que un gran número de factores, incluyendo la temperatura del agua y el tamaño del pez, pueden jugar un papel muy importante en el vaciado del tubo digestivo (Usher *et al.*, 1991; Koed *et al.*, 2001).

### **Índice hepatosomático**

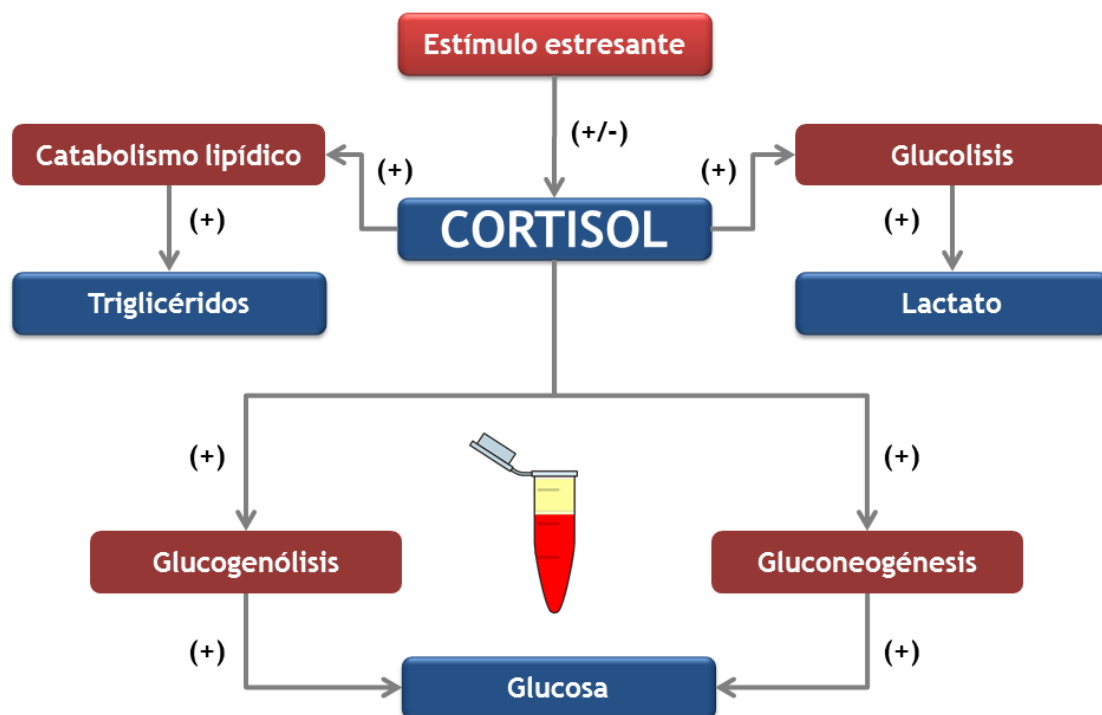
El índice hepatosomático (HSI) se define como el cociente o la relación entre el peso del hígado con respecto al peso vivo del pez. Durante los periodos de ayuno las necesidades energéticas se alcanzan principalmente por la movilización de las reservas del hígado mientras que las grasas periviscerales y el resto de reservas lipídicas del organismo se preservan (Peres *et al.*, 2014). Por ello podemos considerar que el HSI es un buen indicador de las reservas energéticas de las que dispone el pez, ya que el hígado es un órgano regulador muy importante de la utilización de nutrientes tanto en mamíferos como en peces teleósteos (Christiansen y Klungsoyr, 1987). El peso del hígado normalmente disminuye con la falta de alimento en los peces (Blasco *et al.*, 1992; McMillan y Houlihan, 1992; Barcellos *et al.*, 2010; Costas *et al.*, 2011) pero el tiempo que tarda en producirse esta disminución puede variar según las especies y las condiciones experimentales. En cualquier caso, el periodo mínimo para este descenso de peso del hígado parece ser de 2 días (Farbridge y Leatherland, 1992) y es una consecuencia directa de la utilización de los nutrientes almacenados en este órgano (Davis y Gaylord, 2011), principalmente glucógeno (Soengas *et al.*, 1996), pero también se ha observado que disminuye la concentración de otros metabolitos como lípidos o proteínas (Blasco *et al.*, 1992; McMillan y Houlihan, 1992).

#### **2.4.2.2. Parámetros hematológicos**

Los parámetros hematológicos han sido ampliamente utilizados como indicadores de estrés en las distintas especies animales (Reddy y Leatherland, 1988; Erikson *et al.*, 1999). Existe una gran controversia acerca de la elección de indicadores del bienestar que se puedan basar en parámetros de comportamiento o fisiológicos. Entre estos últimos, la existencia de altos niveles de cortisol, glucosa y lactato plasmáticos son utilizados con frecuencia como indicadores de respuesta de estrés (Mommsen *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2009). De hecho, las concentraciones plasmáticas de glucosa y lactato se encuentran relacionadas con las de cortisol, ya que esta hormona tiene un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, aumentando los valores plasmáticos de ambos compuestos, junto con un incremento del catabolismo de los lípidos aumentando la concentración de triglicéridos en sangre (Ellis *et al.*, 2012) (Figura 2.9).

## Cortisol

El cortisol es el principal corticosteroide de los peces teleósteos y sus concentraciones se incrementan significativamente cuando el animal se ve sometido a situaciones de estrés (Barton e Iwama, 1991). El cambio en los niveles plasmáticos de cortisol es el indicador más utilizado para valorar la activación de la respuesta neuroendocrina al estrés (Pottinger y Carrick, 1999). Estos niveles de cortisol en sangre pueden elevarse a más de 100 ng/ml ante una situación de estrés crónico, para retornar a valores próximos a los normales de 10-20 ng/ml después de periodos variables, aunque la causa de la elevación persista (Pickering y Christie, 1981). Generalmente, antes de 6-8 horas, todos los peces vuelven a niveles basales de cortisol después de una situación de estrés (Iwama *et al.*, 2006) y, en el caso de la trucha arcoíris, a las 48 horas (Olsen *et al.*, 2005). Los valores normales en plasma en esta especie son generalmente de 0,4-7,5 ng/ml y después de 5 minutos de acción estresante se elevan alcanzando el máximo de 70-150 ng/ml a los 45 minutos (Pottinger y Moran, 1993).



**Figura 2.9.** Efecto del cortisol sobre el incremento de triglicéridos, lactato y glucosa en sangre.

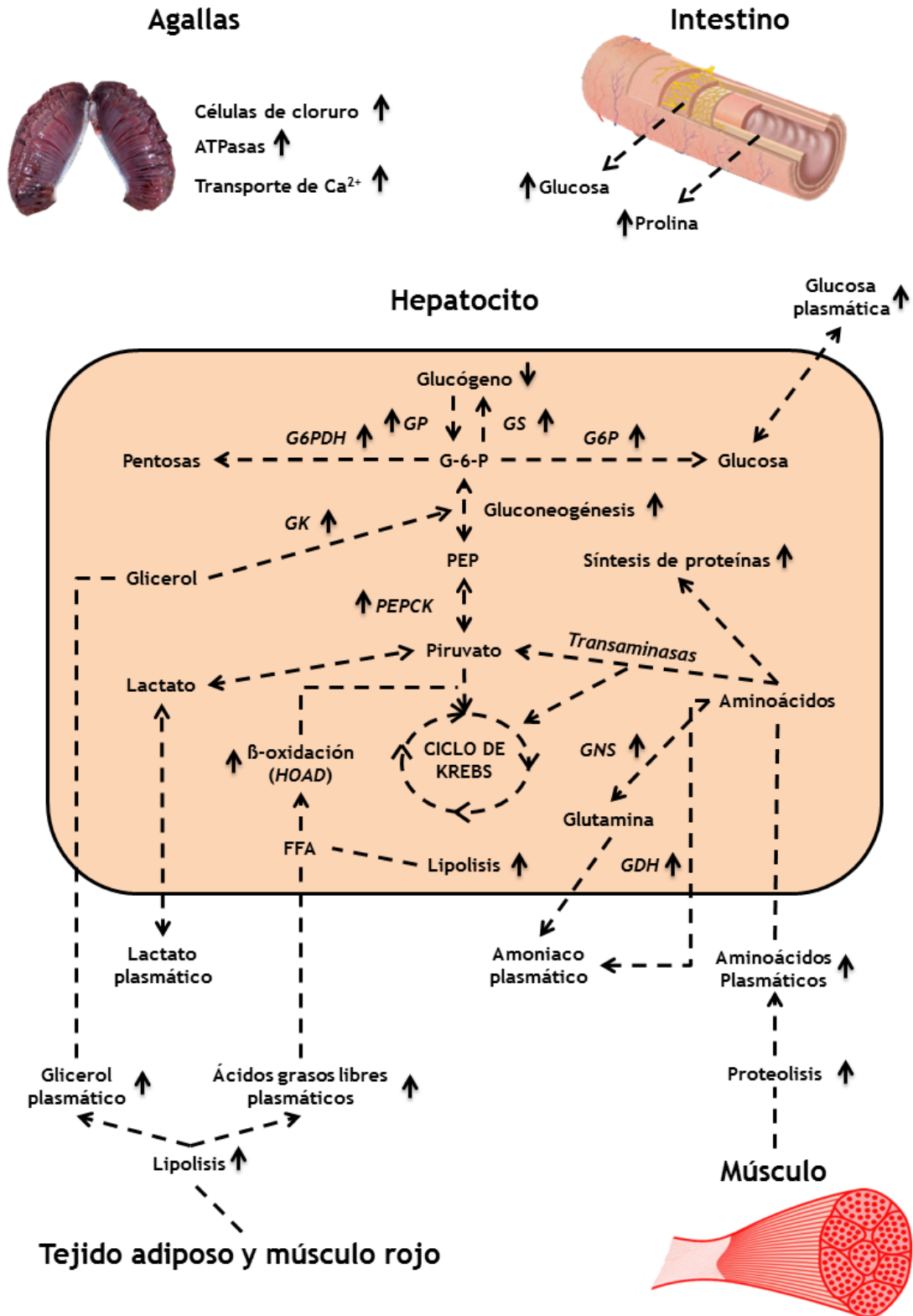
Debe destacarse que a pesar de ser un parámetro para evaluar la intensidad de la respuesta de estrés, se considera que valores bajos de cortisol plasmático no implican

una ausencia de respuesta de estrés (Hontela *et al.*, 1992). Como indicador de respuesta de estrés tiene las siguientes ventajas (Ellis *et al.*, 2012):

- Sus niveles plasmáticos muestran una respuesta unidireccional, normalmente incrementada ante un estímulo estresante, que es de fácil interpretación.
- La producción de cortisol en los peces responde a un amplio número de situaciones que son estresantes para ellos como el despesque, transporte, hacinamiento, periodos de ayuno, calidad de agua pobre, temperatura,...
- La señal que provoca es bastante fuerte tanto para situaciones de estrés agudo (comienzo repentino, duración corta y severidad alta induciendo una respuesta rápida) como crónico (comienzo lento, duración larga y severidad baja induciendo una respuesta lenta).
- Su concentración en plasma responde rápidamente al inicio del estímulo estresante (durante minutos) y a su cese (durante horas o días) y por tanto no requiere de largos periodos de observación.
- Juega un papel regulador en muchos procesos fisiológicos y unos niveles elevados de esta hormona en plasma afectan a funciones fisiológicas dando lugar a efectos negativos en parámetros importantes en acuicultura como el crecimiento, la resistencia a enfermedades o la función reproductiva.

En la Figura 2.10 se muestran los principales efectos metabólicos producidos por el cortisol. Esta hormona produce la activación del proceso de glucogenolisis en el hígado de los peces disminuyendo la concentración de glucógeno y aumentando la de glucosa plasmática, además de incrementar la producción en los hepatocitos de piruvato y con ello la de lactato que se liberará al plasma aumentando sus niveles. En cuanto al metabolismo proteico, produce un incremento de la proteólisis en el músculo aumentando la concentración de aminoácidos en plasma, que van a dirigirse al hígado para seguir tres posibles vías:

1. Transformación en amoniaco y liberación del mismo al plasma mediante la acción de las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.
2. Formación de piruvato por la acción de las transaminasas e incorporación posterior al ciclo de Krebs.
3. Aumento de la síntesis proteica dentro del hepatocito.



**Figura 2.10.** Efectos metabólicos del cortisol en los peces. Las flechas indican vías o procesos que están regulados o sobre los que actúa potencialmente el cortisol. Las líneas con guiones indican el flujo o transporte de metabolitos (Adaptado de Mommsen et al., 1999). Abreviaturas: FFA, ácidos grasos libres; HOAD, 3-hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; GK, glicerol quinasa; GNS, glutamina sintetasa; GP, glucógeno fosforilasa; GS, glucógeno sintetasa; G6P, glucosa 6-fosfatasa; G6PDH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

En relación con el metabolismo lipídico, aumenta la lipólisis a nivel de tejido adiposo, músculo rojo e hígado, lo que genera un incremento de los ácidos grasos libres en plasma. Además de en músculo e hígado, también ejerce su acción en intestino, aumentando la liberación de glucosa y prolina al plasma, y en las agallas, con un incremento de la actividad de las células de cloruro, ATPasas y del transporte de calcio (Mommsen *et al.*, 1999).

### Glucosa

Como se ha descrito en el anterior apartado, una de las respuestas endocrinas al estrés es un aumento de la glucosa plasmática, que es el carbohidrato de mayor importancia en la obtención de energía para los peces, por lo que uno de los parámetros más utilizados en estudios de respuesta de estrés es la variación del nivel de glucosa plasmática.

La hiperglucemia observada durante la respuesta de estrés es el resultado de la glucogenolisis y gluconeogénesis, estando implicadas en este fenómeno tanto las catecolaminas como el cortisol, estimulando la gluconeogénesis en el hígado e incrementando la síntesis de enzimas involucradas en la conversión de aminoácidos, glicerol y lactato, en glucosa (Figura 2.10). Bonga (1997) propone que la glucosa plasmática es mediada a corto plazo por las catecolaminas y a largo plazo por el cortisol, lo que concuerda con Pottinger y Carrick (1999), quienes postulan la activación de los ejes simpático-cromafin e HPI. El cortisol interviene a su vez estimulando la glucogenolisis en el hígado, escindiendo el glucógeno en moléculas de glucosa, que pasan al torrente sanguíneo donde entran en las células por la acción de la insulina (Nelson y Cox, 2005).

De este modo, la glucosa plasmática es un parámetro alternativo para evaluar la magnitud de la respuesta de estrés, teniendo la ventaja de que es de fácil determinación y que su franja de elevación es más estrecha que la del cortisol. Las concentraciones en sangre de cortisol y glucosa son modificadas con velocidades diferentes, observándose que la concentración de glucosa aumenta de forma más lenta y permanece elevada durante periodos de tiempo más largos que la concentración sanguínea de cortisol. (Mommsen *et al.*, 1999).

El principal inconveniente de este parámetro se encuentra en su íntima relación con el estado nutricional y con la dieta, los cuales pueden alterar con gran facilidad las cantidades de glucosa en sangre (Simontacchi *et al.*, 2008). Por ello, los resultados de glucosa como indicador de respuesta de estrés pueden enmascarse, ya que depende de las reservas de glucógeno existentes (Vijayan y Moon, 1992). Sin embargo, el ayuno es un factor que interviene en la reducción de la concentración de glucosa en sangre, ya que disminuye las reservas de glucógeno en la mayor parte de especies de peces dando lugar a una hipoglucemia que se inicia entre 1-2 días de ayuno (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007). Sin embargo, son necesarios hasta 7 días de ayuno para producir un descenso significativo en los niveles de glucosa plasmáticos en la mayoría de las especies (Holloway *et al.*, 1994), aunque otros autores no observaron cambios tras un ayuno prolongado de 14 días (Barcellos *et al.*, 2010), probablemente debido a que los niveles elevados de cortisol juegan un papel importante en la movilización de reservas energéticas, estimulando los procesos de glucogenolisis y gluconeogénesis. Concretamente, en la trucha arcoíris bastan periodos entre 3-4 días según Pottinger *et al.* (2003) y de hasta 5 días según Furné *et al.* (2012) para encontrar reducciones de la concentración de glucosa en sangre.

### **Lactato**

Junto con el cortisol y la glucosa, también se utiliza el lactato como indicador de respuesta de estrés (Ribas *et al.*, 2007; Acerete *et al.*, 2009), ya que es liberado al plasma como consecuencia de la mayor movilización de energía. Además, el incremento de la actividad muscular en los peces, producido por prácticas de manejo como el despesque, inicia la glucolisis terminando con la formación de lactato (Erikson *et al.*, 1999).

El lactato es un producto de la degradación del piruvato, obtenido a su vez del proceso de glucolisis por escisión de la glucosa. Dicha degradación se realiza en las células musculares durante situaciones de máximo esfuerzo por vía anaeróbica (Grutter y Pankhurst, 2000). Por lo tanto, incrementos en los niveles de lactato en sangre se producen en situaciones de estrés con una alta actividad muscular, como podría ser la actividad muscular producida durante la lucha y huida en la captura o despesque (Gatica *et al.*, 2010). En el caso del ayuno los niveles de lactato pueden

disminuir ligeramente, ya que este ión se emplea como precursor de la glucosa en el hígado (Liew *et al.*, 2012) (Figura 2.10).

### Triglicéridos

La concentración plasmática de triglicéridos también puede ser utilizada como indicador de respuesta de estrés (Bennet *et al.*, 2007), ya que esta respuesta incrementa el metabolismo dando como resultado una disminución de las reservas energéticas, que en los peces son los triglicéridos y el glucógeno (Elridge *et al.*, 2015). Los triglicéridos son una fuente importante de energía que los peces van a utilizar en respuesta a un estímulo estresante tal como la aclimatación a distintas densidades de cultivo o periodos de ayuno (Laiz-Carrión *et al.*, 2012; Millán-Cubillo *et al.*, 2016).

Los periodos de ayuno pueden producir una falta de disponibilidad de lípidos de la dieta en los peces, lo que provoca una caída de los niveles plasmáticos de triglicéridos (Rossi *et al.*, 2015). Durante el ayuno, se produce una disminución de la actividad de las enzimas lipogénicas (Shearer *et al.*, 2012) con el objetivo de preservar los niveles de glucosa en plasma (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007). Tanto la falta de alimento como la inhibición de la síntesis de ácidos grasos pueden ser responsables de la reducción de los triglicéridos en plasma durante los periodos de ayuno en peces (Costas *et al.*, 2011; Mancera *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2014; Pérez-Jiménez *et al.*, 2007,2012).

Es conocido que los triglicéridos son la mayor reserva disponible de lípidos durante las fases tempranas del ayuno (Navarro y Gutiérrez, 1995). De forma similar, varios estudios han observado niveles estables de triglicéridos en plasma durante periodos de realimentación tras una fase de ayuno (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007 en lubina; Furné *et al.*, 2012 en esturión y trucha arcoíris; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012 en dentón común). Sin embargo, otros autores han observado que los niveles plasmáticos de triglicéridos disminuyen en respuesta al ayuno (Costas *et al.*, 2011; Falahatkar, 2012). Por otro lado, muchas especies de peces dependen de los lípidos liberados desde el músculo y el tejido adiposo para suplir sus necesidades durante el ayuno, por lo que sus niveles se ven incrementados en plasma (Li *et al.*, 2011a). Las concentraciones plasmáticas de glucosa, proteínas totales, colesterol y triglicéridos oscilan dependiendo de los mecanismos de catabolismo proteico (Andersen *et al.*, 1991) y glucogenolisis

(Vijayan y Moon, 1992). Por ello, los niveles de triglicéridos presentan respuestas muy variables frente al ayuno y estos resultados contradictorios podrían deberse a las diferencias entre especies y a su fisiología para satisfacer las necesidades biológicas durante el periodo de ayuno (Azodi *et al.*, 2014).

### **Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin fosfoquinasa (CPK)**

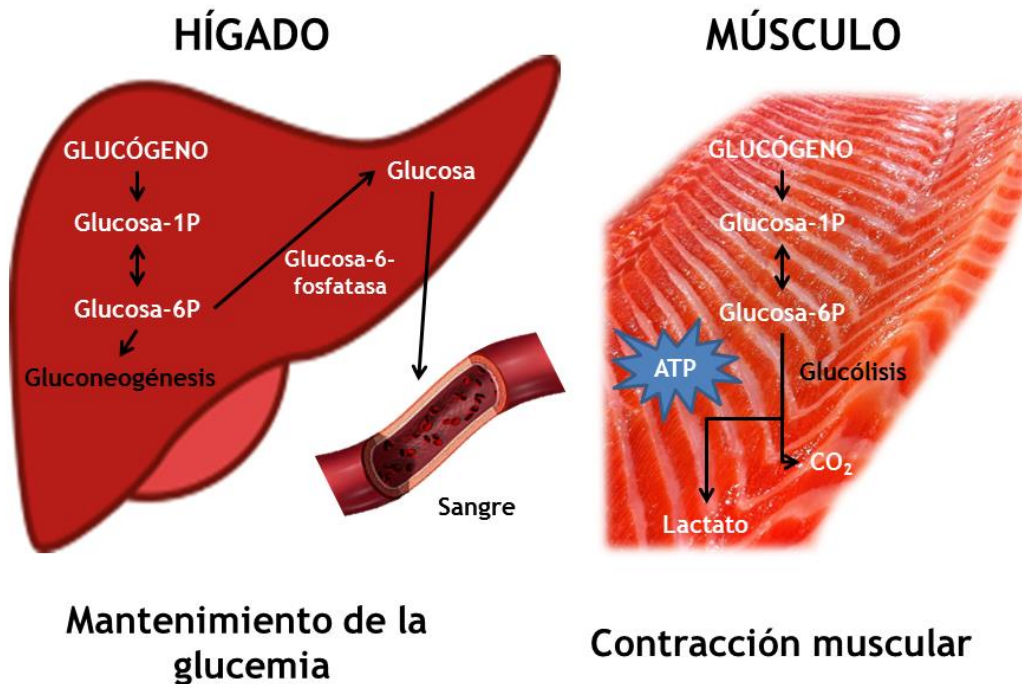
La LDH es una enzima que se encuentra principalmente en el músculo, riñón o hígado de los peces y tiene varias isoformas. Concretamente, en peces, la LDH1 cataliza una reacción redox en la cual el piruvato es reducido a lactato (Tseng *et al.*, 2008). Esta enzima, asociada con la oxidación anaeróbica de la glucosa, es un indicador del metabolismo energético ampliamente utilizado en estudios para determinar la resistencia de los peces frente a un estrés térmico (Feidantsis *et al.*, 2015). Niveles elevados de esta enzima en plasma reflejan un daño a nivel hepático, renal o muscular (Agrahari *et al.*, 2007; Banaee *et al.*, 2011) y este daño puede estar relacionado en peces con una respuesta de estrés producida por distintos tipos de estímulos estresantes como puede ser el transporte (Dobsikova *et al.*, 2006), la temperatura (Shi *et al.*, 2013), exposición a toxinas (Li *et al.*, 2011a) o el ayuno (Vijayan *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2014).

La enzima CPK por su parte, juega un papel importante en la homeostasis energética celular, siendo principalmente expresada en los tejidos muscular y cardiaco, por lo que es un gran indicador de daño en estos tejidos. Un estímulo estresante como el proceso de despesque de los peces, que supone un aumento de la actividad física para los mismos, es capaz de incrementar los niveles plasmáticos de esta enzima, probablemente debido a un daño muscular y la posterior liberación de la CPK citoplasmática a la sangre (Shasavani *et al.*, 2010; Peres *et al.*, 2013). Sin embargo, también se ha observado disminución de los niveles de CPK durante periodos de ayuno en dorada (Peres *et al.*, 2013), posiblemente atribuido a una disminución de la síntesis enzimática e índice de renovación debido a una menor demanda metabólica por parte de los peces sometidos a ayuno (Evans y Watterson, 2009).

### 2.4.2.3. Parámetros metabólicos

#### Glucógeno hepático y muscular

El glucógeno se encuentra principalmente en el hígado y en el músculo, con una diferencia funcional en ambos tejidos como el mantenimiento de la glucemia y como combustible para la contracción muscular, respectivamente (Figura 2.11).



**Figura 2.11.** Diferencia funcional del glucógeno hepático y muscular.

Los carbohidratos son la fuente de energía primaria cuando los peces se encuentran sometidos a ayuno (Navarro y Gutiérrez, 1995; Davis y Gaylord, 2011). Aunque el ayuno produce una hipoglicemia en la mayoría de las especies de peces (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012), el glucógeno, que es el carbohidrato que se almacena en el hígado, se descompone y es transportado a los tejidos extrahepáticos en forma de glucosa para mantener unos niveles circulantes adecuados de este metabolito que les permita afrontar los periodos de ayuno. El tiempo que estas reservas de glucógeno están almacenadas depende de muchas variables, incluido el peso del pez, su estado reproductivo, la disponibilidad y tipo de alimento y la temperatura del agua (Metcalf y Thorpe, 1992). Normalmente, la disminución de las reservas de glucógeno es un proceso continuo desde el inicio del ayuno (Navarro y Gutiérrez, 1995). Sin embargo, el tiempo que tarda en empezar a disminuir no está claro, aunque sucede normalmente de 5-20 días después del cese de alimentación (Sangiao-Alvarellos *et al.*,

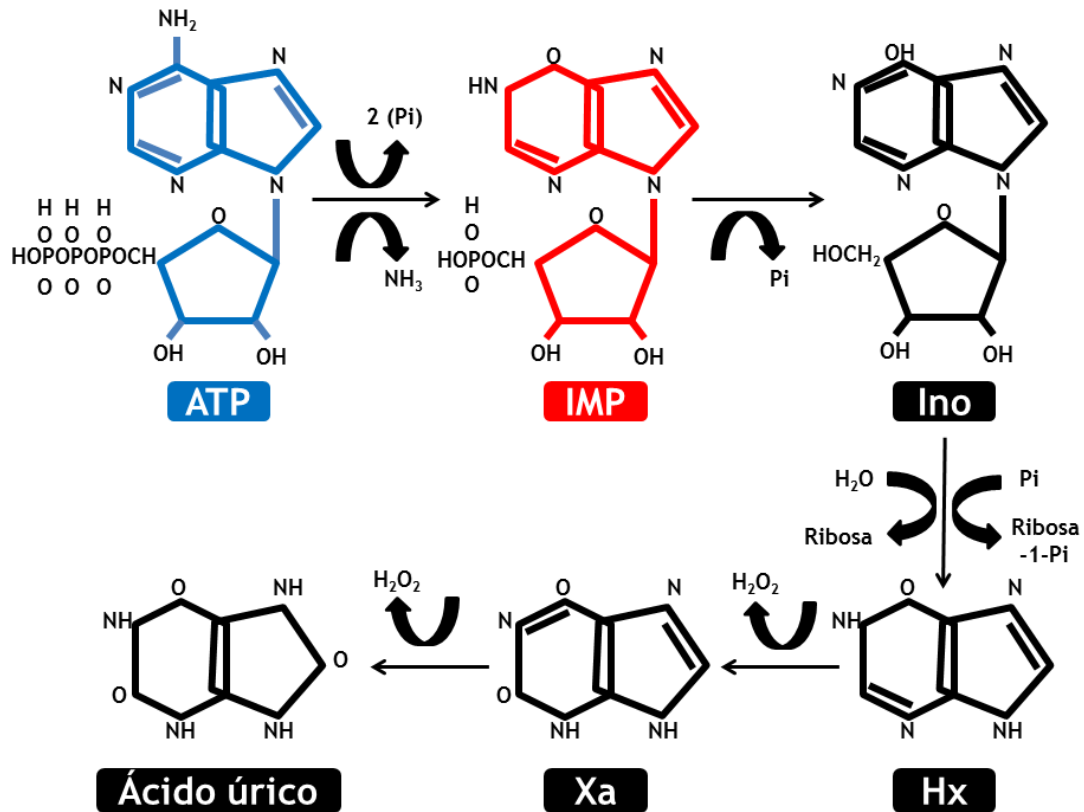
2005; Barcellos *et al.*, 2010). Sin embargo, Gaylord y Gatlin (2000) demostraron que un ayuno de sólo 2 días en pez gato es capaz de afectar al tamaño del hígado y a las reservas de glucógeno hepático.

Respecto al glucógeno muscular, los peces frente al ayuno pueden ver disminuidas sus reservas o mantenerlas a expensas de la liberación a nivel hepático de glucosa (Navarro y Gutiérrez, 1995). Navarro *et al.* (1992) y Furné *et al.* (2012) encontraron disminuciones significativas en trucha arcoíris y trucha común, respectivamente, tras un periodo de ayuno, mientras que Kieffer y Tufts (1998) y Barcellos *et al.* (2010) no encontraron cambios en trucha arcoíris y jundia (*Leiarius marmoratus*), respectivamente. En los peces, el despesque produce una disminución de las reservas de glucógeno en el músculo blanco, debido al aumento de la actividad física, y la recuperación de estas reservas puede ser un proceso lento que requiere normalmente más de 6 horas (Kieffer, 2000). Como se ha descrito anteriormente, el aumento de la actividad física provoca también una elevación de los niveles de cortisol plasmático que tienen una función inhibidora de la glucogenogénesis, por lo que no hay una evidencia clara de la síntesis de glucógeno muscular hasta que los niveles de cortisol en plasma comienzan a disminuir (Milligan, 2003).

### **Ratio IMP/ATP**

La caída del adenosín trifosfato (ATP) en el músculo es la causa por la cual se produce el establecimiento del *rigor mortis* (Greaser, 1986). Tras la muerte del pez, el ATP es rápidamente transformado en adenosín difosfato (ADP) y después a adenosín monofosfato (AMP) e inosina monofosfato (IMP). Este último compuesto se degrada a inosina e hipoxantina (Figura 2.12). Por ello, el ratio IMP/ATP es considerado un indicador fiable del grado de disminución del ATP y, por tanto, del estado fisiológico del animal previo al sacrificio, ya que se ha descrito que la ruptura de los nucleótidos de adenosina en IMP e inosina ocurre mucho más rápido en los animales con una respuesta de estrés mayor que en aquellos que presentan una respuesta más leve (Essen-Gustavsson 1991). Los músculos de aquellos animales con una respuesta de estrés acentuada presentan bajos niveles de ATP y altos de IMP en las fases tempranas del periodo *post-mortem* (mayor ratio IMP/ATP) mientras que en aquellos con una respuesta de estrés más leve se observan altos niveles de ATP y bajos de IMP (menor ratio IMP/ATP) (Essen-Gustavsson, 1991).

En los peces, este ratio también ha sido utilizado como indicador de respuesta de estrés previo al sacrificio (Korhonen *et al.*, 1990). De acuerdo con estos autores, los peces con una respuesta de estrés alta muestran un valor mayor de este ratio tanto en el momento *pre-rigor* como en el del establecimiento del *rigor mortis* respecto a los peces con una respuesta de estrés menor. Además, este indicador también ha sido utilizado para comparar el efecto de distintos tipos de sacrificio en peces (Giuffrida *et al.*, 2007) o para valorar la respuesta de estrés asociada al ayuno (López-Luna *et al.*, 2014).



**Figura 2.12.** Degradación post-mortem del ATP en el músculo de los peces (Adaptado de Gill, 1992). ATP: Adenosín trifosfato; IMP: Inosina monofosfato; Ino: Inosina; Hx: Hipoxantina; Xa: Xantina.

### Color del hígado y agallas

Hay poca información en la bibliografía sobre el color del hígado como indicador de respuesta de estrés en peces, sin embargo, como se ha descrito anteriormente, frente a un estímulo estresante se produce una movilización de las reservas almacenadas en este órgano, principalmente glucógeno y lípidos (Davis y Gaylord, 2011; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012), por lo que podría suceder un cambio de color en este órgano. En pollos broilers se ha descrito un color más oscuro y rojizo (menor luminosidad y mayor índice de rojo) en animales sometidos a ayuno

respecto a los alimentados de forma normal, posiblemente debido a una menor concentración de lípidos en el hígado (Trampel *et al.*, 2005).

El color de las agallas es un indicador de la salud del pez y un importante parámetro de cara al consumidor a la hora de evaluar la frescura del pescado (Poli *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2008), siendo un color rojo brillante indicativo de un pescado con gran frescura (Green, 2011). Por ello es interesante estudiar el efecto que pueda tener una respuesta de estrés sobre el color de las agallas, ya que podría afectar a su color y como consecuencia dar lugar a pescados menos atractivos para el consumidor. Ha sido estudiada su relación con el tiempo de almacenamiento (Dowlati *et al.*, 2013), viendo que una mayor duración del periodo de conservación implica un cambio de color en las agallas tornándose más amarillentas como resultado de la reacción entre proteínas y lípidos oxidados, pero hay poca información respecto al efecto de estímulos estresantes como el ayuno o el despesque sobre su color.

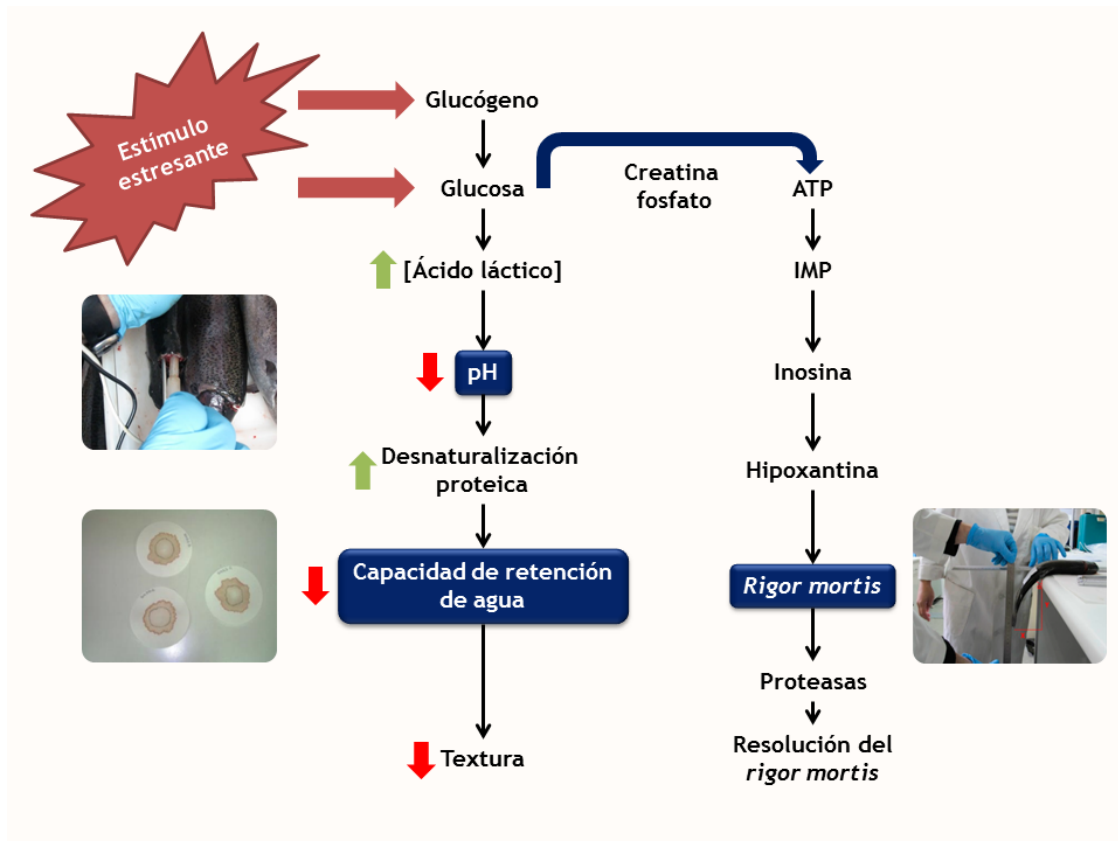
## 2.5. Calidad de carne

La calidad de los productos procedentes de la acuicultura viene determinada principalmente por el valor nutricional de los peces y las características sensoriales de la carne (Grigorakis, 2007). Estos aspectos se encuentran influidos no solo por la composición de la dieta o el régimen de alimentación (Shearer, 2001), sino también por el manejo de estos animales durante su vida productiva y las características de su ambiente (Pottinger, 2001). La calidad de la carne de los peces está influida por diversos factores tales como la especie, edad, manejo de la alimentación, contenido en grasa, distribución de la grasa en el músculo y por la respuesta de estrés producida durante el manejo pre-sacrificio (Poli, 2009; Hardy y Lee, 2010; Suárez *et al.*, 2014). La mejora de prácticas como el despesque, que implica un aumento de la actividad física en los peces, o el ayuno podría beneficiar al bienestar animal y a la calidad de la carne, lo que implicaría una mejora de la rentabilidad de la acuicultura (Ashley, 2007).

No hay evidencias claras de que un ayuno prolongado tenga un beneficio sobre la calidad de la carne en los peces. En el pasado, han sido utilizados largos periodos de ayuno con la creencia de que esto mejoraba la calidad de la carne al reducir los niveles de grasa (Wall, 2001), pero otros autores han demostrado que no hay una pérdida significativa de grasa incluso en largos periodos de restricción de alimento

(Einen *et al.*, 1998). Estudios en trucha común han demostrado que un ayuno pre-sacrificio prolongado puede mejorar ligeramente el color de la carne pero a expensas de una pérdida de peso vivo y rendimiento canal, lo cual no interesa a los productores (Regost *et al.*, 2001). Además se ha observado que los consumidores prefieren la carne de animales que no han sido ayunados previamente (Robb, 2008). Trabajos con dorada han encontrado una mejora muy pequeña con el ayuno en la firmeza del músculo pero viéndose acompañada de una disminución de la vida útil de la carne (Ginés *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2008). Mørkøre *et al.* (2008) concluyeron que un ayuno prolongado mejora la habilidad del salmón para enfrentar una respuesta de estrés severa durante el despesque, pero este problema se aborda de una forma más fácil actuando directamente sobre la causa de esa respuesta de estrés. Sin embargo, un ayuno de corta duración o periodos de ayuno y realimentación alternados pueden mejorar la calidad de la carne en los peces (Foss *et al.*, 2009; Bermejo-Poza *et al.*, 2015). Junto a ello, se ha observado que un aumento de la actividad física previo al sacrificio, como el producido por el despesque de los animales, también tiene un efecto negativo en la calidad de la carne produciendo una rápida caída del pH y un establecimiento del *rigor mortis* más rápido (Digre *et al.*, 2010; Erikson *et al.*, 2011). Este estímulo estresante a su vez puede afectar a las proteínas musculares y, por tanto, a parámetros de calidad de carne como la capacidad de retención de agua (Hultmann *et al.*, 2012).

Por todo esto, es importante valorar la calidad de la carne en los peces y para ello contamos con una serie de parámetros que están muy interrelacionados entre sí. En la Figura 2.13 se presentan los principales procesos bioquímicos que se dan durante la fase *post-mortem* en los peces junto con los indicadores de respuesta de estrés asociados a la calidad de la carne más utilizados.



**Figura 2.13.** Procesos bioquímicos en peces durante la fase post-mortem y principales indicadores de calidad de carne (Adaptado de Poli et al., 2005)

Un animal que no ha sido sometido a un estímulo estresante va a presentar unos valores normales de glucógeno en su organismo. Cuando es sacrificado y sangrado, el suministro de oxígeno al tejido muscular es interrumpido debido a que la sangre ya no se bombea desde el corazón y no circula a través de las agallas donde, en los peces vivos, es enriquecida con oxígeno, y los procesos metabólicos continúan pero sin oxígeno presente. Debido a esta falta de oxígeno, la ruptura de la glucosa y el glucógeno termina con un acúmulo de ácido láctico que va a causar una disminución del pH muscular. En animales que no están sometidos a una situación de estrés, la creatina fosfato va a ayudar inmediatamente a regenerar los niveles de ATP en el músculo cuando sea necesario. Sin embargo, cuando son sometidos a cualquier tipo de estímulo estresante presentan bajas o ninguna concentración de creatina fosfato en el músculo en el momento del sacrificio debido a que ha sido utilizada previamente (Figura 2.13). En esta situación el ATP va a tener que ser generado desde otra fuente de producción de energía. El glucógeno es el mayor depósito de energía en el músculo y va a ser metabolizado para suplir la falta de ATP y en consecuencia mantener los músculos en un estado de *pre-rigor*. Si tiene lugar una gran acumulación previa al sacrificio de

lactato en el músculo, principalmente debida a una respuesta de estrés, el pH de la carne descenderá rápidamente tras el sacrificio. Si el músculo sufre esta rápida caída del pH debida a la rápida generación y consumo del ATP, la acumulación de ácido láctico es más rápida y el establecimiento del *rigor mortis* sucede antes (1-4 horas *post-mortem*). De forma contraria, si el animal presenta un agotamiento de sus reservas de glucógeno previo al sacrificio, el pH no va a descender lo suficientemente rápido tras el sacrificio porque no habrá una suficiente producción de ácido láctico. La Figura 2.14 muestra la ruta normal de producción de energía en el musculo en la mayoría de peces teleósteos y cefalópodos. El glucógeno es oxidado por una serie de reacciones que terminan produciendo dióxido de carbono, agua y ATP. Este proceso tiene lugar en dos fases, una anaeróbica y otra aeróbica. Esta última depende de la presencia continua de oxígeno, mientras que la vía anaeróbica se da cuando no hay oxígeno disponible, obteniéndose ATP también a partir de arginina fosfato o creatina fosfato. En cualquier caso, la producción de ATP cesa cuando estos dos compuestos se agotan.

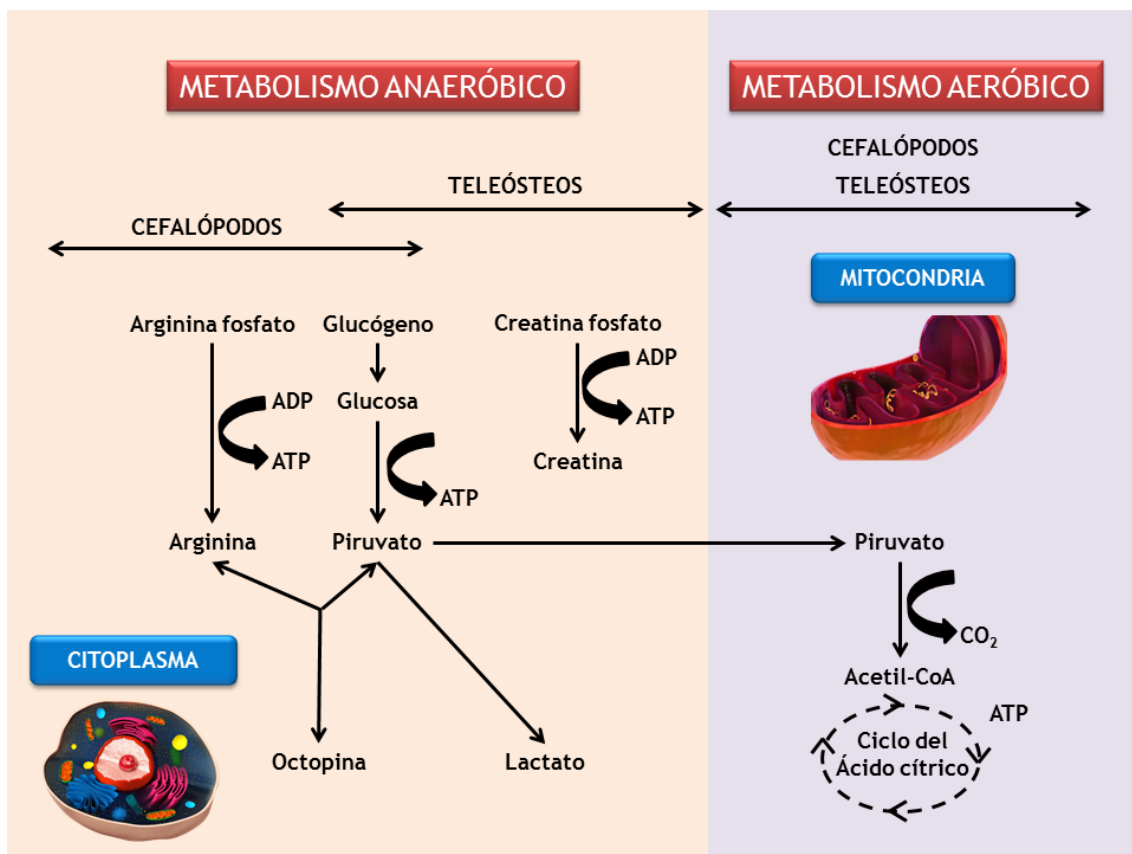
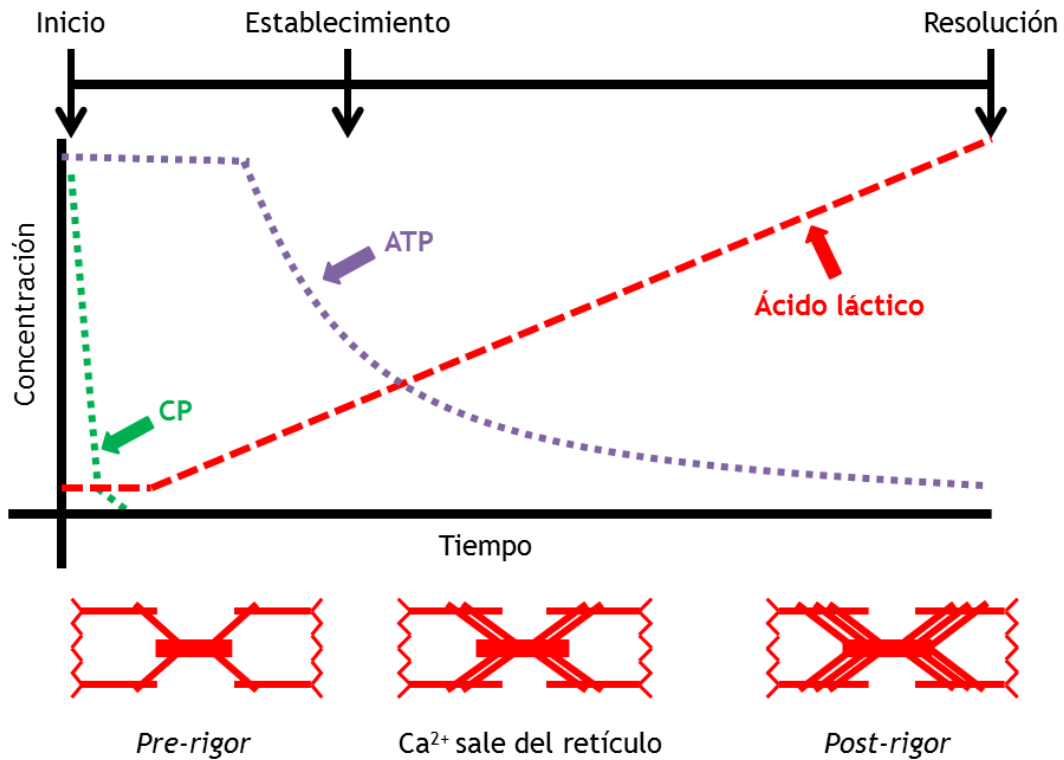


Figura 2.14. Metabolismo anaeróbico y aeróbico del glucógeno muscular en peces (Adaptado de Huss, 1995)

### 2.5.1. Rigor mortis

El *rigor mortis* es un proceso en el cual se produce una falta de flexibilidad de los músculos del pez tras la muerte del mismo. Inmediatamente después de la muerte, los músculos son blandos y fácilmente flexibles, lo que se conoce como la fase *pre-rigor*, y en esta fase es posible la contracción muscular mediante estimulación. Después los músculos empiezan a endurecerse y entonces comienza la fase de *rigor*. En esta etapa los músculos ya no son capaces de contraerse ni mediante estimulación. Tras algunas horas o días los músculos vuelven a reblandecerse y pasan a la fase de *post-rigor*. El cambio de fase de *rigor* a *post-rigor* se denomina resolución del *rigor mortis* (Huss, 1995).

Este proceso es el resultado de una serie de cambios bioquímicos a nivel muscular en los peces tras su muerte. La línea temporal desde el inicio del proceso hasta el establecimiento del *rigor mortis* y su resolución se muestra en la Figura 2.15. Cuando los peces son sacrificados, la creatina fosfato es degradada previamente al ATP hasta que sus niveles se agotan y comienza la degradación del ATP (Watabe *et al.*, 1991). Una vez que los niveles de ATP disminuyen de 10  $\mu\text{mol/g}$  a 1  $\mu\text{mol/g}$ , la fase de *pre-rigor* puede comenzar. Durante el establecimiento del *rigor mortis* se produce una disminución del ATP, como se ha señalado anteriormente, y cuando estos niveles son entre un 33 y un 50% de los valores iniciales se produce la salida de calcio del retículo sarcoplásmico y de las mitocondrias, principalmente debido a la caída del pH y a cambios osmóticos (Pate y Brokaw, 1980). Cuando los niveles intracelulares de calcio llegan a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , se activa la ATP-asa reduciendo la cantidad de ATP libre en el músculo, lo que conlleva la interacción entre la actina y la miosina formando el complejo actina-miosina. Todo este proceso acaba con el acortamiento de los sarcómeros haciendo al músculo rígido e inextensible. La fase de *rigor* comienza normalmente de 1-6 horas tras la muerte del pez y dura un día de media hasta la resolución del mismo.



**Figura 2.15.** Evolución del rigor mortis en peces en función de la concentración de creatina fosfato (CP), ATP y ácido láctico.

El tiempo en el que un pez comienza este proceso y llega hasta la resolución depende de muchos factores:

- **Especie:** Algunas especies de peces tardan más que otras en llegar al establecimiento del *rigor mortis*. La lubina, por ejemplo, tarda una media de 5 horas en llegar al establecimiento del *rigor* (Zampacavallo *et al.*, 2015) mientras que la trucha arcoíris lo alcanza en un margen de 2-9 horas (López-Luna *et al.*, 2014; Concollato *et al.*, 2016).
- **Tamaño del pez:** Los peces pequeños entran en *rigor* más rápidamente que aquellos más grandes de la misma especie (Gokoglu y Yerlikaya, 2015).
- **Manejo pre-sacrificio:** Algunas prácticas que se llevan a cabo antes del sacrificio de los peces como el ayuno o el despesque, que supone un aumento de la actividad física para los animales, pueden afectar al establecimiento del *rigor mortis*. Una respuesta de estrés alta previa al sacrificio produce una mayor actividad muscular en los peces teniendo un efecto directo sobre los cambios *post-mortem* de la carne y el establecimiento y resolución del *rigor mortis* provocando una mayor caída de los niveles de ATP muscular (Zampacavallo *et*

*al.*, 2015). En estas condiciones el proceso del *rigor mortis* es más rápido y la calidad final de la carne será peor (Borderías y Sánchez-Alonso, 2011).

- **Temperatura de conservación:** Este es quizás el factor más importante que influye en el tiempo que un pez tarda en llegar al estado de *rigor mortis* y a su resolución. Cuanta más alta sea la temperatura, más rápido es este proceso (Gokoglu y Yerlikaya, 2015).

### 2.5.2. *pH muscular*

Como se ha explicado anteriormente, inmediatamente después del cese de la circulación de sangre en el organismo, el glucógeno almacenado es degradado anaeróbicamente y se acumula ácido láctico en el músculo (Grigorakis *et al.*, 2003), lo que provoca un descenso del pH muscular de una media de 7,5 a 6,5 en peces. Por ello, el nivel *in vivo* de glucógeno muscular en los peces es el principal determinante del pH muscular tras su sacrificio, ya que se ha observado que están correlacionados negativamente, por lo que a mayor concentración de glucógeno muscular antes del sacrificio, los peces presentarán un pH más bajo y viceversa (Bermejo-Poza *et al.*, 2015).

El estado nutricional del pez, así como el nivel de respuesta de estrés y el despesque previo al sacrificio, tienen una gran influencia sobre este parámetro de calidad. Durante el manejo pre-sacrificio, el proceso de despesque hace que los peces aumenten la actividad del músculo blanco y consecuentemente se produzca la glucogenolisis anaerobia, disminuyendo los valores del pH muscular (Poli *et al.*, 2005). Tras el despesque, el sacrificio se lleva a cabo en poco tiempo, por lo que no permite la recuperación y el pH muscular seguirá bajo. Sin embargo, este proceso se puede ver modificado si los peces han sido ayunados antes del sacrificio debido a que las concentraciones de glucógeno pueden estar reducidas.

### 2.5.3. *Capacidad de retención de agua*

La capacidad de retención de agua (CRA) de la carne es la capacidad de la misma de retener el agua inherente y es una importante propiedad tanto de la carne de los mamíferos como de los peces que afecta al rendimiento y a la calidad del producto final.

El músculo de los peces contiene aproximadamente un 75% de agua y la mayoría de esta agua se encuentra dentro de la estructura muscular en sí misma, ya sea dentro de las miofibrillas, entre ellas, entre las miofibrillas y el sarcolema o entre las células musculares (Venugopal y Shahidi, 1996). Las proteínas musculares tienen una carga eléctrica que se va a ver modificada a medida que el pH cambia, de tal forma que cuanto más alto es el pH muscular, mayor va a ser la carga neta negativa de las proteínas musculares y, por tanto, la unión de estas proteínas con el agua será más alta y esa carne tendrá una mayor capacidad de retención de agua (Toldrá, 2003).

Tras el sacrificio de los peces, la cantidad de agua en la carne puede cambiar dependiendo de numerosos factores relacionados con el tejido muscular o con el manejo del producto. Durante el periodo pre-sacrificio, estímulos estresantes como el ayuno, el despesque o los distintos sistemas de aturdimiento van a provocar una caída más rápida del pH muscular, influyendo sobre la capacidad de retención de agua (Cheng y Sun, 2008). Sin embargo, la capacidad de retención de agua se va a ver afectada sobre todo por la evolución del *rigor mortis*, que a su vez como ya se ha comentado se encuentra afectado por la respuesta de estrés previa al sacrificio. A medida que el músculo entra en la fase de *rigor mortis*, se forman puentes cruzados entre los filamentos gruesos y delgados dentro de las miofibrillas, reduciendo el espacio disponible para alojar el agua. Además, durante el desarrollo del *rigor mortis*, los sarcómeros se acortan, lo que también reduce el espacio para el agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005).

### ***2.5.4. Color del músculo y piel***

Ya que el color del músculo es uno de los parámetros de calidad más importantes y contribuye sustancialmente a la imagen de los salmónidos, la pigmentación y el color de la carne son importantes a la hora de evaluar las consecuencias de estímulos estresantes como el ayuno o el aumento de la actividad física sobre la calidad de la carne (Einen y Thomassen, 1998). La acidificación producida por el acúmulo de ácido láctico, que está relacionada con el estrés pre-sacrificio, ha sido apuntada como la causa de la alteración en el color de la carne, ya que los cambios microestructurales en las fibras musculares dependientes del pH pueden influir en la percepción del color debido a una alteración de la refracción a través de estas fibras (Swatland, 2003). Esta alteración se produce debido al descenso del pH, que

causa una desnaturalización de las proteínas musculares, volviéndose insolubles, lo que provoca cambios en el reflejo de la luz sobre la superficie muscular y, por tanto, en la percepción del color (Warris, 1996).

Se ha observado que un ayuno a corto plazo de unos 3 días de duración no tiene efecto sobre el color del músculo en trucha arcoíris (López-Luna *et al.*, 2014) o salmón (Einen y Thomassen, 1998). Sin embargo, ayunos de mayor duración pueden disminuir la luminosidad de la carne haciéndola más oscura, como observaron Álvarez *et al.* (2008) en salmones ayunados durante 12 días. El tiempo de conservación tiene un gran efecto también sobre el color del músculo. Mørkøre *et al.* (2008) observaron que el color del músculo es más intenso 2 horas tras el sacrificio, disminuyendo su intensidad hasta las 24 horas *post-mortem* en salmones sometidos a ayuno y hasta las 72 horas en salmones no ayunados. En trucha arcoíris, Robb *et al.* (2000) observaron un incremento en la luminosidad durante las 72 horas posteriores al sacrificio, siendo este incremento mayor en los animales con una respuesta de estrés mayor.

El color de la piel en los peces puede ser también un indicador de calidad de la canal importante para el consumidor. Höglund *et al.* (2000) observaron que una respuesta de estrés alta puede producir un oscurecimiento de la piel en la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*). Este efecto sobre la piel ante una respuesta de estrés puede ser explicado por una acción de la ACTH sobre los cromatóforos de la piel (Fuji y Oshima, 1986). Este proceso también se ha descrito otras especies como el salmón (O'Connor *et al.*, 1999) o la trucha arcoíris (Bermejo-Poza *et al.*, 2016).

### **2.5.5. Oxidación lipídica**

El estado de oxidación lipídica se puede cuantificar mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Esta oxidación de las grasas es de gran importancia durante la fase *post-mortem* y la conservación del pescado, ya que va a deteriorar la calidad de la carne y se encuentra influida por diferentes factores como el perfil de ácidos grasos, el oxígeno disponible, el fotoperiodo, la temperatura o la actividad de agua (Yildiz *et al.*, 2015). La oxidación lipídica va a ser un suceso muy importante para la calidad de la carne, especialmente de aquellas que contienen gran proporción de ácidos grasos insaturados como el pescado. Algunas de las consecuencias

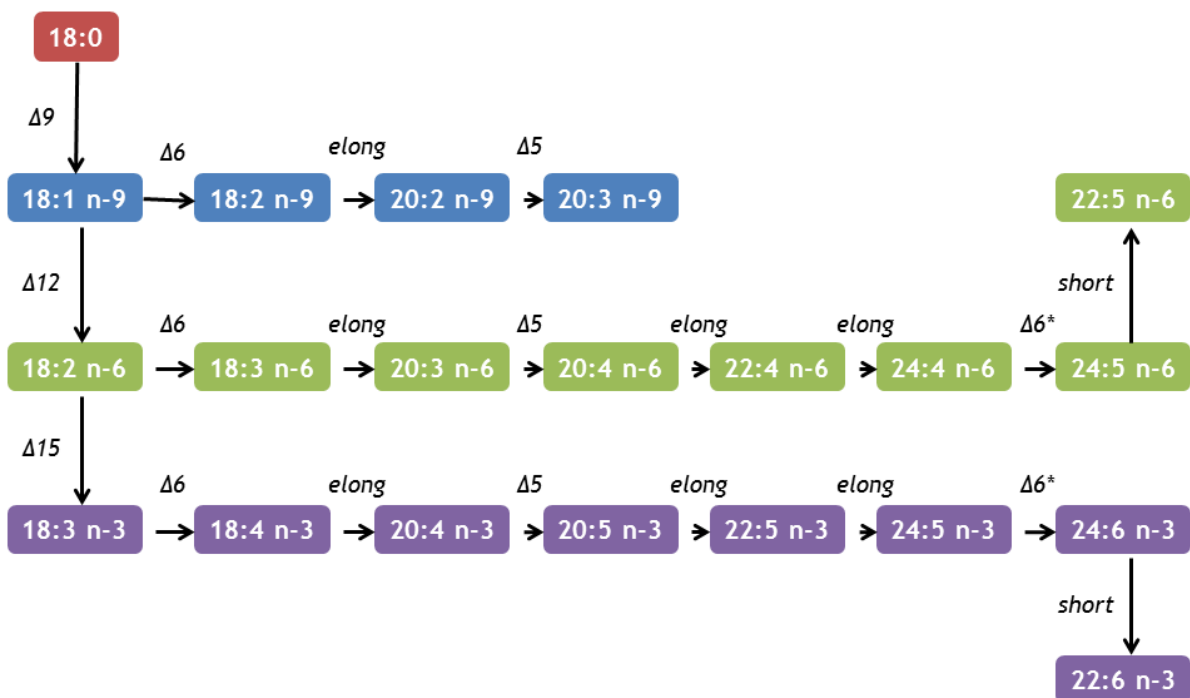
de la oxidación lipídica en el pescado son las pérdidas de calidad, la producción de sabores y olores indeseables, acortamiento de la vida útil, pérdida del valor nutricional y una posible producción de moléculas perjudiciales para la salud (Secci y Parisi, 2016).

El valor de TBARs ha sido utilizado ampliamente para medir la oxidación lipídica en la carne de los peces y otros productos de pescado (Chaiyapera *et al.*, 2003; Yildiz *et al.*, 2006; Boran y Köse, 2007). Se ha observado que se puede ver modificado por algunas prácticas de manejo pre-sacrificio como el ayuno o el despesque. Álvarez *et al.* (2008) sometieron lubinas a un ayuno de 24, 48 y 72 horas y evaluaron los niveles de TBARs en los filetes de esos peces. Aunque no encontraron diferencias significativas entre los periodos de ayuno, observaron una tendencia de incremento de los valores de TBARs con el tiempo de ayuno. Nathanailides *et al.* (2011) apoyaron la hipótesis de que incrementos en los niveles de respuesta de estrés pueden llevar a una mayor oxidación lipídica en la carne, observando que en lubinas sometidas a un estímulo estresante previo al sacrificio, como puede ser el despesque, los valores de TBARs aumentaron respecto a las que no fueron sometidas a ese estímulo.

### 2.5.6. Ácidos grasos

Los depósitos grasos de origen animal están compuestos mayoritariamente por lípidos complejos denominados glicéridos que son productos de la esterificación de ácidos grasos, con uno (monoglicérido), dos (diglicérido), tres (triglicéridos) y una molécula de glicerol, siendo los triglicéridos los que se encuentran más presentes en las grasas de origen animal. Los ácidos grasos se pueden clasificar según su estructura, a partir de la longitud de su cadena carbonada y del grado de insaturación, determinado por la existencia de dobles enlaces. Se consideran de cadena corta aquellos ácidos grasos con menos de 12 átomos de carbono, los de cadena media de 12 a 18 y los de cadena larga aquellos con más de 20 átomos en su molécula. También se clasifican según el número de dobles enlaces presentes en ácidos grasos saturados cuando no poseen dobles enlaces, ácidos grasos monoinsaturados si poseen un doble enlace y poliinsaturados si presentan más de un doble enlace. Por su parte, los ácidos grasos insaturados pueden presentar una configuración *cis* o *trans*, siendo la configuración *cis* la más frecuente en la naturaleza. Esta conformación geométrica confiere a la grasa propiedades diferentes respecto a su punto de fusión (Nelson y Cox, 2005).

Los ácidos grasos de los peces pueden proceder de dos orígenes, síntesis *de novo* a partir de fuentes no lipídicas del propio animal (carbono procedente de glúcidos o aminoácidos) o directamente de los lípidos de la dieta a partir de la acción de la acetil-coA que puede ser transformada en ácidos grasos saturados a través de la acción de la acetil-coA carboxilasa y la ácido graso sintetasa, lo que tiene lugar en el citoplasma. La síntesis *de novo* es inversamente proporcional al nivel de lípidos en la dieta (Henderson, 1996). Los peces de agua dulce pueden desaturar endógenamente los ácidos grasos saturados sintetizados a ácidos grasos monoinsaturados (Figura 2.16). En cuanto a la composición en ácidos grasos del músculo de la trucha arcoíris se ha observado que tiene un mayor porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que saturados, siendo los mayoritarios en líneas generales el ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1 n-9). Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, predominan en el músculo el ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3; EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3; DHA) (Bayraktar y Bayir, 2012; Suárez *et al.*, 2014; Taşbozan *et al.*, 2016).



**Figura 2.16.** Rutas de biosíntesis en peces de ácidos grasos C20 y C22 a partir de ácidos grasos precursores C18 n-9, C18 n-6 y C18 n-3. Δ5, Δ6, Δ6\*, Δ9, Δ12, Δ15: Desaturasas; elong: elongasas (Adaptado de Tocher, 2003)

La composición en ácidos grasos del músculo va a estar influida por una serie de factores intrínsecos o extrínsecos:

### Factores intrínsecos:

- **Genética:** En la producción de trucha es muy común la utilización de animales triploides estériles, ya que tienen un mayor interés comercial debido a una mayor ganancia de peso y en las hembras al haber un menor desarrollo gonadal hay un aumento del desarrollo corporal. Las hembras triploides tienen un incremento de la expresión de los genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, mientras que las diploides tienen aumentada la expresión de los genes de la  $\beta$ -oxidación del hígado, que se trata de un proceso catabólico donde los ácidos grasos se oxidan para obtener energía para la gonadogénesis. Aunque el hígado no es un órgano caracterizado por el almacenamiento de lípidos, en la trucha arcoíris es responsable de la distribución de los ácidos grasos a los tejidos periféricos durante la maduración sexual (Manor *et al.*, 2015).
- **Sexo:** En un estudio en la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) determinaron que la depleción de lípidos en el invierno era mayor en los machos que en las hembras y que cuanto mayor tamaño tuvieran, también era mayor la cantidad que se perdía de lípidos (Hutchings *et al.*, 1999).

### Factores extrínsecos:

- **Época del año:** Las variaciones del contenido de ácidos grasos son mayores dependiendo de la época del año que entre especies. En un estudio realizado con tres especies de tilapia (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis macrochir* y *Tilapia rendalli*) se observó una disminución muy marcada del DHA desde la primavera hasta el otoño (Rasoarahona *et al.*, 2004).
- **Situaciones de estrés:** Montero *et al.* (2001) observaron en dorada que los aumentos en la densidad (3,2 kg/m<sup>3</sup> vs. 12 kg/m<sup>3</sup>) producen una reducción del C18:1 n-9, ácido araquidónico (C20:4 n-6) y ácidos grasos omega 3.
- **Ayuno:** El ayuno tiene consecuencias sobre los ácidos grasos en el periodo de desarrollo larvario. Zengin *et al.* (2013) observaron que los ácidos grasos omega 3 son los que disminuyen en mayor medida siendo utilizados como fuente de energía, aunque el ácido docosaheptaenoico (C22:6 n-3) era conservado, ya que se le atribuyen numerosas funciones fisiológicas,

incorporándose en la retina o en el cerebro de los peces. Einen *et al.* (1998) no encontraron grandes diferencias en el perfil de ácidos grasos del músculo blanco de salmones sometidos a periodos de ayuno de hasta 86 días, sin embargo, observaron diferencias en las enzimas desaturasas, concretamente en la  $\Delta 9$ -desaturasa, lo que produjo un aumento del C16:0 y una disminución del C18:1 n-9 en los peces sometidos a ayuno.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



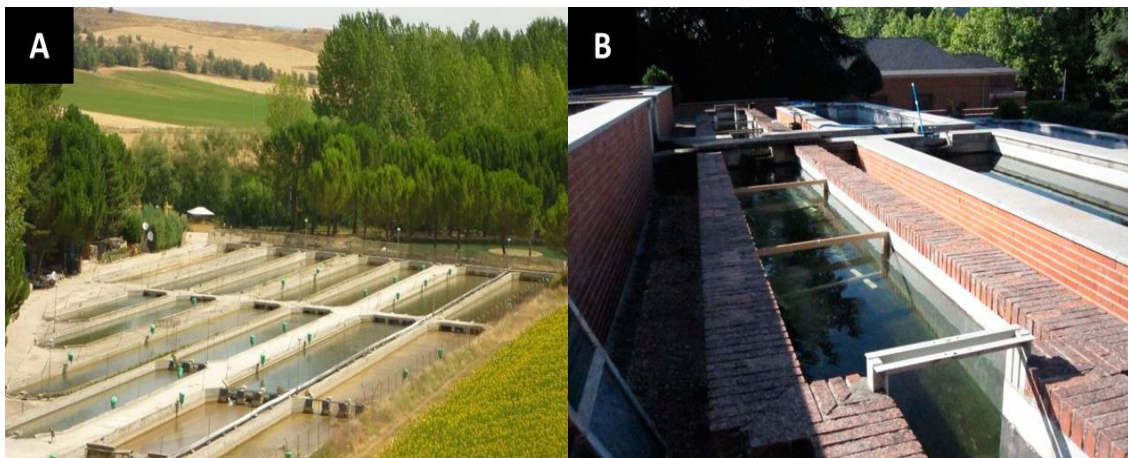
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales y alojamiento

Los animales utilizados en todas las pruebas experimentales fueron truchas arcoíris. Cada pez fue identificado individualmente utilizando microchips subcutáneos (Pit Tag i-Tag 162, 2 x 12 mm) introducidos a nivel de la aleta dorsal, permitiendo llevar un control preciso del crecimiento. En todos los experimentos hubo un periodo de adaptación de un mes previo al comienzo del periodo experimental para que los peces se adaptaran correctamente a las nuevas instalaciones (Experimentos 1 y 3) o condiciones (Experimento 2). Durante el periodo de adaptación y el experimental, la temperatura del agua fue registrada cada 5 minutos utilizando sensores de temperatura subacuáticos (Hobo ® U-11). Con los 288 registros diarios se calculó la temperatura media de cada día y con estos datos se determinaron los grados día mediante la suma de estas medias.

En los **experimentos 1 y 3** los peces fueron suministrados por la piscifactoría Fuente Campillo (Cifuentes, Guadalajara) y se alojaron en las instalaciones acuícolas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes (ETSIM) de la Universidad Politécnica de Madrid (Figura 3.1). Estos experimentos 1 y 3 se llevaron a cabo en invierno y verano, respectivamente. La piscifactoría Fuente Campillo vende hembras trisómicas y alimentadas con pienso comercial con astaxantina en el último mes de engorde, un carotenoide que le da un color anaranjado a la carne de la trucha. La piscifactoría de la ETSIM se encuentra situada en una pequeña pendiente dividida en terrazas donde se sitúan los distintos *raceways* para alojar peces y que cuentan con una capacidad de 5,16 m<sup>3</sup> cada una. El diseño en terrazas permite que el flujo de agua vaya hacia abajo para distribuirse por los distintos tanques por medio de canales. Los tanques tienen un flujo continuo de agua dulce que proviene de un pozo subterráneo. Los tanques se encuentran al aire libre, por lo que los peces durante los distintos experimentos estuvieron sometidos al fotoperiodo natural y se les alimentó con el mismo pienso comercial de la granja de origen (42% proteína bruta, 23% grasa, 4,1% cenizas y 2% fibra bruta; 30 ppm astaxantina; 1% tasa de alimentación).

El **experimento 2** se llevó a cabo en otoño en una piscifactoría situada en la provincia de Guadalajara (Naturix), a orillas del río Tajuña (Figura 3.1). Para el experimento se emplearon seis tanques paralelos o *raceways* (6 m x 30 m), con un suministro de flujo constante de agua (aproximadamente 0,06 m<sup>3</sup>/s) y los peces fueron alojados en jaulas (1,5 m x 0,8 m x 0,35 m) situadas en el centro de estos *raceways*. Durante todo el experimento los animales estuvieron expuestos al fotoperiodo natural. Los peces se alimentaron durante el último mes de engorde con un pienso comercial de cebo para truchas, con la siguiente composición: 41% de proteína bruta, 24% de grasa bruta, 6,5% de cenizas y 2,5% de fibra bruta.



**Figura 3.1.** Instalaciones utilizadas para el desarrollo de los experimentos. A) Experimento 2 en la Piscifactoría Naturix (Guadalajara, España). B) Experimentos 1 y 3 en la Piscifactoría de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de la Universidad Politécnica de Madrid (Madrid, España)

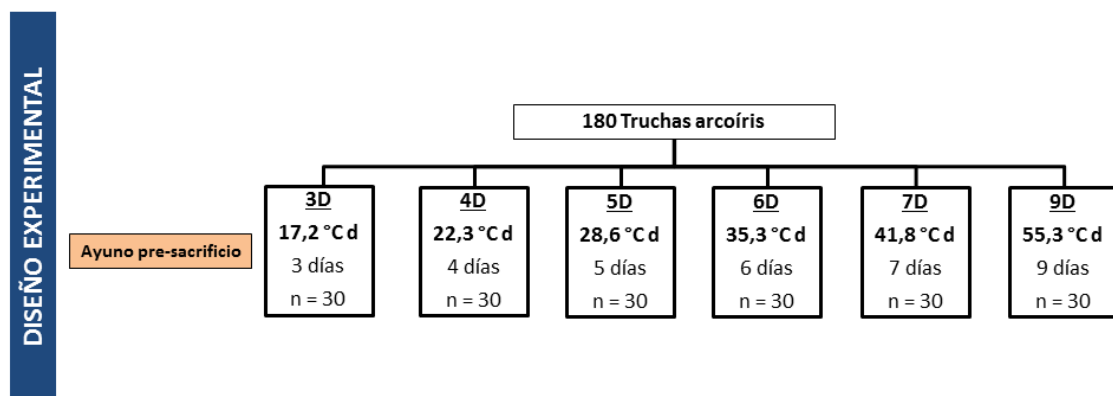
## 3.2. Diseños experimentales

### 3.2.1. Experimento 1

Para realizar el experimento 1 se utilizaron 180 truchas arcoíris divididas en seis grupos de 30 individuos, que se alojaron en dos *raceways*, divididos en tres secciones de aproximadamente 1,25 m x 2,3 m mediante separadores de malla que permitían el paso de agua entre secciones pero los peces de un grupo no eran capaces de ver a los peces de los otros grupos. Los peces fueron alimentados a razón de un 1% de su peso corporal dos veces al día durante el mes previo a la prueba. Tras este mes de adaptación, los peces de cada tanque se sometieron a distintos tiempos de ayuno pre-sacrificio que representaban distintos grados día como se presenta a continuación: 17,2 °C d (3 días,

3D), 22,3 °C d (4 días, 4D), 28,6 °C d (5 días, 5D), 35,3 °C d (6 días, 6D), 41,8 °C d (7 días, 7D) o 55,3 °C d (9 días, 9D) (Figura 3.2).

Los peces se capturaron con salabardos y fueron aturdidos eléctricamente (90 V durante 2 segundos). Inmediatamente después del aturdimiento se tomaron muestras sanguíneas de la vena caudal de cada trucha y la sangre se dividió en dos tubos, uno con ácido etilendiamintetraacético (EDTA) como anticoagulante y otro con fluoruro de sodio (NaF) y después se sacrificaron por decapitación. El tiempo entre la finalización del aturdimiento y el sacrificio fue inferior a 1 min para cada pez. Después del sacrificio, los peces se pesaron y midieron y tras lo cual se evisceraron para calcular el índice digestivo-somático (DSI), el índice hepatosomático (HSI) y el rendimiento canal como se explica más adelante. Además también se valoró la calidad de la canal y de la carne mediante la medición del establecimiento del *rigor mortis* (4 y 24 horas *post-mortem*) y del pH muscular (0 horas *post-mortem*). Los peces se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para tomar estas medidas.



**Figura 3.2.** Diseño experimental del experimento 1. Grupos experimentales y número de peces en cada uno.

### 3.2.2. Experimento 2

En el experimento 2 se contó con 240 truchas arcoíris divididas en seis grupos de 40 individuos en cada una de las seis jaulas. Durante el último mes de engorde, los peces fueron pre alimentados todos los días (D), una vez cada dos días (2D, lo que representa un días de ayuno, en inglés esto se llama sistema *skip a day*) o una vez cada cuatro días (4D, tres días de ayuno). En todos los tratamientos se les suministró la misma cantidad de comida pero distribuida de manera diferente: las truchas D recibieron todos los días un 1,2% de su peso corporal en alimento, las 2D se

alimentaron con un 2,4% de su peso corporal y, por último, las 4D recibieron el día de alimentación un 4,8% de su peso corporal. Debido a que la cantidad de comida aportada el día de alimentación de este último grupo era muy elevada, se les aportó pienso hasta la saciedad y se les repetía el aporte una hora después hasta saciedad. Una vez transcurrido un mes de cebo se las sometió a un ayuno previo al sacrificio de 2 días o de 9 días, dentro de cada frecuencia de alimentación. Así, para cada frecuencia de alimentación se sacrificaron todas las truchas de una jaula con 24,3 °C d (2 días de ayuno) y de otra jaula con 102 °C d (9 días de ayuno) de modo que nos permitiese medir el efecto de la duración de ayuno antes del sacrificio (Figura 3.3).

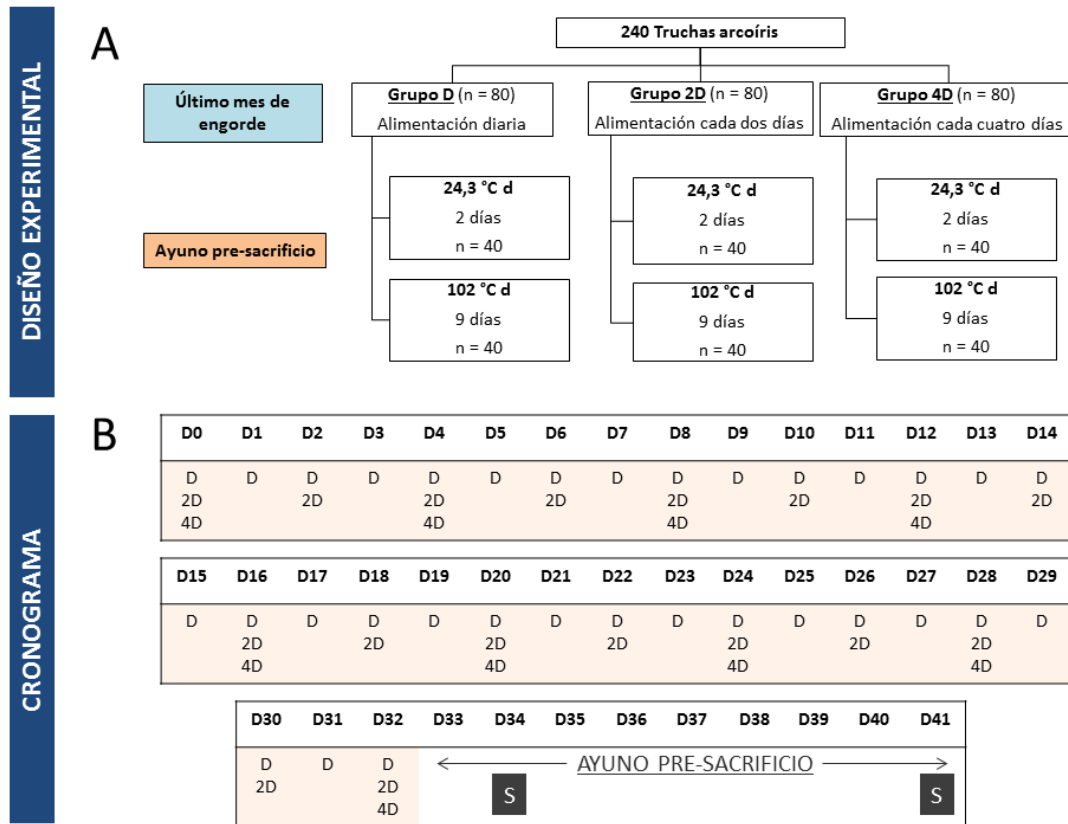
Después del periodo de ayuno, se bajó el nivel de agua de los tanques y se capturaron los peces individualmente con salabardos. Posteriormente fueron sacrificados de inmediato por el método "ikijime", que consiste en perforar el cerebro del pez utilizando una punta afilada y que asegura el menor sufrimiento para el pez y las menores modificaciones posibles sobre la carne (Angus *et al.*, 1995).

Inmediatamente después del sacrificio, se tomó una muestra de sangre de la vena caudal de cada trucha. La sangre se dividió en dos tubos, uno con EDTA como anticoagulante y otro con NaF.

Todos los peces se pesaron y midieron y posteriormente se evisceraron para calcular los índices somáticos (DSI y HSI) y el rendimiento canal, como se explica más adelante. Se tomó una muestra de hígado de cada pez, congelándola inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior determinación de la concentración de glucógeno hepático. Además se midió el color de la piel y de las agallas de cada pez.

Para valorar la calidad de la canal y de la carne se tomaron medidas del establecimiento del *rigor mortis* (0 y 24 horas *post-mortem*), pH muscular (a las 0, 2 y 24 horas *post-mortem*) y color del músculo (0 y 24 horas *post-mortem*). Los peces se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para tomar estas medidas. Para determinar la concentración de glucógeno muscular y el ratio IMP/ATP se tomaron muestras de la musculatura a nivel de la aleta dorsal del pescado eviscerado, congelándose de inmediato en nitrógeno líquido para su posterior determinación a las 0 y 24 horas *post-mortem*. La CRA también fue medida en muestras de músculo tomadas de la misma

zona que las anteriores y refrigeradas a 4 °C hasta su determinación a las 24 horas *post-mortem*.



**Figura 3.3.** *Diseño experimental del experimento 2. A) Grupos experimentales y número de peces en cada uno. B) Cronograma de la prueba indicando los días que fueron alimentados los peces de cada grupo y los días de sacrificio (S) a dos y nueve días de ayuno.*

### 3.2.3. Experimento 3

En este experimento se dispuso de cuatro *raceways* paralelos que se utilizaron para alojar a un total de 144 truchas arcoíris. Cuando las truchas llegaron a las instalaciones, se dividieron de forma aleatoria entre los cuatro *raceways* (n=36). Los peces de dos de los *raceways* fueron sometidos a 7 días de ayuno antes del sacrificio (135,6 °C d), mientras que los peces de los otros dos *raceways* no fueron ayunados. Además, los peces de uno de los *raceways* sometidos a ayuno y otro de los no ayunados fueron ejercitados 20 minutos antes del sacrificio persiguiéndoles con salabardos para simular la práctica del despesque. Como resultado, los peces quedaron divididos en cuatro grupos según fueron sometidos o no a ayuno y despesque pre-sacrificio (Figura 3.4).

Se capturaron los peces mediante el uso de salabardos y fueron aturdidos eléctricamente (90 V durante 2 segundos). Inmediatamente tras el aturdimiento, se tomaron las muestras sanguíneas de la vena caudal de 18 truchas de cada grupo, dividiéndolas en dos tubos, uno con EDTA y otro con NaF.

Tras la extracción de las muestras sanguíneas, los peces se sacrificaron mediante decapitación. El tiempo entre la finalización del aturdimiento y el sacrificio fue inferior a 1 min para cada pez. Después del sacrificio, los peces se midieron, pesaron y evisceraron para calcular los índices somáticos (DSI y HSI) y el rendimiento canal. También se midió el color de los hígados de cada pez y se congelaron en nitrógeno líquido para la posterior determinación de la concentración de glucógeno hepático.

Para valorar la calidad de la canal y de la carne se tomaron medidas del establecimiento del *rigor mortis* (0, 5, 24 y 48 horas *post-mortem*), pH muscular (0 y 48 horas *post-mortem*) y color del músculo (0 y 24 horas *post-mortem*). Los peces se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para tomar estas medidas. Por último se tomaron muestras de la musculatura dorsal de cada pez y se congelaron en nitrógeno líquido para la determinación posterior del glucógeno muscular, ratio IMP/ATP, oxidación lipídica (TBARs) y ácidos grasos, todos ellos a 0 y 48 horas *post-mortem*.

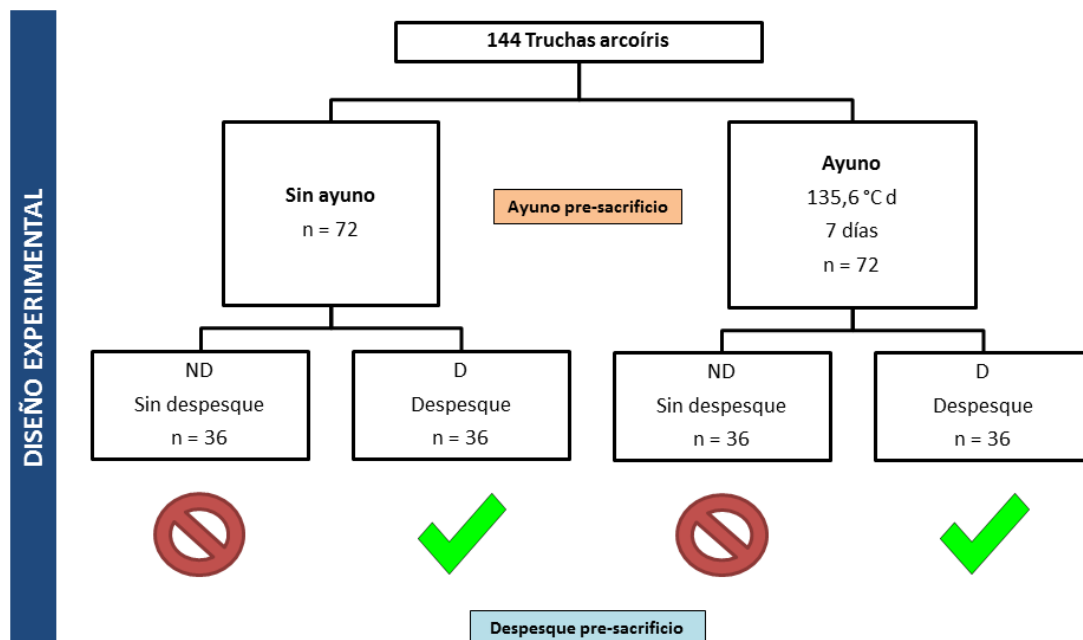


Figura 3.4. Diseño experimental del experimento 3. Grupos experimentales y número de peces en cada uno.

El resumen de las condiciones experimentales de cada prueba se muestra en la Tabla 3.1 y las medidas y análisis que se llevaron a cabo en cada uno de los experimentos están resumidos en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.1.** *Parámetros medios iniciales (Media ± error estándar) en cada uno de los tres experimentos*

	Experimentos		
	1	2	3
<b>Fecha</b>	Diciembre 2013	Octubre 2014	Junio 2014
<b>Salida/Puesta sol</b>	8h27/17h48	8h15/19h24	6h45/21h42
<b>Peso inicial (g)</b>	332±34	324±41	324±47
<b>Densidad (kg/m<sup>3</sup>)</b>	5,77	30,9	2,26
<b>Temperatura media (°C)</b>	6,15±0,6	12,2±1,3	22,6±0,9
<b>Grados día (°C d)</b>	17,2-55,3	24,3/102	135,6

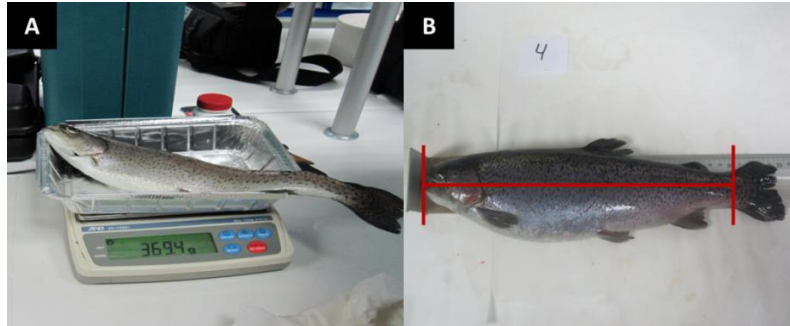
**Tabla 3.2.** *Resumen de las medidas y análisis realizados en cada uno de los tres experimentos*

		Experimentos			
		1	2	3	
<b>Parámetros biométricos</b>	<b>Peso sacrificio y longitud corporal/CC</b>	x	x	x	
	<b>Contenido estomacal</b>	x	x	x	
	<b>Índice digestivo-somático (DSI)</b>	x	x	x	
	<b>Índice hepatosomático (HSI)</b>	x	x	x	
	<b>Rendimiento canal</b>	x	x	x	
<b>Parámetros hematológicos</b>	<b>Cortisol</b>	x	x	x	
	<b>Glucosa</b>	x	x	x	
	<b>Lactato</b>	x	x	x	
	<b>Triglicéridos</b>	x	x	x	
	<b>Enzima lactato deshidrogenasa (LDH)</b>		x		
	<b>Enzima creatin fosfoquinasa (CPK)</b>	x	x	x	
<b>Parámetros metabólicos</b>	<b>Glucógeno hepático</b>		x	x	
	<b>Glucógeno muscular</b>		x	x	
	<b>IMP/ATP ratio</b>		x	x	
	<b>Color hígado</b>	x		x	
	<b>Color agallas</b>		x		
<b>Parámetros de calidad de canal y de carne</b>	<b>Rigor mortis</b>	x	x	x	
	<b>pH muscular</b>	x	x	x	
	<b>Capacidad de retención de agua</b>		x		
	<b>Oxidación lipídica (TBARs)</b>			x	
	<b>Ácidos grasos</b>			x	
	<b>Color</b>	<b>Músculo</b>		x	x
		<b>Piel</b>	x	x	

### 3.3. Técnicas y métodos experimentales

#### 3.3.1. Parámetros biométricos

Los peces se pesaron al inicio de cada prueba y en el momento del sacrificio. Para la longitud se tuvo en cuenta la longitud corporal o estándar, que es la distancia desde la boca del pez a la base de la cola. (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Medición del peso (A) y la longitud corporal o estándar (B)

Con los datos al sacrificio de peso y longitud corporal y la obtención tras la evisceración (Figura 3.6) de los pesos del tracto digestivo lleno y vacío y del peso del hígado se calcularon los siguientes parámetros:

$$\text{Coeficiente de condición corporal (CC)} = \frac{\text{Peso sacrificio (g)}}{\text{Longitud corporal}^3(\text{cm})}$$

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = \frac{\text{Peso inicial (g)} - \text{Peso sacrificio (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} \times 100$$

$$\text{Contenido estomacal (g)} = \text{Peso estómago lleno (g)} - \text{Peso estómago vacío (g)}$$

$$\text{Peso vivo vacío (g)} = \text{Peso sacrificio (g)} - \text{Contenido estomacal (g)}$$

$$\text{Índice digestivo – somático (DSI)(\%)} = \frac{\text{Peso tracto digestivo (g)}}{\text{Peso vivo vacío (g)}} \times 100$$

$$\text{Índice hepatosomático (HSI)(\%)} = \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso vivo vacío (g)}} \times 100$$

$$\text{Peso canal (g)} = \text{Peso sacrificio (g)} - \text{Peso vísceras (g)}$$

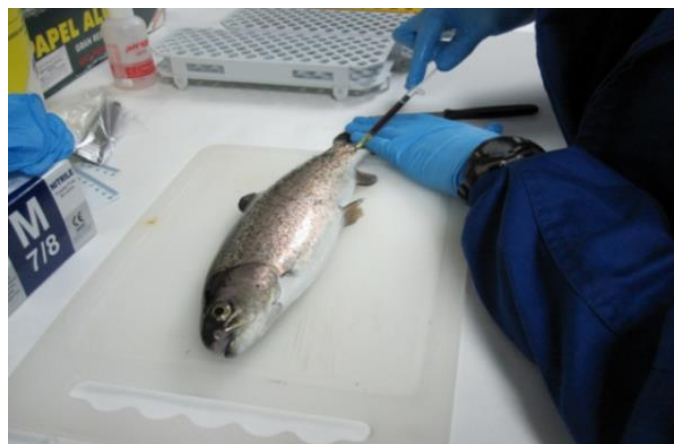
$$\text{Rendimiento canal (\%)} = \frac{\text{Peso canal (g)}}{\text{Peso sacrificio (g)}} \times 100$$



**Figura 3.6.** Evisceración de la trucha arcoíris señalando mediante flechas la localización del hígado, gónadas, aparato digestivo y bazo.

### 3.3.2. *Parámetros hematológicos*

Como se ha descrito anteriormente, las muestras sanguíneas se tomaron de la vena caudal de los peces (Figura 3.7) y se llenaron dos tubos de 2 ml, uno con EDTA como anticoagulante para la obtención de plasma en donde se determinaba la concentración de cortisol, triglicéridos, LDH y CPK, y el otro con NaF, para reducir el consumo de glucosa por parte de los eritrocitos, el cual era centrifugado inmediatamente a 6.000 rpm durante diez minutos para quitar los eritrocitos y recoger el suero para la determinación de las concentraciones de ión lactato y glucosa. Ambos tubos (EDTA y suero) se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis en las siguientes 24 horas.



**Figura 3.7.** Extracción de muestras de sangre de la vena caudal.

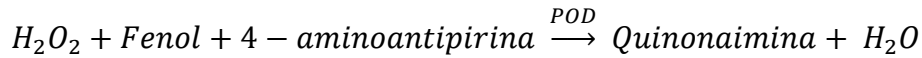
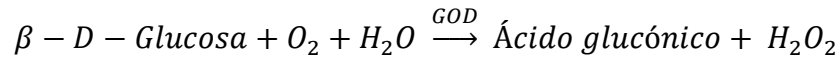
### **3.3.2.1. Cortisol**

El cortisol plasmático se determina mediante enzimoanálisis competitivo (ELISA). Primero, se pipetea 10 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes (recubiertos con antisuero anti-cortisol de conejo). A continuación se añaden 200 µl de conjugado de enzima en todos los pocillos, excepto para el pocillo del blanco. Estos pocillos se incuban durante 60 min a 37 °C. Durante esta primera incubación, el cortisol muestra compite con el cortisol conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) por los sitios específicos del antisuero en los pocillos recubiertos. Después de la incubación, todo el material no unido se elimina mediante aspiración y se lava cuatro veces con 300 µl de solución de lavado diluida (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Se realiza una segunda incubación de los pocillos con 200 µl de una solución de cromógeno (tetrametilbenzidina, TMB) en un tampón sustrato (citrato-fosfato) durante 15 min a 37 °C. Finalmente, para parar la reacción se pipetea 100 µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en los pocillos. La lectura del color se hace en un espectrofotómetro (Hitachi 717®) en dos longitudes de onda, 450 y 405 nm. Se utiliza un blanco de agua destilada para la referencia colorimétrica.

Se realiza una curva patrón para determinar la concentración de cortisol con las siguientes concentraciones 0, 10, 30, 100, 300 y 900 ng/ml. La lectura se debe realizar dentro de los 20 minutos siguientes a la finalización de la prueba. Se mide bajo dos longitudes de onda, porque para concentraciones entre 30 y 900 ng/ml la lectura se debe hacer a 450 nm, mientras que concentraciones menores a 30 ng/ml la longitud de onda para la lectura es 405 nm.

### **3.3.2.2. Glucosa**

La medición de la concentración de glucosa se realiza por la formación de unos complejos coloreados (Quinonaimina) siguiendo dos reacciones enzimáticas acopladas. La primera reacción se produce cuando la muestra con glucosa entra en contacto con oxígeno y agua y por acción de la enzima glucosa oxidasa (GOD, 250 UI/ml) forma glucónico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y en la segunda el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona en presencia de la enzima peroxidasa (POD, 20 UI/ml), 4- aminoantipirina (12,5 mmol/l) y fenol (5 mmol/l) para formarse el compuesto de color quinonaimina.



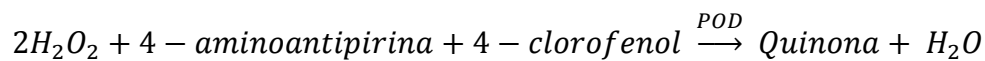
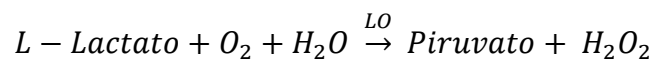
Se mezclan 10 µl del suero de la muestra y 10 µl de la solución patrón de glucosa (100 mg/dl) con 1 ml de la solución reactiva. Se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia del patrón y de la muestra frente a un blanco de solución reactiva a 505 nm en un espectrofotómetro (Hitachi 717®).

La intensidad del color producido es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra y es estable durante 2 horas. La concentración de glucosa (mg/dl) se calcula aplicando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. patrón}} \times \text{Conc. patrón}$$

### **3.3.2.3. Lactato**

La concentración de lactato se mide por la transformación enzimática a un compuesto coloreado (Quinona) en dos fases. En la primera fase, el suero en presencia de oxígeno y agua por acción de la enzima lactato oxidasa (LO, 800 UI/l) forma piruvato y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona en presencia de la enzima POD (2000 UI/l), 4-aminoantipirina (0,4 mmol/l) y 4-clorofenol (4 mmol/l) para formarse un compuesto de color rosáceo, Quinona.



Los reactivos se encuentran en una disolución tampón fosfato a pH 7,5. Se mezclan 10 µl del suero muestra y 10 µl de una solución patrón lactato (10 mg/dl) con 1 ml de disolución de reactivos, se dejan 10 minutos a temperatura ambiente y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro (Hitachi 717®) a 505 nm de las dos mezclas utilizándose como blanco la disolución de reactivos.

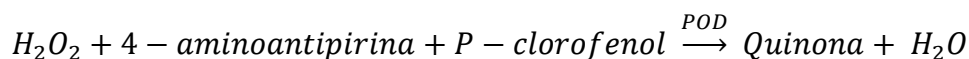
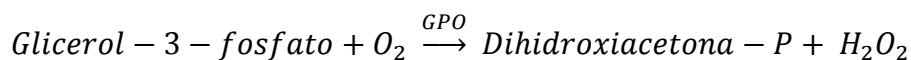
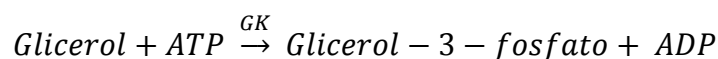
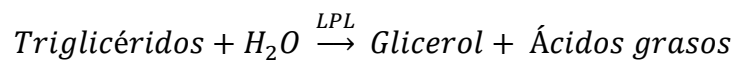
Para el cálculo de la concentración de lactato (mmol/l) se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. patrón}} \times \text{Conc. patrón}$$

El método es lineal hasta valores de 150 mg/dl. Si la concentración de la muestra es superior, se diluye el suero a la mitad con una disolución de ClNa al 0,9% y el resultado final se multiplica por dos.

### **3.3.2.4. Triglicéridos**

Para la determinación de triglicéridos en suero, se utiliza un reactivo enzimático, el cual contiene, principalmente enzimas lipoproteinlipasa (LPL), glicerol quinasa (GK), glicerofosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa (POD). La LPL hidroliza los triglicéridos liberando ácidos grasos y glicerol, éste último es fosforilado por la GK formando glicerol 3-fosfato. Posteriormente, por la acción de la GPO reacciona con el oxígeno para producir dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. Seguidamente, la enzima peroxidasa, reacciona con el peróxido de hidrógeno y la 4-amino-antipirina y p-clorofenol formando quinona, un complejo de color rojo, el cual, absorbe luz a 520 nm. La intensidad de la coloración es proporcional al glicerol liberado de los triglicéridos.



De esta manera, se colocan 3 ml del reactivo enzimático en tres tubos de ensayo debidamente rotulados como muestra, patrón y blanco, todos se calientan a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se adiciona, 30 µl de suero muestra, previamente centrifugado, 30 µl solución estándar y 30 µl de agua destilada. Seguidamente, se agitan suavemente y se calientan nuevamente a 37 °C durante 5 minutos. Al final de este periodo, se lee la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm, utilizando el espectrofotómetro (Hitachi 717®).

Para conocer los valores de triglicéridos en el suero de cada pez se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Abs. muestra}}{\text{Abs. patrón}} \times \text{Conc. patrón}$$

### **3.3.2.5. Lactato deshidrogenasa (LDH)**

Se determina la actividad enzimática, mediante la reacción de hidrogenación del piruvato a L-lactato en presencia de NADH.

Se valora la extinción por minuto de la reacción en los tiempos 30", 1' 30", 2' 30" y 3' 30" tras la mezcla de 2,5 ml de la solución reactiva (0,6 mmol/l de piruvato, 50 mmol/l a pH 7,5 de tampón fosfato y 0,18 mmol/l de NADH) con 0,1 ml de la muestra de plasma con EDTA. La extinción por minuto se valora por reducción de la absorbancia de la mezcla entre esos cuatro tiempos, con una longitud de onda de 340 nm. La temperatura de medición de la reacción fue 30 °C.

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (U/l) se calcula multiplicando la extinción por minuto media de las tres medias por 4.921. Cuando la actividad enzimática es alta, el valor de la extinción por minuto a los 3 minutos de reacción debe ser inferior a 0,100, en estos casos se medía de nuevo la reacción diluyendo el plasma 1/10 con una solución de ClNa al 0,9 % y multiplicado le extinción por minuto media por 49.210.

### **3.3.2.6. Creatin fosfoquinasa (CPK)**

Se valora la actividad enzimática de desfosforilación del creatinifostato a creatinina con la formación de ATP, asociado a dos reacciones: una desfosforilación de glucosa por la enzima hexoquinasa con ATP y la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y como coenzima NADP<sup>+</sup>.

Se valora la extinción por minuto de la reacción en los tiempos 2', 3', 4' y 5' tras la mezcla de 2,5 ml de la solución reactiva (30 mmol/l de creatininfosfato, 2 mmol/l de ADP, 20 mmol/l de glucosa, 2 mmol/l de NADP<sup>+</sup>) con 0,1 ml de la muestra de plasma con EDTA. La extinción por minuto se valora mediante la reducción de la absorbancia

en la mezcla en estos cuatro tiempos, a una longitud de onda de 340 nm. La temperatura de medición de la reacción fue 30 °C.

La actividad de la enzima CPK (U/l) se calcula multiplicando la extinción por minuto media de las tres medias por 4.127. Cuando la actividad enzimática es alta, el valor de la extinción por minuto a los 3 minutos de reacción debe ser inferior a 0,250, en estos casos se medía de nuevo la reacción diluyendo el plasma 1/10 con una solución de ClNa al 0,9 % y multiplicado la extinción por minuto media por 41.270.

### **3.3.3. Parámetros metabólicos**

#### **3.3.3.1. Glucógeno hepático y muscular**

La técnica consiste en la determinación colorimétrica del glucógeno hepático y muscular. Para ello se ha utilizado la formación de complejos glucógeno-yodo que se forman al unirse el yodo con las ramas polisacáridas del glucógeno, estabilizadas por la acción de sales inorgánicas. La intensidad y tono del color de los complejos glucógeno-yodo reflejan la media de uniones del yodo al glucógeno. Se ha seguido la técnica de Dreiling *et al.* (1987) con algunas modificaciones para aplicarla en pescado.

La determinación se ha realizado por duplicado en cada muestra de hígado y músculo (procedente de la musculatura dorsal), que sin descongelar se trocean partiendo la muestra en trozos pequeños, se pican y se pesan 0,5 g en tubos de 10 ml, se añade 5 ml de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) frío al 8,4 %, se homogeneiza durante 30 – 45 s, para posteriormente centrifugarse a 4.500 rpm, a 4 °C, obteniéndose un sobrenadante, donde se encuentra el glucógeno disuelto, y un residuo.

Para la valoración se ha realizado tres diluciones en función de la muestra que se trate:

- Para hígado las diluciones han sido 1/180 y 1/30.
- Para músculo a las 0 horas 1/30 y 1/7,5.
- Para músculo a las 24 horas 1/7,5.

De las diluciones se ha cogido un volumen de 0,4 ml a los cuales se añade 2,6 ml del reactivo de color que se prepara diariamente. Para la lectura y determinación de la concentración es necesario realizar una curva patrón. Hemos utilizado para ello

glucógeno tipo II de ostra de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania). Se realizan 6 diluciones a 160, 80, 40, 20, 10 y 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Para la elaboración del reactivo de color se disuelven 0,26 g de yodo y 2,6 g de yoduro potásico (KI) en 10 ml de agua destilada. De esta solución se cogen 1,3 ml y se añaden a 100 ml de una disolución de cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) saturada. Cuando se añade el reactivo de color se deja estabilizar la disolución de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, siendo el color estable por encima de 2 horas. Transcurrido este tiempo se procede a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro (Hitachi 717®) a una longitud de onda de 460 nm, tomándose como referencia de color (blanco) el ácido perclórico a 8,4 %. La concentración de glucógeno se expresa en mg/g de tejido, para ello se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$\text{Glucógeno (mg/g)} = \frac{D^{-1} \times \text{Conc} \times [10 + (0,75 \times \text{Peso})]}{1000 \times \text{Peso}}$$

**D:** Dilución 1/180, 1/30 ó 1/7,5

**Conc:** Concentración obtenida en el espectrofotómetro

**Peso:** Peso de la muestra

### **3.3.3.2. Ratio IMP/ATP**

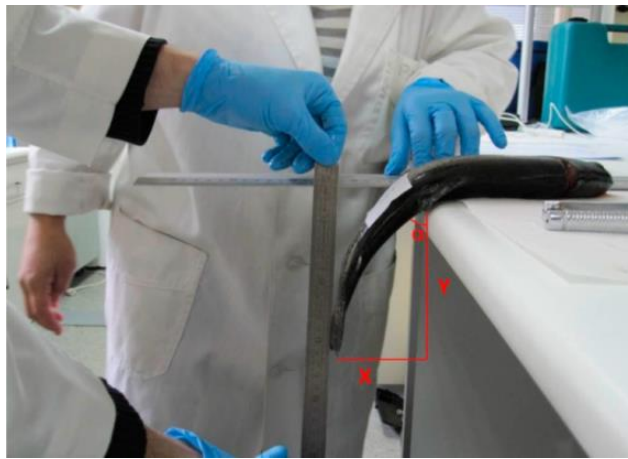
Se ha seguido la técnica de Hönikel y Fischer (1977) con algunas modificaciones para aplicarla en pescado. Se cortan las muestras de músculo en trozos pequeños sin descongelarlas previamente para pesar 0,5 g de músculo. De cada muestra se hicieron dos replicados. Posteriormente se añaden 5 ml de ácido perclórico frío 0,85 M y se homogeneiza la mezcla durante 30 segundos a una velocidad de 20.000 rpm para después centrifugar a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Tras la centrifugación se toman 0,2 ml del sobrenadante y se les añade 3,8 ml de tampón fosfato 0,1 M con un pH de 6,5. Por último se procede a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro (Hitachi 717®) con unas longitudes de onda de 250 y 260 nm, teniendo como referencia de blanco el ácido perclórico. El ratio IMP/ATP se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio IMP/ATP} = \frac{\text{Abs. 250 nm}}{\text{Abs. 260 nm}}$$

### 3.3.4. Parámetros de calidad de canal y de carne

#### 3.3.4.1. Rigor mortis

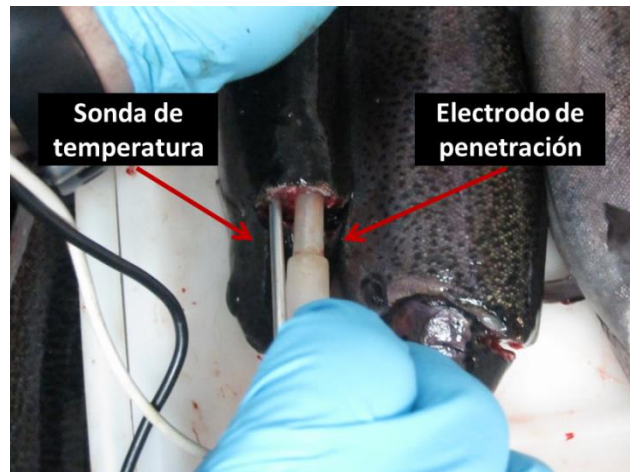
La evolución del *rigor mortis* a distintas horas *post-mortem* se midió siguiendo el método de Cutting (Korhonen *et al.*, 1990). Las mediciones se llevaron a cabo mediante la colocación de la trucha en una superficie plana y sólida de manera que la parte del cuerpo detrás del extremo posterior de la aleta dorsal estaba colgando sobre el borde, sin apoyo. El ángulo de *rigor* se calculó como  $\alpha = \tan^{-1} (X/Y)$ , donde X es la longitud (cm) de la parte horizontal del triángulo rectángulo e Y es la longitud (cm) de la parte vertical del triángulo (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Medición del ángulo del rigor mortis.

#### 3.3.4.2. pH muscular

Para la determinación del pH se utilizó un pHmetro con electrodo de penetración y termómetro, Hanna Instruments HI-9025 (Hanna Instruments, S.L.), introduciéndolo en el músculo (Figura 3.9). Las medidas se han tomado sobre la musculatura dorsal en el lado izquierdo, a distintas horas *post-mortem* según el experimento. La temperatura también se registró en todos los tiempos mediante la sonda de temperatura del equipo utilizado.

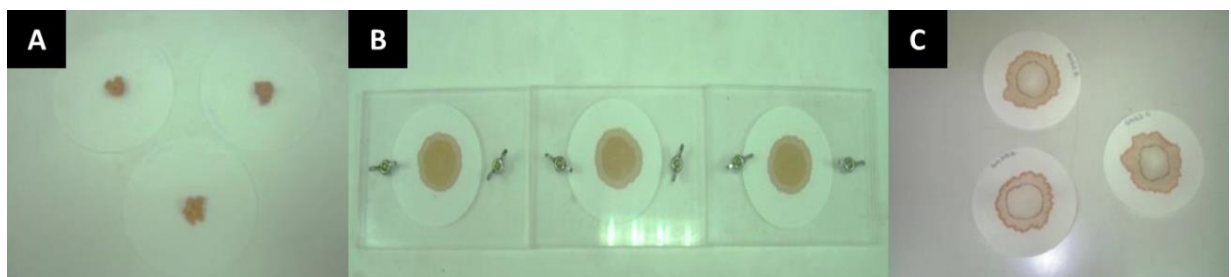


**Figura 3.9.** Medición del pH muscular.

### 3.3.4.3. Capacidad de retención de agua

Se ha realizado utilizando el método de presión en papel de filtro de Grau y Hamm (1953), consistente en presionar una cantidad determinada de músculo, sobre un papel de filtro entre dos placas, valorando el área del agua liberada por el músculo.

Para ello se pesan 300 mg de músculo procedente de la musculatura dorsal del pez, bien picado (procedentes del pez refrigerado 24 h), sobre un papel de filtro Albet® n° 400 colocándolo entre dos placas de metacrilato, apretando fuertemente a mano con dos tornillos las placas durante cinco minutos. Transcurrido este tiempo, se separan las placas, dibujando el área que ha dejado el músculo (M) y el área dejada por el agua liberada por el músculo (T), para la posterior medida de dichas áreas. Se realizaron tres repeticiones por animal (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Determinación de la capacidad de retención de agua. A) Muestras del músculo de la trucha sobre el papel de filtro. B) Placas de metacrilato presionando la carne. C) Áreas resultantes de la muestra y del agua liberada.

Los papeles de filtro fueron escaneados utilizando un escáner HP Scanjet 3200C® y el área fue medida mediante el programa informático Adobe Photoshop®.

Para la determinación del factor de conversión de área a peso del agua liberada por el músculo, se utilizó el método de Wierbicki y Deatherage (1958), obteniéndose un valor de 15,16 mg/cm<sup>2</sup> con un R<sup>2</sup> = 0,9926.

La capacidad de retención de agua del músculo se obtiene como la diferencia entre el porcentaje de agua total del músculo y el de agua liberada, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CRA (\%) = 100 - \frac{[(T (cm^2) - M (cm^2)) \times 15,16 \times 100]}{\text{Agua de la muestra (mg)}}$$

#### **3.3.4.4. Color**

Para su determinación se ha utilizado un colorímetro Minolta Spectrophotometer CM-2500c (Minolta, Osaka, Japón), utilizando el espacio de color CIEL\*a\*b\* (Commission Internationale de l'Eclairage, CIE, 2004). Este sistema permite identificar un color con la ayuda de las coordenadas L\* (luminosidad), a\* (índice de rojo) y b\* (índice de amarillo). Con los índices a\* y b\* se calcularon los parámetros C\* (croma) y h\* (tono):

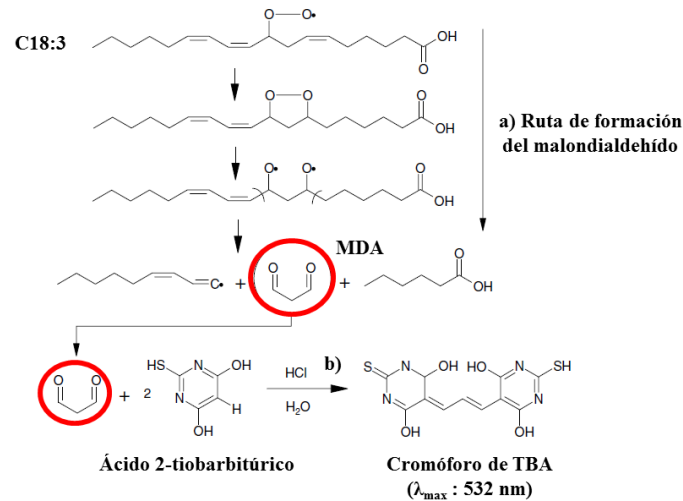
$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h^* (\text{°}) = \arctan (b^*/a^*) \times 57,29$$

Se han tomado tres medidas sobre la superficie de la musculatura dorsal, piel, agallas e hígado y a distintas horas *post-mortem* según el experimento.

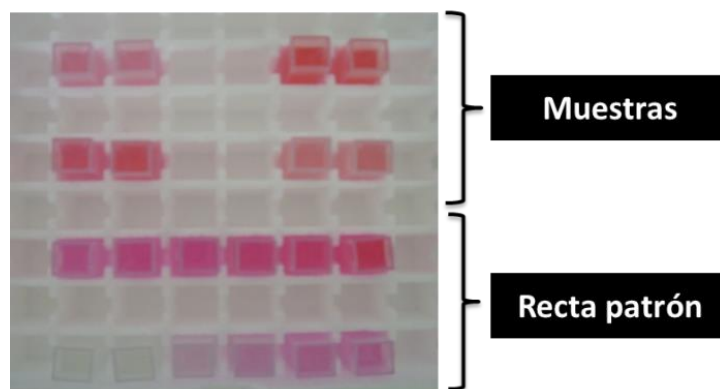
#### **3.3.4.5. Oxidación lipídica (TBARs)**

Se trata de evaluar la reacción del ácido tiobarbitúrico con compuestos con grupos aldehídicos en sus moléculas, formados a partir de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, produciéndose un cromóforo rojo con absorción máxima a 532 nm. El resultado del complejo coloreado se forma por condensación de 2 moles de ácido tiobarbitúrico (TBA) y 1 mol de compuestos aldehídicos (malondialdehído; MDA), bajo la influencia de la temperatura y pH del medio (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** a) Formación del malondialdehído (MDA) a partir de los radicales peroxilo del ácido graso C18:3; b) Formación del cromóforo a partir de ácido 2-tiobarbitúrico y MDA (Adaptado de Laguerre et al., 2007)

Basándonos en el método de Botsoglou *et al.* (1994) y Maraschiello (1999) se pesan 2,5 g de muestra y se homogeneizan con 20 ml de agua destilada en Ultraturrax a 13.000 rpm durante 30 segundos. Después se adicionan 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 25 %, se agita y se deja en reposo durante 15 min a 4°C. A continuación se centrifuga y se filtra el sobrenadante con papel Whatman N°52. De este filtrado se toman 3,5 ml que se llevan a tubos de rosca y se añade 1,5 ml de TBA al 0,6%. Paralelamente se realiza una curva patrón de 0 a 2,5 µg de MDA, consistente en 10 puntos, que se maneja de igual manera que las muestras. Una vez preparados los tubos y agitados se incuban a 70°C durante 30 min, pasado este tiempo se dejan enfriar y se lee su absorbancia en espectrofotómetro (Hitachi 717®) a 532 nm expresando el resultado en µg MDA/g carne (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Escala de color de los patrones para la determinación de TBARs y color obtenido por las muestras.

### 3.3.4.6. Ácidos grasos

La caracterización de los ácidos grasos totales de la grasa de las muestras de músculo analizadas, se ha llevado a cabo mediante la técnica de cromatografía de gases, en la cual se ha de realizar una extracción previa de dicha grasa y posteriormente una metilación de los ácidos grasos presentes en la misma.

#### **Extracción de la grasa**

La extracción de la grasa química se realiza mediante la técnica de Hanson y Olley (1963), siendo una modificación de la técnica de Bligh y Dyer (1959) que es un método rápido para la extracción de lípidos de tejidos y productos alimenticios.

El principio de esta técnica consiste en tratar el producto con una mezcla de dos solventes, cloroformo y metanol, donde el metanol rompe los enlaces lipido-proteicos y el cloroformo solubiliza los lípidos. Para la eliminación de las sustancias no lipídicas solubles en la mezcla, el extracto es lavado con agua salina. La sal disminuye la disociación de los ácidos lipídicos y de esta forma no se disocia la fase solvente (cloroformo). Además, la presencia del agua salina, unida al metanol, permite separar la fase clorofórmica (fase inferior) de la fase metanólica (fase superior). Para el desarrollo de la metodología se toman 5 g de carne, limpia y picada y se introducen en tubos de centrífuga de 50 ml de capacidad. A la muestra se le añade una punta de espátula de butil hidroxitolueno (BHT), para prevenir la oxidación lipídica, 8 ml de metanol y 4 ml de cloroformo, así como la cantidad de agua salina necesaria hasta completar un total de 3,2 ml, siendo la relación cloroformo/metanol/agua 1/2/0,8 (v/v/v). Después se homogeniza la muestra durante 2 minutos, sumergiendo el tubo en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Realizando este tratamiento la solución debe ser monofásica. Posteriormente se añaden otros 4 ml de cloroformo y 4 ml de agua destilada salina, siendo la relación cloroformo/metanol/agua de 2/2/1,8 (v/v/v). Se vuelve a homogeneizar la muestra durante medio minuto en baño de hielo. A continuación, se centrifugan los tubos a 2.000 rpm. durante 10 minutos y a 0 °C. Al centrifugar se forman tres fases: la fase superior es agua y metanol, la fase intermedia contiene sedimentos sólidos, y la inferior es la grasa disuelta en cloroformo. Se debe, por tanto eliminar la fase superior y atravesando la intermedia, recoger con una pipeta una alícuota de 4 ml de la fase inferior. La alícuota se filtra en un matraz redondo de

fondo plano de 25 ml, mediante un papel Whatman nº 42, cubierto con una punta de espátula de sulfato sódico anhidro (usado para permitir condiciones anhídridas), lavando posteriormente dicho filtro con una mezcla de cloroformo/metanol en proporción 2/1 (v/v) y 0,05 % de BHT. La grasa se concentra eliminando los disolventes en un evaporador rotatorio, con el baño de agua a 35-40 °C, cubriendo la parte inferior del matraz. Para asegurar la total evaporación de los solventes se llevan los matraces a otro baño de agua a 35-40 °C, donde se les infunde una corriente de nitrógeno. Las muestras así obtenidas son transvasadas a tubos herméticos con tapón de rosca y junta de teflón, se congelan a -25 °C para su posterior análisis.

### **Metilación de los ácidos grasos**

La metilación de ácidos grasos se realiza siguiendo la metodología del trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) de Morrison y Smith (1964). Se toman 20 mg de la grasa extraída en un tubo con tapón de rosca y junta de teflón, se le añade 1 ml de patrón interno (1µg/µl de ácido tridecanoico (C13:0), en cloroformo), evaporándose hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno, en un concentrador de muestras. Se añade 1 ml de potasa (KOH) en metanol 0,5 N y 1 ml de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol. Este reactivo produce un éter dimetílico, el cual no interfiere con el análisis de los ésteres metílicos. Se agitan los tubos y se llevan a la estufa durante una hora a 100 °C. La reacción del alcali con el BF<sub>3</sub> es fuertemente exotérmica y podría ocurrir una saponificación de los ésteres metílicos si la mezcla no se enfría. Así se dejan enfriar los tubos y se añaden 2 ml de agua salina al 10 % y 2 ml de hexano, se agitan y se dejan reposar la separación de fases. Se toma una alícuota de 1 ml de la fase superior (hexano), llevándose hasta 10 ml con hexano. La solución se transfiere a un vial de 2,5 ml y se sella herméticamente con un tapón de junta de teflón. Esta dilución se inyectó en el cromatógrafo de gases.

### **Cromatografía de gases**

El análisis de los ácidos grasos se hizo mediante la técnica cromatografía de gases, es una de las técnicas más utilizadas, ya que tiene una gran capacidad de separación de compuestos volátiles. El modelo de cromatógrafo de gases utilizado fue Agilent 19091 N113 con un detector de llama ionizada. La columna de separación empleada fue HPINNOWAX de polietilenglicol (30 m x 320 µm x 0,25 µm). Las

condiciones del cromatógrafo de gases fueron: el horno inicialmente estaba a 170 °C y se mantuvo así durante 2 minutos, luego se subió la temperatura del horno hasta los 210 °C con una rampa de temperatura de 3,5 °C/minuto y cuando alcanzó esta temperatura se volvió a subir la misma con mayor velocidad a 7 °C/minuto hasta alcanzar un valor final en el horno de 250 °C manteniéndose esta temperatura durante 3 minutos hasta el final del cromatograma. El gas empleado como portado fue helio (11 psig) y las muestras se inyectaron (0,5 µL) en el modo de Split 1:100. La calibración de todos los ácidos grasos se realizó en relación con la respuesta relativa de un estándar interno, metil tridecanoato (C13:0). La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo comparando su tiempo de retención con esteres metílicos estándares (Sigma-Aldrich). Los datos están expresados en proporción relativa de ácidos grasos.

### **3.4. Análisis estadístico**

#### ***3.4.1. Aspectos generales***

Previo al análisis estadístico de los datos y con el fin de conseguir la normalización de las medidas, se ha realizado el test de Shapiro-Wilks para observar si los residuos de las comparaciones se distribuían según una distribución normal y el test de Cochran para la homogeneidad de la varianza de dichos residuos. Debido a que todas las variables se distribuyeron según una normal no se realizó ningún cambio de variable.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS System V 9.0 para Windows. En la Tabla 3.3 se presentan las abreviaturas de los modelos utilizados para el análisis estadístico.

**Tabla 3.3.** Abreviaturas de los modelos estadísticos empleados en los distintos experimentos

$\mu$	=	media general
GDA	=	efecto de los grados día de ayuno pre-sacrificio
FA	=	efecto de la frecuencia de alimentación
FAGDA	=	interacción de la frecuencia de alimentación y el ayuno pre-sacrificio
HP	=	efecto de las horas <i>post-mortem</i>
FAHP	=	interacción de la frecuencia de alimentación y las horas <i>post-mortem</i>
GDAHP	=	interacción del ayuno pre-sacrificio y las horas <i>post-mortem</i>
FAGDAHP	=	interacción de la frecuencia de alimentación, ayuno pre-sacrificio y horas <i>post-mortem</i>
A	=	efecto del ayuno pre-sacrificio
D	=	efecto del despesque previo al sacrificio
AD	=	interacción del ayuno y del despesque pre-sacrificio
P	=	peso inicial
Phig	=	peso del hígado
$\beta_1$	=	coeficiente de regresión de la covariable peso inicial
$\beta_2$	=	coeficiente de regresión de la covariable peso del hígado
$\varepsilon$	=	error experimental

### 3.4.2. Experimento 1

Para analizar estadísticamente los parámetros biométricos se llevó a cabo un análisis de la varianza, incluyendo el peso inicial como covariable y empleando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \beta_1(P_{ij} - P_{..}) + \mu + GDA_i + \varepsilon_{j(i)}$$

Para el resto de parámetros (hematológicos, metabólicos y de calidad de canal y carne) se realizó también un análisis de la varianza pero con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + GDA_i + \varepsilon_{j(i)}$$

Para la comparación de medias se utilizó el test de Bonferroni con un 5% como nivel de significación ( $p < 0,05$ ).

### **3.4.3. Experimento 2**

Para el análisis estadístico de los parámetros biométricos se realizó un análisis de la varianza siguiendo el siguiente modelo, incluyendo el peso inicial como covariable:

$$Y_{ijk} = \beta_1(P_{ijk} - P_{...}) + \mu + FA_i + GDA_j + FAGDA_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

El glucógeno hepático se estudió estadísticamente incluyendo una covariable también, en este caso el peso del hígado, y mediante un análisis de la varianza siguiendo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \beta_2(Phig_{ijk} - Phig_{...}) + \mu + FA_i + GDA_j + FAGDA_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Para analizar estadísticamente los parámetros sanguíneos, el color de piel y agallas y la capacidad de retención de agua se llevó a cabo un análisis de la varianza utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + FA_i + GDA_j + FAGDA_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Por último, para los parámetros relacionados con la calidad de la canal y de la carne restantes (*rigor mortis*, pH muscular, color del músculo, glucógeno muscular y ratio IMP/ATP) se realizó un análisis de la varianza incluyendo en el modelo el efecto de las horas *post-mortem*:

$$Y_{ijkl} = \mu + FA_i + GDA_j + HP_k + FAGDA_{ij} + FAHP_{ik} + GDAHP_{jk} + FAGDAHP_{ijk} + \varepsilon_{l(ijk)}$$

Para la comparación de medias se utilizó el test de Bonferroni con un 5% como nivel de significación ( $p < 0,05$ ).

### **3.4.4. Experimento 3**

Para analizar estadísticamente los parámetros biométricos se llevó a cabo un análisis de la varianza, incluyendo el peso inicial como covariable y empleando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \beta_1(P_{ijk} - P_{...}) + \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

El glucógeno hepático se estudió estadísticamente incluyendo una covariable también, en este caso el peso del hígado, y mediante un análisis de la varianza siguiendo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \beta_2(Phig_{ijk} - Phig_{...}) + \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Para el resto de parámetros (hematológicos, metabólicos y de calidad de canal y carne) se realizó un análisis de la varianza siguiendo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

Para la comparación de medias se utilizó el test de Bonferroni con un 5% como nivel de significación ( $p < 0,05$ ).



## **RESULTADOS**

---



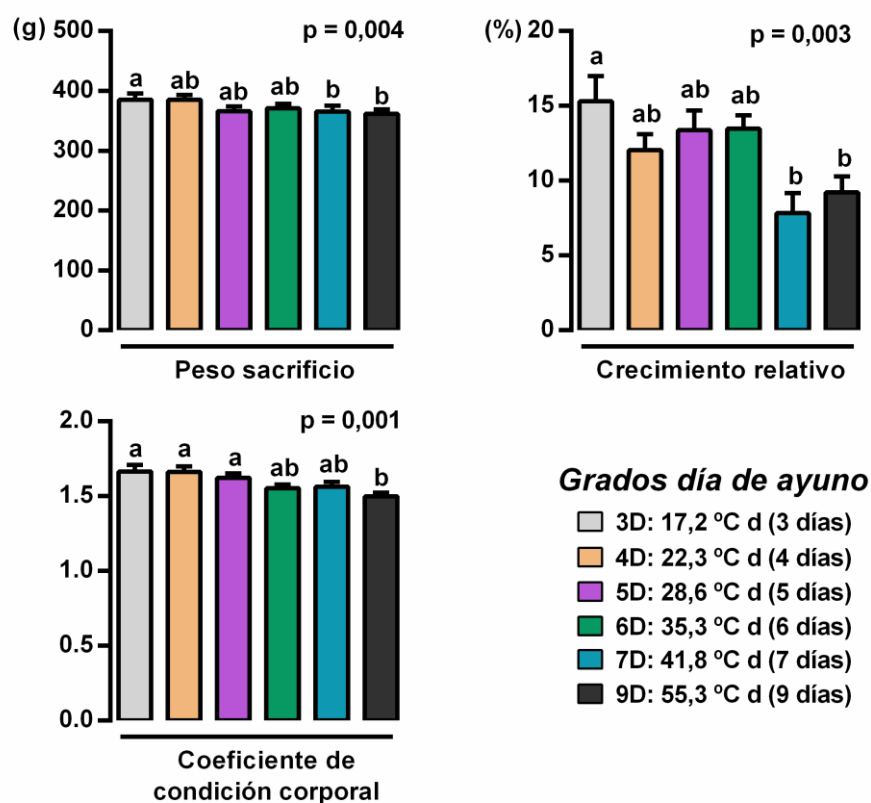
# **CAPÍTULO I**

## **EFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE**



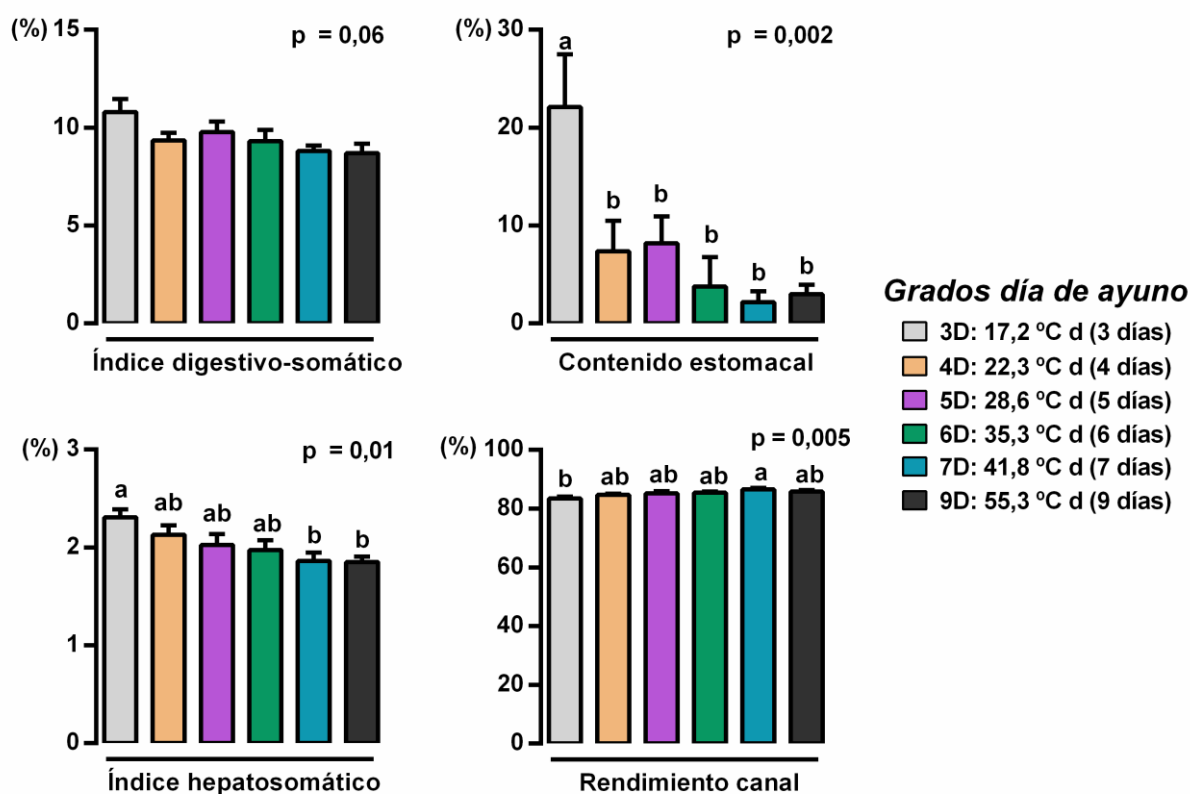
### 4.1.1. Parámetros biométricos

En general, todos los parámetros biométricos presentaron diferencias significativas debidas a los grados día de ayuno. En la Figura 4.1 se presentan las medias y las comparaciones del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal en los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. El peso al sacrificio fue significativamente más alto en los peces del grupo 3D ( $385 \pm 10,2$  g) frente a los de los grupos 7D y 9D ( $366 \pm 9,7$  g y  $362 \pm 7,0$  g, respectivamente). Respecto al crecimiento relativo de los peces en esta prueba, fue estadísticamente más bajo en los grupos 7D y 9D ( $7,8 \pm 1,35$  % y  $9,2 \pm 1,07$  %, respectivamente) que en el grupo 3D ( $15,3 \pm 1,69$  %). Los animales de los grupos 3D, 4D y 5D no presentaron diferencias significativas en el coeficiente de condición corporal, con una media para los tres grupos de  $1,7 \pm 0,04$ , significativamente mayor que el del grupo 9D, con una media de  $1,5 \pm 0,02$ .



**Figura 4.1.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

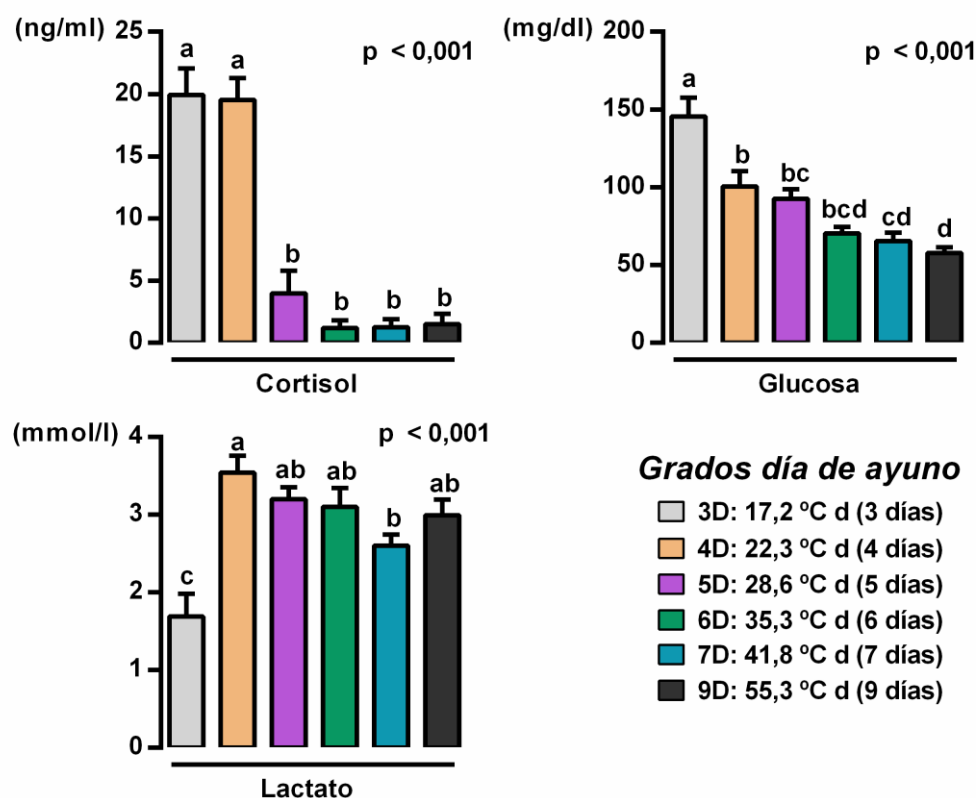
Las medias y las comparaciones del índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal para los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio se presentan en la Figura 4.2. El índice digestivo-somático mostró una tendencia ( $p = 0,06$ ) a disminuir cuanto mayor fueron los grados día de ayuno pre-sacrificio. El contenido estomacal fue significativamente mayor en el grupo 3D ( $22,1 \pm 5,40\%$ ) que en el resto de los grupos, donde el estómago tendió a vaciarse a medida que los grados día aumentaban. El índice hepatosomático, de forma similar a otros parámetros como el peso al sacrificio o el crecimiento relativo, fue estadísticamente más alto en los peces del grupo 3D ( $2,3 \pm 0,08\%$ ) que en los de los grupos 7D y 9D, con medias de  $1,9 \pm 0,08\%$  y  $1,8 \pm 0,06\%$ , respectivamente. Por último, el rendimiento canal fue menor en los peces del grupo 3D ( $83,5 \pm 0,60\%$ ) que en los del grupo 7D ( $86,6 \pm 0,49\%$ ), con valores intermedios y similares entre sí en el resto de los grupos.



**Figura 4.2.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

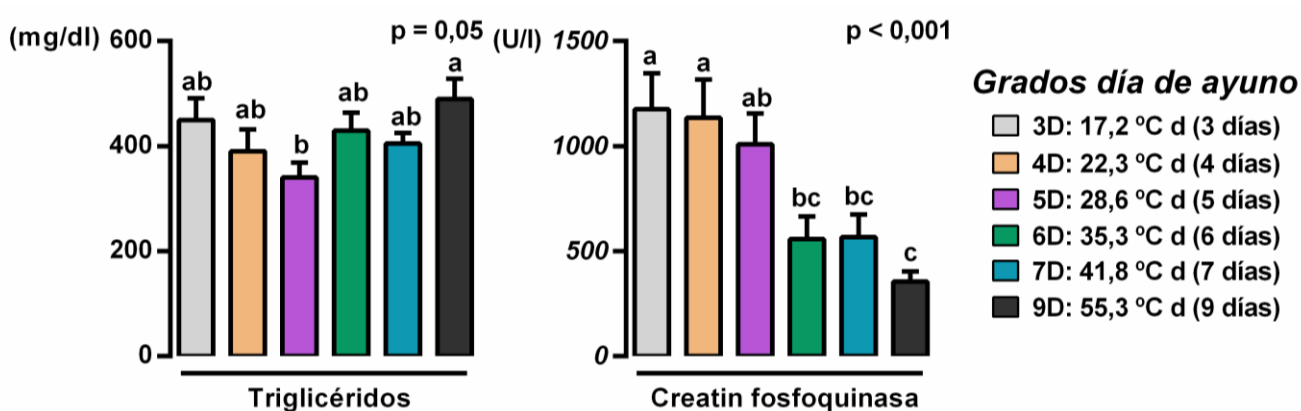
### 4.1.2. Parámetros hematológicos

Todos estos parámetros presentaron diferencias significativas debidas a los grados día de ayuno pre-sacrificio. En la Figura 4.3 se presentan las medias y las comparaciones de las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa y lactato en los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Los grupos 3D y 4D tuvieron unas concentraciones plasmáticas de cortisol ( $19,9 \pm 2,16$  ng/ml y  $19,5 \pm 1,76$  ng/ml, respectivamente), significativamente superiores al resto de los grupos (5D, 6D 7D y 9D). Los niveles de glucosa disminuyeron con los grados día de ayuno, siendo los peces del grupo 3D los que estadísticamente presentaron el valor mayor ( $146 \pm 12,1$  mg/dl). Sin embargo los niveles del ión lactato evolucionaron de una forma contraria, con el valor significativamente más bajo en el grupo 3D ( $1,7 \pm 0,29$  mmol/l).



**Figura 4.3.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de cortisol, glucosa y lactato con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,001$ )

En la Figura 4.4 aparecen reflejadas las medias de la concentración plasmática de triglicéridos y de la actividad enzimática de la enzima creatin fosfoquinasa (CPK) y sus diferencias según los grados día de ayuno pre-sacrificio. Los triglicéridos en plasma en los animales del grupo 9D fueron más altos que en los del grupo 5D ( $490 \pm 38,4$  mg/dl vs.  $341 \pm 28,2$  mg/dl) y en el resto de los grupos se observaron valores intermedios y similares entre sí. La actividad de la enzima CPK siguió el mismo patrón que la glucosa disminuyendo con los grados día de ayuno y observándose los valores más altos y más bajos en los peces de los grupos 3D ( $1177 \pm 169,4$  U/l) y 9D ( $356 \pm 47,3$  U/l), respectivamente.

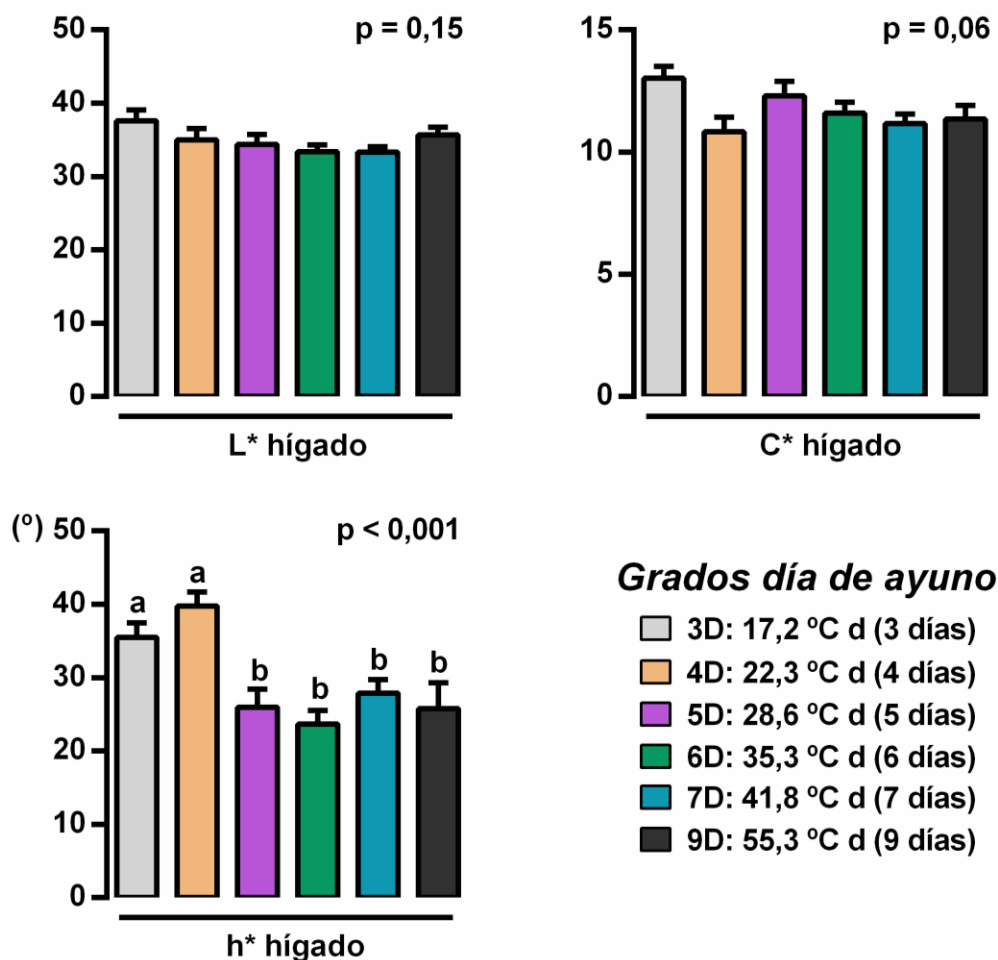


**Figura 4.4.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de triglicéridos y de la actividad enzimática de la creatin fosfoquinasa con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.3. Parámetros metabólicos

Las medias de las variables de color del hígado así como sus comparaciones en los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio se muestran en la Figura 4.5.

Los parámetros  $L^*$  y  $C^*$  no presentaron diferencias significativas debidas a los grados día de ayuno, presentando un valor medio en todos los grupos de  $34,9 \pm 1,18$  y  $11,7 \pm 0,51$ , respectivamente. Sin embargo, el parámetro  $h^*$  se encontró afectado significativamente por los grados día de ayuno, disminuyendo a partir de los  $28,6$  °C d de ayuno (grupo 5D), siendo más alto en los grupos 3D y 4D ( $35,5 \pm 1,95$  ° y  $39,7 \pm 1,96$  °, respectivamente) que en el resto de los grupos, con una media general de  $25,8 \pm 2,42$  °.

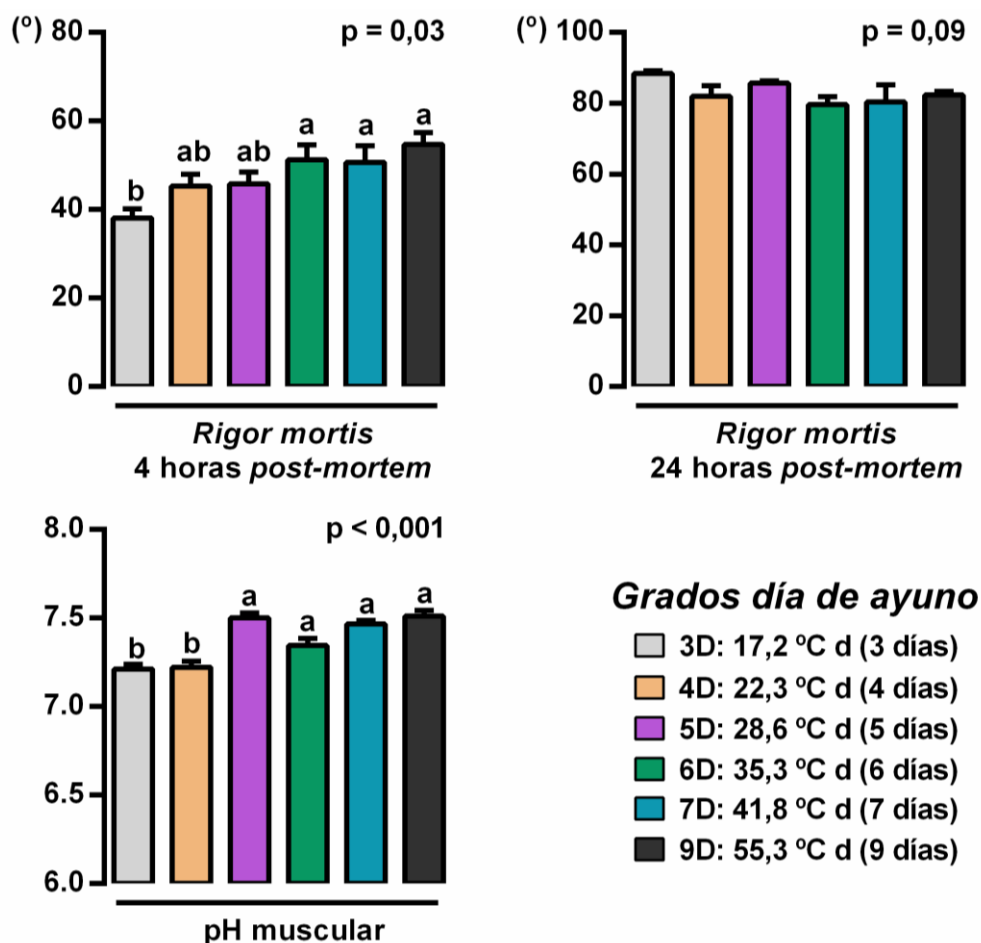


**Figura 4.5.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color del hígado ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.4. Parámetros de calidad de canal y de carne

En la Figura 4.6 se presentan las medias y las comparaciones del establecimiento del *rigor mortis* a las 4 y 24 horas *post-mortem* y del pH muscular a las 0 horas *post-mortem* en los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio.

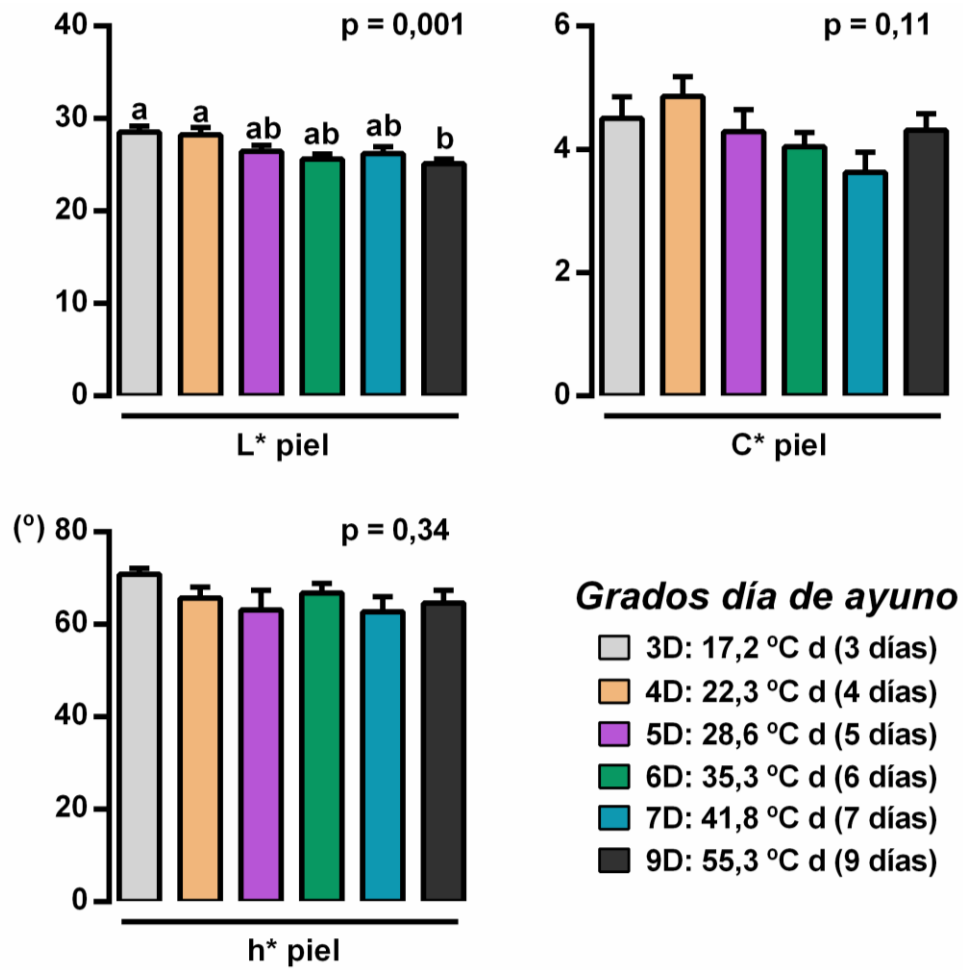
Los grados día de ayuno pre-sacrificio afectaron de manera significativa al establecimiento del *rigor mortis*, observándose a las 4 horas *post-mortem* un valor significativamente menor en los peces del grupo 3D ( $38,0 \pm 2,08^\circ$ ) que en los de los grupos 6D, 7D y 9D ( $51,2 \pm 3,41^\circ$ ,  $50,6 \pm 3,80^\circ$  y  $54,7 \pm 2,67^\circ$ , respectivamente). Sin embargo, a las 24 horas *post-mortem* no hubo diferencias entre los seis grupos. El pH muscular inicial (0 horas *post-mortem*) fue inferior en los grupos 3D y 4D ( $7,2 \pm 0,03$  de media en los dos grupos) que en el resto de los grupos, con una media general de  $7,5 \pm 0,03$ .



**Figura 4.6.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del establecimiento del rigor mortis (4 y 24 horas post-mortem) y pH muscular (0 horas post-mortem) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

En cuanto al color del músculo no se encontraron diferencias significativas debidas a los grados día de ayuno en ninguna de las variables asociadas con medidas de color,  $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ , con una media general en todos los grupos de  $48,8 \pm 0,85$ ,  $14,8 \pm 0,92$  y  $65,8 \pm 4,82$  °, respectivamente.

Las medias de las variables de color de la piel así como sus comparaciones en los diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio se muestran en la Figura 4.7. En relación al color de la piel, sólo presentó diferencias significativas con los grados día de ayuno el parámetro  $L^*$ , siendo mayor en los grupos 3D y 4D ( $28,5 \pm 0,66$  y  $28,2 \pm 0,82$ , respectivamente) que en los del grupo 9D, que presentaron una media de  $25,1 \pm 0,50$ . Los parámetros  $C^*$  y  $h^*$  no presentaron diferencias significativas debidas a los grados día de ayuno, con una media general en todos los grupos de  $4,3 \pm 0,31$  y  $65,6 \pm 2,67$  °, respectivamente.



**Figura 4.7.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de la piel ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) con diferentes grados día de ayuno pre-sacrificio. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

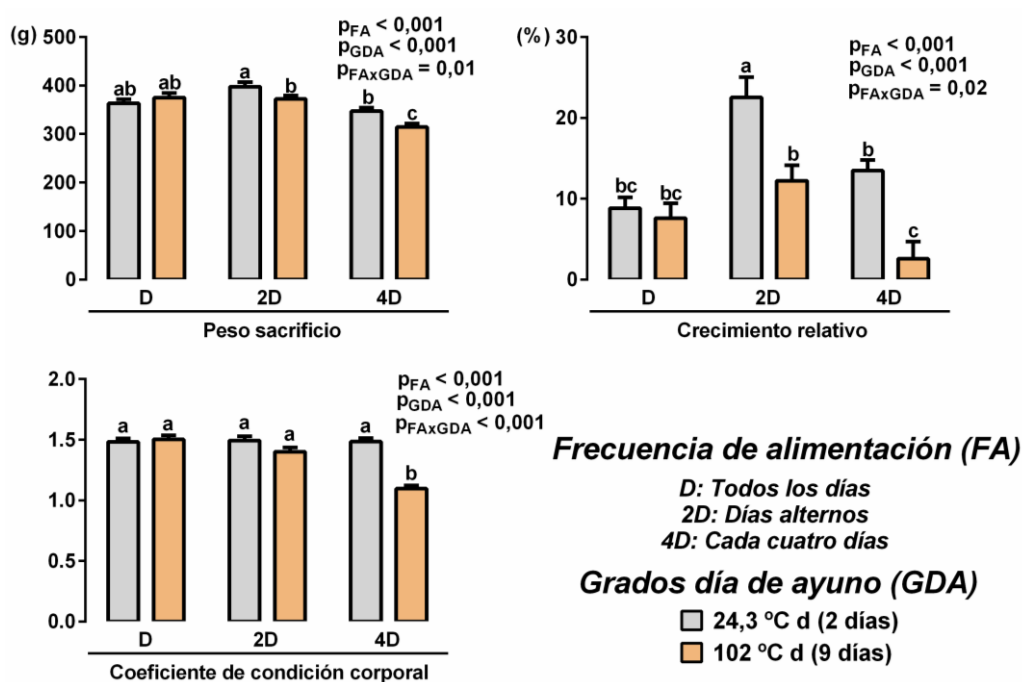


# **CAPÍTULO II**

## **REDUCCIÓN DEL EFECTO DEL AYUNO PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y CALIDAD DE LA CARNE**

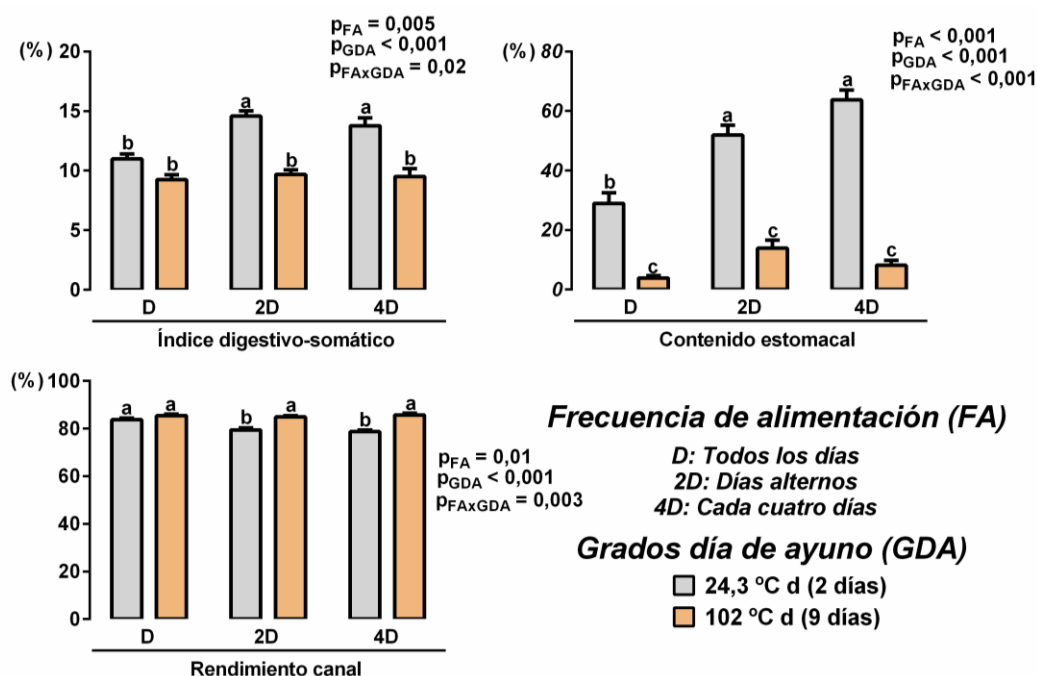
### 4.2.1. Parámetros biométricos

En general, en todos los parámetros biométricos se observó una interacción significativa entre la frecuencia de alimentación y los grados día de ayuno. La Figura 4.8 presenta las medias del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal (CC) para las diferentes frecuencias de alimentación y grados día de ayuno. También se presenta la significación de los efectos fijos, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y la interacción entre ellos (FA x GDA). En el peso al sacrificio y en el crecimiento relativo para los peces a los que se suministraba la alimentación todos los días (D), no se observaron diferencias entre los grados día de ayuno con un valor medio de  $369 \pm 9,0$  g y  $8,2 \pm 1,60$  %, respectivamente, en cambio ambos parámetros disminuyeron al aumentar los grados día de ayuno en los alimentados en días alternos (2D,  $397 \pm 9,9$  g vs.  $372 \pm 7,1$  g y  $22,6 \pm 2,51$  % vs.  $12,2 \pm 1,90$  %, respectivamente) o cada cuatro días (4D,  $347 \pm 7,1$  g vs.  $314 \pm 7,4$  g y  $13,5 \pm 1,30$  % vs.  $2,6 \pm 2,13$  %, respectivamente). El CC fue similar entre grados día de ayuno en los grupos D ( $1,5 \pm 0,03$ ) y 2D ( $1,4 \pm 0,03$ ). Sin embargo, en los peces del grupo 4D fue mayor a los  $24,3$  °C d de ayuno que a los  $102$  °C d ( $1,5 \pm 0,03$  vs.  $1,1 \pm 0,03$ ).



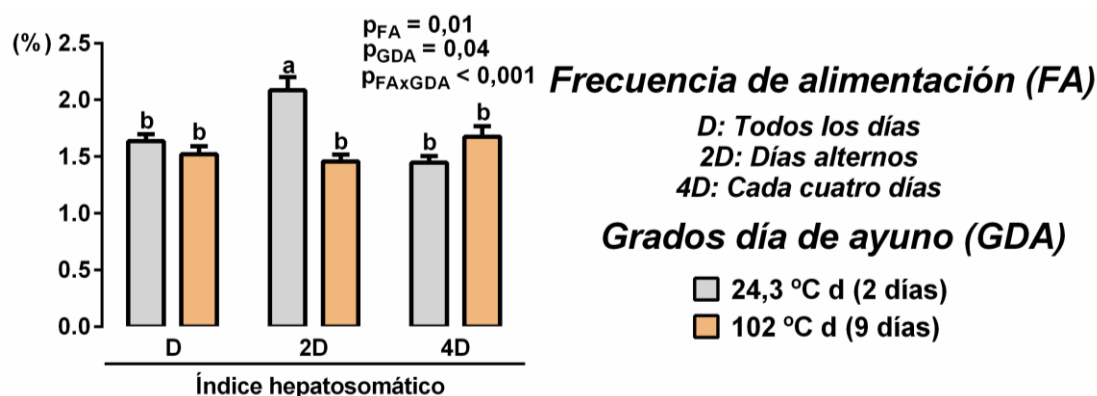
**Figura 4.8.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

En la Figura 4.9 se muestran las medias y las comparaciones de medias del índice digestivo-somático (DSI), contenido estomacal y rendimiento canal en las diferentes frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio estudiados, así como la interacción entre estos dos factores. El índice digestivo-somático fue similar entre grados día de ayuno en el grupo D, con un valor medio de  $10,1 \pm 0,42$  %, pero en los grupos 2D y 4D el aumento de los grados día de ayuno produjo una reducción significativa en este índice ( $14,6 \pm 0,45$  % vs.  $9,7 \pm 0,39$  % y  $13,8 \pm 0,66$  % vs.  $9,5 \pm 0,67$  %, para 2D y 4D respectivamente). El contenido estomacal fue significativamente menor en todos los grupos al aumentar los grados día de ayuno, sin embargo cuando los grados día de ayuno fueron de  $24,3^{\circ}$  C d los peces del grupo D tuvieron significativamente menor contenido en el estómago ( $29,0 \pm 3,59$  %) que los de los grupos 2D y 4D ( $51,9 \pm 3,33$  % y  $63,7 \pm 3,36$  %, respectivamente) que fueron similares entre ellos. A los  $102^{\circ}$  C d de ayuno fue similar en las tres frecuencias de alimentación, con una media general de  $8,7 \pm 1,68$  %. En los grupos 2D y 4D se incrementó el rendimiento canal a los  $102^{\circ}$  C d de ayuno en un 4,96 % y un 6,97 %, respectivamente, con respecto a los ayunados  $24,3^{\circ}$  C d mientras que en los peces del grupo D fue similar entre los dos grados día de ayuno, con una media de  $84,6 \pm 0,61$  %.



**Figura 4.9.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del índice digestivo-somático, contenido estomacal y rendimiento canal en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

En la Figura 4.10 se reflejan las medias y las comparaciones entre ellas del índice hepatosomático (HSI). La significación de los factores frecuencia de alimentación (SA) y grados día de ayuno (GDA) también se muestra, así como la interacción entre ambos (SA x GDA). El HSI mayor se observó en el grupo 2D a los 24,3 °C d de ayuno ( $2,1 \pm 0,12$  %), disminuyendo cuando los grados día de ayuno fueron 102 °C d, mientras en los demás grupos se mantuvo en valores similares.

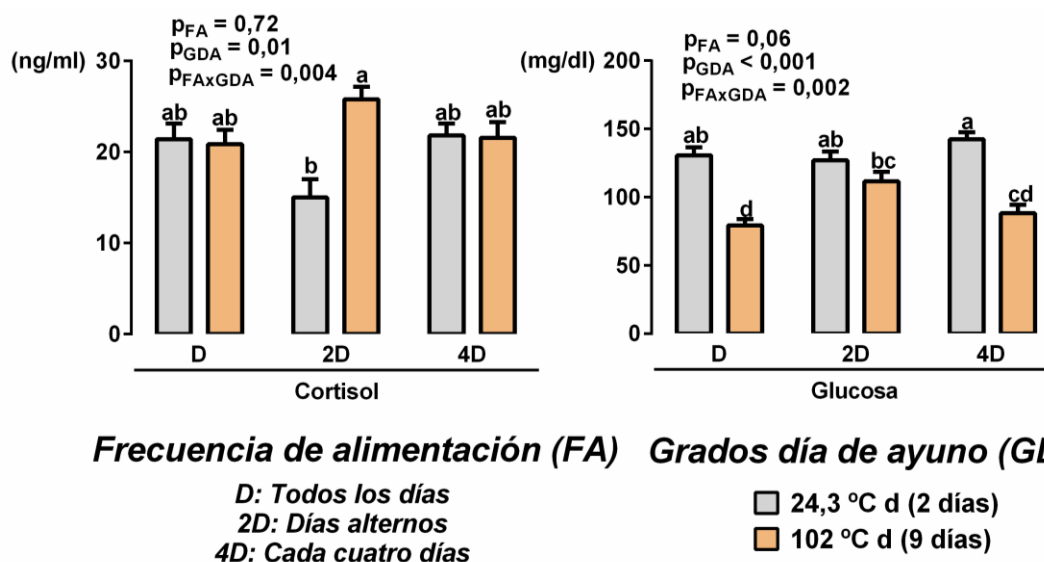


**Figura 4.10.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del índice hepatosomático en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

#### 4.2.2. Parámetros hematológicos

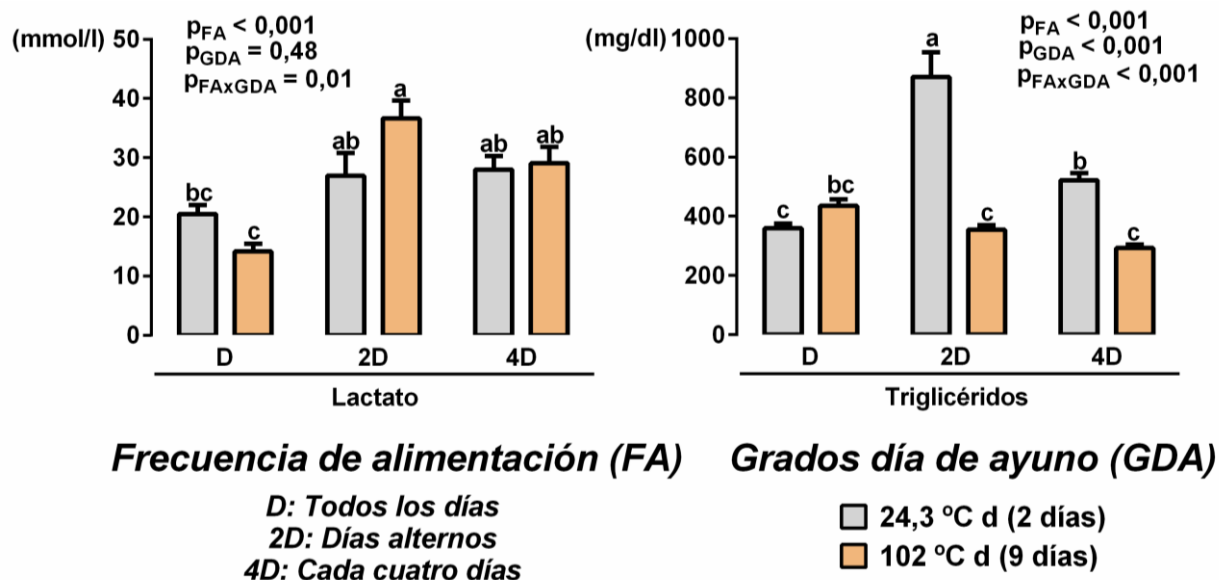
En todos los parámetros sanguíneos se observó una interacción significativa entre ambos factores estudiados. Las concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa para las diferentes frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio se reflejan en la Figura 4.11. La significación de los efectos fijos, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y la interacción entre ambos factores (FA x GDA) se muestran también en la misma figura. La concentración de cortisol plasmático en el grupo 2D fue significativamente menor a los 24,3 °C d de ayuno que a los 102 °C d ( $15,0 \pm 2,03$  ng/ml vs.  $25,8 \pm 1,36$  ng/ml). Sin embargo, en las frecuencias de alimentación D y 4D los niveles de cortisol plasmático fueron similares en ambos grados día de ayuno y también similares a los del grupo 2D, con valores intermedios,  $21,1 \pm 1,66$  ng/ml y  $21,7 \pm 1,50$  ng/ml, respectivamente. En el caso de la concentración plasmática de glucosa, en los grupos D y 4D esta concentración fue mayor cuando los grados día de ayuno fueron 24,3 °C d que cuando fueron 102 °C d ( $130,8 \pm 5,73$  mg/dl

vs.  $79,3 \pm 4,67$  mg/dl y  $142,5 \pm 5,19$  mg/dl vs.  $88,3 \pm 6,31$  mg/dl, respectivamente), mientras que los peces del grupo 2D no presentaron diferencias entre grados día de ayuno, con una concentración plasmática media de  $119,3 \pm 6,77$  mg/dl.



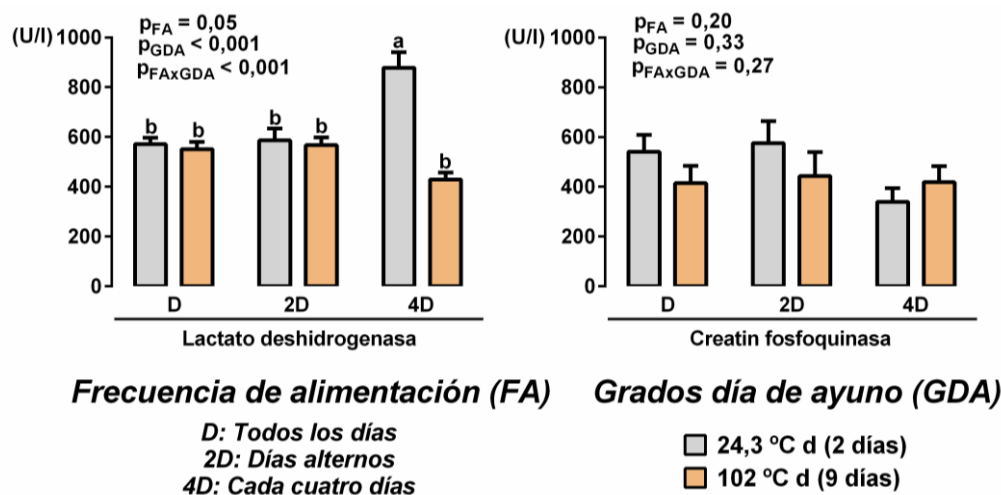
**Figura 4.11.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de las concentraciones plasmáticas de cortisol y glucosa en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

En la Figura 4.12 se reflejan las medias y las comparaciones de medias de la concentración plasmática de lactato y triglicéridos. La significación de los factores, frecuencia de alimentación (FA) y grados día de ayuno (GDA) así como la interacción entre ellos (FA x GDA) se presenta en la misma figura. No hubo diferencias significativas en el nivel plasmático del ión lactato a los 24,3 °C d de ayuno entre las distintas frecuencias de alimentación pero a los 102 °C d los peces del grupo D presentaron significativamente una menor concentración ( $14,2 \pm 1,32$  mmol/l) que los grupos 2D ( $36,6 \pm 2,98$  mmol/l) y 4D ( $29,1 \pm 2,75$  mmol/l). Respecto a la concentración plasmática de triglicéridos, se observó la concentración más alta en los peces del grupo 2D y sometidos a 24,3 °C d de ayuno pre-sacrificio ( $871 \pm 84,0$  mg/dl), mientras que con estos mismos grados día de ayuno, el grupo 4D presentó unos valores mayores que el D ( $522 \pm 24,0$  mg/dl vs.  $360 \pm 15,4$  mg/dl). Además, la concentración plasmática de triglicéridos disminuyó a los 102 °C d de ayuno en los grupos 2D y 4D, manteniéndose similares en el grupo D a cuando fueron sometidos a menos grados día de ayuno.



**Figura 4.12.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de las concentraciones plasmáticas de lactato y triglicéridos en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

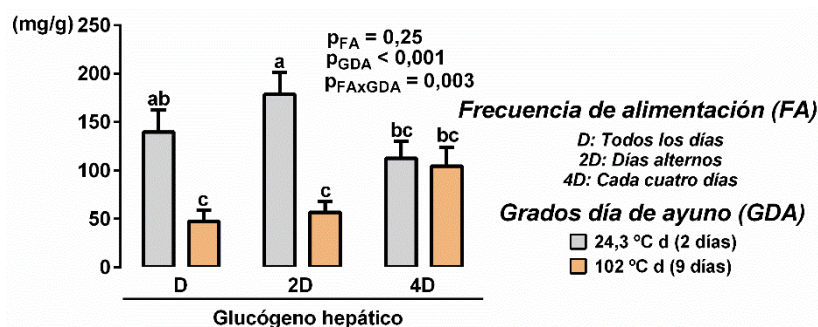
La Figura 4.13 presenta las medias de la actividad plasmática de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y CPK para las diferentes frecuencias de alimentación y grados día de ayuno. También se presenta la significación de los efectos fijos, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y la interacción entre ellos (FA x GDA). La actividad plasmática de la LDH mostró una interacción significativa entre ambos factores estudiados, siendo similar en todos los grupos excepto en el 4D a los 24,3 °C d de ayuno, con un valor de  $878 \pm 63,3$  U/l, que estadísticamente fue superior. Sin embargo la actividad plasmática de la CPK no presentó diferencias significativas debidas a la frecuencia de alimentación y a los grados día de ayuno pre-sacrificio ni a la interacción entre ambos factores.



**Figura 4.13.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de las actividades plasmáticas de las enzimas lactato deshidrogenasa y creatin fosfoquinasa en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

### 4.2.3. Parámetros metabólicos

La concentración de glucógeno hepático tuvo una interacción significativa entre los dos factores estudiados (frecuencia de alimentación y grados día de ayuno) (Figura 4.14). En los grupos D y 2D la concentración de glucógeno disminuyó al aumentar los grados día de ayuno, así pasó de  $139,6 \pm 22,81$  mg/g a  $47,7 \pm 11,08$  mg/g en el grupo D y de  $178,7 \pm 22,62$  mg/g, concentración más alta respecto a todos los demás grupos, a  $56,7 \pm 11,07$  mg/g en el grupo 2D. Sin embargo, en el grupo 4D esta concentración fue similar entre los peces sometidos a 24,3 ó a 102 °C d de ayuno antes del sacrificio, con un valor intermedio de  $108,5 \pm 18,57$  mg/g.



**Figura 4.14.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración de glucógeno hepático en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

En la Tabla 4.1 se muestran las medias y las comparaciones de medias de la concentración de glucógeno muscular y el ratio IMP/ATP. También se presenta la significación de los factores, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y horas *post-mortem* (HP), así como la interacción entre ellos. En la concentración de glucógeno muscular se observó una interacción significativa entre la frecuencia de alimentación y los grados día de ayuno, disminuyendo en el grupo 2D a los 102 °C d de ayuno respecto a los animales de la misma frecuencia de alimentación que solo ayunaron durante 24,3 °C d. En el ratio IMP/ATP solamente se observó una modificación significativa por las horas *post-mortem*, sin que tuvieran ningún efecto sobre el mismo ni la frecuencia de alimentación ni los grados día de ayuno, con valores mayores a las 24 horas *post-mortem* que a las 0 horas ( $0,56 \pm 0,014$  vs.  $0,46 \pm 0,025$ ).

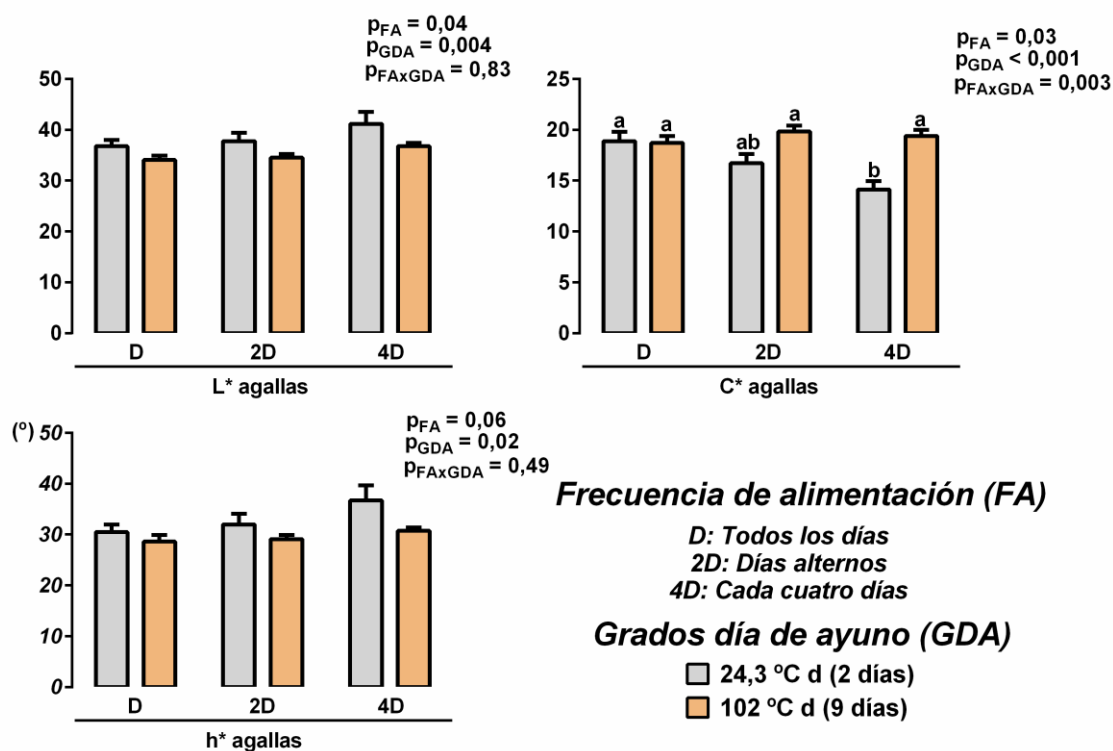
**Tabla 4.1.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración de glucógeno muscular (GM, mg/g) y del ratio IMP/ATP (I/A) en los diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA), grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) y horas *post-mortem* (HP).

	HP	Todos los días (D)		Días alternos (2D)		Cada cuatro días (4D)	
		24,3 °C d (2 días)	102 °C d (9 días)	24,3 °C d (2 días)	102 °C d (9 días)	24,3 °C d (2 días)	102 °C d (9 días)
GM	0	12,4 $\pm$ 0,92 <sup>bc</sup>	17,1 $\pm$ 2,45 <sup>ab</sup>	21,1 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 1,21 <sup>c</sup>	11,5 $\pm$ 0,88 <sup>c</sup>	13,4 $\pm$ 1,23 <sup>bc</sup>
	24	9,1 $\pm$ 0,82 <sup>bc</sup>	14,6 $\pm$ 2,19 <sup>ab</sup>	16,4 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,96 <sup>c</sup>	7,8 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	11,4 $\pm$ 1,23 <sup>abc</sup>
I/A	0	0,44 $\pm$ 0,025	0,48 $\pm$ 0,031	0,47 $\pm$ 0,036	0,44 $\pm$ 0,017	0,44 $\pm$ 0,022	0,48 $\pm$ 0,022
	24	0,56 $\pm$ 0,014	0,58 $\pm$ 0,017	0,59 $\pm$ 0,019	0,54 $\pm$ 0,011	0,56 $\pm$ 0,012	0,56 $\pm$ 0,011
Significación (p)							
	FA	GDA	HP	FA x GDA	FA x HP	GDA x HP	FA x GDA x HP
GM	0,011	0,17	<0,001	<0,001	0,76	0,36	0,96
I/A	0,94	0,97	<0,001	0,06	0,93	0,20	0,87

<sup>a,b,c</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). <sup>x,y</sup> Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

Las medias de los parámetros relacionados con el color de las agallas (L\*, C\* y h\*) se muestran en la Figura 4.15. También se presenta la significación de los efectos fijos, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y la interacción entre ellos (FA x GDA).

El valor de  $L^*$  en las agallas se encontró afectado significativamente por la frecuencia de alimentación, siendo mayor en el grupo 4D ( $39,0 \pm 1,50$ ) que en los peces de los grupos D ( $35,4 \pm 1,04$ ) y 2D ( $36,2 \pm 1,16$ ), y por los grados día de ayuno, con un valor más alto a los  $24,3 \text{ }^\circ\text{C d}$  que a los  $102 \text{ }^\circ\text{C d}$  de ayuno ( $38,6 \pm 1,33$  vs.  $35,1 \pm 0,83$ ). En relación al parámetro  $C^*$ , los peces del grupo 4D presentaron un valor menor a los  $24,3 \text{ }^\circ\text{C d}$  que a los  $102 \text{ }^\circ\text{C d}$  de ayuno ( $14,1 \pm 0,84$  vs.  $19,4 \pm 0,59$ ), mientras que los grupos D y 2D no mostraron diferencias significativas entre grados día de ayuno, con unos valores medios de  $18,8 \pm 0,81$  y  $18,3 \pm 0,73$ , respectivamente. El parámetro  $h^*$  en las agallas presentó diferencias significativas entre grados día de ayuno con un valor mayor a los  $24,3 \text{ }^\circ\text{C d}$  que a los  $102 \text{ }^\circ\text{C d}$  de ayuno en todos los grupos ( $33,1 \pm 1,88 \text{ }^\circ$  vs.  $29,5 \pm 0,64 \text{ }^\circ$ ).



**Figura 4.15.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de las agallas ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

#### 4.2.4. *Parámetros de calidad de canal y de carne*

Las medias y comparaciones entre ellas de los parámetros de calidad de canal y de carne (*rigor mortis*, pH muscular y color del músculo) se muestran en la Tabla 4.2. La significación de los factores, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y horas *post-mortem* (HP) y la interacción entre ellos también aparecen reflejados.

El *rigor mortis* presentó una interacción triple entre todos los efectos fijos, con valores similares a las 0 horas *post-mortem* que aumentaron significativamente a las 24 horas. A los 102 °C d de ayuno, los peces del grupo D y 2D presentaron un ángulo menor que los del grupo 4D.

En el pH muscular se observó una triple interacción entre todos los efectos fijos (frecuencia de alimentación, grados día de ayuno y horas *post-mortem*), siendo más alto su valor en el momento inicial (0 horas *post-mortem*) cuando fueron sometidas las truchas a 102 °C d de ayuno independientemente de la frecuencia de alimentación al que fueran sometidas en el mes previo al sacrificio (D, 2D y 4D). Además, fue mayor a las 24 horas *post-mortem* en los peces ayunados durante 102 °C d antes del sacrificio que en los sometidos a un ayuno de 24,3 °C d, no habiendo diferencias significativas en el grupo 2D sometido a 102 °C d de ayuno entre los tres tiempos en que se valoró el pH muscular, mientras que en los otros grupos de frecuencia de alimentación y grados día de ayuno a las 24 horas *post-mortem* sí se observó un descenso en el pH muscular.

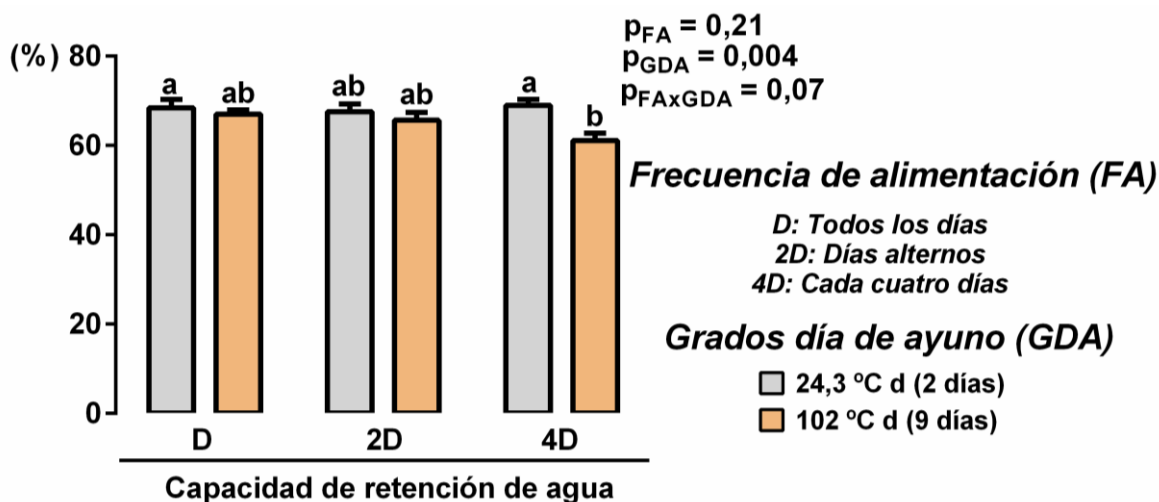
Respecto al color del músculo, el parámetro L\* no fue afectado de manera significativa por la frecuencia de alimentación o los grados día de ayuno, presentando solo diferencias significativas debidas a las horas *post-mortem*, con un valor menor de este parámetro a las 0 horas que a las 24 horas *post-mortem* ( $47,2 \pm 0,95$  vs.  $48,8 \pm 0,73$ ). El parámetro C\* en el músculo presentó diferencias significativas debidas a la frecuencia de alimentación, siendo mayor en el grupo D ( $21,7 \pm 1,08$ ) que en los peces de los grupos 2D ( $19,1 \pm 0,90$ ) y 4D ( $18,8 \pm 1,12$ ). Las horas *post-mortem* también influyeron de forma significativa en el parámetro C\* del músculo con valores más altos de este parámetro a las 0 horas que a las 24 horas *post-mortem* ( $21,3 \pm 1,04$  vs.  $18,4 \pm 1,03$ ). El parámetro h\* en el músculo no se encontró afectado significativamente por ninguno de los factores estudiados.

**Tabla 4.2.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los distintos parámetros estudiados relacionados con la calidad de la canal y de la carne (rigor mortis, RM, °; pH muscular y color del músculo: L\*, C\* y h\*) en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA), grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA) y horas post-mortem (HP).

	HP	Todos los días (D)		Días alternos (2D)		Cada cuatro días (4D)	
		2 días (24,3 °C d)	9 días (102 °C d)	2 días (24,3 °C d)	9 días (102 °C d)	2 días (24,3 °C d)	9 días (102 °C d)
<b>RM</b>	<b>0</b>	32,7 $\pm$ 0,82 <sup>y</sup>	33,5 $\pm$ 0,98 <sup>y</sup>	35,6 $\pm$ 1,23 <sup>y</sup>	34,6 $\pm$ 0,81 <sup>y</sup>	35,4 $\pm$ 1,17 <sup>y</sup>	31,7 $\pm$ 0,68 <sup>y</sup>
	<b>24</b>	86,7 $\pm$ 1,10 <sup>ab,x</sup>	89,7 $\pm$ 0,32 <sup>a,x</sup>	86,7 $\pm$ 1,17 <sup>ab,x</sup>	90,0 <sup>a,x</sup>	84,2 $\pm$ 1,16 <sup>b,x</sup>	89,8 $\pm$ 0,24 <sup>a,x</sup>
<b>pH</b>	<b>0</b>	6,9 $\pm$ 0,04 <sup>ab,x</sup>	7,0 $\pm$ 0,02 <sup>a,x</sup>	6,8 $\pm$ 0,04 <sup>b,x</sup>	6,8 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	6,7 $\pm$ 0,03 <sup>b,x</sup>	6,8 $\pm$ 0,03 <sup>ab,x</sup>
	<b>2</b>	6,7 $\pm$ 0,03 <sup>b,x</sup>	7,0 $\pm$ 0,07 <sup>a,x</sup>	6,7 $\pm$ 0,05 <sup>b,x</sup>	6,8 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	6,6 $\pm$ 0,05 <sup>b,x</sup>	6,7 $\pm$ 0,04 <sup>b,xy</sup>
<b>Color Músculo</b>	<b>24</b>	6,3 $\pm$ 0,01 <sup>b,y</sup>	6,7 $\pm$ 0,03 <sup>a,y</sup>	6,2 $\pm$ 0,01 <sup>b,y</sup>	6,7 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,02 <sup>b,y</sup>	6,7 $\pm$ 0,01 <sup>a,y</sup>
	<b>0</b>	48,0 $\pm$ 0,94	47,4 $\pm$ 0,83	47,1 $\pm$ 0,95	46,0 $\pm$ 0,87	48,6 $\pm$ 1,51	46,4 $\pm$ 0,61
<b>L*</b>	<b>24</b>	48,5 $\pm$ 0,56	47,3 $\pm$ 0,45	48,3 $\pm$ 0,76	48,7 $\pm$ 0,82	49,3 $\pm$ 1,03	50,7 $\pm$ 0,77
<b>C*</b>	<b>0</b>	22,7 $\pm$ 1,21	24,0 $\pm$ 0,90	19,9 $\pm$ 0,94	21,0 $\pm$ 0,89	19,7 $\pm$ 1,41	20,5 $\pm$ 0,89
	<b>24</b>	20,8 $\pm$ 1,13	19,2 $\pm$ 1,08	18,6 $\pm$ 1,05	17,1 $\pm$ 0,72	16,1 $\pm$ 1,06	18,8 $\pm$ 1,13
<b>h*</b>	<b>0</b>	57,7 $\pm$ 0,83	57,8 $\pm$ 0,93	58,6 $\pm$ 1,82	59,0 $\pm$ 0,89	53,0 $\pm$ 7,72	58,0 $\pm$ 1,32
	<b>24</b>	55,7 $\pm$ 0,88	58,1 $\pm$ 0,81	55,7 $\pm$ 1,45	60,0 $\pm$ 1,36	49,9 $\pm$ 7,31	57,0 $\pm$ 2,31
Significación (p)							
	FA	GDA	HP	FA x GDA	FA x HP	GDA x HP	FA x GDA x HP
<b>RM</b>	0,06	0,013	<0,001	0,73	0,33	<0,001	0,021
<b>pH</b>	<0,001	<0,001	<0,001	0,18	<0,001	<0,001	0,002
<b>Color Músculo</b>							
<b>L*</b>	0,13	0,30	0,004	0,89	0,16	0,15	0,27
<b>C*</b>	0,003	0,45	<0,001	0,34	0,86	0,32	0,19
<b>h*</b>	0,29	0,12	0,55	0,62	0,97	0,50	0,98

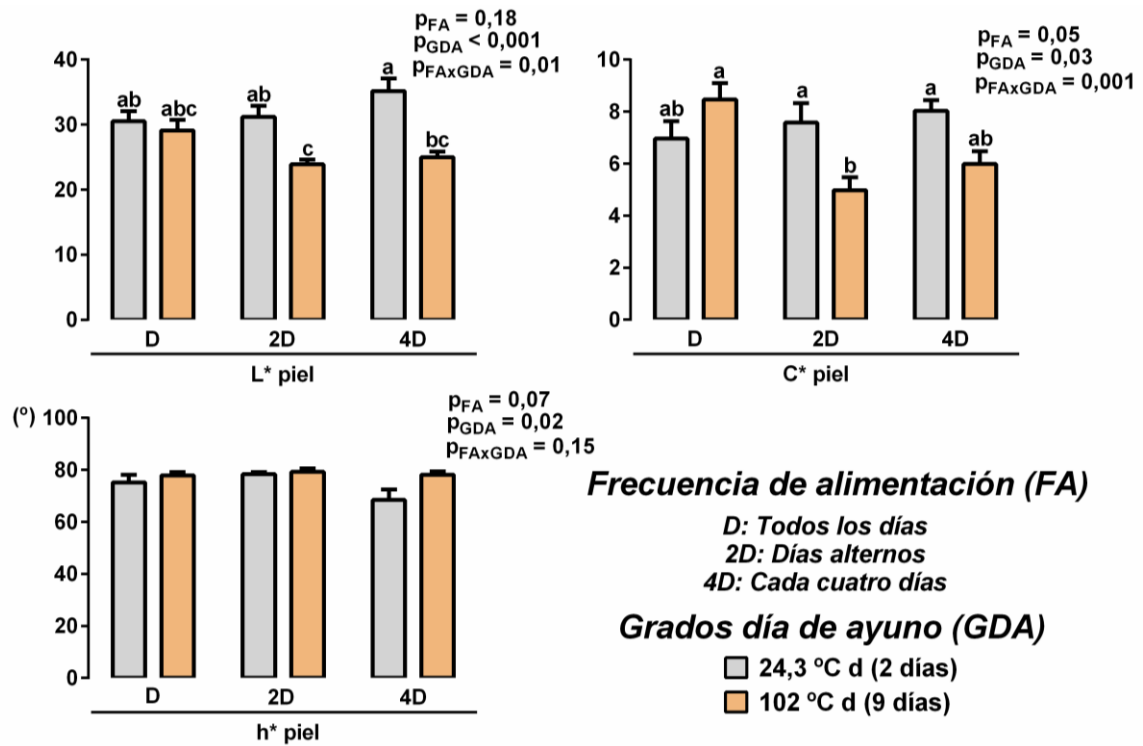
<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). <sup>x,y</sup> Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias de la misma columna ( $p < 0,05$ ).

La capacidad de retención de agua del músculo mostró una tendencia en la interacción entre la frecuencia de alimentación y los grados día de ayuno ( $p = 0,07$ ), siendo en el grupo 4D significativamente mayor a los  $24,3\text{ }^{\circ}\text{C d}$  de ayuno ( $68,9 \pm 1,35\%$ ) que a los  $102\text{ }^{\circ}\text{C d}$  ( $61,1 \pm 1,64\%$ ), mientras que en los grupos D y 2D no hubo diferencias significativas entre grados día de ayuno, con unos valores medios de  $67,7 \pm 1,41\%$  y  $66,6 \pm 1,72\%$ , respectivamente (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la capacidad de retención de agua del músculo en diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio (FA x GDA,  $p < 0,05$ )

Las medias de los distintos parámetros relacionados con el color de la piel ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) se muestran en la Figura 4.17. También se presenta la significación de los efectos fijos, frecuencia de alimentación (FA), grados día de ayuno (GDA) y la interacción entre ellos (FA x GDA). En el caso del color de la piel, la luminosidad ( $L^*$ ) no se encontró modificada con los grados día de ayuno en el grupo D, con un valor medio de  $29,8 \pm 1,60$ , mientras que en los grupos 2D y 4D fue mayor en aquellos peces sometidos a  $24,3\text{ }^{\circ}\text{C d}$  de ayuno pre-sacrificio que en los sometidos a  $102\text{ }^{\circ}\text{C d}$  ( $31,2 \pm 1,67$  vs.  $23,9 \pm 0,75$  y  $35,2 \pm 1,95$  vs.  $25,0 \pm 0,84$ , respectivamente). El parámetro  $C^*$  fue similar entre grados día de ayuno en los peces de los grupos D y 4D, con unos valores medios de  $7,7 \pm 0,64$  y  $7,0 \pm 0,45$ , respectivamente, pero en los peces del grupo 2D fue significativamente mayor a los  $24,3\text{ }^{\circ}\text{C d}$  que a los  $102\text{ }^{\circ}\text{C d}$  de ayuno ( $7,6 \pm 0,62$  vs.  $5,0 \pm 0,53$ ). Los valores de  $h^*$  en la piel presentaron diferencia significativas debidas a los grados día de ayuno, siendo menores sus valores a los  $24,3\text{ }^{\circ}\text{C d}$  que a los  $102\text{ }^{\circ}\text{C d}$  de ayuno ( $74,0 \pm 2,91^{\circ}$  vs.  $78,5 \pm 0,43^{\circ}$ ).



**Figura 4.17.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros de color de la piel ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) en las diferentes frecuencias de alimentación en el último mes de engorde (FA) y grados día de ayuno pre-sacrificio (GDA). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas frecuencias de alimentación y grados día de ayuno pre-sacrificio ( $FA \times GDA$ ,  $p < 0,05$ )



# **CAPÍTULO III**

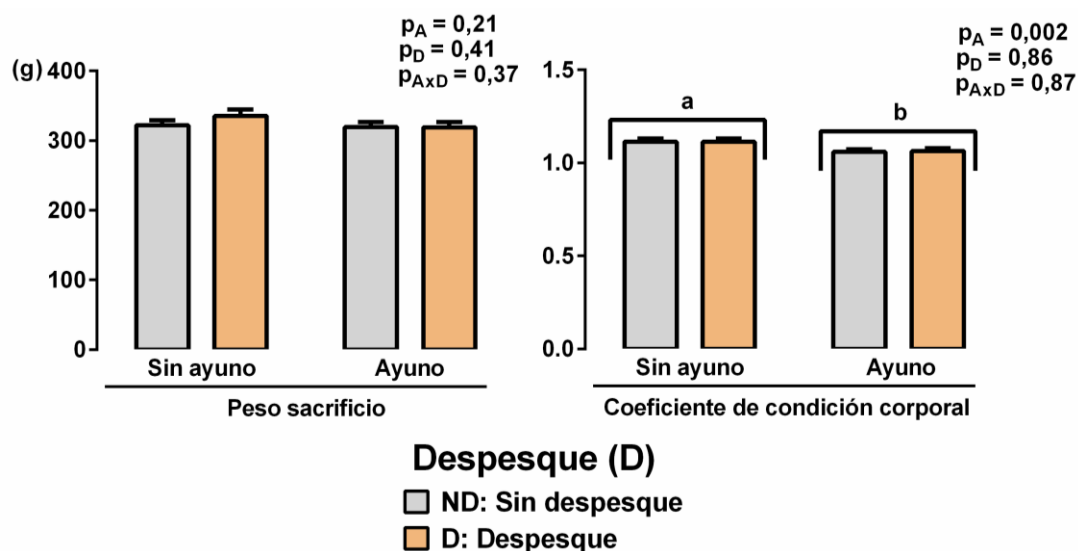
## **EFECTO DEL AYUNO Y DEL DESPESQUE PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE**



### 4.3.1. Parámetros biométricos

En la Figura 4.18 aparecen reflejadas las medias y las comparaciones entre ellas del peso al sacrificio y coeficiente de condición corporal. Además la significación de los efectos fijos ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio, así como la interacción entre ambos (A x D), también se presenta en la misma figura.

El peso al sacrificio no presentó diferencias significativas debidas al ayuno ni al despesque previo al sacrificio, con una media general en todos los grupos de  $324 \pm 7,7$  g. El coeficiente de condición corporal fue afectado significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces no sometidos a un ayuno pre-sacrificio que en los sometidos a un ayuno de  $135,6$  °C d ( $1,11 \pm 0,018$  vs.  $1,06 \pm 0,013$ ).

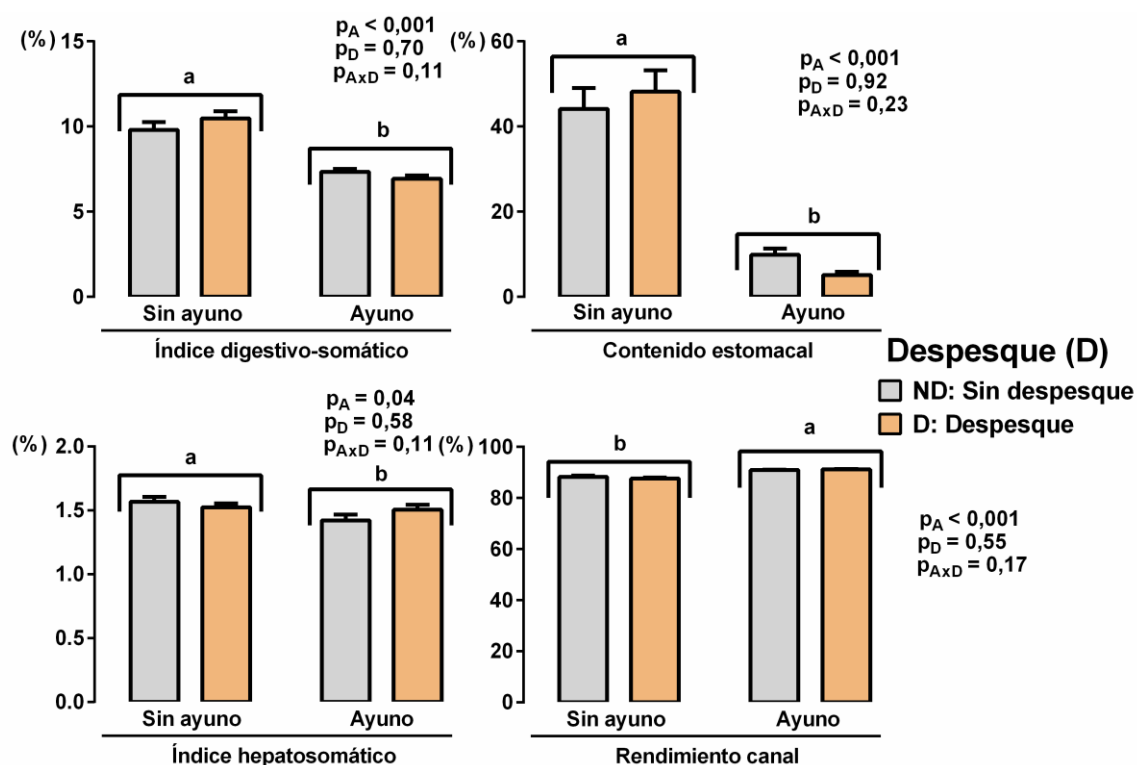


**Figura 4.18.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del peso al sacrificio y el coeficiente de condición corporal para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

Las medias y las comparaciones del índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal aparecen reflejadas en la Figura 4.19 junto con la significación de los efectos fijos estudiados, ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio y la interacción entre ambos (A x D).

El índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal se vieron afectados de forma significativa por el ayuno. Tanto el índice digestivo-somático como el contenido estomacal fueron mayores en los peces sin ayuno pre-sacrificio que en los sometidos a un ayuno de  $135,6$  °C d

( $10,1 \pm 0,43$  % vs.  $7,1 \pm 0,18$  % y  $46,1 \pm 4,97$  % vs.  $7,5 \pm 1,11$  %, respectivamente). El índice hepatosomático estuvo significativamente afectado por el ayuno, siendo mayor en los peces sin ayuno pre-sacrificio que en los sometidos a un ayuno de 135,6 °C d ( $1,54 \pm 0,035$  % vs.  $1,46 \pm 0,042$  %). Sin embargo, el rendimiento canal fue menor en los peces no sometidos a ayuno que en los ayunados durante 135,6 °C d ( $88,0 \pm 0,46$  % vs.  $91,1 \pm 0,19$  %).



**Figura 4.19.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del índice digestivo-somático, contenido estomacal, índice hepatosomático y rendimiento canal para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

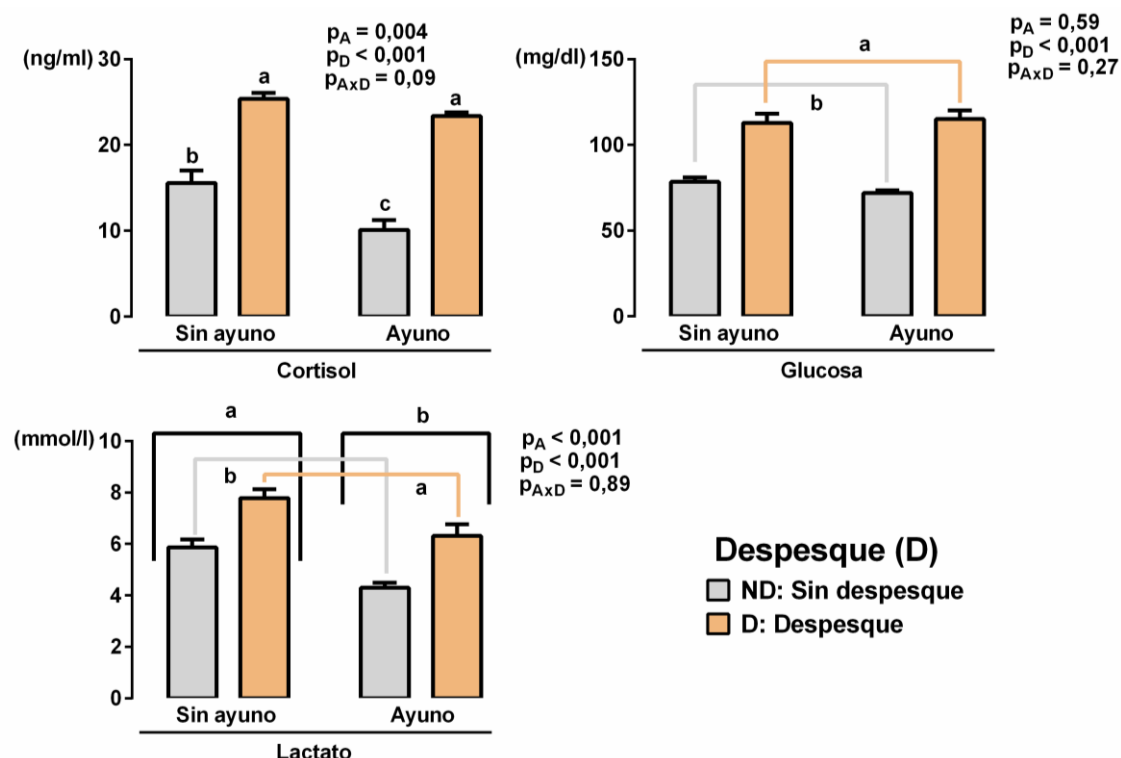
### 4.3.2. Parámetros hematológicos

Las medias y las comparaciones de las concentraciones plasmáticas de cortisol, glucosa y lactato aparecen reflejadas en la Figura 4.20 junto con la significación de los efectos fijos estudiados, ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio y la interacción entre ambos (A x D).

La concentración de cortisol plasmático estuvo significativamente afectada por el ayuno y el despesque pre-sacrificio, siendo mayor en las no ayunadas respecto a las

sometidas a un ayuno de 135,6 °C d ( $20,5 \pm 1,08$  ng/ml vs.  $16,7 \pm 0,77$  ng/ml) y en las truchas del grupo D frente a las del ND ( $24,4 \pm 0,56$  ng/ml vs.  $12,8 \pm 1,29$  ng/ml).

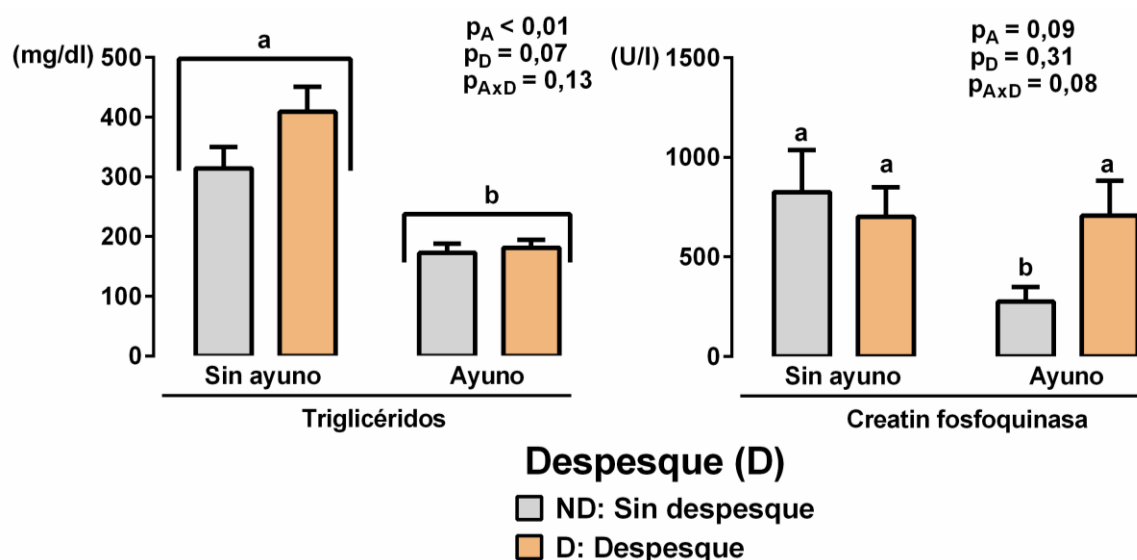
Además, se observó una tendencia ( $p = 0,09$ ) en la interacción entre el ayuno y el despesque pre-sacrificio, de manera que en el grupo D no hubo diferencias entre las sometidas a ayuno y las que no lo fueron, mientras que en los peces que no fueron sometidos a un despesque de 20 min (ND), el valor de cortisol fue superior en los no ayunados que en aquellos ayunados durante 135,6 °C d ( $15,6 \pm 1,45$  ng/ml vs.  $10,1 \pm 1,12$  ng/ml). Los niveles de glucosa en plasma se vieron afectados de forma significativa por el despesque pre-sacrificio, siendo mayores en los peces del grupo D que en el grupo ND ( $114,0 \pm 5,13$  mg/dl vs.  $75,1 \pm 2,05$  mg/dl). De la misma forma, la concentración plasmática del ión lactato se encontró también afectada por el despesque pre-sacrificio con valores mayores en el grupo D que en las truchas del grupo ND ( $7,0 \pm 0,39$  mmol/l vs.  $5,1 \pm 0,25$  mmol/l). Junto a ello se observaron diferencias significativas debidas al ayuno, siendo menor la concentración de este ión en las truchas sometidas al ayuno respecto a las no ayunadas ( $5,3 \pm 0,32$  mmol/l vs.  $6,8 \pm 0,32$  mmol/l).



**Figura 4.20.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de cortisol, glucosa y lactato para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

La Figura 4.21 presenta las medias de la concentración plasmática de triglicéridos y la actividad plasmática de la enzima CPK para el efecto del ayuno y despesque pre-sacrificio. También se presenta la significación de los efectos fijos, ayuno (A) y despesque pre-sacrificio (D), así como la interacción entre ambos (A x D).

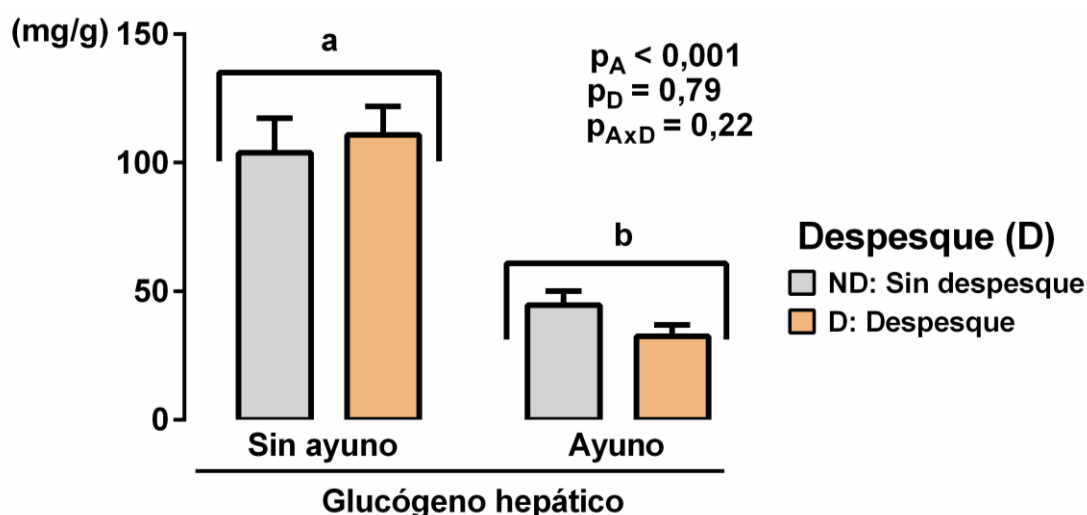
Los valores de triglicéridos en plasma fueron significativamente menores en las truchas ayunadas durante 135,6 °C d que en las que no tuvieron periodo de ayuno pre-sacrificio ( $177 \pm 14,1$  mg/dl vs.  $362 \pm 39,0$  mg/dl). Finalmente, la actividad de la CPK presentó una tendencia ( $p = 0,08$ ) en la interacción entre el ayuno y despesque pre-sacrificio. En el grupo D no hubo diferencias entre las sometidas a ayuno y las que no lo fueron, sin embargo, en los peces del grupo ND el valor de esta enzima fue inferior en aquellos ayunados durante 135,6 °C d que en los no ayunados ( $276 \pm 74,4$  U/l vs.  $825 \pm 211,6$  U/l).



**Figura 4.21.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de la concentración plasmática de triglicéridos y la actividad plasmática de la enzima creatin fosfoquinasa para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los distintos grupos ( $p < 0,05$ )

### 4.3.3. Parámetros metabólicos

La concentración de glucógeno en el hígado presentó diferencias significativas debidas al ayuno, siendo mayor en los peces sin ayuno pre-sacrificio que en aquellos sometidos a 135,6 °C d de ayuno ( $106,6 \pm 12,31$  mg/g vs.  $39,2 \pm 4,97$  mg/g) (Figura 4.22).



**Figura 4.22.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del glucógeno hepático para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas debidas al ayuno ( $p < 0,05$ )

La Tabla 4.3 muestra las medias del glucógeno muscular y el ratio IMP/ATP a las 0 y 48 horas *post-mortem*. La significación de los efectos, ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio, así como la interacción entre ellos también se muestran.

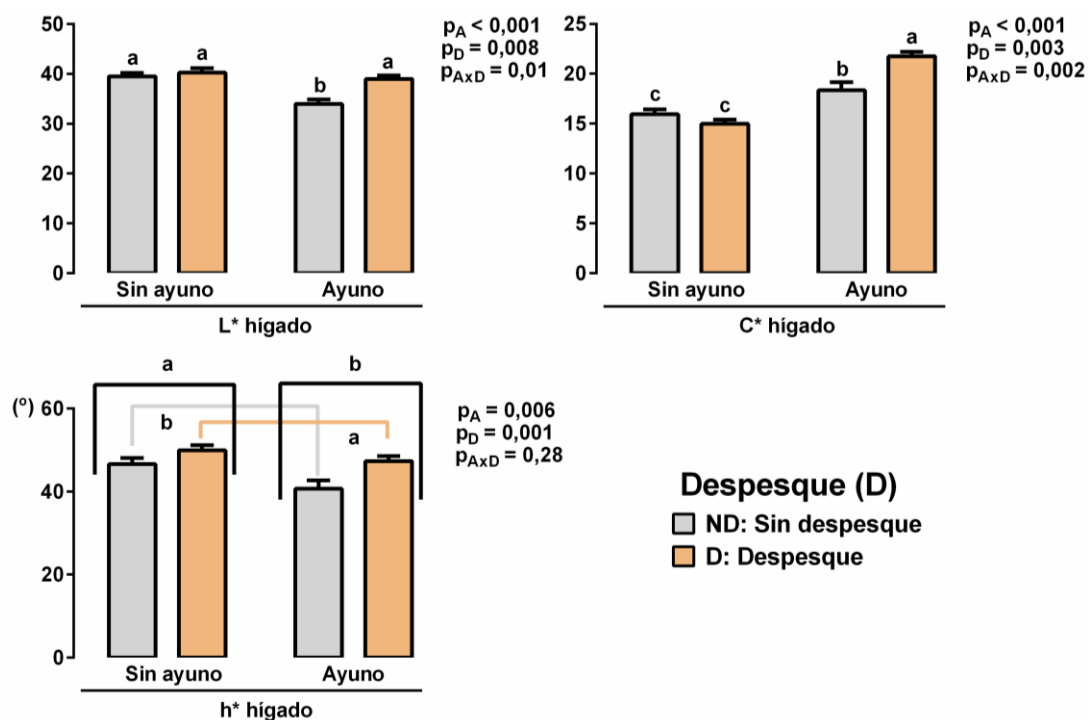
En el glucógeno muscular a las 0 horas *post-mortem* se observó un efecto significativo del ayuno, siendo mayor en los peces sometidos a ayuno que en los no ayunados ( $3,6 \pm 0,83$  vs.  $1,6 \pm 0,37$  mg/g), mientras que a las 48 horas *post-mortem* no hubo diferencias significativas debidas a ninguno de los factores estudiados. El ratio IMP/ATP no presentó diferencias significativas debidas a los factores estudiados (ayuno y despesque pre-sacrificio) ni a las 0 ni a las 48 horas *post-mortem*.

**Tabla 4.3.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas del glucógeno muscular (GM, mg/g) y ratio IMP/ATP (I/A) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 y 48 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>GM0</b>	1,8 $\pm$ 0,44	1,4 $\pm$ 0,31	4,4 $\pm$ 0,98	2,8 $\pm$ 0,69	0,004	0,15	0,32
<b>GM48</b>	2,0 $\pm$ 0,60	1,9 $\pm$ 0,30	2,6 $\pm$ 0,49	2,6 $\pm$ 0,49	0,21	0,91	0,90
<b>I/A0</b>	1,33 $\pm$ 0,015	1,37 $\pm$ 0,014	1,32 $\pm$ 0,018	1,32 $\pm$ 0,017	0,06	0,29	0,12
<b>I/A48</b>	1,41 $\pm$ 0,011	1,42 $\pm$ 0,010	1,40 $\pm$ 0,013	1,41 $\pm$ 0,010	0,53	0,18	0,89

Las medias y las comparaciones de medias de los parámetros relacionados con el color del hígado ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ), así como la significación de los efectos fijos estudiados, ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio y la interacción entre ambos (A x D) se presentan en la Figura 4.23.

El parámetro  $L^*$  y  $C^*$  presentaron una interacción significativa entre el ayuno y el despesque pre-sacrificio. Respecto a la luminosidad o  $L^*$ , en el grupo ND fue mayor en los peces no ayunados respecto a los sometidos a ayuno ( $39,5 \pm 0,67$  vs.  $34,0 \pm 0,92$ ), mientras que en los peces del grupo D se mantuvieron valores similares entre no ayunados y ayunados, con una media general de  $39,6 \pm 0,83$ . El parámetro  $C^*$  en el hígado en los peces sometidos a ayuno fue menor en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $18,3 \pm 0,83$  vs.  $21,7 \pm 0,44$ ), mientras que en los peces no ayunados fue similar entre el grupo ND y D y menor al parámetro  $C^*$  de los peces ayunados, con una media general de  $15,5 \pm 0,45$ . El parámetro  $h^*$  presentó diferencias significativas debidas al ayuno, siendo mayor en los peces no ayunados que en los sometidos a ayuno ( $48,3 \pm 1,37^\circ$  vs.  $44,0 \pm 1,62^\circ$ ), y al despesque pre-sacrificio, con un parámetro  $h^*$  en el hígado mayor en los peces del grupo D que en los del grupo ND ( $48,7 \pm 1,22^\circ$  vs.  $43,6 \pm 1,77^\circ$ ).



**Figura 4.23.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los parámetros relacionados con el color ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $h^*$ ) del hígado para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas debidas al ayuno ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.4. Parámetros de calidad de canal y de carne

Las medias y comparaciones entre ellas del establecimiento del *rigor mortis* a las 0, 5, 24 y 48 horas *post-mortem*, así como las diferencias entre estos tiempos, se muestran en la Tabla 4.4. En la tabla también se presentan las significaciones de los efectos ayuno (A) y despesque (D) pre-sacrificio y la interacción entre ellos (A x D).

El ángulo del *rigor mortis* a las 0 horas *post-mortem* presentó una interacción significativa entre el ayuno y el despesque pre-sacrificio, siendo mayor en el grupo ND que en los peces del grupo D cuando ambos grupos fueron sometidos a un ayuno de 135,6 °C d, mientras que en los peces no ayunados el ángulo fue similar en ambos grupos con una media general de  $47,4 \pm 2,13$  °. A las 5 horas *post-mortem* se alcanzó el ángulo máximo de *rigor* en general en todos los grupos (90 °), sin diferencias significativas debidas a ninguno de los factores. A las 24 horas *post-mortem* hubo de nuevo una interacción significativa entre los dos factores estudiados mencionados anteriormente, siendo el ángulo mayor en los grupos que no fueron sometidos a ayuno en el grupo D que en los peces del grupo ND, mientras que en los peces ayunados el

ángulo fue similar en ambos grupos con una media general de  $87,1 \pm 0,61^\circ$ . Finalmente, a las 48 horas *post-mortem* el ángulo del *rigor* fue influido significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces sometidos a ayuno que en los no ayunados ( $77,6 \pm 1,36^\circ$  vs.  $69,7 \pm 2,75^\circ$ ), y por el despesque pre-sacrificio, con un ángulo mayor en el grupo D que en los peces del grupo ND ( $76,4 \pm 1,81^\circ$  vs.  $70,9 \pm 2,30^\circ$ ). En cuanto a las diferencias entre horas *post-mortem*, entre las 0 y 5 horas *post-mortem*, el ángulo del *rigor* presentó una interacción significativa entre el ayuno y el despesque pre-sacrificio, siendo el ángulo mayor en los grupos sometidos a un ayuno de  $135,6^\circ\text{C d}$  en el grupo D que en los peces del grupo ND, mientras que en los peces no ayunados el incremento del ángulo fue similar en ambos grupos con una diferencia media general de  $42,0 \pm 2,13^\circ$ . Entre las 5 y 24 horas *post-mortem* no hubo diferencias significativas para ninguno de los factores estudiados. Por último, entre las 24 y 48 horas *post-mortem* la diferencia en el ángulo fue afectada significativamente por el ayuno, siendo mayor esta diferencia en los peces no ayunados que en los sometidos a ayuno ( $-17,9 \pm 2,72^\circ$  vs.  $-9,9 \pm 1,75^\circ$ ), y por el despesque pre-sacrificio, con una diferencia mayor en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $-16,7 \pm 2,36^\circ$  vs.  $-11,1 \pm 2,12^\circ$ ).

**Tabla 4.4.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del establecimiento del *rigor mortis* (RM,  $^\circ$ ) en distintas horas *post-mortem* (0, 5, 24 y 48 horas) y las diferencias entre estos tiempos (Dif,  $^\circ$ ) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D).

	Sin ayuno		Ayuno ( $135,6^\circ\text{C d}$ )		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>RM0</b>	$45,0 \pm 1,78^{ab}$	$49,7 \pm 2,49^{ab}$	$51,6 \pm 1,17^a$	$43,6 \pm 1,93^b$	0,90	0,37	0,001
<b>RM5</b>	$88,7 \pm 0,64$	90,0	90,0	90,0	0,05	0,05	0,05
<b>RM24</b>	$85,4 \pm 1,16^b$	$87,9 \pm 0,54^a$	$87,6 \pm 0,57^{ab}$	$86,5 \pm 0,65^{ab}$	0,60	0,39	0,019
<b>RM48</b>	$65,7 \pm 2,96$	$73,7 \pm 2,54$	$76,1 \pm 1,65$	$79,2 \pm 1,07$	0,001	0,015	0,27
<b>Dif 0-5</b>	$43,7 \pm 1,78^{ab}$	$40,3 \pm 2,49^{ab}$	$37,8 \pm 1,54^b$	$47,8 \pm 2,44^a$	0,69	0,12	0,002
<b>Dif 5-24</b>	$-3,3 \pm 1,06$	$-2,1 \pm 0,54$	$-2,4 \pm 0,57$	$-3,53 \pm 0,65$	0,75	0,98	0,11
<b>Dif 24-48</b>	$-22,0 \pm 2,71$	$-13,8 \pm 2,74$	$-11,5 \pm 2,01$	$-8,3 \pm 1,50$	0,001	0,017	0,29

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 4.5 se presentan las medias y las comparaciones del pH muscular a las 0 y 48 horas *post-mortem* y los parámetros relacionados con el color del músculo a las 0 y 24 horas *post-mortem* para el efecto del ayuno y del despesque pre-sacrificio junto con la significación de estos factores y de su interacción.

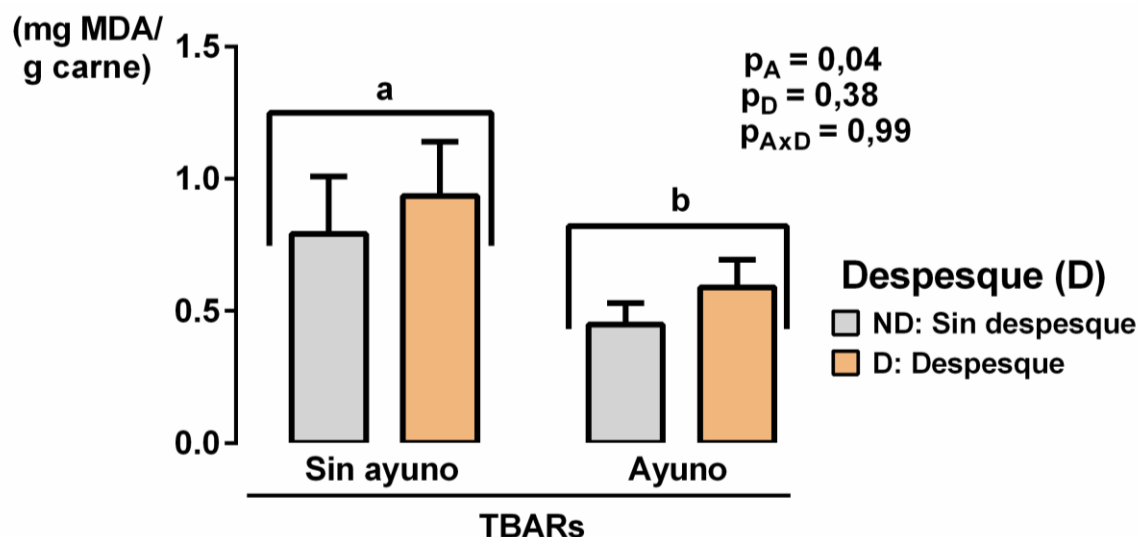
El pH muscular a las 0 horas *post-mortem* fue mayor de forma significativa en los peces del grupo D que en el grupo ND ( $6,76 \pm 0,021$  vs.  $6,62 \pm 0,031$ ), mientras que a las 48 horas *post-mortem* se observó una interacción significativa entre ambos factores, ayuno y despesque pre-sacrificio, con un pH mayor en los peces del grupo D y sometidos a ayuno respecto a los peces del mismo grupo pero no ayunados y con un valor similar de pH muscular en el grupo ND entre peces ayunados y no ayunados, con una media general de  $6,19 \pm 0,026$ .

Respecto a los parámetros de color del músculo, en el parámetro L\* a las 0 horas *post-mortem* se observaron diferencias significativas debidas al despesque pre-sacrificio con una media mayor en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $47,4 \pm 1,46$  vs.  $43,9 \pm 0,93$ ), mientras que a las 24 horas *post-mortem*, el índice L\* fue afectado significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces no ayunados que en aquellos sometidos a ayuno ( $41,4 \pm 1,06$  vs.  $36,5 \pm 1,13$ ), y por el despesque pre-sacrificio, con un valor mayor de este parámetro en el grupo D que en los peces del grupo ND ( $40,5 \pm 1,14$  vs.  $37,3 \pm 1,05$ ). El parámetro C\* en el músculo fue afectado significativamente por el ayuno tanto a las 0 como a las 24 horas *post-mortem*, siendo mayor en los peces no ayunados respecto a los sometidos a un ayuno de  $135,6$  °C d en los dos tiempos mencionados anteriormente ( $14,8 \pm 0,88$  vs.  $11,7 \pm 0,75$  y  $11,5 \pm 0,75$  vs.  $9,1 \pm 0,69$ , respectivamente). El parámetro h\* en el músculo no presentó diferencias significativas para los factores estudiados (ayuno y despesque pre-sacrificio) ni a las 0 ni a las 24 horas *post-mortem*.

**Tabla 4.5.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas de los distintos parámetros estudiados relacionados con la calidad de la carne (pH muscular y color del músculo: L\*, C\* y h\*) para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) en distintas horas post-mortem (pH: 0 y 48 horas; Color músculo: 0 y 24 horas).

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>pH0</b>	6,71 $\pm$ 0,035	6,76 $\pm$ 0,021	6,54 $\pm$ 0,027	6,77 $\pm$ 0,022	0,20	0,022	0,17
<b>pH48</b>	6,14 $\pm$ 0,035 <sup>bc</sup>	6,09 $\pm$ 0,040 <sup>c</sup>	6,23 $\pm$ 0,018 <sup>ab</sup>	6,31 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup>	<0,001	0,59	0,040
<b>Color músculo</b>							
<b>L*0</b>	46,0 $\pm$ 1,24	43,6 $\pm$ 1,01	48,7 $\pm$ 1,68	44,1 $\pm$ 0,85	0,20	0,007	0,37
<b>L*24</b>	40,1 $\pm$ 1,04	42,6 $\pm$ 1,09	34,5 $\pm$ 1,07	38,4 $\pm$ 1,19	<0,001	0,005	0,55
<b>C*0</b>	15,3 $\pm$ 0,90	14,3 $\pm$ 0,86	11,0 $\pm$ 0,92	12,3 $\pm$ 0,59	0,001	0,86	0,15
<b>C*24</b>	11,2 $\pm$ 0,87	11,8 $\pm$ 0,64	8,3 $\pm$ 0,51	9,8 $\pm$ 0,87	0,002	0,18	0,56
<b>h*0</b>	67,8 $\pm$ 2,04	69,0 $\pm$ 1,96	73,1 $\pm$ 3,22	65,0 $\pm$ 2,29	0,80	0,16	0,06
<b>h*24</b>	66,7 $\pm$ 2,92	68,1 $\pm$ 2,65	69,9 $\pm$ 3,67	70,3 $\pm$ 3,28	0,40	0,78	0,87

<sup>a,b,c</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.24.** Medias ( $\pm$  Error estándar) y comparaciones entre ellas de los niveles de TBARs en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D). Diferentes superíndices indican diferencias significativas debidas al ayuno ( $p < 0,05$ ).

En relación a la oxidación lipídica muscular se ha observado que el ayuno afectó significativamente a los compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARs), siendo mayor en los peces no ayunados que en los sometidos a 135,6 °C d de ayuno ( $0,86 \pm 0,211$  mg MDA/g carne vs.  $0,52 \pm 0,094$  mg MDA/g carne) (Figura 4.24).

En las Tablas 4.6, 4.7 y 4.8 se presentan las medias del porcentaje en músculo de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente, a las 0 horas *post-mortem*. La significación de los factores ayuno (A) y despesque pre-sacrificio (D), así como la interacción entre ambos (A x D) también se muestra.

Respecto a los **ácidos grasos saturados**, a las 0 horas *post-mortem*, su porcentaje total (SFA) no presentó diferencias significativas debida a ninguno de los factores estudiados, ayuno y despesque pre-sacrificio.

En referencia a ácidos grasos saturados concretos a las 0 horas *post-mortem*, el ayuno influyó de forma significativa en la proporción de ácido pentadecanoico (C15:0), ácido margárico (C17:0) y ácido araquídico (C20:0), de manera que los peces sin ayuno previo al sacrificio presentaron mayores proporciones de C17:0 y C20:0 que los ayunados durante 135,6 °C d ( $0,222 \pm 0,008$  % vs.  $0,201 \pm 0,010$  % y  $0,273 \pm 0,005$  vs.  $0,264 \pm 0,004$  %), mientras que los peces sometidos a 135,6 °C d de ayuno pre-sacrificio presentaron mayores proporciones de C15:0 que los no ayunados ( $0,228 \pm 0,004$  % vs.  $0,218 \pm 0,002$  %). Además, el despesque incidió significativamente en el C17:0 con mayores proporciones en el grupo ND respecto a los peces del grupo D ( $0,222 \pm 0,008$  vs.  $0,201 \pm 0,011$  %).

**Tabla 4.6.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos saturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>SFA*</b>	18,8 $\pm$ 0,13	18,5 $\pm$ 0,11	18,8 $\pm$ 0,20	18,9 $\pm$ 0,11	0,10	0,75	0,20
<b>C14:0</b>	2,10 $\pm$ 0,023	2,06 $\pm$ 0,024	2,14 $\pm$ 0,024	2,09 $\pm$ 0,029	0,18	0,05	0,83
<b>C15:0</b>	0,219 $\pm$ 0,003	0,217 $\pm$ 0,002	0,225 $\pm$ 0,005	0,231 $\pm$ 0,004	0,008	0,68	0,29
<b>C16:0</b>	12,7 $\pm$ 0,12	12,6 $\pm$ 0,12	12,7 $\pm$ 0,16	12,9 $\pm$ 0,07	0,09	0,79	0,25
<b>C17:0</b>	0,225 $\pm$ 0,007	0,218 $\pm$ 0,010	0,219 $\pm$ 0,009	0,184 $\pm$ 0,012	0,045	0,041	0,16
<b>C18:0</b>	3,27 $\pm$ 0,024	3,20 $\pm$ 0,035	3,22 $\pm$ 0,063	3,28 $\pm$ 0,035	0,67	0,95	0,15
<b>C20:0</b>	0,276 $\pm$ 0,004	0,271 $\pm$ 0,006	0,266 $\pm$ 0,004	0,262 $\pm$ 0,004	0,038	0,28	0,91

\*SFA: Ácidos grasos saturados totales

El porcentaje total de **ácidos grasos monoinsaturados** (MUFA), a las 0 horas post-mortem, no presentó diferencias significativas para ninguno de los factores estudiados, ayuno y despesque pre-sacrificio.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados concretos a las 0 horas post-mortem, en el ácido erúico (C22:1 n-9), se observó un efecto significativo del despesque pre-sacrificio, con un mayor porcentaje de este ácido graso en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $0,396 \pm 0,009$  % vs.  $0,368 \pm 0,010$  %). El porcentaje de ácido heptadecenoico (C17:1) presentó una interacción significativa entre el ayuno y el despesque pre-sacrificio, de manera que en los animales sometidos a ayuno fue mayor en el grupo ND que en el grupo D, mientras que en aquellos no sometidos a un ayuno previo al sacrificio su porcentaje fue similar entre los grupos ND y D, con una media general de  $0,230 \pm 0,005$  %.

**Tabla 4.7.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>MUFA*</b>	46,2 $\pm$ 0,34	45,9 $\pm$ 0,34	46,0 $\pm$ 0,47	44,9 $\pm$ 0,41	0,15	0,07	0,28
<b>C16:1 n-9</b>	0,296 $\pm$ 0,008	0,292 $\pm$ 0,022	0,291 $\pm$ 0,013	0,303 $\pm$ 0,011	0,83	0,82	0,58
<b>C16:1 n-7</b>	3,02 $\pm$ 0,037	2,98 $\pm$ 0,049	3,04 $\pm$ 0,053	3,04 $\pm$ 0,057	0,45	0,66	0,65
<b>C17:1</b>	0,233 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,228 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,234 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,199 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,025	0,002	0,016
<b>C18:1 n-9</b>	38,4 $\pm$ 0,32	38,0 $\pm$ 0,38	38,0 $\pm$ 0,46	37,1 $\pm$ 0,36	0,13	0,10	0,51
<b>C18:1 n-7</b>	2,06 $\pm$ 0,056	2,26 $\pm$ 0,146	2,29 $\pm$ 0,190	2,10 $\pm$ 0,074	0,78	0,99	0,14
<b>C20:1</b>	1,77 $\pm$ 0,028	1,74 $\pm$ 0,030	1,72 $\pm$ 0,034	1,73 $\pm$ 0,034	0,37	0,64	0,56
<b>C22:1 n-9</b>	0,397 $\pm$ 0,006	0,384 $\pm$ 0,012	0,396 $\pm$ 0,012	0,352 $\pm$ 0,007	0,10	0,006	0,12

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). \*MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados totales

El porcentaje total de **ácidos grasos poliinsaturados** (PUFA), a las 0 horas *post-mortem*, presentó diferencias significativas debidas al despesque pre-sacrificio, con un porcentaje mayor en el grupo D que en los peces del grupo ND (35,9  $\pm$  0,36 % vs. 35,1  $\pm$  0,35 %). El porcentaje total de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y ácidos grasos n-3 también se encontró afectado significativamente por el despesque pre-sacrificio, siendo mayores ambos en los peces del grupo D que en los del grupo ND (19,9  $\pm$  0,38 % vs. 19,1  $\pm$  0,42 % y 20,2  $\pm$  0,38 % vs. 19,3  $\pm$  0,41 %, respectivamente).

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados concretos a las 0 horas *post-mortem*, el porcentaje de los ácidos grasos eicosadienoico (C20:2 n-6) y dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) fue afectado de forma significativa por el ayuno, siendo mayores en los peces no ayunados respecto a aquellos sometidos a un ayuno de 135,6 °C d (0,602  $\pm$  0,014 % vs. 0,566  $\pm$  0,016 % y 0,354  $\pm$  0,009 % vs. 0,333  $\pm$  0,010 %, respectivamente). El despesque pre-sacrificio afectó significativamente al porcentaje de DHA (C22:6 n-3), con un mayor porcentaje del mismo en el grupo D que en los peces del grupo ND (10,4  $\pm$  0,33 % vs. 9,6  $\pm$  0,35 %).

El porcentaje del ácido  $\gamma$ -linolénico (C18:3 n-6) presentó una interacción significativa entre el ayuno y el despesque previo al sacrificio, con un porcentaje mayor en el grupo D y sometidos a 135,6 °C d de ayuno respecto a los peces también ayunados y del grupo ND, mientras que aquellos no sometidos a ayuno presentaron porcentajes similares de este ácido graso entre los grupos ND y D, con una media general de  $0,184 \pm 0,030$  %.

**Tabla 4.8.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 0 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>PUFA*</b>	35,1 $\pm$ 0,33	35,6 $\pm$ 0,34	35,2 $\pm$ 0,36	36,2 $\pm$ 0,37	0,33	0,035	0,48
<b>LCFA**</b>	19,1 $\pm$ 0,38	19,5 $\pm$ 0,34	19,1 $\pm$ 0,46	20,4 $\pm$ 0,43	0,29	0,039	0,28
<b>n-3</b>	19,3 $\pm$ 0,38	19,8 $\pm$ 0,35	19,4 $\pm$ 0,44	20,6 $\pm$ 0,42	0,23	0,041	0,38
<b>n-6</b>	15,2 $\pm$ 0,08	15,2 $\pm$ 0,08	15,2 $\pm$ 0,13	15,0 $\pm$ 0,09	0,32	0,61	0,32
<b>n-6/n-3</b>	1,27 $\pm$ 0,029	1,30 $\pm$ 0,024	1,28 $\pm$ 0,039	1,37 $\pm$ 0,033	0,19	0,07	0,33
<b>C18:2 n-6</b>	13,7 $\pm$ 0,113	13,7 $\pm$ 0,093	13,7 $\pm$ 0,165	13,4 $\pm$ 0,103	0,13	0,24	0,14
<b>C18:3 n-6</b>	0,191 $\pm$ 0,032 <sup>b</sup>	0,178 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>	0,200 $\pm$ 0,030 <sup>b</sup>	0,312 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup>	0,018	0,10	0,038
<b>C18:3 n-3</b>	3,63 $\pm$ 0,034	3,67 $\pm$ 0,041	3,65 $\pm$ 0,037	3,54 $\pm$ 0,029	0,13	0,26	0,05
<b>C18:4 n-3</b>	0,894 $\pm$ 0,023	0,887 $\pm$ 0,020	0,924 $\pm$ 0,021	0,918 $\pm$ 0,019	0,15	0,77	0,99
<b>C20:2 n-6</b>	0,612 $\pm$ 0,017	0,593 $\pm$ 0,012	0,579 $\pm$ 0,020	0,552 $\pm$ 0,013	0,027	0,15	0,80
<b>C20:3 n-6</b>	0,360 $\pm$ 0,009	0,348 $\pm$ 0,009	0,336 $\pm$ 0,013	0,329 $\pm$ 0,007	0,039	0,35	0,82
<b>C20:4 n-6</b>	0,763 $\pm$ 0,015	0,781 $\pm$ 0,015	0,787 $\pm$ 0,016	0,812 $\pm$ 0,016	0,08	0,17	0,79
<b>C20:3 n-3</b>	0,317 $\pm$ 0,036	0,294 $\pm$ 0,033	0,314 $\pm$ 0,031	0,263 $\pm$ 0,033	0,61	0,27	0,67
<b>C20:5 n-3</b>	3,58 $\pm$ 0,090	3,66 $\pm$ 0,073	3,69 $\pm$ 0,088	3,82 $\pm$ 0,077	0,10	0,19	0,72
<b>C22:4 n-6</b>	0,149 $\pm$ 0,018	0,167 $\pm$ 0,016	0,143 $\pm$ 0,018	0,190 $\pm$ 0,018	0,65	0,07	0,41
<b>C22:5 n-3</b>	1,19 $\pm$ 0,030	1,24 $\pm$ 0,028	1,23 $\pm$ 0,029	1,26 $\pm$ 0,022	0,27	0,12	0,75
<b>C22:6 n-3</b>	9,7 $\pm$ 0,30	10,0 $\pm$ 0,30	9,6 $\pm$ 0,41	10,8 $\pm$ 0,36	0,31	0,030	0,23

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). \*PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados totales. \*\*LCFA: Ácidos grasos de cadena larga totales.

En las Tablas 4.9, 4.10 y 4.11 se presentan las medias del porcentaje en músculo de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente, a las 48 horas *post-mortem*.

Respecto a los **ácidos grasos saturados**, a las 48 horas *post-mortem*, su porcentaje total (SFA) fue afectado significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces sometidos a un ayuno de 135,6 °C d respecto a los no ayunados ( $18,8 \pm 0,12$  % vs.  $18,5 \pm 0,10$  %).

En referencia a ácidos grasos saturados concretos a las 48 horas *post-mortem*, el C16:0 y el C20:0 presentaron diferencias significativas debidas al ayuno. Mientras que el porcentaje de C16:0 fue mayor en los peces ayunados respecto a los no ayunados ( $12,9 \pm 0,10$  % vs.  $12,5 \pm 0,08$  %), en el caso del porcentaje de C20:0 sucedió lo contrario, siendo mayor en los peces no ayunados respecto a los sometidos a un ayuno de 135,6 °C d ( $0,267 \pm 0,003$  % vs.  $0,255 \pm 0,004$  %). El porcentaje de C20:0 también estuvo afectado significativamente por el despesque pre-sacrificio, con un porcentaje mayor de este ácido graso en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $0,266 \pm 0,003$  % vs.  $0,256 \pm 0,004$  %). El porcentaje de C17:0 presentó una interacción significativa entre los factores ayuno y despesque pre-sacrificio, de forma que en los peces sometidos a ayuno fue mayor en el grupo ND que en los peces del grupo D, mientras que en los peces no ayunados fue similar entre los grupos ND y D con una media general de  $0,218 \pm 0,009$  %. Finalmente, el porcentaje de ácido esteárico (C18:0) también presentó una interacción significativa entre los dos factores estudiados, siendo mayor en los peces sometidos a ayuno en el grupo ND respecto a los peces del grupo D, mientras que en los peces no ayunados fue similar entre los grupos ND y D con una media general de  $3,21 \pm 0,041$  %.

**Tabla 4.9.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos saturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>SFA*</b>	18,5 $\pm$ 0,11	18,4 $\pm$ 0,09	18,9 $\pm$ 0,06	18,7 $\pm$ 0,17	0,009	0,44	0,65
<b>C14:0</b>	2,09 $\pm$ 0,018	2,07 $\pm$ 0,019	2,09 $\pm$ 0,016	2,13 $\pm$ 0,024	0,18	0,57	0,14
<b>C15:0</b>	0,219 $\pm$ 0,002	0,219 $\pm$ 0,002	0,220 $\pm$ 0,003	0,227 $\pm$ 0,002	0,07	0,13	0,12
<b>C16:0</b>	12,5 $\pm$ 0,10	12,5 $\pm$ 0,07	12,8 $\pm$ 0,05	13,1 $\pm$ 0,14	<0,001	0,12	0,24
<b>C17:0</b>	0,219 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,217 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,223 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,175 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,041	0,009	0,014
<b>C18:0</b>	3,23 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>	3,18 $\pm$ 0,061 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 0,058 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,050 <sup>b</sup>	0,016	<0,001	0,001
<b>C20:0</b>	0,270 $\pm$ 0,003	0,265 $\pm$ 0,003	0,263 $\pm$ 0,004	0,247 $\pm$ 0,005	0,003	0,016	0,16

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ).

\*SFA: Ácidos grasos saturados totales

En relación con los **ácidos grasos monoinsaturados**, a las 48 horas post-mortem, su porcentaje total (MUFA) se encontró afectado significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces no ayunados respecto a los sometidos a un ayuno de 135,6 °C d ( $46,0 \pm 0,31$  % vs.  $45,3 \pm 0,33$  %).

En referencia a ácidos grasos monoinsaturados concretos a las 48 horas post-mortem, el C18:1 n-9 presentó diferencias significativas debidas al ayuno, siendo mayor en los peces no ayunados respecto a aquellos sometidos a ayuno ( $38,2 \pm 0,26$  % vs.  $36,7 \pm 0,35$  %), y al despesque pre-sacrificio, con un porcentaje mayor de este ácido graso en el grupo ND que en los peces del grupo D ( $37,9 \pm 0,29$  % vs.  $37,0 \pm 0,32$  %). Los porcentajes de los ácidos palmítico (C16:1 n-9), C17:1, vaccénico (C18:1 n-7) y C22:1 n-9 presentaron todos ellos una interacción significativa entre los factores ayuno y despesque pre-sacrificio. Los porcentajes de C16:1 n-9 y C18:1 n-7 fueron mayores en los peces sometidos a ayuno en el grupo D que en los peces del grupo ND, mientras que en los peces no ayunados fue similar entre los grupos ND y D con una media general de  $0,287 \pm 0,011$  % y  $2,23 \pm 0,095$  %, respectivamente. Los porcentajes de C17:1 y C22:1 n-9 fueron mayores en los peces sometidos a ayuno en el grupo ND respecto a los peces del grupo D,

mientras que en los peces no ayunados fue similar entre los grupos ND y D con una media general de  $0,227 \pm 0,005$  % y  $0,388 \pm 0,006$  %, respectivamente.

**Tabla 4.10.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>MUFA*</b>	46,1 $\pm$ 0,29	45,9 $\pm$ 0,32	45,3 $\pm$ 0,33	45,3 $\pm$ 0,32	0,031	0,85	0,79
<b>C16:1 n-9</b>	0,283 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>	0,290 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup>	0,309 $\pm$ 0,018 <sup>b</sup>	0,438 $\pm$ 0,016 <sup>a</sup>	<0,001	0,001	0,001
<b>C16:1 n-7</b>	2,97 $\pm$ 0,044	2,95 $\pm$ 0,041	2,91 $\pm$ 0,031	2,94 $\pm$ 0,039	0,41	0,77	0,52
<b>C17:1</b>	0,227 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,226 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,228 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,197 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,009	0,004	0,007
<b>C18:1 n-9</b>	38,3 $\pm$ 0,25	38,1 $\pm$ 0,28	37,4 $\pm$ 0,34	36,0 $\pm$ 0,35	<0,001	0,011	0,09
<b>C18:1 n-7</b>	2,14 $\pm$ 0,053 <sup>b</sup>	2,33 $\pm$ 0,137 <sup>b</sup>	2,40 $\pm$ 0,193 <sup>b</sup>	3,73 $\pm$ 0,140 <sup>a</sup>	<0,001	<0,001	0,002
<b>C20:1</b>	1,70 $\pm$ 0,031	1,66 $\pm$ 0,026	1,66 $\pm$ 0,027	1,63 $\pm$ 0,016	0,20	0,22	0,95
<b>C22:1 n-9</b>	0,391 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,384 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,380 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,322 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	<0,001	0,003	0,003

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). \*MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados totales

El porcentaje total de **ácidos grasos poliinsaturados** (PUFA), a las 48 horas *post-mortem*, no presentó diferencias significativas debidas al ayuno o al despesque pre-sacrificio. Sin embargo, el porcentaje total de ácidos grasos n-6 y el cociente n-6/n-3 fue afectado significativamente por el ayuno, siendo mayor en los peces no ayunados respecto a los ayunados en el caso de los n-6 ( $15,4 \pm 0,07$  % vs.  $15,2 \pm 0,09$  %) y en el caso del cociente n-6/n-3 mayor en los ayunados respecto a los no ayunados ( $1,33 \pm 0,026$  % vs.  $1,27 \pm 0,024$  %).

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados concretos, a las 48 horas *post-mortem*, el porcentaje de los ácidos C18:2 n-6 y araquidónico C20:4 n-6 se encontró afectado de forma significativa por el ayuno. El porcentaje de C18:2 n-6 fue mayor en los peces no ayunados respecto a aquellos sometidos a un ayuno de 135,6 °C d ( $14,0 \pm 0,08$  % vs.  $13,7 \pm 0,11$  %), mientras que en el caso del C20:4 n-6 ocurrió lo contrario, con un mayor porcentaje del mismo en los peces ayunados respecto a los no ayunados ( $0,799 \pm 0,016$  % vs.  $0,763 \pm 0,013$  %). El porcentaje del ácido

estearidónico (C18:4 n-3) presentó una interacción significativa entre el ayuno y el despesque previo al sacrificio, con un porcentaje mayor en el grupo ND y sometidos a 135,6 °C d de ayuno respecto a los peces también ayunados y del grupo D, mientras que aquellos no sometidos a ayuno presentaron porcentajes similares de este ácido graso entre los grupos ND y D, con una media general de  $0,940 \pm 0,024$  %.

**Tabla 4.11.** Medias ( $\pm$  error estándar) y comparaciones entre ellas del porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en músculo para el efecto del ayuno (A) y del despesque pre-sacrificio (D) a las 48 horas post-mortem.

	Sin ayuno		Ayuno (135,6 °C d)		Significación (p)		
	ND	D	ND	D	A	D	A x D
<b>PUFA*</b>	35,4 $\pm$ 0,38	35,6 $\pm$ 0,33	35,9 $\pm$ 0,31	36,0 $\pm$ 0,30	0,25	0,65	0,92
<b>LCFA**</b>	19,0 $\pm$ 0,35	19,1 $\pm$ 0,36	19,7 $\pm$ 0,36	19,7 $\pm$ 0,34	0,07	0,87	0,82
<b>n-3</b>	19,5 $\pm$ 0,37	19,7 $\pm$ 0,35	20,1 $\pm$ 0,33	20,2 $\pm$ 0,32	0,08	0,75	0,81
<b>n-6</b>	15,4 $\pm$ 0,06	15,4 $\pm$ 0,08	15,1 $\pm$ 0,06	15,3 $\pm$ 0,12	0,019	0,44	0,53
<b>n-6/n-3</b>	1,26 $\pm$ 0,023	1,28 $\pm$ 0,026	1,33 $\pm$ 0,024	1,32 $\pm$ 0,028	0,027	0,92	0,70
<b>C18:2 n-6</b>	14,0 $\pm$ 0,06	14,0 $\pm$ 0,10	13,7 $\pm$ 0,08	13,8 $\pm$ 0,14	0,024	0,64	0,72
<b>C18:3 n-6</b>	0,184 $\pm$ 0,031	0,179 $\pm$ 0,030	0,146 $\pm$ 0,014	0,197 $\pm$ 0,028	0,70	0,37	0,29
<b>C18:3 n-3</b>	3,73 $\pm$ 0,029	3,69 $\pm$ 0,036	3,68 $\pm$ 0,033	3,68 $\pm$ 0,043	0,42	0,52	0,65
<b>C18:4 n-3</b>	0,922 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup>	0,958 $\pm$ 0,025 <sup>a</sup>	0,919 $\pm$ 0,020 <sup>a</sup>	0,829 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup>	0,005	0,24	0,007
<b>C20:2 n-6</b>	0,573 $\pm$ 0,022	0,552 $\pm$ 0,010	0,561 $\pm$ 0,010	0,534 $\pm$ 0,009	0,30	0,09	0,85
<b>C20:3 n-6</b>	0,349 $\pm$ 0,021	0,333 $\pm$ 0,009	0,329 $\pm$ 0,009	0,312 $\pm$ 0,009	0,12	0,21	0,93
<b>C20:4 n-6</b>	0,755 $\pm$ 0,014	0,772 $\pm$ 0,012	0,806 $\pm$ 0,018	0,792 $\pm$ 0,015	0,023	0,93	0,29
<b>C20:3 n-3</b>	0,294 $\pm$ 0,043	0,283 $\pm$ 0,033	0,310 $\pm$ 0,031	0,366 $\pm$ 0,006	0,12	0,47	0,29
<b>C20:5 n-3</b>	3,66 $\pm$ 0,091	3,74 $\pm$ 0,060	3,78 $\pm$ 0,081	3,66 $\pm$ 0,043	0,76	0,74	0,15
<b>C22:4 n-6</b>	0,144 $\pm$ 0,019	0,148 $\pm$ 0,017	0,171 $\pm$ 0,021	0,185 $\pm$ 0,014	0,08	0,63	0,77
<b>C22:5 n-3</b>	1,20 $\pm$ 0,038	1,21 $\pm$ 0,032	1,25 $\pm$ 0,037	1,24 $\pm$ 0,030	0,24	0,93	0,79
<b>C22:6 n-3</b>	9,66 $\pm$ 0,283	9,78 $\pm$ 0,315	10,2 $\pm$ 0,290	10,4 $\pm$ 0,320	0,06	0,59	0,88

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices indican diferencias entre las medias de la misma fila ( $p < 0,05$ ). \*PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados totales. \*\*LCFA: Ácidos grasos de cadena larga totales.

## **DISCUSIÓN**

---



# **CAPÍTULO I**

## **EFECTO DE LOS GRADOS DÍA DE AYUNO PREVIOS AL SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE**



### 5.1.1. *Parámetros biométricos*

El periodo de ayuno en el que se puede encontrar una reducción de peso vivo del pez es muy largo, así Sumpter *et al.* (1991) y Pottinger *et al.* (2003) lo cifraron de 2 a 6 semanas (161 °C d a 174 °C d, respectivamente). Sin embargo, en nuestro estudio, fue suficiente un ayuno de 7 días (41,8 °C d) para que las truchas presentaran un menor peso al sacrificio y crecimiento relativo respecto a los animales ayunados durante 3 días. Estas diferencias con los estudios mencionados podrían deberse a que los efectos del ayuno van a depender de diversos factores como el tamaño de los peces, las reservas lipídicas de las que disponen, la fase del ciclo vital en el que se encuentran y de la temperatura del agua (EFSA, 2008). Además, hay estudios en otras especies de salmónidos como el salmón que han encontrado diferencias significativas en el peso vivo tras sólo tres días de privación de alimento equivalentes a 13,5 °C d (Einen *et al.*, 1998). La no disminución del peso vivo hasta los 7 días de ayuno puede ser debida a que los peces ajustan su tasa metabólica en respuesta a la disponibilidad de alimentos (Lines y Spence, 2012), reduciendo la pérdida de masa corporal hasta ese momento. Algunos autores llegan a la conclusión de que la privación de alimento durante 24 y 48 h antes de cualquier procedimiento estresante (manipulación, transporte o sacrificio) parece aumentar la tolerancia de los peces (Davis y Gaylord, 2011), lo que implica que el ayuno a corto plazo puede en realidad ser beneficioso justo antes de la manipulación, siendo requerido un menor tiempo de ayuno previo al sacrificio a altas temperaturas (Robb, 2008).

El coeficiente de condición corporal refleja el estado nutricional de los peces (Bavcevic *et al.*, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2011) y permite una visión más exacta del tamaño de los mismos al no depender tanto de las variaciones de peso vivo e incluir la longitud corporal en su cálculo. En el caso de la trucha arcoíris comienza a descender con periodos de ayuno de 31,5 °C d (Pottinger *et al.*, 2003) a 98 °C d (Sumpter *et al.*, 1991), por lo que la duración máxima del ayuno en nuestra prueba, de 55,3 °C d, fue suficiente para tener un efecto negativo sobre este parámetro.

El contenido estomacal disminuyó a partir de los 4 días de ayuno (22,3 °C d) manteniéndose similar entre el resto de grupos y el DSI tendió a disminuir también con el aumento de los grados día de ayuno, por lo que podemos considerar que un periodo de ayuno de 4 días es suficiente para asegurarnos un estómago vacío en las truchas que

nos eviten posibles problemas de contaminación de la canal durante su evisceración. Consecuentemente debido al mayor contenido estomacal, el rendimiento canal fue menor en los animales sometidos a 3 días de ayuno (17,2 °C d). El vaciado del aparato digestivo es un proceso que depende de la temperatura del agua y de la duración del ayuno, requiriendo un tiempo mayor para un vaciado completo a temperaturas bajas (Usher *et al.*, 1991). Nuestros resultados concuerdan con Lines y Spence (2012) y McMillan y Houlihan (1992), quienes estimaron un tiempo medio de 1 a 5 días de ayuno para que se produjera este vaciado. Por lo tanto se recomienda un ayuno de al menos 4 días o 22,3 °C d antes del sacrificio para asegurar el vaciado estomacal.

Respecto al HSI, al igual que el peso al sacrificio y el crecimiento relativo, disminuyó en los peces a partir de los 7 días de ayuno (41,8 °C d) respecto a aquellos ayunados durante 3 días (17,2 °C d). Este descenso en el índice a los 7 días de ayuno es similar a al encontrado por Farbridge y Leatherland (1992) en trucha arcoíris, aunque su valor en los peces ayunados fue menor al de nuestra prueba (1,3 vs. 1,8), posiblemente debido a que las truchas utilizadas en ese estudio fueron de un peso menor, con una media aproximada de 130 g. El peso del hígado disminuye habitualmente con la falta de alimento (Barcellos *et al.*, 2010; Costas *et al.*, 2011), pero el tiempo en el que empieza a disminuir su peso puede ser diferente según las especies y las condiciones experimentales. En el caso de la trucha arcoíris, este periodo mínimo varía desde los 2 (Farbridge y Leatherland, 1992) hasta los 6 días de ayuno pre-sacrificio (McMillan y Houlihan, 1992). En otras especies como la lubina (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007) o la dorada (Metón *et al.*, 2003) también se ha observado un descenso de este índice con el aumento de los grados día de ayuno. Este descenso del peso de este órgano es una consecuencia de la utilización de las reservas almacenadas en el mismo debido a la mayor demanda de ellas durante el ayuno (Davis y Gaylord, 2011). Se produce una disminución principalmente de glucógeno (Soengas *et al.*, 1996) pero también de otros metabolitos como lípidos o proteínas (Blasco *et al.*, 1992; McMillan y Houlihan, 1992).

### **5.1.2. Parámetros hematológicos**

En la literatura científica, no hay un consenso sobre el efecto del ayuno en los niveles de cortisol plasmático en la trucha arcoíris. Algunos describen un aumento de la concentración de cortisol en plasma dependiendo de la duración del periodo de ayuno

(Sumpter *et al.*, 1991), mientras que otros estudios no observaron efecto alguno del ayuno sobre este parámetro (Holloway *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 1995) o incluso concentraciones más bajas de cortisol en plasma en truchas sometidas a ayuno respecto a otras no ayunadas (Farbridge y Leatherland, 1992), como es el caso de nuestros resultados. En otras especies también hay estudios contradictorios, con valores de cortisol más altos (Barcellos *et al.*, 2010), bajos (Barton *et al.*, 1988) o sin diferencias (Weber y Bosworth, 2005) entre animales sometidos a ayuno y no ayunados en jundia, salmón y pez gato, respectivamente. En nuestro caso, las truchas ayunadas durante 3 (17,2 °C d) y 4 días (22,3 °C d) presentaron mayores concentraciones plasmáticas de cortisol que el resto de los grupos, lo que coincide con Olsen *et al.* (2008) y Hutlmann *et al.* (2012), quienes observaron una respuesta de estrés mayor con unos niveles de cortisol superiores en bacalaos no sometidos a ayuno respecto a otros ayunados. Los niveles tan bajos de cortisol en el resto de los grupos experimentales podrían ser explicados por un mecanismo de adaptación de la trucha al ayuno, tras 5 días (28,6 °C d), debido a una respuesta de estrés de tipo crónico, reduciendo su tasa metabólica (Lines y Spence, 2012). Otra hipótesis para este descenso de los valores de cortisol podría ser un agotamiento del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal.

El cortisol estimula la hidrólisis del glucógeno en el hígado, lo que incrementa los niveles de glucosa en plasma (Menezes *et al.*, 2015). En la trucha arcoíris, los niveles de glucosa ante una respuesta de estrés pueden alcanzar en plasma los 150 mg/100 ml (Pottinger y Carrick, 1999), con niveles basales de 70-90 mg / 100 ml (Jentoft *et al.*, 2005). Pottinger *et al.* (2003) observaron que los niveles de este metabolito disminuyen en trucha arcoíris a partir de 38 °C d de ayuno y ha sido demostrado que un ayuno superior a 70 °C d es suficiente para inducir un estado de hipoglucemia en esta especie (Furné *et al.*, 2012). En nuestro estudio, un ayuno de 4 días (22,3 °C d) comenzó a disminuir los niveles plasmáticos de glucosa y a partir de 7 días (41,8 °C d) podemos decir que los niveles encontrados sugieren un estado de hipoglucemia en esas truchas (55 mg/ 100 ml). Generalmente, los peces son ayunados durante 24 horas previas a cualquier manejo para asegurar su paso a una fase postabsortiva, en la cual los metabolitos circulantes vuelven a sus valores basales y se mantienen estables. En este estudio, la mayor caída de los niveles de glucosa con el incremento de los grados día de ayuno podría indicar un mecanismo de adaptación que

deprime el metabolismo basal para adaptarse a la restricción energética por la falta de alimento.

El lactato es considerado un indicador de estrés agudo en peces, ya que sus niveles plasmáticos se incrementan ante una situación estresante (Grutter y Pankhurst, 2000). Este parámetro también se puede ver afectado por el ayuno debido a que la falta de alimento puede aumentar la agresividad en los peces, modificando la jerarquía social, lo que provoca una respuesta de estrés aguda. Las concentraciones plasmáticas de lactato deberían disminuir con el incremento de los grados día de ayuno (Blasco *et al.*, 1992) para estimular la formación de glucosa en el hígado (Liew *et al.*, 2012). Esto podría explicar la tendencia a disminuir sus niveles en las truchas desde los 4 días (22,3 °C d) a los 9 días de ayuno (55,3 °C d). Sin embargo, la concentración más baja de lactato se observó en los peces sometidos a 3 días de ayuno (17,2 °C d), lo que se puede considerar también como una consecuencia de una respuesta de estrés, ya que los niveles basales de este ión se encuentran sobre 0,5 mmol/l y valores por encima de 1,3 mmol/l, como es el caso de las truchas sometidas a 3 días de ayuno ( $1,7 \pm 0,29$  mmol/l) se relacionan con una respuesta de estrés (Ings *et al.*, 2011).

Los triglicéridos en plasma deberían disminuir con el incremento de los grados día de ayuno, ya que los peces movilizan reservas grasas para hacer frente al ayuno y estas reservas acaban disminuyendo con el tiempo (Costas *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio, los valores de triglicéridos plasmáticos se mantuvieron similares entre los distintos grupos e incluso hubo una mayor concentración en las truchas sometidas a 9 días de ayuno (55,3 °C d) que en aquellas sometidas a 5 días (28,6 °C d). Esto puede ser debido a que los grados día de ayuno a los que fueron sometidas las truchas no fueron suficientes para agotar las reservas grasas y encontramos valores aumentados de triglicéridos en plasma al ser liberados desde el músculo y el tejido adiposo para suplir las necesidades de los peces ante la falta de alimento (Li *et al.*, 2011a).

La enzima creatin fosfoquinasa (CPK) fue mayor en las truchas sometidas a 3 (17,2 °C d), 4 (22,3 °C d) y 5 días de ayuno (28,6 °C d) que en aquellas ayunadas durante 9 días (55,3 °C d). Los niveles de esta enzima en plasma tienen una tendencia a disminuir con el incremento de los grados día de ayuno como se ha observado en otras

especies como la dorada (Peres *et al.*, 2013). Este descenso en la actividad de esta enzima es atribuido a una disminución de la síntesis enzimática y de los índices de renovación debido a la menor demanda metabólica de los peces sometidos a ayuno (Echevarría *et al.*, 1997; Evans y Watterson, 2009).

### **5.1.3. Parámetros metabólicos**

En cuanto al color del hígado, las truchas sometidas a 3 (17,2 °C d) y 4 días de ayuno (22,3 °C d) presentaron un mayor  $h^*$  o tono que el resto de los grupos. Esto podría ser indicador de una mayor movilización de reservas hepáticas en los demás grupos debido a un incremento de la respuesta de estrés ante el ayuno (Davis y Gaylord, 2011; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012), viéndose modificado el color de este órgano. Este cambio de color posiblemente se pueda deber a una disminución de la composición en lípidos del hígado, como se ha visto en otros animales como pollos en situaciones de ayuno (Trampel *et al.*, 2005).

### **5.1.4. Parámetros de calidad de canal y de carne**

En los peces, una reducción inicial del pH muscular tras el sacrificio se atribuye al aumento de la concentración de ácido láctico producido por el metabolismo anaerobio del glucógeno en el músculo (Grigorakis *et al.*, 2003) y esta reducción se acompaña del establecimiento del *rigor mortis* (Huss, 1995). El establecimiento del *rigor mortis* se alcanzó de forma más temprana en los peces sometidos a 6, 7 y 9 días de ayuno respecto a los ayunados durante 3 días, lo que implica una peor calidad de la carne (Borderías y Sánchez-Alonso, 2011). El pH muscular fue inferior a las 0 horas *post-mortem* en las truchas sometidas a ayunos de 3 (17,2 °C d) y 4 días (22,3 °C d) respecto al resto de los grupos, lo que se puede deber a una mayor actividad muscular que el resto de los grupos (como se puede observar en los mayores niveles de CPK en estos grupos), que redujeron su actividad para afrontar los mayores periodos de ayuno (Thomas *et al.*, 1999). En esta prueba no se valoró el pH a las 24 horas *post-mortem* pero observando la tendencia a presentar un menor ángulo de *rigor mortis* en los grupos sometidos a 6 (35,3 °C d), 7 (41,8 °C d) y 9 días de ayuno (55,3 °C d) respecto a las truchas sometidas a 3 días de ayuno, así como la correlación negativa entre el pH muscular y el ángulo de *rigor mortis* a las 24 horas *post-mortem* en las otras pruebas,

podríamos esperar un mayor pH a las 24 horas *post-mortem* en las truchas ayunadas durante 6, 7 y 9 días de ayuno.

Respecto al color de la piel, sólo se observó una disminución de la L\* o luminosidad en las truchas sometidas a 9 días de ayuno (55,3 °C d) respecto a las ayunadas durante 3 (17,2 °C d) o 4 días (22,3 °C d). Esto puede ser debido a una mayor respuesta de estrés con el incremento de los grados día de ayuno, actuando la ACTH sobre los cromatóforos de la piel produciendo su oscurecimiento (Höglund *et al.*, 2000).

### **5.1.5. Conclusiones parciales**

En base a los resultados obtenidos en esta prueba podemos destacar que uno de los principales objetivos del ayuno pre-sacrificio en acuicultura, como es el vaciado completo del aparato digestivo, se alcanza a los 4 días de ayuno (22,3 °C d) en la trucha arcoíris.

La trucha arcoíris es capaz de ajustar su tasa metabólica en respuesta a la falta de alimento, deprimiendo el metabolismo basal para adaptarse a la restricción energética producida por el ayuno. Este ajuste de la tasa metabólica se puede observar en los niveles de cortisol, glucosa o CPK, que disminuyeron con el incremento de los grados día de ayuno. En el caso de la concentración de cortisol plasmática harían falta más estudios para poder confirmar si su descenso tras 5 días de ayuno (28,6 °C d) se debe a una respuesta de estrés crónica o a un agotamiento del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal. Mediante este mecanismo de adaptación son además capaces de reducir la pérdida de masa corporal hasta los 7 días de ayuno (41,8 °C d), lo que nos podría sugerir desde un punto de vista productivo que podemos ahorrar en el coste de alimentación alcanzando estos grados día de ayuno sin que los peces pierdan peso vivo. Sin embargo, hemos observado que periodos de ayuno a partir de 5 días (28,6 °C d) tienen un efecto negativo sobre la calidad de la carne y la canal, ya que presentaron un pH muscular a las 0 horas *post-mortem* más alto que conlleva una evolución del *rigor mortis* más rápida y una peor calidad de la carne, además de presentar un color de la piel más oscuro que podría causar un rechazo por parte de los consumidores.

Por ello, podemos concluir que, con un ayuno pre-sacrificio de 17,2-22,3 °C d, la trucha arcoíris presenta una menor respuesta de estrés y la calidad de la carne va a ser mejor.

# **CAPÍTULO II**

## **REDUCCIÓN DEL EFECTO DEL AYUNO PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y CALIDAD DE LA CARNE**



### 5.2.1. *Parámetros biométricos*

El peso al sacrificio, crecimiento relativo y coeficiente de condición corporal (CC) de las truchas alimentadas todos los días durante el último mes de engorde (D) no se vieron afectados por los grados día de ayuno, mientras que en los grupos alimentados cada 2 días (2D) y cada cuatro días (4D), el peso al sacrificio y el crecimiento relativo fueron inferiores a los 9 días de ayuno (102 °C d). El CC se mantuvo también similar entre grados día de ayuno en el grupo 2D. A los 2 días de ayuno (24,3 °C d), la cantidad de alimento en el estómago de los peces de los grupos 2D y 4D fue mayor que en los del grupo D, cayendo a niveles cercanos a cero a los 9 días de ayuno. Esto sugiere que el mayor peso al sacrificio de las truchas del grupo 2D comparadas con las del grupo D pudo ser debido a la mayor cantidad de alimento presente en el estómago, pero esta hipótesis no explica por qué el peso de las truchas del grupo 4D fue similar a las del grupo D tras 2 días de ayuno, ya que podríamos esperar que tuvieran cuatro veces la cantidad de alimento en sus estómagos dos días antes. Los datos de contenido estomacal sugieren que las truchas del grupo 4D ingirieron una cantidad similar de alimento por día que las del grupo 2D y posiblemente rechazaron la mitad del alimento que les fue ofrecido. No se tuvo en cuenta el consumo por pez o las pérdidas de alimento en las jaulas pero se observó que fue complicado para las truchas del grupo 4D consumir una ración correspondiente a 4 días. En cualquier caso, en base a estos parámetros podemos interpretar que la alimentación cada cuatro días durante el último mes de engorde o sistema 4D parece ser la peor opción.

El HSI, como indicador de reservas corporales, disminuyó con los grados día de ayuno, probablemente porque las truchas empezaron a usar sus reservas corporales para abastecer sus necesidades calóricas minimizando la pérdida de tejidos. Sin embargo, el ritmo de cambio del HSI puede variar con los grados día de ayuno. Farbridge y Leatherland (1992) observaron una disminución de este índice tras 2 días de ayuno mientras que McMillan y Houlihan (1992) no encontraron diferencias entre peces ayunados y no ayunados hasta los 6 días de ayuno. En trucha arcoíris, se han observado en estudios previos valores medios de este índice entre 1,5 y 1,8 (Kizak *et al.*, 2013; Rehulka, 2000). En esta prueba, el HSI de las truchas del grupo 2D fue mayor a los dos días de ayuno (24,3 °C d) que en el resto de los grupos y a los 9 días de ayuno (102 °C d) descendió significativamente. Esto pudo ser debido a una disminución del

glucógeno hepático (Davis y Gaylord, 2011), bastante acusada a los 9 días de ayuno en el grupo 2D, y/o de los aminoácidos libres (Costas *et al.*, 2011), siendo ambas las fuentes de energía primarias que se utilizan durante el ayuno.

Finalmente, los valores de rendimiento canal en esta prueba se encontraron en los límites normales para la trucha arcoíris, de 79-83 % (Kizak *et al.*, 2013), siendo más bajos estos rendimientos en las truchas de los grupos 2D y 4D y sometidas a 2 días de ayuno (24,3 °C d), lo que pudo ser debido a su mayor contenido estomacal y DSI, a su vez relacionado con la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde.

### **5.2.2. Parámetros hematológicos**

Los niveles de cortisol plasmático fueron similares entre grados día de ayuno en los peces de los grupos D y 4D. Sin embargo, en el grupo 2D, el cortisol fue menor a los 2 (24,3 °C d) que a los 9 días de ayuno (102 °C d). Estos resultados subrayan la importancia de considerar el efecto de la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde de la trucha arcoíris sobre la respuesta de estrés que se genera en los peces ante un periodo de ayuno. La similitud entre los niveles plasmáticos de cortisol a 2 y 9 días de ayuno en los peces del grupo 4D podría ser consecuencia de la propia frecuencia de alimentación, que produjo una respuesta de estrés crónica, reduciendo el aumento de cortisol plasmático ante un estímulo estresante agudo (Ings *et al.*, 2011; Wunderink *et al.*, 2011), por lo que los niveles de cortisol no se vieron incrementados a los 9 días respecto a los peces sometidos solamente a 2 días de ayuno. Se encontró un patrón similar en las truchas del grupo D, manteniéndose similares las concentraciones de cortisol entre grados día de ayuno. En este caso, la razón podría ser que debido a la alta respuesta de estrés producida por el cambio de recibir alimentación diariamente a no recibirla pudo haber incrementado el estrés social y por consiguiente la respuesta de estrés (Jeffrey *et al.*, 2014). Finalmente, los niveles más bajos de cortisol respecto al resto de grupos a los dos días de ayuno sugieren una menor respuesta de estrés, posiblemente porque las truchas se habituaron mejor a esta frecuencia de alimentación que al resto.

La concentración plasmática de glucosa disminuyó en los peces sometidos a 9 días de ayuno (102 °C d) respecto a los ayunados durante 2 días (24,3 °C d) en los grupos D y 4D, mientras que en el grupo 2D se mantuvieron similares estos niveles

entre grados día de ayuno, debido probablemente a los altos niveles de cortisol en este grupo ya comentados anteriormente, estimulando la gluconeogénesis (Polakof *et al.*, 2006). Sin embargo, los niveles plasmáticos de glucosa fueron bastante elevados a los 2 días de ayuno en todos los grupos al compararlos con los niveles basales propios de la trucha arcoíris (70-90 mg/ 100 ml; Jentoft *et al.*, 2005), quizás debido a una activación de la gluconeogénesis mediada por el cortisol (Hoseini *et al.*, 2013).

Los niveles plasmáticos de ión lactato se vieron afectados en mayor medida por la frecuencia de alimentación que por los grados día de ayuno, siendo menor su valor a los 9 días de ayuno (102 °C d) en el grupo D que en el resto de los grupos. Por consiguiente, nuestros resultados indican que el ayuno no tuvo un claro efecto sobre los niveles plasmáticos de lactato, como ha sido descrito en otras especies con diferentes periodos de ayuno. Soengas *et al.* (1996) no encontró variaciones en el lactato en plasma durante 7 días de ayuno en salmones. Costas *et al.* (2011) tampoco observaron cambios en estos niveles tras periodos de ayuno de 24 horas a 21 días en solea (*Solea senegalensis*). En general, los valores medios de lactato en esta prueba (14-37 mmol/l) fueron bastante altos para la trucha arcoíris al compararlos con otros autores (Trenzado *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2004; Morrow *et al.*, 2004), lo que podría indicar una respuesta de estrés producida en todos los peces por el despesque o por ajustes de las jerarquías sociales entre los individuos del mismo grupo, lo que incrementaría la actividad muscular anaeróbica y por tanto los niveles de lactato. El despesque posiblemente no fue causa de esta respuesta de estrés debido a que los niveles de lactato tardan de 2-4 horas en verse aumentados en plasma tras un episodio de estrés agudo (Olsen *et al.*, 2005).

Los triglicéridos son una reserva energética que los peces van a utilizar durante los periodos de ayuno (Costas *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). En este estudio, disminuyeron con el los grados día de ayuno en todos los grupos excepto en las truchas del grupo D. Nuestros resultados sugieren por tanto que la frecuencia de alimentación puede afectar a los niveles de triglicéridos plasmáticos en la trucha arcoíris tras dos días de ayuno (24,3 °C d), ya que los peces del grupo D presentaron unos niveles mucho más bajos a este tiempo que los de los grupos 2D y 4D, lo que indica que sus reservas estaban agotadas en mayor medida, posiblemente debido a que no necesitaban mantener sus reservas grasas al recibir alimento diariamente. La razón de que los peces del grupo

4D tuvieran menores niveles de triglicéridos que los del grupo 2D posiblemente sea el mayor tiempo de ayuno intermitente en ese grupo. Por ello podemos decir que la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde puede regular el nivel de reservas grasas en la trucha arcoíris.

Los cambios en las enzimas LDH y CPK fueron similares, con los peces de los grupos D y 2D mostrando una ligera disminución de la actividad enzimática entre grados día de ayuno. Sin embargo, los peces del grupo 4D presentaron una mayor actividad de la enzima LDH a los 2 días (24,3 °C d) que a los 9 días de ayuno (102 °C d), indicando una mayor actividad muscular a los 2 días de ayuno. Unos altos niveles de enzima LDH se encuentran relacionados con lesiones musculares desencadenadas por diferentes tipos de estímulos estresantes como el transporte (Dobsikova *et al.*, 2006) o el ayuno (Vijayan *et al.*, 2006). Por consiguiente, la actividad muscular en los grupos D y 2D fue menor, posiblemente reflejo de una menor respuesta de estrés que en los peces del grupo 4D.

### **5.2.3. Parámetros metabólicos**

El ayuno produce una movilización de los nutrientes almacenados en el hígado, como el glucógeno, para el mantenimiento de la homeostasis, jugando un papel importante como fuente de metabolitos, especialmente durante las fases iniciales del ayuno (Davis y Gaylord, 2011). El tiempo en el que empiezan a disminuir estos niveles con el ayuno es variable, pero pueden ser movilizados de 5-20 días desde el comienzo del periodo de ayuno (Barcellos *et al.*, 2010). Furné *et al.* (2012) observaron que, en la trucha arcoíris, la movilización del glucógeno hepático comienza a los 5 días de ayuno. En nuestro estudio, los peces de los grupos D y 2D presentaron unas concentraciones menores de glucógeno en el hígado a los 9 días (102 °C d) que a los 2 días de ayuno (24,3 °C d). Sin embargo, los peces del grupo 4D no presentaron diferencias entre grados día de ayuno, lo que podría indicar que debido a la frecuencia de alimentación previa al ayuno, las truchas de este grupo estaban más adaptadas a periodos con falta de alimento y movilizaron menos glucógeno desde el hígado o que los niveles iniciales de glucógeno en estos peces fueron menores.

El glucógeno muscular disminuyó en todos los grupos a las 24 horas *post-mortem*. En los peces del grupo 2D, las reservas de glucógeno muscular fueron

menores a los 9 días (102 °C d) que a los 2 días de ayuno (24,3 °C d), lo que puede estar relacionado con la gran disminución del contenido estomacal en este grupo con los grados día de ayuno. El glucógeno muscular sólo hace un pequeño aporte al gasto total de energía y se encuentra directamente relacionado con la actividad muscular, estando más relacionado con esta actividad que con el ayuno en sí mismo (Navarro y Gutiérrez, 1995). Sin embargo, este descenso en el grupo 2D también podría ser atribuido al ayuno, ya que hay autores que han visto un descenso en sus niveles con 2 días de ayuno en trucha arcoíris (Furné *et al.*, 2012) o 9 días de ayuno en trucha común (Navarro *et al.*, 1992).

A los 9 días de ayuno (102 °C d), las agallas presentaron una coloración más oscura (menor L\*) que a los 2 días de ayuno (24,3 °C d), independientemente de la frecuencia de alimentación, indicando una peor calidad respecto a la frescura de esos peces (Green 2011). Además, en base a nuestros resultados podemos destacar que la frecuencia de alimentación también influye sobre el color de las agallas, ya que en las truchas del grupo 4D se produjo un aumento de la saturación del color (mayor C\*) entre grados día de ayuno, presentando unas agallas más rojizas y amarillentas a los 9 días de ayuno. Este aumento de saturación en el color podría venir dado por el incremento de pigmentos amarillentos en las agallas, resultado de la reacción entre las proteínas y los lípidos oxidados, indicando un deterioro de la calidad (Dowlati *et al.*, 2013). Los peces del grupo D no mostraron diferencias en el color de las agallas entre grados día de ayuno, lo que sugiere que los peces del grupo 4D presentaron una mayor respuesta de estrés afectando al color de sus agallas y presentando una apariencia de menor frescura.

#### **5.2.4. Parámetros de calidad de canal y de carne**

El establecimiento del *rigor mortis* en la trucha arcoíris ocurre entre las 2 y las 9 horas *post-mortem*, alcanzándose la fase de *rigor* completo (máxima rigidez) a las 24 horas *post-mortem* (López-Luna *et al.*, 2014). En nuestro estudio, el ángulo del *rigor mortis* se vio incrementado en todos los grupos de las 0 a las 24 horas *post-mortem*, alcanzando en este momento una rigidez máxima con ángulos cercanos a 90 °. En general, el ángulo fue mayor a las 24 horas *post-mortem* en los animales sometidos a 9 días de ayuno (102 °C d) respecto a los ayunados durante 2 días (24,3 °C d) en todos los grupos. Esta situación puede ser explicada por los valores de pH más altos a los 9 días de ayuno en todos los grupos, que indican una evolución más

rápida del *rigor mortis* en estos peces (Love y Haq, 1970). Así, a las 24 horas *post-mortem*, mientras que los ayunados durante 2 días siguen en la fase de *rigor*, los peces sometidos a 9 días de ayuno ya han entrado en la fase de resolución del *rigor mortis*.

El pH muscular a las 24 horas *post-mortem* en la trucha arcoíris se encuentra en valores entre 6,5 (Lefevre *et al.*, 2008) y 7 (Robb *et al.*, 2000), siendo los valores de este estudio un poco inferiores (6,2-6,7). Entre 0 y 24 horas *post-mortem* se produjo un mayor descenso de pH en los peces sometidos a 2 días de ayuno (24,3 °C d) respecto a aquellos ayunados durante 9 días (102 °C d). Esto podría explicarse por los menores niveles de glucógeno muscular a las 0 horas *post-mortem* en los peces ayunados durante 9 días, que por consiguiente produjeron menos ácido láctico y una menor caída del pH muscular (Grigorakis *et al.*, 2003). Además, el pH a las 24 horas *post-mortem* fue mayor en todos los grupos a los 9 días que a los 2 días de ayuno, lo que se interpreta como una menor calidad de la carne.

En cuanto al color del músculo, tanto la luminosidad como el tono fueron independientes de los tratamientos estudiados (frecuencia de alimentación y grados día de ayuno), viéndose afectada únicamente la luminosidad por las horas *post-mortem*, con un músculo más brillante (mayor L\*) a las 24 horas *post-mortem* como resultado de la decoloración normal del músculo de los salmónidos con el tiempo (Robb *et al.*, 2000). De forma contraria, la saturación del color (C\*) del músculo se vio disminuida a las 24 horas *post-mortem* en todos los grupos, siendo mayor en el grupo D. Esta reducción se han descrito anteriormente por otros autores como Álvarez *et al.* (2008), quienes observaron en dorada una disminución de la saturación en el color del músculo tras 7 días de almacenamiento debida a una acidificación provocada por la glucólisis anaerobia. Además existen estudios en peces que explican que en el músculo de los peces, debido a la reducción del pH *post-mortem*, se produce una desnaturalización proteica y por consiguiente cambios en la reflexión de la luz sobre la superficie muscular, lo que da lugar a un cambio en la percepción de su color (Warris, 1996).

En general, la capacidad de retención de agua fue similar entre grados día de ayuno excepto en el grupo 4D, donde los peces presentaron una mayor CRA a los 2 días (24,3 °C d) que a los 9 días de ayuno (102 °C d). Roth *et al.* (2006) determinaron que un estímulo estresante actúa sobre las fibras musculares o las proteasas del tejido conectivo

liberando y acelerando la degeneración de la estructura del músculo en el salmón, disminuyendo su CRA. Este parámetro también se encuentra muy relacionado con el pH muscular, por lo que a medida que el pH desciende, la carga superficial neta de las proteínas musculares se reduce, causando su desnaturalización y la pérdida de CRA (Toldrá, 2003). Sin embargo, los peces del grupo 4D a los 9 días de ayuno (102 °C d) presentaron un pH muscular similar al resto de los grupos, por lo que otros factores además del pH podrían ser responsables de esta disminución de CRA.

Los peces de los grupos 2D y 4D y ayunados durante 9 días (102 °C d) presentaron una piel más oscura (menor  $L^*$ ), lo que se podría relacionar con una mayor respuesta de estrés producida por el ayuno en estos grupos a los 9 días de ayuno. En el grupo 2D se produjo además una disminución del parámetro  $C^*$ , que indica un color menos saturado. Sin embargo, en los peces del grupo D no hubo variación alguna en estos parámetros con los grados días de ayuno. Höglund *et al.* (2000) observaron que una respuesta de estrés provoca un marcado oscurecimiento de la piel en la trucha alpina debido al efecto dispersante de la ACTH sobre los cromatóforos (Fuji y Oshima, 1986) y un proceso similar también se ha confirmado en otras especies como el salmón (O'Connor *et al.*, 1999) y otros salmónidos como la trucha arcoíris (Abbott *et al.*, 1985). En base a estos estudios podemos contemplar el color de la piel como un índice de calidad de la canal útil en acuicultura, que se encuentra ligado a la respuesta de estrés producida por el manejo previo al sacrificio.

### ***5.2.5. Conclusiones parciales***

El ayuno pre-sacrificio es una práctica muy común en acuicultura como ya se ha descrito y provoca en la mayoría de las ocasiones una respuesta de estrés que causa un efecto negativo sobre el bienestar animal. Los resultados de este estudio tienen dos principales implicaciones prácticas respecto al bienestar animal en la trucha arcoíris.

Por un lado, hemos observado que diferentes frecuencias de alimentación pueden ser utilizados en las últimas semanas previas al sacrificio para habituar a los peces a diferentes periodos de ayuno, lo que reduce sus respuestas de estrés antes del sacrificio. Específicamente, las truchas pueden acostumbrarse a una alimentación en días alternos (2D) reduciendo la respuesta de estrés producida por un ayuno posterior de 2 días de duración (24,3 °C d) y por consiguiente presentando una mejor calidad de carne. Por otro lado, este estudio subraya que la respuesta de estrés producida por los

periodos de ayuno es dependiente de la temperatura y que ayunos superiores a 100 °C d parecen tener efectos negativos sobre el bienestar animal de la trucha arcoíris.

El estudio que se presenta en este capítulo tiene algunas limitaciones, ya que toma al pez como unidad experimental y no a la jaula. Esto podría tener implicaciones en la reproducibilidad de nuestros resultados, pero el utilizar más jaulas bajo unas condiciones comerciales no fue posible y probablemente habría creado densidades “poco naturales” y unas condiciones (para una granja comercial) con demasiados peces en un volumen reducido.

En conclusión, las truchas ayunadas durante 9 días (102 °C d) presentaron una mayor respuesta de estrés que aquellas sometidas a un ayuno de 2 días (24,3 °C d). Además, los peces alimentados una vez cada dos días (2D) mostraron una respuesta de estrés menor a los 2 días de ayuno, reflejado por los niveles inferiores de cortisol plasmático y el mayor peso al sacrificio. Por otro lado, una alimentación una vez cada cuatro días (4D) tuvo un efecto negativo sobre los indicadores de calidad, color de las agallas y de la piel, que podría asociarse con una respuesta de estrés mayor. Aunque nuestros resultados son contingentes a nuestras condiciones experimentales, sugieren que es posible una reducción del efecto del ayuno pre-sacrificio sobre la respuesta de estrés en la trucha arcoíris empleando distintas frecuencias de alimentación en el último mes de engorde. Esta información podría ser utilizada para mejorar el manejo en las explotaciones acuícolas y abre un nuevo campo de estudio donde más investigación es necesaria.

# **CAPÍTULO III**

## **EFECTO DEL AYUNO Y DEL DESPESQUE PRE-SACRIFICIO SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS Y LA CALIDAD DE LA CARNE**



### 5.3.1. *Parámetros biométricos*

El despesque previo al sacrificio no tuvo ningún efecto sobre los parámetros biométricos pero respecto al ayuno pre-sacrificio se observó un efecto significativo del mismo sobre todos los parámetros biométricos analizados excepto el peso al sacrificio. El coeficiente de condición corporal es un indicador más fiable que el peso al sacrificio a la hora de valorar el crecimiento de los peces, ya que tiene en cuenta también la longitud corporal del pez (Chatzifotis *et al.*, 2011), lo que podría explicar la falta de diferencias significativas debidas al ayuno en el peso al sacrificio pero sí presentes en este coeficiente, ya que un ayuno de 7 días (135,6 °C d) es suficiente para reducir este parámetro en la trucha arcoíris (Sumpter *et al.*, 1991; Pottinger *et al.*, 2003).

Tanto el contenido estomacal como el DSI fueron menores en las truchas ayunadas respecto a las no ayunadas y, por consiguiente, el rendimiento canal fue mayor en las truchas sometidas a ayuno por presentar un menor contenido estomacal. En nuestro caso, un ayuno de 135,6 °C d fue suficiente para reducir el contenido estomacal de forma considerable, apoyando la teoría de que el vaciado estomacal es un proceso muy dependiente de la temperatura en los peces (Usher *et al.*, 1991) y sólo hace falta un periodo de ayuno de 1 a 5 días para que se produzca un vaciado completo (Lines y Spence, 2012), confirmando lo observado en las pruebas anteriores. En cuanto al HSI, los animales ayunados durante 135,6 °C d presentaron un HSI menor que los no ayunados debido a una disminución del peso del hígado posiblemente por el uso de las reservas de glucógeno, principalmente, y otros metabolitos como lípidos o proteínas para mantener la homeostasis al enfrentarse a una situación de falta de alimento (Blasco *et al.*, 1992; McMillan y Houlihan, 1992; Soengas *et al.*, 1996; Davis y Gaylord, 2011). Respecto al efecto del despesque pre-sacrificio sobre el HSI podemos observar que no hubo diferencias entre aquellos peces sometidos a 20 min de ejercicio agudo durante el despesque y aquellos que no lo fueron. Esto podría ser debido a que los niveles de glucógeno hepático se mantuvieron similares en ambos grupos tras 20 min de despesque, por lo que podemos destacar que un ejercicio a corto plazo como el producido por despesque de los peces no disminuye los niveles de glucógeno hepático y, por tanto, el HSI.

### 5.3.2. *Parámetros hematológicos*

En general, los valores de cortisol plasmático en este estudio se encuentran en el rango de valores basales descritos en trucha arcoíris por otros autores (5-20 ng/ml; Pottinger *et al.*, 2003), excepto tras el despesque pre-sacrificio, donde se vieron aumentados a concentraciones superiores a las basales. Estos incrementos debidos al aumento de la actividad física se han descrito previamente por otros autores, ya que este factor desencadena una respuesta de estrés que produce una mayor liberación de cortisol a sangre (Parisi *et al.*, 2001; Poli *et al.*, 2005; Merkin *et al.*, 2010). En esta prueba además pudimos observar que en las truchas sometidas a despesque durante 20 min no hubo diferencias entre las sometidas a ayuno y las que no lo fueron, mientras que en los peces que no fueron sometidos a despesque presentaron valores superiores de cortisol aquellos no ayunados respecto a los ayunados. La falta de diferencias debidas al ayuno en los peces sometidos a 20 min de despesque se podría explicar como consecuencia a que el despesque por sí sólo ya genera una gran respuesta de estrés en los peces cuya magnitud va a ser indiferente del estado de ayuno previo. Por otro lado, en los peces no sometidos a despesque, el ayuno produjo una disminución del cortisol plasmático posiblemente debido a que estos peces estaban adaptados ya a la falta de alimento tras 135,6 °C d días de ayuno presentando una respuesta de estrés de tipo crónico y reduciendo su tasa metabólica (Olsen *et al.*, 2008; Hultmann *et al.*, 2012; Lines y Spence, 2012).

En los resultados de esta prueba observamos que el despesque previo al sacrificio incrementó los niveles de glucosa plasmáticos por encima de los niveles basales descritos en trucha arcoíris (70-90 mg/dl; Jentoft *et al.*, 2005). López-Patiño *et al.* (2014) observaron un incremento similar tras un estímulo estresante agudo relacionado con operaciones de manejo debido a un aumento de la gluconeogénesis para suministrar energía al organismo y mantener la homeostasis. Sin embargo, el ayuno no tuvo efecto sobre los niveles de glucosa en esta prueba, posiblemente debido a que a veces las concentraciones de glucosa se mantienen estables durante el ayuno al estimularse los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis (Caruso *et al.*, 2011). Además, la trucha arcoíris es una especie caracterizada por una baja utilización de los carbohidratos y una regulación endógena de la glucosa bastante fuerte (Panserat *et al.*, 2000). Por tanto, los resultados de esta prueba nos parecen

indicar que las truchas son capaces de mantener sus niveles de glucosa plasmáticos tras un ayuno de 135,6 °C d utilizando las reservas de glucógeno.

Las truchas sometidas a un ejercicio agudo de 20 min durante el despesque previo al sacrificio presentaron mayores concentraciones de lactato respecto a las que no fueron sometidas a ese despesque. Merkin *et al.* (2010) observaron que un ejercicio intenso en los peces incrementa el metabolismo anaeróbico en el músculo blanco a nivel de las fibras musculares rápidas glucolíticas, conduciendo a un incremento de los niveles de lactato plasmático. Además, otros autores han observado que un aumento de la actividad física previo al sacrificio de unos 15 min de duración produce un incremento de los niveles de glucosa y lactato en plasma (Olsen *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2008), como se ha observado en esta prueba sometiendo a los peces a 20 min de despesque. Aunque el lactato se encuentra más asociado con un estímulo estresante agudo como puede ser el despesque, también se puede ver afectado por el ayuno, ya que la falta de alimento puede modificar las jerarquías sociales o incrementar la agresividad de los peces (Blanco Cachafeiro, 1995). En este estudio los niveles de lactato fueron menores en las truchas ayunadas respecto a las no ayunadas, posiblemente por la utilización del mismo como sustrato para la gluconeogénesis hepática (Blasco *et al.*, 1992; Vijayan *et al.*, 1996; Polakof *et al.*, 2006)

Los niveles de triglicéridos en plasma fueron menores en las truchas sometidas a ayuno respecto a las no ayunadas, lo que indica que las reservas grasas disminuyeron con el ayuno de 135,6 °C d como se ha descrito en otros estudios (Costas *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). Sin embargo, no hubo un efecto significativo del despesque sobre los valores plasmáticos de triglicéridos, por lo que podemos suponer que un estrés agudo producido por un despesque de 20 minutos no es suficiente para disminuir las reservas grasas de los peces. Estudios previos en otras especies como la carpa también han observado la falta de variación de la concentración de triglicéridos en plasma frente a un estímulo estresante de tipo agudo (Li *et al.*, 2011b).

En cuanto a los niveles de la enzima CPK, fueron menores en aquellos peces sometidos a ayuno pero no sometidos a ejercicio previo al sacrificio que en el resto de los grupos, posiblemente debido a unas menores demandas metabólicas en estos peces (Evans y Watterson, 2009). Sin embargo, las truchas ayunadas pero sometidas después a un despesque de 20 min, presentaron unos niveles similares de CPK que las no

ayunadas, ya que el despesque puede provocar un estrés fisiológico en los peces incrementando los niveles plasmáticos de esta enzima, probablemente debido a un daño muscular que libera la CPK presente en el citoplasma de las células musculares a plasma (Shahsavani *et al.*, 2010; Peres *et al.*, 2013).

### **5.3.3. *Parámetros metabólicos***

El ayuno de 135,6 °C d produjo una disminución de los niveles de glucógeno hepático al ser utilizados por los peces para suministrar glucosa al organismo (Navarro y Gutiérrez *et al.*, 1995; Davis y Gaylord, 2011). Sin embargo no se encontró efecto del despesque sobre este parámetro, lo que concuerda con lo observado por Vijayan *et al.* (1997), quienes tras someter a truchas arcoíris a un estrés de manejo no encontraron una disminución de la concentración de glucógeno en el hígado. En otras especies si se ha descrito una reducción del glucógeno hepático pocos minutos después de un estímulo estresante, como es el caso de la perca (Schwalme y MacKay, 1991) o la lubina (Reubush y Heath, 1996), pero la trucha arcoíris es una especie que se caracteriza por una baja utilización de los carbohidratos (Panserat *et al.*, 2000), como se ha mencionado en puntos anteriores. La concentración de glucógeno en el músculo fue mayor a las 0 horas *post-mortem* en los peces sometidos a ayuno respecto a los no ayunados. Para enfrentar la situación de ayuno, los peces emplearon las reservas de glucógeno hepáticas sin modificar las concentraciones presentes en el músculo, cuya disminución se relaciona más con la actividad muscular (Navarro y Gutiérrez, 1995) y el aumento de estas reservas con el ayuno pudo ser debido a las menores concentraciones de cortisol plasmático que estimularon la síntesis de glucógeno muscular (Milligan, 2003). Sin embargo, el despesque de 20 min previo al sacrificio no fue lo suficientemente intenso como para modificar las reservas musculares de glucógeno.

Respecto al color del hígado, observamos un color más oscuro y con mayor saturación (menor L\* y h\* y mayor C\*) en las truchas sometidas a ayuno, posiblemente debido a una disminución de la concentración de lípidos en el hígado como se ha descrito en otras especies como los pollos broilers (Trampel *et al.*, 2005). Esta hipótesis se puede apoyar con los niveles más bajos de triglicéridos plasmáticos encontrados en las truchas sometidas a ayuno, que podrían indicar un mayor agotamiento de las reservas lipídicas en el hígado. Sin embargo, el despesque produjo un efecto contrario,

con un hígado más brillante y con un tono menor (mayor L\* y C\* y menor h\*) en las truchas sometidas a 20 min de despesque previamente al sacrificio. Merkin *et al.* (2010) observaron que el aumento de actividad física produce una respuesta de estrés en los peces que incrementa su actividad metabólica (menor presión parcial de O<sub>2</sub> y mayor presión parcial de CO<sub>2</sub>), lo que reduce el suministro sanguíneo al hígado pudiendo relacionarse con esta pérdida de tonalidad en el mismo.

#### **5.3.4. Parámetros de calidad de canal y de carne**

La evolución del *rigor mortis* se vio afectada de forma general en las distintas horas *post-mortem* por el ayuno y el despesque pre-sacrificio, siendo evidente este efecto a las 48 horas *post-mortem*, ya que mientras todos los grupos llegaron a la fase de *rigor* completo a la vez (24 horas *post-mortem*), la resolución del mismo a las 48 horas *post-mortem* fue más lenta en los peces sometidos a ayuno y despesque previo al sacrificio respecto a los no ayunados y no sometidos a ejercicio agudo durante el despesque, respectivamente, como también se puede observar en la menor diferencia en estos grupos entre los ángulos a 24 y 48 horas *post-mortem*. Esto pudo ser debido al tamaño de los peces, ya que aquellos sometidos a ayuno presentaron un coeficiente de condición corporal menor que los no ayunados y esto retrasa la resolución del *rigor* (Gokoglu y Yerlikaya, 2015). El propio ayuno y el despesque pre-sacrificio también pudieron haber provocado una resolución del *rigor mortis* más lenta al generar una respuesta de estrés alta (Zampacavallo *et al.*, 2015) y empeorando por tanto la calidad de la carne (Borderías y Sánchez-Alonso, 2011).

El pH muscular a las 0 horas *post-mortem* fue mayor en las truchas sometidas a ejercicio agudo durante el despesque respecto a las que no lo fueron. El aumento de la actividad física producido durante el despesque de los peces genera una actividad muscular que va a dar lugar a una glucogenolisis anaerobia que disminuye el pH muscular (Poli *et al.*, 2005), sin embargo, el despesque prolongado durante 20 min a los que fueron sometidos los peces hizo que los niveles de glucógeno muscular descendieran, aunque no de manera significativa, en los peces sometidos a ejercicio agudo previo al despesque y por tanto no hubiese suficiente conversión de glucógeno a ácido láctico para descender el pH (Bermejo-Poza *et al.*, 2015). Este proceso se vio más acentuado a las 48 horas *post-mortem* por el ayuno, que generó una mayor respuesta de estrés en las truchas sometidas a 20 min de despesque previo al sacrificio presentando

un pH muscular en este tiempo mayor que las no sometidas a ejercicio agudo previo al despesque.

El ayuno de 135,6 °C d al que fueron sometidas las truchas produjo una disminución de la luminosidad y la saturación del color del músculo, como se ha descrito en otros estudios en salmónidos sometidos a ayuno (Álvarez *et al.*, 2008). Esta pérdida de color se hizo mayor a las 24 horas *post-mortem*, ya que el tiempo de conservación influye en gran medida en el color del músculo, disminuyendo su intensidad a medida que avanza el tiempo de conservación (Mørkøre *et al.*, 2008). Estos cambios se vieron también producidos por el despesque pero sólo a nivel de la luminosidad, disminuyendo la misma con el despesque a las 0 horas *post-mortem* y aumentando a las 24 horas *post-mortem*, lo que podría estar relacionado con los cambios en el pH muscular que producen una desnaturalización proteica en las fibras musculares cambiando sus propiedades de refracción de la luz (Warris, 1996; Swatland, 2003).

Las truchas ayunadas durante 135,6 °C d presentaron un menor número de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) como producto de la oxidación de lípidos presentes en el músculo. Se ha visto en otras especies como la lubina que el ayuno hasta 72 horas genera una tendencia a incrementar los valores de TBARs debido a la oxidación lipídica (Álvarez *et al.*, 2008). En trucha arcoíris se ha descrito una disminución de los valores de TBARs tras 3 días de ayuno (Kamireddy *et al.*, 2011) y, en nuestro caso, el ayuno fue más prolongado, posiblemente agotando las reservas lipídicas presentes en el músculo y generando una menor oxidación por falta de lípidos

En cuanto a la composición en ácidos grasos del músculo, podemos observar que los ácidos grasos mayoritarios en ambos tiempos *post-mortem* (0 y 48 horas) fueron los ácidos grasos monoinsaturados y los poliinsaturados, debido a la capacidad de los peces de agua dulce, como la trucha arcoíris, de desaturar endógenamente los ácidos grasos saturados a ácidos grasos monoinsaturados (Tocher, 2003). Los ácidos grasos de mayor porcentaje fueron el C16:0 y el C18:1 n-9, indicando que estos son las principales fuentes de energía en la trucha arcoíris (Suárez *et al.*, 2014), seguidos de los ácidos grasos poliinsaturados C18:2 n-6 y C22:6 n-3, lo que confirma lo descrito por otros autores que observaron esta composición mayoritaria en ácidos grasos en el músculo de la trucha arcoíris (Bayraktar y Bayir, 2012; Suárez *et al.*, 2014; Taşbozan *et al.*, 2016).

La mayoría de los cambios destacables debido a los dos factores estudiados (ayuno y despesque pre-sacrificio) se produjeron a las 48 horas *post-mortem*.

Respecto a los ácidos grasos saturados podemos destacar que a las 48 horas *post-mortem* se observó un aumento del porcentaje total de ácidos grasos saturados. Jezierka *et al.* (1982) estudiaron el perfil de ácidos grasos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el músculo y observaron un aumento de los ácidos grasos saturados tras someterlas a 27 días de ayuno, causado por la disminución de los monoinsaturados, mientras que el contenido de los poliinsaturados se mantuvo constante, lo que está en consonancia con nuestros resultados. Concretamente, el porcentaje del ácido graso C16:0 fue mayor en las truchas ayunadas respecto a las no ayunadas, lo que concuerda con los datos obtenidos por Einen *et al.* (1998) en salmón atlántico tras someterlos a ayuno antes del sacrificio. El C18:0 mostró un descenso significativo en la proporción de este ácido graso en las truchas ayunadas y sometidas a despesque respecto al resto de los grupos. Sargent *et al.* (1997) observaron que los ácidos grasos saturados son generalmente considerados como sustratos para la producción de energía, de la misma forma que Penney y Moffit (2015), quienes estudiaron los perfiles de ácidos grasos en la trucha arcoíris durante las migraciones y observaron que la trucha arcoíris utiliza selectivamente los ácidos grasos saturados y los monoinsaturados. Sin embargo, Hazel y Sidel (2003) establecieron que la energía para el metabolismo aeróbico está administrada por el catabolismo de los ácidos grasos insaturados.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, la proporción total y de C18:1 n-9, ácido graso monoinsaturado mayoritario, estuvieron significativamente afectados por el ayuno pre-sacrificio las 48 horas *post-mortem*, siendo estas proporciones menores en las truchas sometidas a ayuno respecto de las no ayunadas. En este sentido, Sidell *et al.* (1995) observaron, a través de experimentos de competición de sustrato, que los tejidos tienen preferencia por el catabolismo de los ácidos grasos monoinsaturados, además sugieren que los ácidos grasos monoinsaturados son los más utilizados en el metabolismo energético, al igual que Tocher (2003), el cual indica que los ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga se pueden oxidar fácilmente ante situaciones de estrés, especialmente el C18:1 n-9, que se vio también disminuido debido al ejercicio agudo previo al despesque pre-sacrificio. El C17:1 y C22:1 n-9 disminuyeron en los animales sometidos a ayuno y a 20 min de ejercicio agudo previo

al despesque debido a la interacción del ayuno y despesque. Diversos estudios han mostrado un uso preferencial de los ácidos grasos monoinsaturados como fuente de energía. Ringø *et al.* (1990) no obtuvieron resultados significativos en músculo de la trucha alpina sometidas a 50 días de ayuno, no obstante, obtuvieron resultados significativos en el hígado, produciéndose una disminución del C22:1 n-9, el cual era utilizado como fuente de energía. En cambio, en el C16:1 n-9 y C18:1 n-7 se observó una proporción de estos ácidos grasos aumentados en las truchas sometidas a ayuno y ejercicio agudo previo al despesque. La utilización del C16:1 n-9, pero no del C18:1 n-7 ha sido observada anteriormente por Sargent *et al.* (1997) en larvas de trucha arcoíris sometidas a ayuno y también por Takeuchi y Watanabe (1982), que estudiaron el efecto del ayuno en el perfil de ácidos grasos de la trucha arcoíris.

En los salmónidos sometidos a ayuno, la oxidación de SFA y MUFA es más habitual que la de los PUFA. En las mitocondrias se produce la  $\beta$ -oxidación de los SFA y MUFA para la obtención de energía en la célula, siendo esta vía más complicada de ser realizada por los PUFA. Además, los ácidos grasos de cadena larga son oxidados más lentamente que los de cadena corta (Tocher, 2003). En líneas generales los resultados obtenidos muestran como los PUFA fueron conservados al someter a los animales a situaciones estresantes. Los PUFA estuvieron menos afectados por el ayuno y el despesque que los SFA y MUFA. Esto se debe a que los PUFA tienen funciones muy importantes en las membranas biológicas gracias a sus propiedades físicas únicas aportando fluidez a las membranas. Así en los estudios de Henderson y Tocher (1987) en peces sometidos a restricciones alimentarias, los ácidos grasos n-3 estuvieron menos afectados que los ácidos grasos monoinsaturados (C16:1, C18:1 n-9 y C20:1 n-9), que son movilizados para la producción de energía. Zengin *et al.* (2013) observaron como el ácido C22:6 n-3 era conservado, ya que se le atribuyen numerosas funciones fisiológicas, incorporándose en la retina o el cerebro. Sushick *et al.* (2007) también observaron como el C20:5 n-3 y C22:6 n-3 eran conservados antes del periodo reproductivo.

Los ácidos grasos que estuvieron afectados por el ayuno, el despesque o la interacción entre ambos factores fueron a las 0 horas *post-mortem* el C20:2 n-6, C20:3 n-6, C22:6 n-3 y C18:3 n-6, mientras que a las 48 horas *post-mortem* se vieron afectados el C18:2 n-6, C18:4 n-3, C20:4 n-6. Kiessling *et al.* (2005), en un estudio con salmones en el que compararon el perfil de ácidos grasos en salmones sometidos a

restricción alimentaria frente a otros alimentados con la ración máxima y sometidos a ejercicio, obtuvieron sólo resultados significativos en aquellos animales cuya ración era del 75% de la ración diaria, lo que sugiere que un incremento en la demanda de energía no es suficiente para evocar cambios en la composición, sino que debe de ser acompañado de una restricción en la alimentación. En este estudio los ácidos grasos más afectados por el ejercicio fueron los n-3, al igual que en nuestro estudio (C22:6 n-3). El aumento de la actividad física tiene efectos sobre la acción de determinadas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico. Magnoni y Weber (2007) observaron un aumento de la actividad en el músculo de la lipoproteína lipasa, en truchas arcoíris, sometidas a un ejercicio de resistencia, mientras que Morash *et al.* (2014) determinaron que truchas entrenadas tienen más altos los niveles de enzimas asociadas con el metabolismo aeróbico, sobre todo de la HOAD (hidroxacil CoA deshidrogenasa).

### ***5.3.5. Conclusiones parciales***

Someter a las truchas a un ayuno de 135,6 °C d produjo una disminución del coeficiente de condición corporal, la concentración de triglicéridos en plasma o el glucógeno hepático. Además se vieron afectados parámetros relacionados con la calidad de la carne importantes para el consumidor como la composición en ácidos grasos, afectándose en menor medida los PUFA debido a que los peces tienden a conservarlos por sus importantes funciones fisiológicas. Además se pudo observar que las diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos fueron debidas a los efectos del ayuno y del despesque sumados, siendo el primero el más importante, lo que sugiere que un incremento en la demanda de energía no es suficiente para evocar cambios en la composición de ácidos grasos sino está acompañado de una restricción en la alimentación.

Sin embargo, no pareció ser tan estresante para los peces como el someterlos durante 20 minutos a un despesque pre-sacrificio, que aumentó de manera significativa los niveles de cortisol, glucosa y lactato plasmáticos, indicando un efecto negativo sobre el bienestar animal. El estado metabólico de las truchas también se vio reflejado en el color del hígado, volviéndose más oscuro con el ayuno y más brillante frente al aumento de la actividad física producido por el despesque, lo que confirma a este parámetro como un buen indicador de bienestar animal para ser utilizado en peces, aunque son necesarios más estudios para determinar si la pérdida de luminosidad se debe a una

reducción en la concentración de lípidos en el hígado o a una reducción de la perfusión sanguínea. En vista a nuestros resultados podemos destacar que, independientemente del periodo de ayuno pre-sacrificio, parece indispensable reducir al mínimo el tiempo dedicado al despesque de los peces en el caso de la trucha arcoíris.

## **CONCLUSIONES**

---



## 6. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se han podido extraer las siguientes conclusiones que responden a los tres objetivos planteados inicialmente:

1. Un periodo de ayuno de 17,2-22,3 °C d durante el manejo pre-sacrificio en la trucha arcoíris nos permite obtener un vaciado total del aparato digestivo y a la vez nos aseguramos una menor respuesta de estrés con la consiguiente mejor calidad de la carne.
2. La respuesta de estrés generada por el ayuno pre-sacrificio en la trucha arcoíris se puede reducir mediante la modificación de la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde. En concreto, la frecuencia de alimentación “skip a day” o en días alternos es capaz de disminuir la respuesta de estrés generada por un ayuno de 2 días (24,3 °C d, cercano a los márgenes óptimos de duración para el ayuno pre-sacrificio comentados anteriormente) permitiendo a los productores acuícolas proporcionar un mejor bienestar animal a los peces.
3. El sistema de alimentación en días alternos o “skip a day” presenta además unos beneficios en la calidad de la carne de las truchas sometidas a este régimen alimenticio, ya que al reducir la respuesta de estrés producida por el ayuno se produce una caída del pH y una evolución del rigor mortis más adecuada para la obtención de una carne de mejor calidad.
4. Independientemente del periodo de ayuno pre-sacrificio, el despesque produce una gran respuesta de estrés en los peces durante el periodo pre-sacrificio, por lo que es indispensable reducir al mínimo el tiempo en que se lleva a cabo esta práctica.
5. Sin embargo, para que se produzcan cambios significativos en el perfil de ácidos grasos de la carne de trucha no es suficiente el incremento de la demanda energética producido por el ejercicio agudo durante el despesque, sino que la falta de alimento tiene un efecto mayor en este perfil, factor importante en la calidad de la carne de pescado para el consumidor.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Abbott, J., Dunbrack, R., Orr, C., 1985. The interaction of size and experience in dominance relationships of juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Behaviour*. 91, 241-253.
- Acerete, L., Reig, L., Alvarez, D., Flos, R., Tort, L., 2009. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 287, 139-144.
- Agrahari, S., Pandey, K.C., Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88, 268-272.
- Andersen, D.E., Reid, S.D., Moon, T.W., Perry, S.F., 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences*. 48, 1811-1817.
- Angus, L., Malcolmsen, L., Nicolson, S., Inkster, A., 1995. Improving the quality of farmed salmon by ike jime harvesting. *Fisheries Development Note*.
- Álvarez, A., García, B.G., Garrido, M., Hernández, M., 2008. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*. 284, 106-114.
- APROMAR, 2015. La acuicultura en España 2015. Disponible en: <http://www.apromar.es/content/la-acuicultura-en-españa-2015>.
- Armstrong, J.B., Schindler, D.E., 2011. Excess digestive capacity in predators reflects a life of feast and famine. *Nature*. 476, 84-87.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*. 104, 199-235.
- Azam, K., Mackie, I., Smith, J., 1989. The effect of slaughter method on the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during storage on ice. *International Journal of Food Science & Technology*. 24, 69-79.

- Azodi, M., Ebrahimi, E., Motaghi, E., Morshedi, V., 2015. Metabolic responses to short starvation and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ichthyological Research*. 62, 177-183.
- Azodi, M., Ebrahimi, E., Farhadian, O., Mahboobi-Soofiani, N., Morshedi, V., 2015. Compensatory growth response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum following short starvation periods. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 33, 928-933.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A., Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99, 1-6.
- Barcellos, L., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R., Ferreira, D., 2010. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 300, 231-236.
- Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes, T.B., Malison, J.A., 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*. 117, 351-363.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1, 3-26.
- Barton, B.A., Schreck, C.B., Fowler, L.G., 1988. Fasting and diet content affect stress-induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile chinook salmon. *The Progressive Fish-Culturist*. 50, 16-22.
- Bavčević, L., Klanjšček, T., Karamarko, V., Aničić, I., Legović, T., 2010. Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. *Aquaculture*. 301, 57-63.

- Bayraktar, K., Bayır, A., 2012. The effect of the replacement of fish oil with animal fats on the growth performance, survival and fatty acid profile of rainbow trout juveniles, *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 12, 661-666.
- Belanger, J., Son, J., Laugero, K., Moberg, G., Doroshov, S., Lankford, S., Cech, J., 2001. Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Aquaculture. 203, 165-176.
- Bennett, P.M., Weber, L.P., Janz, D.M., 2007. Comparison of Chloroform-Methanol-Extracted and Solvent-Free Triglyceride Determinations in Four Fish Species. Journal of aquatic animal health. 19, 179-185.
- Bermejo-Poza, R., De la Fuente, J., Pérez, C., Lauzurica, S., González, E., Diaz, M.T., Villarroel, M., 2015. The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout. Aquaculture. 443, 24-30.
- Bermejo-Poza, R., De la Fuente, J., Pérez, C., Lauzurica, S., González de Chávarri, E., Diaz, M.T., Villarroel, M., 2016. Reducing the effect of pre-slaughter fasting on the stress response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Welfare. 25, 339-346.
- Biswas, G., Jena, J., Singh, S., Patmajhi, P., Muduli, H., 2006. Effect of feeding frequency on growth, survival and feed utilization in mrigal, *Cirrhinus mrigala*, and rohu, *Labeo rohita*, during nursery rearing. Aquaculture. 254, 211-218.
- Blanco Cachafeiro, M.C., 1995. La trucha: cría industrial. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J., 1992. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. Journal of Comparative Physiology B. 162, 539-546.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology. 37, 911-917.

- Blom, S., Andersson, T.B., Förlin, L., 2000. Effects of food deprivation and handling stress on head kidney  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 48, 265-274.
- Bonga, S.W., 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*. 77, 591-625.
- Bonhomme, R., 2000. Bases and limits to using 'degree. day' units. *European journal of agronomy*. 13, 1-10.
- Boran, M., Köse, S., 2007. Storage properties of three types of fried whiting balls at refrigerated temperatures. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*. 7, 65-70.
- Borderías, A.J., Sánchez-Alonso, I., 2011. First processing steps and the quality of wild and farmed fish. *Journal of food science*. 76, R1-R5.
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatellis, A.G., 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1931-1937.
- Brown, J.A., Watson, J., Bourhill, A., Wall, T., 2010. Physiological welfare of commercially reared cod and effects of crowding for harvesting. *Aquaculture*. 298, 315-324.
- Caruso, G., Denaro, M.G., Caruso, R., Mancari, F., Genovese, L., Maricchiolo, G., 2011. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Marine environmental research*. 72, 46-52.
- Chaiyapechara, S., Liu, K.K., Barrows, F.T., Hardy, R.W., Dong, F.M., 2003. Proximate composition, lipid oxidation, and sensory characteristics of fillets from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed diets containing 10% to 30% lipid. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34, 266-277.

- Chatzifotis, S., Papadaki, M., Despoti, S., Roufidou, C., Antonopoulou, E., 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 316, 53-59.
- Cheng, Q., Sun, D.-W., 2008. Factors affecting the water holding capacity of red meat products: A review of recent research advances. *Critical reviews in food science and nutrition*. 48, 137-159.
- Chezik, K.A., Lester, N.P., Venturelli, P.A., 2013. Fish growth and degree-days I: selecting a base temperature for a within-population study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 71, 47-55.
- Chowdhury, M., Pane, E., Wood, C., 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 139, 163-173.
- Christiansen, D.C., Klungsøyr, L., 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 88, 701-711.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*. 267, 1244-1252.
- Commission Internationale de L'Eclairage CIE, 2004. Colorimetry. Central Bureau of CIE. Viena, Austria.
- Compassion in World Farming CIWF, 2009. The welfare of farmed fish. Disponible en: [http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm\\_docs/2009/f/farmed\\_fish\\_briefing\\_aug2009.pdf](http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2009/f/farmed_fish_briefing_aug2009.pdf).
- Concollato, A., Olsen, R.E., Vargas, S.C., Bonelli, A., Cullere, M., Parisi, G., 2016. Effects of stunning/slaughtering methods in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from death until *rigor mortis* resolution. *Aquaculture*. 464, 74-79.

- Consejo Europeo, 2005. Standing Committee of the European Convention for the Protection of animals kept for farming purposes: Recommendation concerning farmed fish. Disponible en: [http://www.coe.int/t/e/legal\\_affairs/legal\\_cooperation/biological\\_safety\\_and\\_use\\_of\\_animals/Farming/Rec%20fish%20E.asp](http://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/Farming/Rec%20fish%20E.asp).
- Cooke, S.J., Suski, C.D., 2005. Do we need species-specific guidelines for catch-and-release recreational angling to effectively conserve diverse fishery resources? *Biodiversity & Conservation*. 14, 1195-1209.
- Costas, B., Aragão, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Dinis, M.T., Mancera, J.M., Conceição, L.E., 2011. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. *Fish physiology and biochemistry*. 37, 495-504.
- Davis, K.B., Gaylord, T.G., 2011. Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 158, 30-36.
- Digre, H., Erikson, U., Misimi, E., Lambooi, B., Van De Vis, H., 2010. Electrical stunning of farmed Atlantic cod *Gadus morhua* L.: a comparison of an industrial and experimental method. *Aquaculture Research*. 41, 1190-1202.
- Dobšíková, R., Svobodová, Z., Blahová, J., Modrá, H., Velíšek, J., 2006. Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*. 75, 437-448.
- Dowlati, M., Mohtasebi, S.S., Omid, M., Razavi, S.H., Jamzad, M., De La Guardia, M., 2013. Freshness assessment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by machine vision based on gill and eye color changes. *Journal of Food Engineering*. 119, 277-287.
- Dreiling, C., Brown, D., Casale, L., Kelly, L., 1987. Muscle glycogen: Comparison of iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. *Meat Science*. 20, 167-177.

- Echevarría, G., Martínez-Bebíá, M., Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 118, 111-123.
- Einen, O., Thomassen, M.S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*. 169, 37-53.
- Einen, O., Waagan, B., Thomassen, M.S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Effects on weight loss, body shape, slaughter-and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture*. 166, 85-104.
- Eldridge, W.H., Sweeney, B.W., Law, J.M., 2015. Fish growth, physiological stress, and tissue condition in response to rate of temperature change during cool or warm diel thermal cycles. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 72, 1527-1537.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C.I., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*. 38, 163-188.
- Erikson, U., Digre, H., Misimi, E., 2011. Effects of perimortem stress on farmed Atlantic cod product quality: A baseline study. *Journal of food science*. 76, S251-S261.
- Erikson, U., Sigholt, T., Rustad, T., Einarsdottir, I., Jørgensen, L., 1999. Contribution of bleeding to total handling stress during slaughter of Atlantic salmon. *Aquaculture International*. 7, 101-115.
- Essén-Gustavsson, B., Karlström, K., Lundström, K., Pösö, R., 1993. Adenine nucleotide breakdown products in muscle at slaughter and their relation to meat quality in pigs with different halothane genotypes. *Proceedings of the 37<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Alemania*, pp. 348-348.

- European Food Safety Authority EFSA, 2008. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Animal Welfare. EFSA Journal. 796, 1-22.
- European Food Safety Authority EFSA, 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish: rainbow trout. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. EFSA Journal. 1013, 1-55.
- Evans, G.O., Watterson, C.L., 2009. General enzymology. In: Evans, G.O. (Ed.), Animal clinical chemistry, a practical guide for toxicologists and biochemical researchers, CRC Press, New York, EEUU, pp. 17-36.
- Falahatkar, B., 2012. The metabolic effects of feeding and fasting in beluga *Huso huso*. Marine environmental research. 82, 69-75.
- Farbridge, K., Leatherland, J., 1992. Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. 10, 245-257.
- Farmed Animal Welfare Council FAWC, 1996. Report on the Welfare of Farmed Fish. FAWC Report 2765, Surrey, United Kingdom.
- Farmed Animal Welfare Council FAWC, 2009. Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future. Disponible en: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/319292/Farm\\_Animal\\_Welfare\\_in\\_Great\\_Britain\\_-\\_Past\\_\\_Present\\_and\\_Future.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/319292/Farm_Animal_Welfare_in_Great_Britain_-_Past__Present_and_Future.pdf).
- Feidantsis, K., Pörtner, H.-O., Antonopoulou, E., Michaelidis, B., 2015. Synergistic effects of acute warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. Journal of Comparative Physiology B. 185, 185-205.

- Figueiredo-Garutti, M., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R., Moraes, G., Gutiérrez, J., Vicentini-Paulino, M., 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 132, 467-476.
- Fisheries Society of the British Isles (FSBI) (2002) Fish Welfare. *Briefing Report 2*. Disponible en: <http://www.fsbi.org.uk/assets/brief-welfare-refs.pdf> (Fecha de consulta: 6 Mayo 2016).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2010. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*, FAO, Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2011. *Desarrollo de la acuicultura. Enfoque ecosistémico a la acuicultura. Orientaciones técnicas de la FAO para la pesca responsable*, FAO, Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2012a. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*, FAO, Roma, Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2012b. *Cultured aquatic species information program*. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*, FAO, Roma, Italia.
- Foss, A., Imsland, A.K., Vikingstad, E., Stefansson, S.O., Norberg, B., Pedersen, S., Sandvik, T., Roth, B., 2009. Compensatory growth in Atlantic halibut: effect of starvation and subsequent feeding on growth, maturation, feed utilization and flesh quality. *Aquaculture*. 290, 304-310.
- Fujii, R., Oshima, N., 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. *Zoological science*. 3, 13-47.

- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M., Morales, A., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2009. Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*. 15, 587-595.
- Furné, M., Morales, A.E., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Rus, A.S., 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B*. 182, 63-76.
- Gatica, M., Monti, G., Knowles, T., Warriss, P., Gallo, C., 2010. Effects of commercial live transportation and preslaughter handling of Atlantic salmon on blood constituents. *Arch Med Vet*. 42, 73-78.
- Gaylord, I.G., Gatlin, D.M., 2000. Assessment of compensatory growth in channel catfish *Ictalurus punctatus* R. and associated changes in body condition indices. *Journal of the world Aquaculture Society*. 31, 326-336.
- Gill, T., 1992. Biochemical and chemical indices of seafood quality. In: Huss, H.H., Jacobsen, M., Liston, J. (Eds.), *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, pp. 377-388.
- Ginés, R., Palicio, M., Zamorano, M., Argüello, A., López, J., Afonso, J., 2002. Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture International*. 10, 379-389.
- Giuffrida, A., Pennisi, L., Ziino, G., Fortino, L., Valvo, G., Marino, S., Panebianco, A., 2007. Influence of slaughtering method on some aspects of quality of gilthead seabream and smoked rainbow trout. *Veterinary research communications*. 31, 437-446.
- Gokoglu, N., Yerlikaya, P., 2015. *Seafood Chilling, Refrigeration and Freezing: Science and Technology*. John Wiley & Sons.
- Grau, R., Hamm, R., 1957. Über das Wasserbindungsvermögen des Säugetiermuskels. II. Mitteilung. Über die Bestimmung der Wasserbindung des Muskels. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 105, 446-460.

- Greaser, M., 1986. Conversion of muscle to meat. In: Bechtel, P.J. (Ed.), Muscle as food, Academic Press, Orlando, EEUU, pp. 37-102.
- Green, D., Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U., 2011. Sensory evaluation of fish freshness and eating qualities. In: Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U. (Eds.), Handbook of seafood quality, safety and health application, Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, pp. 29-38.
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*. 272, 55-75.
- Grigorakis, K., Taylor, K., Alexis, M., 2003. Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*. 81, 263-268.
- Grutter, A., Pankhurst, N., 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*. 57, 391-401.
- Hagen, Ø., Solberg, C., 2010. Fasting of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) used as tool to improve fillet texture during the summer. *International journal of food science & technology*. 45, 2669-2673.
- Hanson, S., Olley, J., 1963. Application of Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates, *Biochemical Journal*. 89, 101-102.
- Hanssen, H., Imslund, A.K., Foss, A., Vikingstad, E., Bjørnevik, M., Solberg, C., Roth, B., Norberg, B., Powell, M.D., 2012. Effect of different feeding regimes on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 364, 298-304.
- Hardy, R.W., Lee, C.-s., 2010. Aquaculture feed and seafood quality. *Bulletin of Fisheries Research and Development Agency*. 31, 43-50.
- Hastein, T., 2004. Animal welfare issues relating to aquaculture. *Proceedings of the Global Conference on Animal Welfare: An OIE Initiative, Paris, Francia*, pp. 219-227.

- Haylor, G., Bland, S., 2001. Integrating aquaculture into rural development in coastal and inland areas. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P.B., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., Arthur, J.R. (Eds.), *Aquaculture in the third millennium*, FAO Technical Proceedings, Bangkok, Thailand, pp. 73-81
- Hazel, J.R., Prosser, C.L., 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological reviews*. 54, 620-677.
- Hazel, J., Sidell, B., 2004. The substrate specificity of hormone-sensitive lipase from adipose tissue of the Antarctic fish *Trematomus newnesi*. *Journal of Experimental Biology*. 207, 897-903.
- Henderson, R., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*. 49, 5-22.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in lipid research*. 26, 281-347.
- Hoglund, E., Balm, P., Winberg, S., 2000. Skin darkening, a potential social signal in subordinate arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of Experimental Biology*. 203, 1711-1721.
- Holloway, A., Reddy, P., Sheridan, M., Leatherland, J., 1994. Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol and glucose concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. *Biological Rhythm Research*. 25, 415-432.
- Hönikel, K.O., Fischer, C., 1977. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscles. *Journal of Food Science*. 42, 1633-1636.
- Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C., Chevalier, G., 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 22, 278-283.

- Hoseini, S., Yousefi, M., Rajabiesterabadi, H., Paktinat, M., 2014. Effect of short-term (0-72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*. 30, 569-573.
- Humane Slaughter Association HSA, 2005. Humane Harvesting of Salmon and Trout. Guidance notes no 5, HSA & CJA, Wheathampstead, United Kingdom.
- Huntingford, F.A., 2010. Exercise and welfare. Proceedings of the FitFish workshop on the swimming physiology of fish, Barcelona, España, p. 29.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S.M., 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*. 71, 194-204.
- Hultmann, L., Phu, T.M., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Rustad, T., 2012. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food chemistry*. 134, 1399-1408.
- Huss, H.H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical paper 348, Roma, Italia.
- Hutchings, J.A., Pickle, A., McGregor-Shaw, C., Poirier, L., 1999. Influence of sex, body size, and reproduction on overwinter lipid depletion in brook trout. *Journal of fish biology*. 55, 1020-1028.
- Ings, J.S., Servos, M.R., Vijayan, M.M., 2011. Exposure to municipal wastewater effluent impacts stress performance in rainbow trout. *Aquatic toxicology*. 103, 85-91.
- Innovación Sostenible de la Acuicultura Continental IS-AC, 2010. Trayectoria del sector de la acuicultura continental. Una mirada desde 1960 hasta 2010. Disponible en: [http://www.is-ac.es/attachments/098\\_Trayectoria%20del%20sector%20de%20la%20acuicultura%20continental.%201960-2010.pdf](http://www.is-ac.es/attachments/098_Trayectoria%20del%20sector%20de%20la%20acuicultura%20continental.%201960-2010.pdf).

- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in fishes. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The physiology of fishes*, Taylor and Francis, EEUU, pp. 319-342.
- Jeffrey, J., Gollock, M., Gilmour, K., 2014. Social stress modulates the cortisol response to an acute stressor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*. 196, 8-16.
- Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A., Andersen, Ø., 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 141, 353-358.
- Jones, H.A.C., Noble, C., Damsgård, B., Pearce, G.P., 2012. Investigating the influence of predictable and unpredictable feed delivery schedules upon the behaviour and welfare of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) using social network analysis and fin damage. *Applied Animal Behaviour Science*. 138, 132-140.
- Kamireddy, N., Jittinandana, S., Kenney, P., Slider, S., Kiser, R., Mazik, P., Hankins, J., 2011. Effect of dietary vitamin E supplementation and refrigerated storage on quality of rainbow trout fillets. *Journal of food science*. 76, 233-241.
- Kieffer, J., Tufts, B., 1998. Effects of food deprivation on white muscle energy reserves in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the relationships with body size and temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19, 239-245.
- Kieffer, J.D., 2000. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 126, 161-179.
- Kiessling, A., Pickova, J., Eales, J., Dosanjh, B., Higgs, D., 2005. Age, ration level, and exercise affect the fatty acid profile of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) muscle differently. *Aquaculture*. 243, 345-356.

- Kızak, V., Güner, Y., Türel, M., Kayım, M., 2013. Comparison of growth performance, gonadal structure and erythrocyte size in triploid and diploid brown trout (*Salmo trutta fario* L, 1758). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 13, 571-580.
- Kjær, M.A., Vegusdal, A., Berge, G.M., Galloway, T.F., Hillestad, M., Krogdahl, Å., Holm, H., Ruyter, B., 2009. Characterisation of lipid transport in Atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets. Aquaculture. 288, 325-336.
- Koed, A., 2001. The effects of meal size, body size and temperature on gastric evacuation in pikeperch. Journal of Fish Biology. 58, 281-290.
- Korhonen, R.W., Lanier, T.C., Giesbrecht, F., 1990. An evaluation of simple methods for following *rigor* development in fish. Journal of Food Science. 55, 346-348.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in lipid research. 46, 244-282.
- Laiz-Carrión, R., Viana, I.R., Cejas, J.R., Ruiz-Jarabo, I., Jerez, S., Martos, J.A., Eduardo, A.B., Mancera, J.M., 2012. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus* L. Aquaculture International. 20, 585-599.
- Le Cren, E., 1958. Observations on the growth of perch (*Perca fluviatilis* L.) over twenty-two years with special reference to the effects of temperature and changes in population density. The Journal of Animal Ecology, 287-334.
- Lefèvre, F., Bugeon, J., Aupérin, B., Aubin, J., 2008. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. Aquaculture. 284, 81-89.
- Li, X.-F., Tian, H.-Y., Zhang, D.-D., Jiang, G.-Z., Liu, W.-B., 2014. Feeding frequency affects stress, innate immunity and disease resistance of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. Fish & shellfish immunology. 38, 80-87.

- Li, Z.-H., Velisek, J., Grabic, R., Li, P., Kolarova, J., Randak, T., 2011a. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*. 83, 572-578.
- Li, D., Fu, C., Wang, Y., Zhu, Z., Hu, W., 2011b. The hematological response to exhaustive exercise in 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*. 311, 263-268.
- Liew, H.J., Sinha, A.K., Mauro, N., Diricx, M., Blust, R., De Boeck, G., 2012. Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 163, 327-335.
- Lines, J., Spence, J., 2012. Safeguarding the welfare of farmed fish at harvest. *Fish physiology and biochemistry*. 38, 153-162.
- López-Luna, J., Torrent, F., Villarroel, M., 2014. Fasting up to 34° C days in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has little effect on flesh quality. *Aquaculture*. 420, 63-70.
- López-Olmeda, J., Noble, C., Sánchez-Vázquez, F., 2012. Does feeding time affect fish welfare? *Fish physiology and biochemistry*. 38, 143-152.
- López-Patiño, M.A., Hernández-Pérez, J., Gesto, M., Librán-Pérez, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2014. Short-term time course of liver metabolic response to acute handling stress in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 168, 40-49.
- Love, R., Haq, M., 1970. The connective tissues of fish III. The effect of pH on gaping in cod entering *rigor mortis* at different temperatures. *International Journal of Food Science & Technology*. 5, 241-248.
- Love, R., Robertson, I., Smith, G., Whittle, K., 1974. The texture of cod muscle. *Journal of Texture studies*. 5, 201-212.

- Lowe, T., Ryder, J., Carragher, J., Wells, R., 1993. Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *Journal of Food Science*. 58, 770-773.
- Lund, V., Coleman, G., Gunnarsson, S., Appleby, M.C., Karkinen, K., 2006. Animal welfare science-Working at the interface between the natural and social sciences. *Applied Animal Behaviour Science*. 97, 37-49.
- Lymbery, P., Close, M., 2002. In too deep the welfare of intensively farmed fish a report for compassion in world farming trust. Disponible en: [http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm\\_docs/2008/i/in\\_too\\_deep\\_2001.pdf](http://www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/i/in_too_deep_2001.pdf)
- Magnoni, L., Weber, J.-M., 2007. Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *Journal of Experimental Biology*. 210, 4016-4023.
- Mancera, J.M., Vargas-Chacoff, L., García-López, A., Kleszczyńska, A., Kalamarz, H., Martínez-Rodríguez, G., Kulczykowska, E., 2008. High density and food deprivation affect arginine vasotocin, isotocin and melatonin in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 149, 92-97.
- Manor, M.L., Cleveland, B.M., Kenney, P.B., Yao, J., Leeds, T., 2015. Differences in growth, fillet quality, and fatty acid metabolism-related gene expression between juvenile male and female rainbow trout. *Fish physiology and biochemistry*. 41, 533-547.
- Maraschiello, C., Sárraga, C., Garcia Regueiro, J., 1999. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 47, 867-872.
- Marx, H., Brunner, B., Weinzierl, W., Hoffmann, R., Stolle, A., 1997. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung A*. 204, 282-286.

- Mattila, J., Koskela, J., Pirhonen, J., 2009. The effect of the length of repeated feed deprivation between single meals on compensatory growth of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture*. 296, 65-70.
- McMillan, D.N., Houlihan, D.F., 1992. Protein synthesis in trout liver is stimulated by both feeding and fasting. *Fish physiology and biochemistry*. 10, 23-34.
- Menezes, C., Ruiz-Jarabo, I., Martos-Sitcha, J.A., Toni, C., Salbego, J., Becker, A., Loro, V.L., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., Baldisserotto, B., 2015. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): a metabolic and endocrine approach. *Aquaculture*. 435, 257-264.
- Merkin, G.V., Roth, B., Gjerstad, C., Dahl-Paulsen, E., Nortvedt, R., 2010. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 309, 231-235.
- Metcalf, N.B., Thorpe, J.E., 1992. Anorexia and defended energy levels in overwintering juvenile salmon. *Journal of Animal Ecology*. 61, 175-181.
- Metón, I., Fernández, F., Baanante, I., 2003. Short-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 225, 99-107.
- Milano, E.G., Basari, F., Chimenti, C., 1997. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *General and comparative endocrinology*. 108, 483-496.
- Milligan, C.L., 2003. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Journal of experimental biology*. 206, 3167-3173.
- Millán-Cubillo, A.F., Martos-Sitcha, J.A., Ruiz-Jarabo, I., Cárdenas, S., Mancera, J.M., 2016. Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*. 451, 87-92.

- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9, 211-268.
- Montero, D., Robaina, L., Socorro, J., Vergara, J., Tort, L., Izquierdo, M., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiology and Biochemistry*. 24, 63-72.
- Morash, A.J., Vanderveken, M., McClelland, G.B., 2014. Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Frontiers in physiology*. 5, 452.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of lipid research*. 5, 600-608.
- Morrow, M.D., Higgs, D., Kennedy, C.J., 2004. The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 137, 143-154.
- Mørkøre, T., Tahirovic, V., Einen, O., 2008. Impact of starvation and handling stress on *rigor* development and quality of Atlantic salmon (*Salmon salar* L). *Aquaculture*. 277, 231-238.
- Nathanailides, C., Panopoulos, S., Kakali, F., Karipoglou, C., Lenas, D., 2011. Antemortem and postmortem biochemistry, drip loss and lipid oxidation of European sea bass muscle tissue. *Procedia Food Science*. 1, 1099-1104.
- Navarro, I., Gutierrez, J., 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes* vol. 4, Elsevier, Nueva York, EEUU, pp. 393-434.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., Planas, J., 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 102, 401-407.

- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th ed, WH Freeman and Co., New York, EEUU.
- Neuheimer, A.B., Taggart, C.T., 2007. The growing degree-day and fish size-at-age: the overlooked metric. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 64, 375-385.
- Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M., Karjalainen, J., 2004. Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture*. 235, 285-296.
- Nordgreen, J., Garner, J.P., Janczak, A.M., Ranheim, B., Muir, W.M., Horsberg, T.E., 2009. Thermonociception in fish: effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Applied Animal Behaviour Science*. 119, 101-107.
- O'Connor, K.I., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Animal Behaviour*. 58, 1269-1276.
- Okawara, Y., Ko, D., Morley, S.D., Richter, D., Lederis, K.P., 1992. In situ hybridization of corticotropin-releasing factor-encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker, *Catostomus commersoni*. *Cell and tissue research*. 267, 545-549.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Ringø, E., 2005. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*. 250, 480-495.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G.-I., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Ringø, E., 2002. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish physiology and biochemistry*. 26, 211-221.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Ringø, E., Myklebust, R., Hemre, G.-I., Hansen, T., Karlsen, Ø., 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 280, 232-241.

- Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, 2015. Aquatic Animal Health Code. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea>.
- Oyedeki, J., Atteh, J., 2005. Response of broilers to feeding manipulations. *International Journal of Poultry Science*. 4, 91-95.
- Panserat, S., Médale, F., Breque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of nutritional biochemistry*. 11, 22-29.
- Palmeri, G., Turchini, G.M., Marriott, P.J., Morrison, P., De Silva, S.S., 2009. Biometric, nutritional and sensory characteristic modifications in farmed Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) during the purging process. *Aquaculture*. 287, 354-360.
- Palstra, A.P., Planas, J.V., 2011. Fish under exercise. *Fish Physiology and Biochemistry*. 37, 259-272.
- Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Zampacavallo, G., Poli, B., 2001. Fish welfare and quality: experimental results on rearing and harvesting practices. In: *Proceedings of the Third Congress of the European Society for Agricultural and Food Ethics "Food Safety, Food Quality and Food Ethics"*, Florencia, Italia, pp. 3-5.
- Pate, E.F., Brokaw, C.J., 1980. Cross-bridge behaviour in *rigor*-muscle. *Biophysics of Structure & Mechanism*. 7, 51-54.
- Penney, Z., Moffitt, C., 2015. Fatty-acid profiles of white muscle and liver in stream-maturing steelhead trout *Oncorhynchus mykiss* from early migration to kelt emigration. *Journal of fish biology*. 86, 105-120.
- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A., 2013. Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*. 29, 630-636.

- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A., 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish physiology and biochemistry*. 40, 1339-1347.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*. 265, 325-335.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M., García-Alcázar, A., Abellán, E., Morales, A., 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish physiology and biochemistry*. 38, 1145-1157.
- Peterson, B.C., Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic animal endocrinology*. 26, 231-240.
- Pickering, A., Pottinger, T., 1995. Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 5, 349-379.
- Pickering, A.D., 1998. Stress responses of farmed fish. In: Black, K.D., Pickering, A.D. (Eds.), *Biology of farmed fish*, Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom, pp. 222-255.
- Pickering, A.D., Christie, P., 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. *General and comparative endocrinology*. 44, 487-496.
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Del Río, M.P.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology B*. 176, 441-452.
- Poli, B.M., 2009. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science*. 8, 139-160.

- Poli, B.M, Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G., 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*. 13, 29-49.
- Poli, B.M, Parisi, G., Zampacavallo, G., Scappini, P., De Francesco, M., 2003. The effect of slaughter methods on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) behaviour, *rigor* onset, plasmatic and tissue stress indexes and quality. Proceedings of the First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference, Reykjavik, Islandia, pp. 11-14.
- Pottinger, T., 2001. Effects of husbandry stress on flesh quality indicators in fish. In: Kestin, S.C., Warriss, P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science, London, United Kingdom, pp. 145-160.
- Pottinger, T., Moran, T., 1993. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology*. 43, 121-130.
- Pottinger, T., Carrick, T., 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and comparative endocrinology*. 116, 122-132.
- Pottinger, T., Rand-Weaver, M., Sumpter, J., 2003. Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 136, 403-417.
- Rasoarahona, J.R., Barnathan, G., Bianchini, J.-P., Gaydou, E.M., 2005. Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and *Tilapia rendalli*) from Madagascar. *Food Chemistry*. 91, 683-694.
- Reddy, P.K., Leatherland, J.F., 1988. Stress Physiology. In: Leatherland, J.F., Woo, P.T.K. (Eds.), *Fish Diseases Volume III: Non-infectious disorders*, C.A.B. International, Guelph, Canadá, pp. 279-302.

- Reddy, P., Vijayan, M., Leatherland, J., Moon, T., 1995. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? *Journal of fish biology*. 46, 341-359.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Laroche, M., Kaushik, S., 2001. Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture*. 193, 325-345.
- Řehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 190, 27-47.
- Reubush, K., Heath, A., 1996. Metabolic responses to acute handling by fingerling inland and anadromous striped bass. *Journal of fish biology*. 49, 830-841.
- Ribas, L., Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B., Tort, L., 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. *Aquaculture*. 269, 250-258.
- Ringø, E., Andreassen, T.V., Burkow, I.C., 1990. Effects of starvation on the lipid composition in muscle tissue and liver of hatchery-reared Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L), from lake Takvatn. *Fiskeridirektoratets Skrifter. Serie Ernæring*. 3, 13-20.
- Robb, D., Kestin, S., 2002. Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Animal welfare*. 11, 269-282.
- Robb, D.H., 2008. Welfare of fish at harvest. *Fish welfare*, 217-242.
- Rodríguez, A., Castelló-Orvay, F., Gisbert, E., 2009. Somatic growth, survival, feed utilization and starvation in European elver *Anguilla anguilla* (Linnaeus) under two different photoperiods. *Aquaculture Research*. 40, 551-557.
- Rose, J.D., 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science*. 10, 1-38.
- Rossi, A., Cazenave, J., Bacchetta, C., Campana, M., Parma, M.J., 2015. Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) during starvation. *Ecological Indicators*. 56, 161-170.

- Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J., 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on *rigor mortis* and the physical properties of flesh. *Aquaculture*. 257, 504-510.
- Sáez, M.I., Navarro, G., García-Mesa, S., Martínez, T.F., García-Gallego, M., Suárez, M.D., 2013. Influence of pre-slaughtering feed restriction on muscle characteristics of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 2323-2330.
- Sánchez, J., López-Olmeda, J., Blanco-Vives, B., Sánchez-Vázquez, F., 2009. Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiology & Behavior*. 98, 125-129.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish & shellfish immunology*. 28, 296-302.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Láiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín Del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2005. Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 303, 761-775.
- Sargent, J., McEvoy, L., Bell, J., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*. 155, 117-127.
- Schreer, J.F., Cooke, S.J., McKinley, R., 2001. Cardiac response to variable forced exercise at different temperatures: an angling simulation for smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*. 130, 783-795.
- Schwalme, K., Mackay, W.C., 1991. Mechanisms that elevate the glucose concentration of muscle and liver in yellow perch (*Perca flavescens* Mitchill) after exercise-handling stress. *Canadian journal of zoology*. 69, 456-461.

- Secci, G., Parisi, G., 2016. From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*. 15, 124-136.
- Shahsavani, D., Mohri, M., Kanani, H.G., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. *Fish physiology and biochemistry*. 36, 39-43.
- Sharpe, P.J., DeMichele, D.W., 1977. Reaction kinetics of poikilotherm development. *Journal of Theoretical Biology*. 64, 649-670.
- Shearer, K.D., 2001. The effect of diet composition and feeding regime on the proximate composition of farmed fishes. In: Kestin, P.D., We, S.C. (Eds.), *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science, London, United Kingdom, pp. 31-41.
- Shearer, G.C., Savinova, O.V., Harris, W.S., 2012. Fish oil-how does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821, 843-851.
- Shi, G.C., Dong, X.H., Chen, G., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquaculture Research*. 46, 658-668.
- Sidell, B.D., Crockett, E.L., Driedzic, W.R., 1995. Antarctic fish tissues preferentially catabolize monoenoic fatty acids. *Journal of Experimental Zoology*. 271, 73-81.
- Simontacchi, C., Poltronieri, C., Carraro, C., Bertotto, D., Xiccato, G., Trocino, A., Radaelli, G., 2008. Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Journal of Fish Biology*. 72, 747-752.
- Small, B.C., 2005. Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 142, 217-223.
- Sneddon, L.U., 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*. 83, 153-162.

- Sneddon, L.U., Braithwaite, V.A., Gentle, M.J., 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270, 1115-1121.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W., 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 291, R810-R821.
- Stien, L.H., Hirmas, E., Bjørnevik, M., Karlsen, Ø., Nortvedt, R., Rørå, A.M.B., Sunde, J., Kiessling, A., 2005. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture research*. 36, 1197-1206.
- Suarez, M., Garcia-Gallego, M., Trenzado, C., Guil-Guerrero, J., Furne, M., Domezain, A., Alba, I., Sanz, A., 2014. Influence of dietary lipids and culture density on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) flesh composition and quality parameter. *Aquacultural Engineering*. 63, 16-24.
- Sumpter, J.P., 1997. *Society for Experimental Biology. Seminar Series*. 62, 73-94.
- Sumpter, J., Le Bail, P., Pickering, A., Pottinger, T., Carragher, J., 1991. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*. 83, 94-102.
- Suski, C.D., Killen, S.S., Cooke, S.J., Kieffer, J.D., Philipp, D.P., Tufts, B.L., 2004. Physiological significance of the weigh-in during live-release angling tournaments for largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*. 133, 1291-1303.
- Swatland, H., 2003. Ellipsometry across isolated muscle fibres indicates a refractive contribution to paleness in pork. *Meat science*. 63, 463-467.
- Takahashi, L., Biller, J., Criscuolo-Urbinati, E., Urbinati, E.C., 2011. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 95, 259-266.

- Takeuchi, T., Watanabe, T., 1982. Effects of starvation and environmental temperature on proximate and fatty acid compositions of carp and rainbow trout [Feeding, starvation physiology]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*.
- Taşbozan, O., Gökçe, M.A., Erbaş, C., 2016. The effect of different growing conditions to proximate composition and fatty acid profiles of rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Animal Research*. 44, 442-445.
- Thomas, P., Pankhurst, N., Bremner, H., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 54, 1177-1196.
- Thorup, J., 1963. Growth and life-cycle of invertebrates from Danish springs. *Hydrobiologia*. 22, 55-84.
- Tian, X., Qin, J.G., 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*. 224, 169-179.
- Toldrá, F., 2003. Muscle foods: water, structure and functionality. *Food science and technology international*. 9, 173-177.
- Trampel, D., Sell, J., Ahn, D., Sebranek, J., 2005. Preharvest feed withdrawal affects liver lipid and liver color in broiler chickens. *Poultry science*. 84, 137-142.
- Trenzado, C., Carrick, T., Pottinger, T., 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and comparative endocrinology*. 133, 332-340.
- Tseng, Y.-C., Lee, J.-R., Chang, J.C.-H., Kuo, C.-H., Lee, S.-J., Hwang, P.-P., 2008. Regulation of lactate dehydrogenase in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gills during acclimation to salinity challenge. *Zool Stud*. 47, 473-480.
- Usher, M., Talbot, C., Eddy, F., 1991. Effects of transfer to seawater on growth and feeding in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 94, 309-326.
- Velarde, A., Dalmau, A., 2012. Animal welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from inputs to outputs. *Meat science*. 92, 244-251.

- Venugopal, V., Shahidi, F., 1996. Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*. 12, 175-197.
- Vijayan, M., Moon, T., 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49, 2260-2266.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Forsyth, R.B., Kennedy, C.J., Iwama, G.K., 1997. Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with  $\beta$ -naphthoflavone. *Life sciences*. 61, 117-127.
- Vijayan, M., Morgan, J., Sakamoto, T., Grau, E., Iwama, G., 1996. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. *Journal of Experimental Biology*. 199, 2467-2475.
- Vijayan, M.M., Aluru, N., Maule, A.G., Jørgensen, E.H., 2006. Fasting augments PCB impact on liver metabolism in anadromous arctic char. *Toxicological Sciences*. 91, 431-439.
- Villarroel, M., Alavriño, J.M.R., López-Luna, J., 2011. Effect of feeding frequency and one day fasting on tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water quality. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 63, 1-6.
- Wall, A., 2001. Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. *Farmed fish quality*. Blackwell Science. Bristol, England, 108-119.
- Wang, Y., Li, C., Qin, J.G., Han, H., 2009. Cyclical feed deprivation and refeeding fails to enhance compensatory growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture research*. 40, 204-210.
- Warriss, P., 1996. Instrumental measurement of colour. in: Taylor, S.A., Raimundo, A., Severini, M., Smulders, F.J.M., (Eds.), *Meat quality and meat packaging*, ECCEAMST, Utrecht, Países Bajos, pp. 221–231.
- Watabe, S., Kamal, M., Hashimoto, K., 1991. Postmortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. *Journal of Food Science*. 56, 151-153.

- Weber, J.M., 2010. Fuel metabolism: How do fish cope with exercise and hypoxia? Proceedings of the FitFish workshop on the swimming physiology of fish, Barcelona, España, p. 18.
- Weber, T.E., Bosworth, B.G., 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture*. 246, 483-492.
- Wedemeyer, G., 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Wierbicki, E., Deatherage, F.E., 1958. Determination of water-holding capacity of fresh meats. *Agricultural and Food Chemistry*. 6, 387-392.
- Wunderink, Y.S., Engels, S., Halm, S., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., Flik, G., Klaren, P.H., Mancera, J.M., 2011. Chronic and acute stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): the involvement of cortisol, CRH and CRH-BP. *General and comparative endocrinology*. 171, 203-210.
- Xie, F., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Ma, H., 2011. The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae. *Aquaculture*. 311, 162-167.
- Xie, S., Zhu, X., Cui, Y., Wootton, R.J., Lei, W., Yang, Y., 2001. Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Journal of Fish Biology*. 58, 999-1009.
- Yildiz, M., Şener, E., Gün, H., 2006. Effect of refrigerated storage on fillet lipid quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed a diet containing different levels of DL  $\alpha$ -tocopherol acetate. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 30, 143-150.
- Yildiz, M., Köse, İ., Issa, G., Kahraman, T., 2015. Effect of different plant oils on growth performance, fatty acid composition and flesh quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 46, 2885-2896.

- Zampacavallo, G., Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Giorgi, G., Poli, B.M., 2015. Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. *Journal of food science and technology*. 52, 2585-2597.
- Zengin, H., Vural, N., Çelik, V.K., 2013. Comparison of Changes in Fatty Acid Composition of Starved and Fed Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 13, 397-405.
- Zhu, X., Cui, Y., Ali, M., Wootton, R.J., 2001. Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. *Journal of Fish Biology*. 58, 1149-1165



# **ANEXO I: ABREVIATURAS**

---



**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa

**ADP:** Adenosín difosfato

**AMP:** Adenosín monofosfato

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BHT:** Butil hidroxitolueno

**CC:** Coeficiente de condición corporal

**CIWF:** Compassion in World Farming

**CPK:** Enzima creatin fosfoquinasa

**CRA:** Capacidad de retención de agua

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina

**DHA:** Ácido graso docosahexaenoico (C22:6 n-3)

**DSI:** Índice digestivo-somático

**EDTA:** Ácido etilendiamintetraacético

**EFSA:** European Food Safety Authority

**elong:** Enzimas elongasas

**EPA:** Ácido graso eicosapentaenoico (C20:5 n-3)

**ETSIM:** Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

**FAWC:** Farm Animal Welfare Council

**FFA:** Ácidos grasos libres

**G6P:** Enzima glucosa 6-fosfatasa

**G6PDH:** Enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

**GDH:** Enzima glutamato deshidrogenasa

**GK:** Enzima glicerol quinasa

**GM:** Glucógeno muscular

**GNS:** Enzima glutamina sintetasa

**GOD:** Enzima glucosa oxidasa

**GP:** Enzima glucógeno fosforilasa

**GPO:** Enzima glicerofosfato oxidasa

**Grados día:** °C d

**GS:** Enzima glucógeno sintetasa

**HOAD:** 3-hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa

**HPI:** Eje hipotálamo-pituitaria-interrenal

**HRPO:** Peroxidasa de rábano picante

**HSA:** Humane Slaughter Association

**HSI:** Índice hepatosomático

**Hx:** Hipoxantina

**I/A:** Ratio IMP/ATP

**IMP:** Inosina monofosfato

**Ino:** Inosina

**LCFA:** Ácidos grasos de cadena larga

**LDH:** Enzima lactato deshidrogenasa

**LO:** Enzima lactato oxidasa

**LPL:** Enzima lipoproteinlipasa

**MDA:** Malondialdehído

**MUFA:** Ácidos grasos monoinsaturados

**n-3:** Ácidos grasos omega-3

**n-6:** Ácidos grasos omega-6

**OIE:** Organización Internacional para la salud animal

**PBS:** Tampón fosfato

**PEP:** Fosfoenolpiruvato

**PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

**POD:** Enzima peroxidasa

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados

**RM:** *Rigor mortis*

**SFA:** Ácidos grasos saturados

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico

**TBARs:** Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TMB:** Tetrametilbenzidina

**Xa:** Xantina



# **ANEXO II: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES**

---



**The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout**

**Artículo publicado en: Aquaculture**

**Factor de impacto: 1.893 (Q1)**

**Categoría: Fisheries**

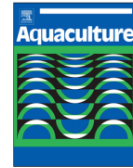
**DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.007**





Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)

## The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout



R. Bermejo-Poza <sup>a,\*</sup>, J. De la Fuente <sup>a</sup>, C. Pérez <sup>b</sup>, S. Lauzurica <sup>a</sup>, E. González <sup>a</sup>, M.T. Diaz <sup>c</sup>, M. Villarroel <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Production, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Animal Physiology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Food Technology, INIA, Ctra. La Coruña, Km 7500, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Animal Production, College of Agronomics Engineering, Polytechnic University of Madrid, Avenida Complutense 3, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 July 2014

Received in revised form 2 March 2015

Accepted 11 March 2015

Available online 18 March 2015

#### Keywords:

Fasting

Glycogen

Flesh quality

Degree-days

Fish welfare

Skip a day

### ABSTRACT

Pre-slaughter fasting, usually measured in days, helps to empty the digestive system but less is known about its effect on fish welfare or flesh quality. We evaluated the combined effects of fasting (measured in degree-days, °C d), preceded by intermittent feeding in the last month of production, on the flesh quality rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Trout (n = 240) were fed the same total amount of food either daily (D), once every two days (2D) or once every four days (4D) for one month, and then fasted for 24.3 °C d (2 days) or 102 °C d (9 days). There was a significant interaction between the effects of intermittent feeding and pre-slaughter fasting for most of the parameters measured. Slaughter weight was higher in 2D and 4D trout after two days of fasting, probably since they had more feed in their stomachs. Muscle glycogen and the hepato-somatic index were also higher in 2D trout after 2 days of fasting, suggesting higher energy reserves. There was no interaction between the effects of intermittent feeding and fasting on final muscle pH which was higher after 9 days of fasting, indicating poorer flesh quality. Overall, the results suggest that trout that received a skip-a-day feeding schedule one month before slaughter, adapt better to a two day fast than trout fed daily or once every four days.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ethical and sustainable aquaculture involves considering fish welfare, but there is little information about the effect of some routine handling procedures on trout welfare, despite its being one of the most produced species in Europe (176.983 metric tons in 2012; APROMAR, 2013). One example of the effects of a routine procedure which we know little about is fasting, which is performed under several different situations including size classification and pre-slaughter handling. Fasting prior to slaughter empties the gut and decreases oxygen demand and waste production (Robb, 2008). It also reduces the amount of feed and feces in the digestive system, so spoilage is delayed and digestive enzyme activity is reduced after *rigor mortis* is resolved. However, fasting may also increase stress levels and if these levels are high enough, it affects the onset and release of *rigor mortis*, which determines the duration of fish freshness (Poli et al., 2005).

The duration of fasting necessary to empty the gut is species and water temperature dependent but may be expected to be from one to five days. Previous authors have suggested that food withdrawal during that period is unlikely to cause significant welfare problems (Lines and Spence, 2012; López-Luna et al., 2013). In commercial practice there are

no strict rules controlling the time of pre-slaughter fasting. However, the Farm Animal Welfare Council (FAWC, 1996) suggests 48 h of fasting as a maximum for trout and the Compassion in World Farming (CIWF, 2009) suggests a maximum of 72 h. The European Food Safety Authority (EFSA, 2008) recommends not fasting rainbow trout for over 50 °C d (degree-days). Apart from assessing time limits (in days or hours), it is important to set acceptable ranges in terms of degree-days (López-Luna et al., 2014). In aquaculture, degree-days are used to estimate the amount of time needed for different stages of growth, such as incubating eggs, breeding or fattening (From and Rasmussen, 1992). Some authors have analyzed the effect of short term fasting (up to 65 °C d) on flesh quality (López-Luna et al., 2014) but few studies have considered the effect of feeding in the last month of fattening on pre-slaughter fasting stress and product quality or compared extremes of fasting in terms of degree-days (for example 20 °C days vs. values over 65 °C days).

Much research has been performed on the effect of feeding frequency on fish stress (e.g., Cañon Jones et al., 2012), but less is known about the effects of short intermittent feeding in the last part of fattening on the subsequent response to pre-slaughter fasting. According to Armstrong and Schindler (2011), in the wild, most carnivorous fish eat once every two days. This suggests that feeding once every two days might be acceptable for trout physiologically, like the skip-a-day systems commonly used in poultry (Oyededeji and Atteh, 2005) and tested on other

\* Corresponding author. Tel.: +34 616858629.

E-mail address: [rbermejo@ucm.es](mailto:rbermejo@ucm.es) (R. Bermejo-Poza).



**Reducing the effect of pre-slaughter fasting on  
the stress response of rainbow trout  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

**Artículo publicado en: Animal Welfare**

**Factor de impacto: 1.314 (Q2)**

**Categoría: Veterinary Sciences**

**DOI: 10.7120/09627286.25.3.339**



© 2016 Universities Federation for Animal Welfare  
The Old School, Brewhouse Hill, Wheathampstead,  
Hertfordshire AL4 8AN, UK  
[www.ufaw.org.uk](http://www.ufaw.org.uk)

*Animal Welfare* 2016, 25: 339-346  
ISSN 0962-7286  
doi: 10.7120/09627286.25.3.339

## Reducing the effect of pre-slaughter fasting on the stress response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

R Bermejo-Poza<sup>\*†</sup>, J De la Fuente<sup>†</sup>, C Pérez<sup>‡</sup>, S Lauzurica<sup>†</sup>, E González de Chávarri<sup>†</sup>,  
MT Díaz<sup>§</sup> and M Villarroya<sup>#</sup>

<sup>†</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

<sup>‡</sup> Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

<sup>§</sup> Departamento de Tecnología Alimentaria, INIA, Ctra La Coruña, Km 7500, 28040, Madrid, Spain

<sup>#</sup> Departamento de Producción Agraria, Escuela de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica, Avenida Complutense 3, 28040, Madrid, Spain

\* Contact for correspondence and requests for reprints: [rbermejo@ucm.es](mailto:rbermejo@ucm.es)

### Abstract

Fasting is commonly used in aquaculture to empty the gut before slaughter, but little is known about how feeding frequency before fasting affects the stress response of trout. To find out more, 240 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were separated into three groups with different feeding schedules during the final month of fattening, from 26 September to 28 October 2013 (daily, every two days or every four days) and two durations of pre-slaughter fasting (two days of fasting; 24.3 degree days, to nine days of fasting; 102 degree days). After slaughter, a number of stress-related parameters were measured, such as liver glycogen, skin/gill colour and haematological parameters (cortisol, glucose, lactate, triglycerides, lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase). Trout given food every two days on the farm had lower levels of cortisol and higher levels of triglycerides and liver glycogen than the other treatments after two days of fasting; indicating that habituating trout to feed once every two days in the final month of fattening lowered their stress response to two days of fasting before slaughter.

**Keywords:** animal welfare, cortisol, fasting, glycogen, rainbow trout, stress response

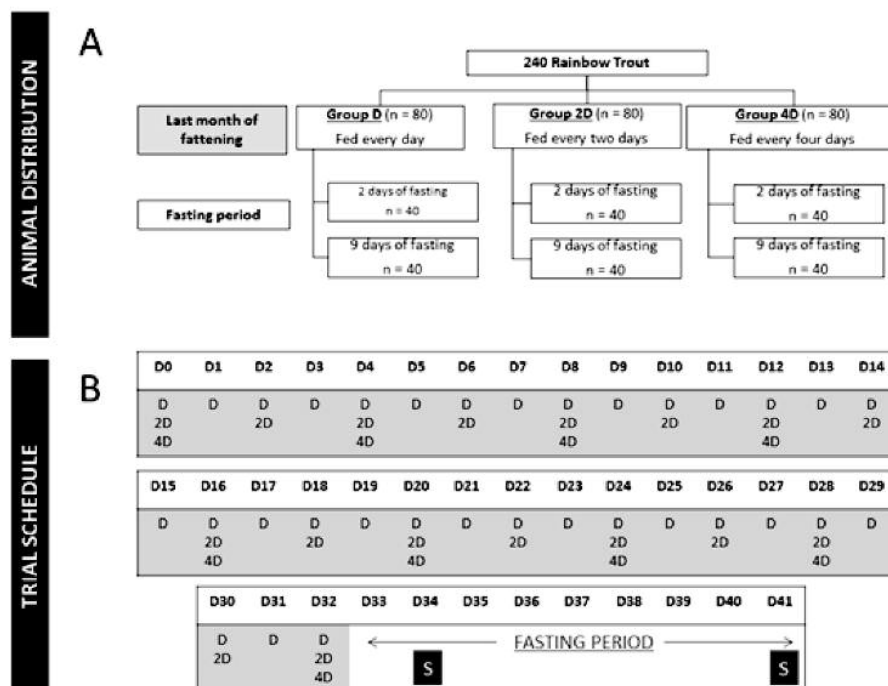
### Introduction

In aquaculture, the fasting of fish prior to slaughter is commonly practiced to evacuate the gut and reduce oxygen demand and waste production (Lines & Spence 2012). In recent years concerns regarding the maximum permissible duration of the fasting have been raised for different continental (Barcellos *et al* 2010) and marine fish (Morkore *et al* 2008). In trout, the Farm Animal Welfare Council recommends a 48-h limit on fasting (FAWC 1996), arguing that the welfare of farmed fish that have been fed regularly will be affected negatively by a sudden cessation of feeding. However, it is also important to consider the effect of feeding frequency before fasting. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the wild, as most carnivorous fish, live a life of feast and famine, where prey is distributed heterogeneously in space and time (Armstrong & Schindler 2011). Fish can store energy when abundant and mobilise it during fasting, although both processes have limitations dependent upon species, life stage, environmental conditions and habituation.

Many recent publications have considered the effect of feeding frequency on fish growth and welfare (eg Cañon Jones *et al* 2012) but fewer have considered the effect of

intermittent access to feed and its effect on the reaction to short-term pre-slaughter fasting. In the wild, most carnivorous fish have one meal every two days (Armstrong & Schindler 2011), suggesting that trout could adapt to a skip a day system, commonly used in poultry (Oyediji & Atteh 2005) and tested on other fish, such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Villarroya *et al* 2011). Although fish may present motivational mechanisms for feeding when nutritional reserves are low (eg Metcalfe & Thorpe 1992), farmed rainbow trout can fast for weeks (Ashley 2007) with no apparent negative effect on stress physiology or behaviour (Pottinger *et al* 2003; Jentoft *et al* 2005). More recently, a number of authors have analysed the effect of short-term fasting (up to three days) on plasma stress indicators in rainbow trout (Hoseini *et al* 2013), including the effect of water temperature (López-Luna *et al* 2013) and its effect on flesh quality (López-Luna *et al* 2014) but few studies have considered the effect of different feeding schedules in the final month of fattening on pre-slaughter fasting stress or compared extremes of fasting in terms of degree days (for example 20°C days vs values over 65°C days).

Figure 1



Experimental design. A) Experimental groups and number of fish in each one. Trout fed during the last month of fattening every day (group D), every two days (group 2D) or every four days (group 4D) and different fasting period, with a total of six different groups. B) Trial sequence indicating when each group was fed and the days of sampling (S) at two or nine days of fasting.

Recently, we published results regarding the effect of feeding frequency in the final month of fattening and pre-slaughter fasting on the flesh quality of rainbow trout (Bermejo-Poza *et al* 2015). Here, we describe results from the same trial carried out under commercial conditions but concerning different stress response indicators, such as plasma levels of cortisol, glucose, lactate, triglycerides, lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK) as well as liver glycogen, skin/gill colour.

## Materials and methods

### Fish and experimental design

The experimental design has been described previously in Bermejo-Poza *et al* (2015). Briefly, the trial was carried out at a fish farm in the province of Guadalajara, Spain, on the banks of the Tajuña River (40° 49' 4.605", 2° 44' 49.2072"). Six groups of 40 rainbow trout were placed in cages (1.5 × 0.8 × 0.35 m; length × width × height) in six parallel raceways (30 × 6 m; length × width) receiving a constant flow of river water (approximately 0.06 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), for a total of 240 fish. The headwater for each raceway came directly from the river (had not passed through other tanks of fish) and was not recirculated (one pass). Their initial mean (± SD) weight was 324 (± 41) g.

Each trout was individually identified using 2 × 12-mm Pit-Tags (Pit Tag i-Tag 162, Sweden) injected under the dorsal fin, a month prior to the experiment. During the entire experiment animals were subjected to natural photoperiod

and fed a commercial feed during the final month of fattening, from 26 September (Day 0) to 28 October 2013 (Day 32), with the following composition: 41% crude protein, 21.5% carbohydrate, 24% crude fat, 6.5% ash and 2.5% crude fibre. To calculate degree-days, water temperature was recorded once every 5 min during the entire trial using underwater temperature sensors (Hobo®-U11, Bourne, MA, USA).

Two cages of trout were fed every day (D), two once every two days (2D; one day of fasting or skip-a-day system) and two more once every four days (4D; three days of fasting), with a total of six cages for the experiment. All treatments were given the same amount of food in total but D trout received 1.2% of their bodyweight in feed every day, 2D trout were fed 2.4% of their bodyweight once every two days and 4D trout were fed 4.8% of their bodyweight once every four days. Since the amount of food provided per day in this group was very high, they were fed to satiation and fed again to satiation 1 h later. All fish were fed in this manner for a month, then before slaughter three cages (one cage per treatment; n = 40 per treatment) was fasted two days pre-slaughter and the other three were fasted nine days pre-slaughter (one cage per treatment; n = 40 per treatment), corresponding to 24.3°C days (Day 34) and 102°C days (Day 41), respectively, based on the temperature data. This way, all trout started their fasting period the day after they received food for the last time (Figure 1).

**Table 1** Mean ( $\pm$  SEM) haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on different feeding system (FS) and days of fasting (DF).

Haematological parameters	Daily (D)		Skip a day (2D)		Every four days (4D)		Significance (P)		
	2	9	2	9	2	9	FS	DF	FS $\times$ DF
n	37	31	30	40	39	33			
Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )	21.4 ( $\pm$ 1.7) <sup>ab</sup>	20.9 ( $\pm$ 1.6) <sup>ab</sup>	15.0 ( $\pm$ 2.0) <sup>b</sup>	25.8 ( $\pm$ 1.4) <sup>a</sup>	21.8 ( $\pm$ 1.3) <sup>ab</sup>	21.6 ( $\pm$ 1.7) <sup>ab</sup>	ns	< 0.05	< 0.01
Glucose mg dl <sup>-1</sup> )	131 ( $\pm$ 6) <sup>ab</sup>	79 ( $\pm$ 5) <sup>d</sup>	127 ( $\pm$ 7) <sup>ab</sup>	112 ( $\pm$ 7) <sup>bc</sup>	142 ( $\pm$ 5) <sup>a</sup>	88 ( $\pm$ 6) <sup>cd</sup>	ns	< 0.001	< 0.01
Lactate (mmol l <sup>-1</sup> )	20.5 ( $\pm$ 1.5) <sup>bc</sup>	14.2 ( $\pm$ 1.3) <sup>c</sup>	26.9 ( $\pm$ 3.9) <sup>ab</sup>	36.6 ( $\pm$ 2.9) <sup>a</sup>	28 ( $\pm$ 2.3) <sup>ab</sup>	29.1 ( $\pm$ 2.7) <sup>ab</sup>	< 0.001	ns	< 0.01
Triglycerides (mg dl <sup>-1</sup> )	360 ( $\pm$ 15) <sup>c</sup>	436 ( $\pm$ 21) <sup>bc</sup>	871 ( $\pm$ 83) <sup>a</sup>	354 ( $\pm$ 16) <sup>c</sup>	522 ( $\pm$ 24) <sup>b</sup>	293 ( $\pm$ 12) <sup>c</sup>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
LDH (U l <sup>-1</sup> )	571 ( $\pm$ 26) <sup>b</sup>	551 ( $\pm$ 29) <sup>b</sup>	587 ( $\pm$ 47) <sup>b</sup>	567 ( $\pm$ 31) <sup>b</sup>	878 ( $\pm$ 63) <sup>a</sup>	430 ( $\pm$ 28) <sup>b</sup>	ns	< 0.001	< 0.001
CPK (U l <sup>-1</sup> )	541 ( $\pm$ 68)	414 ( $\pm$ 69)	576 ( $\pm$ 85)	443 ( $\pm$ 96)	340 ( $\pm$ 55)	419 ( $\pm$ 64)	ns	ns	ns

<sup>a,b,c,d</sup> Different superscripts within a row indicate significant differences among groups (feeding system  $\times$  days of fasting;  $P < 0.05$ ).

### Slaughtering and analysis

Prior to slaughter, the water level of the raceway was slowly lowered to half the cage height (which took 10 min). The trout were captured with dip nets and killed immediately (< 15 s) using the *ikijime* method, piercing the brain of the fish with a sharp metal tip, as it is suggested to cause the least amount of suffering as well as the smallest possible changes in flesh quality (Malcolmsen *et al* 1995).

Immediately following slaughter, each fish was weighed and blood samples taken from the caudal vein which were divided into two Eppendorf tubes, one with sodium fluoride (NaF) for the determination of glucose and lactate and another with EDTA as an anticoagulant for cortisol, LDH, CPK and triglycerides. Both tubes were centrifuged at 6,000g for 10 min to remove the plasma, and stored immediately at 4°C until analysis.

Determination of concentration of liver glycogen was based on the technique described by Dreiling *et al* (1987), using samples of liver of 0.3 g. The liver was weighed previously in all fish. Finally, colour measurements were taken for skin and gill using a Minolta Spectrophotometer CM-2500c (Minolta, Osaka, Japan). The CIE 1976 L\*a\*b\* system recommended by the International Commission Illumination (CIE 1978) was chosen as the colour scale. Three measurements were taken on the right side of the fish for both skin and gill.

### Statistical analysis

The parameters were analysed using the SAS software version 9.0 (Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC, USA). A Bonferroni test was used to compare means. We used the GLM procedure of SAS with the feeding system (daily, once every two days or once every four days) and days of fasting (two or nine) as fixed effects, including in the model the interaction between the two factors. For the liver glycogen and slaughter weight, liver weight and initial weight were introduced into the model as covariates.

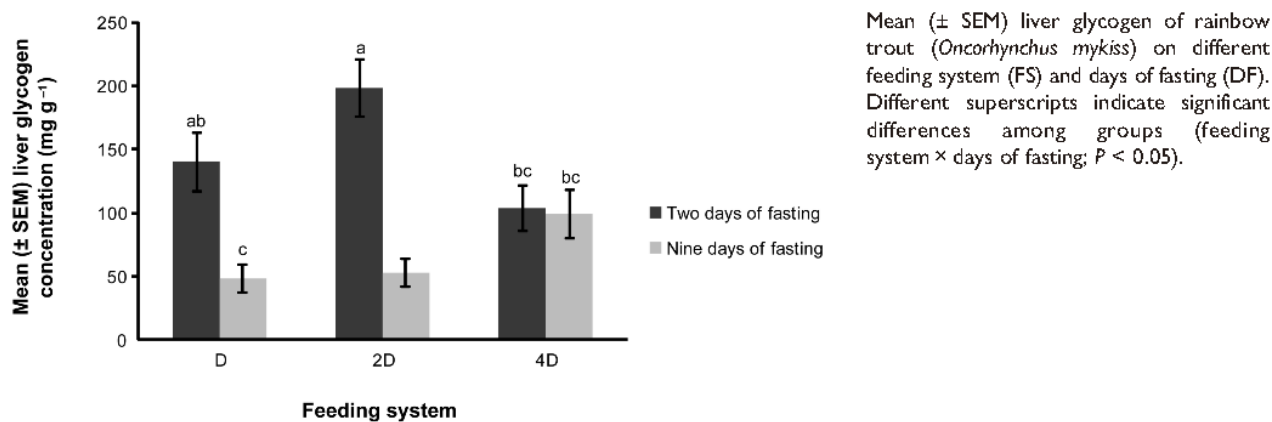
### Results

Overall, the haematological parameters and glycogen levels, for the 2D trout were indicative of a lower stress response. As far as production data, slaughter weight was lower after nine days of fasting (102°C) in 2D (365 [ $\pm$  5.49] g) and 4D trout (330 [ $\pm$  6.03] g), while D trout did not vary significantly between two (353 [ $\pm$  5.91] g) and nine days of fasting (352 [ $\pm$  6.91] g). The 2D trout also had the highest slaughter weight (381 [ $\pm$  5.73] g).

### Haematological parameters

There was a significant interaction between feeding system and days of fasting for plasma cortisol levels. In feeding systems D and 4D, cortisol levels were similar at two and nine days (24.3 vs 102°C days). On the other hand, 2D trout had lower levels of cortisol at two days of fasting than after nine. Glucose plasma levels also showed a significant interaction between feeding system and days of fasting. In this case, the plasma glucose concentrations in D and 4D trout were lower after nine than after two days of fasting. For lactate, a significant interaction was found between the two factors studied. There were no significant differences in lactate concentrations after two days of fasting between feeding systems. But, after nine days of fasting, the D trout had the lowest values of lactate. Regarding triglycerides, there was a significant interaction between the two fixed factors (FS and DF); after two days of fasting 2D trout showed the highest values, and 4D trout were, in turn, higher than D trout values. These values decreased after nine days of fasting in 2D and 4D trout but not in D trout. There was a significant interaction between feeding system and days of fasting for LDH, where values were similar among groups, except for highest value for 4D trout fasted two days. The CPK values were not significantly different among feeding system or days of fasting (Table 1).

Figure 2



**Table 2** Mean (± SEM) skin and gill colour of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on different feeding system (FS) and days of fasting (DF).

Colour	Daily (D)		Skip a day (2D)		Every four days (4D)		Significance (P)		
	2	9	2	9	2	9	FS	DF	FS × DF
n	19	16	16	20	20	17			
<i>Skin colour</i>									
L*	30.53 (± 1.56) <sup>ab</sup>	29.12 (± 1.64) <sup>abc</sup>	31.22 (± 1.62) <sup>ab</sup>	23.92 (± 0.75) <sup>c</sup>	35.17 (± 1.95) <sup>a</sup>	25.00 (± 0.84) <sup>bc</sup>	ns	< 0.001	< 0.01
a*	1.51 (± 0.27) <sup>b</sup>	1.78 (± 0.24) <sup>ab</sup>	1.56 (± 0.18) <sup>ab</sup>	0.86 (± 0.12) <sup>b</sup>	2.94 (± 0.59) <sup>a</sup>	1.19 (± 0.15) <sup>b</sup>	< 0.05	< 0.01	< 0.01
b*	6.76 (± 0.59) <sup>ab</sup>	8.23 (± 0.60) <sup>a</sup>	7.40 (± 0.71) <sup>a</sup>	4.88 (± 0.49) <sup>b</sup>	6.95 (± 0.38) <sup>ab</sup>	5.84 (± 0.48) <sup>ab</sup>	< 0.05	ns	< 0.01
<i>Gill colour</i>									
L*	36.76 (± 1.24) <sup>ab</sup>	34.08 (± 0.83) <sup>b</sup>	37.77 (± 1.61) <sup>ab</sup>	34.54 (± 0.72) <sup>b</sup>	41.15 (± 2.37) <sup>a</sup>	36.76 (± 0.64) <sup>ab</sup>	< 0.05	< 0.01	ns
a*	16.26 (± 0.91) <sup>a</sup>	16.45 (± 0.71) <sup>a</sup>	14.19 (± 0.94) <sup>ab</sup>	17.29 (± 0.49) <sup>a</sup>	11.39 (± 0.96) <sup>b</sup>	16.66 (± 0.51) <sup>a</sup>	< 0.01	< 0.001	< 0.01
b*	9.38 (± 0.53) <sup>ab</sup>	8.80 (± 0.31) <sup>ab</sup>	8.57 (± 0.47) <sup>ab</sup>	9.62 (± 0.40) <sup>a</sup>	7.84 (± 0.47) <sup>b</sup>	9.91 (± 0.37) <sup>a</sup>	ns	< 0.05	< 0.01

<sup>abc</sup> Different superscripts within a row indicate significant differences among groups (feeding system × days of fasting;  $P < 0.05$ ).

### Liver glycogen

Regarding liver glycogen, there was a significant interaction between feeding system and days of fasting. While in 4D trout, liver glycogen remained similar after nine days of fasting, in D and 2D trout there was a significant decrease between two and nine days of fasting. The 2D trout subjected to two days of fasting presented the highest value of liver glycogen (Figure 2).

### Skin and gill colour

There was a significant interaction between feeding system and days of fasting for skin L\*, a\* and b\*. The L\* was lower in 2D and 4D trout subjected to nine days of fasting than after two days of fasting. Skin a\* was similar in D and

2D trout, but in 4D trout was significantly lower at nine days of fasting than after two. Skin b\* presented comparable values at both fasting times in D and 4D trout. Regarding gill colour, L\* was significantly affected by feeding system and days of fasting, with a slight decrease in all feeding systems after nine days of fasting. Gill a\* showed a significant interaction between the two fixed effects (FS and DF). 4D trout after two days of fasting showed lower values than D trout (two and nine days of fasting) and 2D and 4D trout after nine days of fasting. Finally, gill b\* also presented a significant interaction between feeding system and days of fasting. 4D trout showed lower values after two days of fasting than 2D and D trout after nine (Table 2).

## Discussion

### Haematological parameters

Plasma cortisol levels were similar after two and nine days of fasting in D and 4D trout. However, in the 2D system, cortisol concentrations were lower after two days than after nine days of fasting. In the literature, there is no clear consensus about the effect of fasting on plasma cortisol concentrations in rainbow trout. Overall, cortisol levels in our study were slightly higher than resting values reported by others (5–20 ng ml<sup>-1</sup>; Barton & Iwama 1991; Pottinger *et al* 2003). Some studies report an increase in cortisol with fasting (Sumpster *et al* 1991; Varnavsky *et al* 1995; Blom *et al* 2000; Peterson & Small 2004), others find no effect (Reddy *et al* 1995) or even decreased levels with fasting (Farbridge & Leatherland 1992; Small 2005). Our study underlines the importance of considering previous feeding frequencies on the response of fish to fasting, since the 2D trout had lower cortisol levels after two days of fasting than after nine while D and 4D fish showed no changes across two or nine days of fasting. The lack of change in the 4D group could be a result of the prior feeding regime introducing a chronic stress, that has been reported to diminish the cortisol response to an acute stressor (Ings *et al* 2011; Wunderink *et al* 2011), so that the cortisol levels could not increase from day two to day nine of fasting. A similar pattern was found in the D trout, where cortisol levels remained similar at two and nine days of fasting. Here, the reason may be due to the high stress of going from plenty of access to food every day to zero food which could increase social stress and the stress response (Jeffrey *et al* 2014). The lower plasma cortisol levels in 2D trout after two days of fasting suggest a lower stress response, possibly since trout were already habituated to this schedule.

Glucose levels can reach 150 mg 100 ml<sup>-1</sup> in rainbow trout (Pottinger & Carrick 1999), with basal levels of 70–90 mg 100 ml<sup>-1</sup> (Jentoft *et al* 2005). Pottinger *et al* (2003) found that it decreased after three days of fasting and it has been demonstrated that five days was sufficient to induce hypoglycaemia (Furné *et al* 2012). As expected, plasma glucose levels decreased after nine days of fasting compared to two days in D and 4D trout. In contrast, glucose concentrations were similar in 2D trout at two and nine days of fasting. This lack of change between glucose levels of 2D trout at nine days of fasting compared to two days could be associated with the elevated concentrations of cortisol observed. In fact, high cortisol concentrations might warrant normoglycaemia through activation of gluconeogenesis (Polakof *et al* 2006). Nevertheless, glucose levels were relatively high after two days of fasting in all treatments, perhaps due to a significant decrease in plasma glucose levels and activation of gluconeogenesis mediated by cortisol (Hoseini *et al* 2013).

Plasma lactate levels were not greatly affected by days of fasting but more by feeding system. Lactate levels should decrease in fasted fish (Blasco *et al* 1992) to enhance the formation of glucose in the liver (Liew *et al* 2012). In the case of rainbow trout, basal levels are around 0.5 mmol l<sup>-1</sup>

and values above 1.3 mmol l<sup>-1</sup> have been suggested to indicate stress (Ings *et al* 2011). The high levels obtained during our test (14–37 mmol l<sup>-1</sup>) may be due to other factors besides fasting that were not measured, but probably not a result of the capture since lactate takes 2–4 h to increase in plasma after an episode of acute stress (Olsen *et al* 2005). Other pre-harvest stimuli, such as adjustments of social hierarchies within the groups, may have increased anaerobic muscular activity as well as lactate levels.

Triglycerides should decrease with increased fasting since the fish will mobilise reserves to cope with fasting but those reserves will decrease with time (Costas *et al* 2011; Takahashi *et al* 2011). In our study, triglyceride levels decreased with fasting in all fish except D trout where fish had food every day. Our results suggest that feeding system can affect triglyceride levels in trout after two days of fasting, since D fish had much lower levels in blood by day two of fasting than 2D and 4D trout, indicating that their stores were more depleted, possibly since they did not need to maintain fat reserves when being fed every day. This suggests that the feeding frequency can regulate the storage of triglycerides in trout. The reason that the 4D trout had lower fat reserves compared to 2D trout may be that they used them up during the longer fasting.

The changes in LDH and CPK were similar, with D and 2D trout showing a slight decrease in enzyme activity between two and nine days of fasting. The 4D trout had a higher LDH activity after two days of fasting than after nine days, indicating high muscle activity. High LDH levels are more related to muscle injury, triggered by different types of stress, such as transport (Dobšíková *et al* 2006) or fasting (Vijayan *et al* 2006). Thus, the muscle activity of D and 2D trout was lower, probably reflecting a lower stress response than 4D trout.

### Liver glycogen

Fasting mobilises liver nutrients for maintenance and this organ plays an important role as a source of metabolites, especially during the early phases of the fast (Davis & Gaylord 2011). The time taken to reduce these levels with fasting is variable, but can be mobilised within 5–20 days after fasting starts (Barcellos *et al* 2010). Furné *et al* (2012) found that in rainbow trout liver nutrients can be mobilised after five days of fasting. In our study, D and 2D trout had lower concentrations of glycogen in the liver after nine than after two days of fasting. But 4D trout had lower levels after two days of fasting than 2D and 4D trout, and did not mobilise them after nine days of fasting. This could indicate that due to the feeding system previous to the fasting, 4D trout were more used to deprivation of food and mobilised less liver glycogen or that initial liver glycogen levels were lower.

### Skin and gill colour

2D and 4D trout fasted for nine days had a darker skin colour (lower L\*) than after two days of fasting, which could be related a higher stress level (increased cortisol) due to fasting itself, which in our study occurs in 2D trout. However, in trout fed daily, D trout, there was no significant variation in skin colour due to days of fasting. Höglund *et al* (2000)

showed that social stress produced a darkening of the skin in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) because of the dispersing effect of ACTH on chromatophores (Fujii & Oshima 1986) and a similar process has been reported in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (O'Connor *et al* 1999) and several other species of salmonid fish like rainbow trout (Abbott *et al* 1985). After two days of fasting there were no differences among feeding systems. On the contrary, after nine days of fasting,  $b^*$  was lower for 2D trout and  $a^*$  was lower for 4D trout than after two days, suggesting that feeding system can affect skin colour after nine days fasting, and could lead to a darker skin among other variations in colour.

The colour of the gill is an indicator of health and an important parameter for consumers in evaluating the freshness of fish (Poli *et al* 2005; Álvarez *et al* 2008; Green 2011) and it has been studied mainly related to the storage time (Dowlati *et al* 2013) but there is little information on the effect of fasting on gill colour. An indicator of a fresh fish is a bright red gill colouration (Green 2011). As in the case of skin, trout fasted for nine days showed darker (lower  $L^*$ ) gill colour than after two days. Feeding system and fast duration can affect the colour of the gill since 4D trout had redder and yellowish gills after nine than after two days of fasting. Yellow pigments are formed as result of reaction between protein and oxidised lipid, indicating the quality deterioration of fish (Dowlati *et al* 2013). Again, D trout showed no significant differences in gill colour between durations of fast. This suggests that the 4D feeding system produced a higher stress response in fish and affected the colour of the gill and led to an appearance of less-fresh trout.

Our results indicate that adjusting the feeding regime during the last month of fattening in rainbow trout could help to reduce the stress response during pre-slaughter fasting. However, for most of the data analyses discussed, and as in previous studies (López-Luna *et al* 2013, 2014; Bermejo-Poza *et al* 2015), we used each fish as the experimental unit, and not each cage. This may have implications for the reproducibility of our results, but using many more cages under commercial conditions was not feasible and probably would have created 'unnatural' densities and conditions (for a commercial farm or normal aquaculture setting) with too few fish in a given volume.

### Animal welfare implications

Pre-slaughter fasting is a common practice in fish farming and causes a stress response that can be to the detriment of their welfare. The results of this study have two main practical implications for how we consider rainbow trout welfare prior to slaughter. On the one hand, we have shown that different management techniques can be used in the last weeks prior to slaughter to habituate fish to different fasting durations, which reduces their stress response before slaughter. Specifically, trout can get used to fasting for periods of two days in the last month of fattening, which reduces their stress response when fasted for two days before slaughter. On the other hand, we underline that the stress response during fasting is temperature-dependent and that fasting for over 100°C days appears to have negative effects on trout stress.

### Conclusion

Regarding welfare and fasting, trout fasted for nine days had a higher stress response than trout fasted for only two days. Regarding welfare and feeding schedules, the trout fed once every two days had a lower stress response when subjected to two days of fasting prior to slaughter, as reflected by lower cortisol levels and a higher slaughter weight. Feeding trout once every four days has a negative effect on skin and gill colour that could be associated with a higher stress response. Although our results are contingent on our experimental conditions, they suggest that it is possible to reduce the effect of pre-slaughter fasting on the stress response of rainbow trout using different feeding schedules before slaughter. Such information could be used to improve handling, but overall it opens up a new field of study where more research is needed.

### Acknowledgements

This project was financed by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Project AGL2010-19479. We would like to thank Francisco Villarreal and Adrian Ardila from the trout farm Naturix SA as well as Alba Montalvo for helping with logistics. We also thank Jorge López-Tello from UCM Veterinary Faculty for his assessment of the manuscript.

### References

- Abbott JC, Dunbrack RL and Orr CD 1985 The interaction of size and experience in dominance relationships of juvenile steerhead trout (*Salmo gairdneri*). *Behaviour* 92: 241-253
- Álvarez A, García García B, Garrido MD and Hernández MD 2008 The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 284: 106-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.025>
- Armstrong JB and Schindler DE 2011 Excess digestive capacity in predators reflects a life of feast and famine. *Nature* 476: 84-87. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10240>
- Ashley PJ 2007 Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behavior Science* 104: 199-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Barcellos LJG, Marqueze A, Trapp M, Quevedo RM and Ferreira D 2010 The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture* 300: 231-236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.013>
- Barton BA and Iwama GK 1991 Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-26. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Bermejo-Poza R, De la Fuente J, Pérez C, Lauzurica S, González E, Díaz MT and Villarreal M 2015 The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout. *Aquaculture* 443: 24-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.007>
- Blasco J, Fernández J and Gutiérrez J 1992 Fasting and refeeding in carp (*Cyprinus carpio* L.): the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. *Journal of comparative physiology B* 162: 539-546. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00264815>

- Blom S, Andersson TB and Forlin L** 2000 Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 $\alpha$ -hydroxypregesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 48: 265-274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00031-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00031-4)
- Cañon Jones HA, Noble C, Damsgård B and Pearce GP** 2012 Investigating the influence of predictable and unpredictable feed delivery schedules upon the behaviour and welfare of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) using social network analysis and fin damage. *Applied Animal Behavior Science* 138: 132-140
- Commission Internationale de l'Éclairage CIE** 1978 Recommendations on uniform color spaces color difference equations, psychometric color terms. *Supplement No 2 to CIE Publication No 15. Colorimetry*. Bureau Central de la CIE: Paris, France
- Costas B, Aragão C, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Dinis MT, Mancera JM and Conceição LE** 2011 Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 495-504. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-010-9451-2>
- Davis KB and Gaylord TG** 2011 Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. *Comparative Biochemistry and Physiology A158*: 30-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.08.019>
- Dobšíková R, Svobodová Z, Blahova J, Modrá H and Velíšek J** 2006 Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L). *Acta Veterinaria Brno* 75: 437-448. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200675030437>
- Dowlati M, Mohtasebi SS, Omid M, Razavi SH, Jamzad M and de la Guardia M** 2013 Freshness assessment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by machine vision based on gill and eye color changes. *Journal of Food Engineering* 119: 277-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.023>
- Dreiling CE, Brown DE, Casale L and Kelly L** 1987 Muscle glycogen: Comparison of iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. *Meat Science* 20: 167-177. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(87\)90009-X](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(87)90009-X)
- Farbridge KJ and Leatherland JF** 1992 Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 10: 245-257. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004518>
- FAWC (Farmed Animal Welfare Council)** 1996 *Report on the welfare of farmed fish*. <http://www.fawc.org.uk/reports/fish/fishrtoc.htm>
- Fujii R and Oshima N** 1986 Control of chromatophore movements in teleost fishes. *Zoological Science* 3: 13-47
- Furné M, Morales AE, Trenzado CE, García-Gallego M, Hidalgo MC, Domezain A and Sanz A** 2012 The metabolic effects of prolonged starvation and re-feeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of comparative physiology B182*: 63-76. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-011-0596-9>
- Green DP** 2011 Sensory evaluation of fish freshness and eating qualities. In: Alasalvar C, Shahidi F, Miyashita K and Wanasundara U (eds) *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications* pp 29-37. Wiley-Blackwell Publication: UK
- Höglund E, Balm PH and Winberg S** 2000 Skin darkening, a potential social signal in subordinate arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *The Journal of Experimental Biology* 203: 1711-1721
- Hoseini SM, Yousefi M, Rajabiesterabadi H and Paktinat M** 2013 Effect of short-term (0-72 h) fasting on serum biochemical characteristics in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology* 30: 569-573. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.12221>
- Ings JS, Servos MR and Vijayan MM** 2011 Exposure to municipal wastewater effluent impacts stress performance in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 103: 85-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.013>
- Jeffrey JD, Gollock MJ and Gilmour KM** 2014 Social stress modulates the cortisol response to an acute stressor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 196: 8-1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.010>
- Jentoft S, Aastveit AH, Torjesen PA and Andersen O** 2005 Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A141*: 353-358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.06.006>
- Liew HJ, Sinha AK, Mauro N, Diricx M, Blust R and De Boeck G** 2012 Fasting goldfish (*Carassius auratus*), and common carp (*Cyprinus carpio*), use different metabolic strategies when swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology A163*: 327-335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.012>
- Lines JA and Spence J** 2012 Safeguarding the welfare of farmed fish at harvest. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 153-162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9561-5>
- López-Luna J, Torrent F and Villarreal M** 2014 Fasting up to 34°C days in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has little effect on flesh quality. *Aquaculture* 420-421: 63-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.037>
- López-Luna J, Vásquez L, Torrent F and Villarreal M** 2013 Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 400: 142-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.009>
- Malcolmsen L, Nicolson S and Inkster A** 1995 Improving the quality of farmed salmon by 'iki jime' harvesting. *Journal of Food Science* 58: 770-773
- Metcalfe NB and Thorpe JE** 1992 Anorexia and defended energy levels in over-wintering juvenile salmon. *Journal of Animal Ecology* 61: 175-181. <http://dx.doi.org/10.2307/5520>
- Morkore T, Mazo TP, Tahirovic V and Einen O** 2008 Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture* 277: 231-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.036>
- O'Connor KI, Metcalfe NB and Taylor AC** 1999 Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Animal Behaviour* 58: 1269-1276. <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1999.1260>
- Olsen RE, Sundell K, Mayhew TM, Myklebust R and Ringo E** 2005 Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 250: 480-495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.014>

- Oyedeji JO and Atteh JO** 2005 Response of broilers to feeding manipulations. *International Journal of Poultry Science* 4: 91-95. <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2005.91.95>
- Peterson BC and Small BC** 2004 Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology* 26: 231-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2003.10.005>
- Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Del Río MPM, Mancera JM and Soengas JL** 2006 Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology B* 176: 441-452. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-006-0065-z>
- Poli BM, Parisi G, Scappini F and Zampacavallo G** 2005 Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13: 29-49. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-004-9035-1>
- Pottinger TG and Carrick TR** 1999 A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture* 175: 351-363. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00107-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00107-6)
- Pottinger TG, Rand-Weaver M and Sumpter JP** 2003 Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 136: 403-417. [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00212-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00212-4)
- Reddy PK, Vijayan MM, Leatherland JF and Moon TW** 1995 Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? *Journal of Fish Biology* 46: 341-359. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb05973.x>
- Small BC** 2005 Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 142: 217-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.008>
- Sumpter JP, Le Bail PY, Pickering AD, Pottinger TG and Carragher JF** 1991 The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 83: 94-102. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90109-j](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(91)90109-j)
- Takahashi LS, Biller JD, Criscuolo-Urbinati E and Urbinati EC** 2011 Feeding strategy with alternate fasting and re-feeding: effects on farmed pacu production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95: 259-266. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01050.x>
- Varnavsky VS, Sakamoto T and Hirano T** 1995 Effects of premature seawater transfer and fasting on plasma growth hormone levels of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) parr. *Aquaculture* 135: 141-145. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01001-7](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(95)01001-7)
- Vijayan MM, Aluru N, Maule AG and Jorgensen EH** 2006 Fasting augments PCB impact on liver metabolism in anadromous arctic char. *Toxicology Science* 91: 431-443. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfj154>
- Villaruel M, Alavriño JMR and López-Luna J** 2011 Effect of feeding frequency and one day fasting on tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water quality. *The Israeli Journal of Aquaculture* 63: 1-6
- Wunderink YS, Engels S, Halm S, Yúfera M, Martínez-Rodríguez G, Flik G, Klaren PHM and Mancera JM** 2011 Chronic and acute stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The involvement of cortisol, CRH and CRHBP. *General and Comparative Endocrinology* 171: 203-210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.01.010>

**Effect of degree-days of fasting stress on rainbow  
trout, *Oncorhynchus mykiss***

**Artículo publicado en: Aquaculture**

**Factor de impacto: 1.893 (Q1)**

**Categoría: Fisheries**

**DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.05.017**





Contents lists available at ScienceDirect

## Aquaculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquaculture](http://www.elsevier.com/locate/aquaculture)

## Effect of degree-days of fasting stress on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*



Javier López-Luna<sup>a,\*</sup>, Ruben Bermejo-Poza<sup>c</sup>, Fernando Torrent Bravo<sup>d</sup>, Morris Villarroel<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Evolution, Ecology and Behaviour, Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Biosciences Building, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, UK

<sup>b</sup> Department of Animal Production, College of Agronomics Engineering, Polytechnic University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Animal Production, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Forestry Engineering, College of Forestry Engineering, Polytechnic University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 December 2015  
Received in revised form 5 May 2016  
Accepted 10 May 2016  
Available online 11 May 2016

## Keywords:

Fasting  
Degree days  
Trout  
Cortisol  
Glucose  
Lactate

## ABSTRACT

Most farm animals are fasted before slaughter to empty the digestive system but in fish, the appropriate fasting time also depends on the water temperature. To analyze how the physiological and haematological response vary with degree-days ( $^{\circ}\text{C}$  days), 180 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were fasted for 1, 2 or 3 days in two different trials with water at 22.7 or 11.1  $^{\circ}\text{C}$ . In general, water temperature had a significant influence on most variables measured, although the number of degree days had a less important effect on trout physiological response, being only important in the depletion of reserves rate. The condition factor decreased at 2 and 3 days of fasting. At warmer temperatures (22.7  $^{\circ}\text{C}$ ), relative weight of the gut content, hepatosomatic index and plasma levels of glucose were lower while cortisol, lactate and haematocrit were higher than at colder ones (11.1  $^{\circ}\text{C}$ ). Fasting up to 68  $^{\circ}\text{C}$  days did not seem to have a negative effect on stress but a high water temperature above 20  $^{\circ}\text{C}$  was stressful for trout.

*Statement of relevance:* This paper present data on the effect of the number of degree days of fasting on body measurements and the haematological response of rainbow trout prior to slaughter. Fasting up to 68 degree days did not have a major effect on their welfare and that their haematological response was solely affected by the water temperature and not by food deprivation

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pre-slaughter handling involves several processes which can potentially have negative effects on fish welfare (Lines and Spence, 2012), including fasting, transport, crowding, and stunning, all of which must be performed in water, where the temperature cannot always be controlled easily. Short term fasting (i.e., the early phase of food deprivation during which animals mobilize readily available metabolic reserves), normally lasts 7–10 days (Soengas et al., 1996) as is different from starvation (i.e., chronic fasting associated with weight loss and pronounced protein and lipid catabolism). Very little is known about the effect of short term fasting (measured in degree days) on fish that are normally fed regularly. Several interest groups have proposed maximum limits to fasting, but measured in hours as 48 h (FAWC, 1996) and 72 h (HSA, 2005; CIWF, 2009). More prudently, EFSA (2008) indicates that it is difficult to specify a maximum acceptable duration of fasting, since its

impact on welfare is related to size, lipid reserves, life stage and water temperature. However, EFSA (2009) does point out that fasting for 50  $^{\circ}\text{C}$  days (degree days) can stimulate the use of body fat reserves and then functional tissue, which is associated with poor welfare. Robb (2008) considers that in salmon there is no evidence that fasting for 72 h is needed to void the digestive tract. Lines and Spence (2012) conclude that fasting for 1–5 days prior to slaughter is unlikely to cause significant welfare problems, and Nikki et al. (2004) report no significant effects of 14 day fasting on live weight in rainbow trout.

Little is also known about the effect of fasting at relatively high water temperatures, although previous studies have found that the accumulated amount of degree days may be more important than fasting duration itself (Lopez-Luna et al., 2013). The optimum water temperature range to grow rainbow trout is suggested to range from 13 to 19  $^{\circ}\text{C}$ , when oxygen is not a limiting factor (Schurmann et al., 1991), and up to 20–22  $^{\circ}\text{C}$  (FAO, 2011) without loss of appetite. Water temperatures in raceways used for trout production the Mediterranean region are often in the upper part of that range, particularly around summer, but few studies have considered fasting effects at the high end. The aim of the present study was to compare the stress response of trout to fasting at two different water temperatures that represent harvesting in winter and summer months.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jlopez@liverpool.ac.uk](mailto:jlopez@liverpool.ac.uk) (J. López-Luna), [rbermejo@ucm.es](mailto:rbermejo@ucm.es) (R. Bermejo-Poza), [fernando.torrent@upm.es](mailto:fernando.torrent@upm.es) (F. Torrent Bravo), [morris.villarroel@upm.es](mailto:morris.villarroel@upm.es) (M. Villarroel).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study animals and experimental design

We carried out two trials, one in winter and one in summer, at the aquaculture facilities of the School of Forestry Engineering, at the Polytechnic University of Madrid (Madrid, Spain). The fish farm is located on a small slope divided into terraces with raceways filled with freshwater from an underground well and re-circulated. In each trial we used 180 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) obtained from Fuente Campillo farm (Zaorejas, Guadalajara, Spain) with an initial average weight ( $\pm$  standard deviation) of  $417.7 \pm 61.3$  g in trial 1 (T1) and  $368.8 \pm 63.7$  g in trial 2 (T2). Upon arrival, fish were randomly divided into two groups of 90 individuals in two parallel raceways (volume  $5.16 \text{ m}^3$ ), for control and treatment fish. They were kept in the raceway for two weeks, after which each raceway was divided into three sections of  $1.72 \text{ m}^3$  (housing 30 fish) using net separators, with 30 trout in each section. Fish were kept under these conditions for two additional weeks until the trials started, to make sure they had adjusted to the new arrangement. During the whole experiment, animals were subjected to natural photoperiod (T1: sunrise at 07 h40 and sunset at 19 h12; T2: sunrise at 06 h52 and sunset at 21 h31). Water temperature averaged  $11.1 \pm 0.6$  °C in T1 and  $22.7 \pm 0.9$  °C in T2, whereas the water pH varied between 7.7 and 8.0 in the two trials and the average oxygen concentration was  $9.9 \text{ mg l}^{-1}$  in T1 and  $7.8 \text{ mg l}^{-1}$  in T2. Before fasting, fish were fed the same commercial feed given on the source farm, twice a day (42% crude protein, 23% fat, 4.1% ash and 2.0% crude fibre, 30 ppm astaxanthin; 1% feeding rate) and in compliance with recommendations for rainbow trout.

Fish in the treatment raceway were fasted for 1, 2 or 3 days before slaughter ( $n = 30$  trout for each day), while fish in the control raceway were fed twice a day (10 h00 and 18 h00) and also slaughtered on the same days. To calculate degree-days, water temperature was recorded once every 5 min during the whole trial using underwater temperature sensors (Hobo-U11, ONSET, Bourne, Massachusetts, USA). The average temperatures per day for T1 were  $11.1 \pm 0.3$  °C on day 1,  $11.1 \pm 0.3$  °C on day 2 and  $11.2 \pm 0.2$  °C on day 3, which meant 11.1, 22.2 and 33.4 °C days for days 1, 2 and 3 of fasting respectively. In T2, the average temperature was  $22.7 \pm 0.9$  °C on day 1,  $22.6 \pm 0.9$  °C on day 2 and  $22.7 \pm 0.9$  °C on day 3 (averaging 22.7 °C), obtaining 22.7, 45.3 and 68.0 °C days for days 1, 2 and 3 of fasting, respectively.

### 2.2. Slaughter and analyses

All fish were slaughtered and all samples taken at 14 h00. After 1, 2 or 3 days of fasting, 30 treatment fish and 30 control fish were quickly captured (alternating between treatment and control fish) and immediately anesthetized in clove oil for 2 min ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ), to avoid unnecessary stress. They were then weighed and measured individually and sampled to evaluate haematological variables. Blood samples were withdrawn from the caudal vein using 2 ml syringes (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), 1 ml was centrifuged at  $1500 \times g$  for 10 min and the plasma was extracted to measure cortisol, glucose and lactate (using potassium fluoride as the anticoagulant). Another 1 ml of blood was used to measure leucocytes and haematocrit (with ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, as anticoagulant) and immediately stored at 4 °C until analysis. Immediately after blood collection, fish were killed by sectioning the spinal cord at the base of the head. Then, half of the fish were gutted and the gut content and liver were extracted and weighed separately. Using the body weight, body length, gut content and liver weight, we calculated the condition factor (CF) = body weight (g) / body length (cm)<sup>3</sup>, the relative weight of the gut content (RWGC) =  $100 \times \text{gut content (g)} / \text{body weight (g)}$  and the hepatosomatic index (HSI) =  $100 \times \text{liver weight (g)} / \text{body weight (g)}$ .

### 2.3. Statistical analyses

Mean  $\pm$  standard deviations (s.d.) of each sampling group were calculated using the SAS software ver. 9.0 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA) for each parameter analysed. The data were tested for normality (Shapiro-Wilks) and homogeneity (Levene). A nested analysis of variance using the MIXED procedure of SAS was run to compare biometric and haematological indicators both in fasted and fed trout. Prior to analysis, all the fish samples were classified as fasted or not fasted and this new nominal variable (treatment) was nested to the day of sampling. The nested ANOVA was performed with the day of sampling and treatment nested to day of sampling (hereafter, treatment (day of sampling)) as the main factors. To determine the effect of water temperature, the average water temperature of trials 1 and 2 was also included as a fixed effect and the fish sample as the random effect:

$$Y_{ijkl} = \mu_0 + D_i + T(D)_{j(i)} + M_k + TE_i + DTE_{it} + TET(D)_{ij(i)} + \varepsilon_{i(j)k}$$

where  $D_i$  is the day of sampling (1st, 2nd and 3rd; d.f. = 2),  $T(D)_{j(i)}$  is the treatment (fasted or fed) nested to the day of sampling (fasted 1, 2 and 3 days and fed and slaughtered on day 1, 2 and 3; d.f. = 5),  $M_k$  represents the fish sample,  $TE_i$  is the water temperature ( $11.1$  °C and  $22.7$  °C; d.f. = 1),  $DTE_{it}$  is the interaction between the day of sampling and the water temperature (d.f. = 5) and  $TET(D)_{ij(i)}$  is the interaction between the treatment (day of sampling) and the water temperature (d.f. = 11).

## 3. Results

Overall, the water temperature had a significant influence on most variables measured (Table 1), but the effect of degree-days of fasting on trout physiology was not so apparent. There was a significant interaction between day of slaughter and treatment for the condition factor (CF). It only decreased significantly after 2 days of fasting (an average of 28% compared to one day of fasting), while was the same in all control trout (Fig. 1). The relative weight of the gut content (RWGC), was lower for fasted trout at higher temperatures (from 22.7 to 68 °C days; Fig. 2), and more similar between fasted and control fish at lower temperatures. The HSI was significantly lower in fasted trout at higher temperatures (Fig. 3) at all sampling points, i.e. from 22.7 °C d (around 24% less than fasted fish in winter or control fish in summer or winter). There were no statistical differences in HSI between fasted and controls at lower temperatures in winter, with the exception of a small reduction in fasted trout on day 3 (12.9% less than days 1 and 2).

The duration of fasting did not have a significant effect on plasma cortisol, which decreased in fish held at the higher temperatures (by 40% on average; Fig. 4), and remained stable at lower temperatures (averaging  $137 \pm 13 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Plasma glucose levels were lower at higher temperatures after 45.3 and 68.0 °C days (2 and 3 days of fasting) compared to the other groups (Fig. 5). Plasma lactate levels were consistently higher on day 3 in both fasted and fed trout ( $27 \pm 1 \text{ mmol l}^{-1}$ ), compared to day 1 or 2 ( $23 \pm 1 \text{ mmol l}^{-1}$  for both groups). With regard to the effect of water temperature, lactate was lower in trout held at  $11.1$  °C compared to  $22.7$  °C ( $22 \pm 1 \text{ mmol l}^{-1}$  vs.  $27 \pm 1 \text{ mmol l}^{-1}$ , respectively). The haematocrit was affected by water temperature (but not fasting), with higher levels at  $22.7$  °C ( $35.9 \pm 0.5\%$ ) compared to  $11.1$  °C ( $30.4 \pm 0.5\%$ ). Finally, the leucocyte count did not vary significantly with day of slaughter, water temperature or fasting.

## 4. Discussion

Based on our results, it appeared that water temperature itself had the greatest effect on the haematological response in the fish and that the number of degree days of fasting had more of an effect on body measurements (CF, RWGC and HSI) than on plasma measurements associated with welfare. The CF (an index of fish volume) has no units (as

**Table 1**Summary of *p*-values of biometric and haematological parameters for the statistical model used ( $y_{ijkl} = \mu_0 + D_i + T(D)_{j(i)} + M_k + TE_l + DTE_{il} + TET(D)_{j(i)} + \varepsilon_{ijkl}$ ).

	D (n = 120)	DT (n = 60)	TE (n = 180)	DTE (n = 60)	DTET (n = 30)
CF	NS	***	NS	NS	NS
RWGC	NS	***	***	NS	**
HSI	NS	**	**	NS	*
Cortisol	***	NS	***	***	NS
Glucose	NS	NS	**	NS	***
Lactate	**	NS	***	NS	NS
Haematocrit	NS	NS	***	NS	NS
Leucocytes	NS	NS	NS	NS	NS

CF: condition factor, RWGC: relative weight of the gut content, HSI: hepatosomatic index. D: day of slaughter, DT: type of feeding (fasted or fed) nested with day of slaughter, TE: water temperature, DTE: interaction day of slaughter \* water temperature, DTET: interaction treatment (day of slaughter) \* water temperature (for complete model see text). NS: *p* > 0.05.

\* *p* < 0.05.\*\* *p* < 0.01.\*\*\* *p* < 0.001.

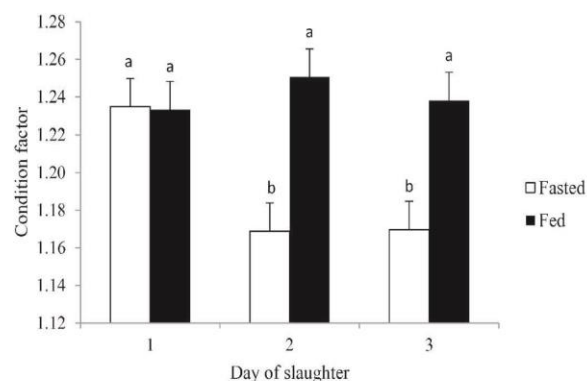
compared to weight or length) and is widely used in aquaculture to evaluate the nutritional status of fish (Bavecic et al., 2010; Chatzifotis et al., 2011), as it is more independent of differences in fish weight among treatments. We observed a lower CF in the trout after two days of fasting, which is 5 days earlier than that reported for rainbow trout by Sumpter et al. (1991) and Pottinger et al. (2003). This change suggests that the depletion of body reserves is more important than the environment, as we did not find any differences between the two water temperatures tested, which is in contradiction with Klontz (1993).

Regarding the RWGC, the gut is expected to empty in 1 to 5 days (Lines and Spence, 2012), but that is temperature dependent (requiring more time at low temperatures; Usher et al., 1991). However, other authors found that this process is completed by three days in Atlantic salmon, regardless of temperature (Robb, 2008). According to our results, the gut is almost emptied (0.88% of live weight) after only one day of fasting at summer temperatures (22 °C, equivalent to 22 °C days), whereas it was not completed even after three days at 11 °C (33 °C days), which may imply that temperature is the major factor influencing the gut emptying.

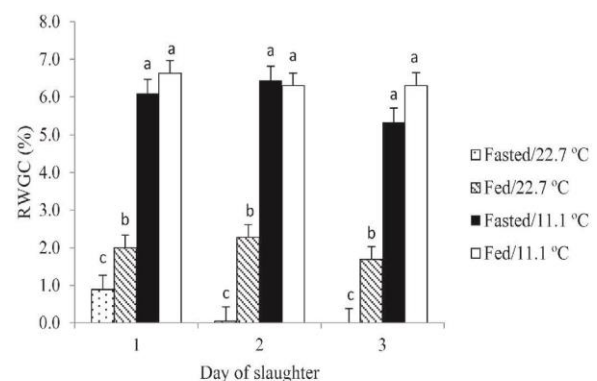
The HSI, an indicator of body reserves, was lower in fasted fish with the warmer temperature. Similar results have been reported for rainbow trout by Farbridge and Leatherland (1992b) but their HSI was lower than ours, probably since they used smaller fish (140 g). In contrast, the trout used by Lefevre et al. (2008) had a similar weight to ours and very similar HSI values. Hypothetically, we assume that the HSI should decrease with increased fasting, as trout begin to use up their body reserves to supply caloric needs, while minimizing tissue loss. However, the rate of change of HSI may vary. In rainbow trout, Farbridge and Leatherland (1992b) found a decrease with fasting after 48 h, but McMillan and Houlihan (1992) report significantly lower HSI only after 6 days of fasting (with fish weighing approximately 100 g). In our study, trout with higher

degree-days of fasting (warmer temperatures) presented a lower HSI, while it remained unaffected at the lower temperature.

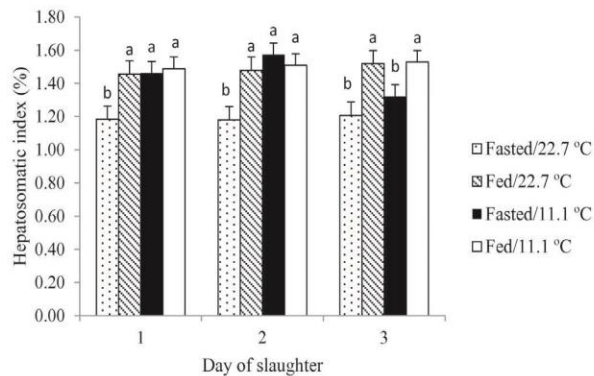
Cortisol levels varied with the day of sampling only for the higher temperature used in this study (22 °C). In the literature, data about the effect of fasting on cortisol in rainbow trout are inconsistent. Some authors report an increase in cortisol in fasted rainbow trout with fasting (Sumpter et al., 1991) while other find no effect (Holloway et al., 1994; Reddy et al., 1995) or even decreased levels in fasted fish (Farbridge and Leatherland, 1992a). In other species, the evidence is also contradictory, with cortisol being higher (Barcellos et al., 2010), lower (Barton et al., 1988) or similar to controls (Weber and Bosworth, 2005) in fasted jundia, salmon and channel catfish compared to fed fish, respectively. Our results concur with Sumpter et al. (1991) and Pottinger et al. (2003), who found no differences in the concentration of cortisol between fasted and fed fish after 6–9 weeks of fasting in trout. In our study, three days of fasting may be too short a period to provoke any physiological effect on cortisol, but we were unable to find studies assessing cortisol using shorter periods. The combination of water temperature and the day of slaughter had a significant effect on cortisol, with decreasing levels at 22.7 °C and similar levels at 11.1 °C. In addition, cortisol levels were higher at 22.7 °C than 11.1 °C. These results are similar to studies that demonstrated that fishes acclimated to lower temperatures have lower cortisol concentration than fishes in warmer water (Kuhn et al., 1986; Arends et al., 1998; Pottinger, 1998). The optimal water temperature range for rainbow trout is 7–18 °C (FAO, 2011; Skov et al., 2011), so this could explain the higher cortisol levels at 22.7 °C. The decreasing levels in fish exposed to high temperatures in this study may be explained because of the lower stocking density (North et al., 2006) or improved water quality (lower ammonia levels, higher pH, etc.) (Pottinger et al., 1992) on the second and third day of experiment. However, with the existing data we cannot make any further assumption.



**Fig. 1.** Changes in the condition factor (CF) of rainbow trout during the three days of slaughter. Data are means ± SEM. Different letters indicate significant differences among groups.

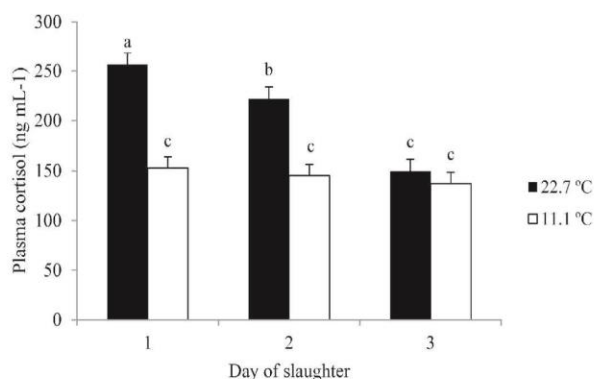


**Fig. 2.** Changes in the relative weight of gut content (RWGC) of rainbow trout by day of slaughter, type of fasting and water temperature. Data are means ± SEM. Different letters indicate significant differences among groups.

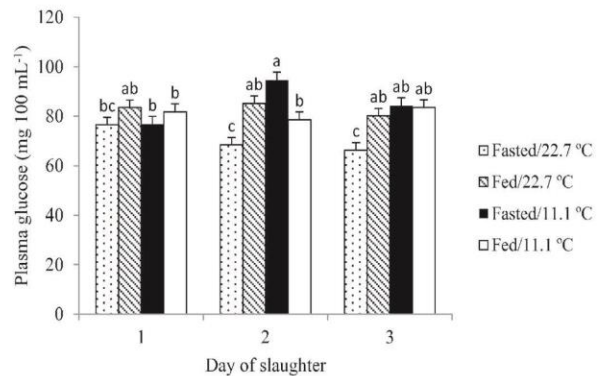


**Fig. 3.** Changes in the hepatosomatic index (HSI) of rainbow trout by day of slaughter, type of fasting and water temperature. Data are means  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant differences among groups.

In rainbow trout, basal glucose levels are around 70–90 mg 100 ml<sup>-1</sup> (Jentoft et al., 2005), so the values in our study were within the normal range. Fed fish maintained similar glucose levels throughout the trial but plasma glucose decreased significantly in fasted fish by day 2 and 3 only when fish were kept at 22 °C. This implies that the use of liver metabolites was not enough to maintain glucose levels at this temperature (Soengas et al., 1996; Pérez-Jiménez et al., 2012) when the oxidative catabolism of the glucose is higher compared to lower temperatures (Brauge et al., 1995), which indicates a rapid fall of plasma glucose levels at high temperature than at low temperature. Trout at warmer temperatures in this study presented lower plasma glucose and higher cortisol levels, maybe due to a higher stress response, which seems to be in disagreement with Gesto et al. (2014), who suggest that increased cortisol synthesis under stress conditions is probably linked to the hyperglycemia elicited by catecholamines release in rainbow trout. However, our results do not allow to make any clear conclusion on the correlation between plasma cortisol and glucose levels. Further research is needed to completely understand how the cortisol level modulates the glucose response under fasting conditions. Glucose concentrations in rainbow trout may vary with diet and nutritional status but in general decrease with fasting since carbohydrates are the primary and earliest source of energy when fish are food deprived (Davis and Gaylord, 2011), although other studies have found no variations in rainbow trout after 14 days of starvation (Soengas et al., 2006). The time that glucose levels take to start decreasing varies with species but is not normally before the first 5–7 days of food deprivation in salmonids (Navarro et al., 1992; Holloway et al., 1994; Furné et al., 2012) and in many other species (tench: De Pedro et al., 2003; channel catfish:



**Fig. 4.** Changes in plasma concentration of cortisol of rainbow trout during the three days of slaughter. Data are means  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant differences among groups.



**Fig. 5.** Changes in the plasma concentration of glucose of rainbow trout by day of slaughter, type of fasting and water temperature. Data are means  $\pm$  SEM. Different letters indicate significant differences among groups.

Peterson and Small, 2004; sunshine bass: Davis and Gaylord, 2011). One exception is Soengas et al. (1996), who found glucose decreased after 1 day of fasting in Atlantic salmon.

Plasma lactate levels appear to decrease in several species of fish that have been fasted (Hemre et al., 1990; Blasco et al., 1992). That may be related to increased use of lactate as a substrate for hepatic gluconeogenesis (Vijayan et al., 1996; Polakof et al., 2006). However, our results indicate that fasting did not decrease lactate levels. Overall, mean lactate levels were quite high for rainbow trout, compared to other authors. Trenzado et al. (2003) show peak values of 119.3 mg 100 ml<sup>-1</sup> or 13.2 mmol l<sup>-1</sup> for fish subjected to confinement for a period of 336 h, whereas these decreased after 6 h to around 20–40 mg 100 ml<sup>-1</sup> (2.2 and 4.4 mmol l<sup>-1</sup>). Lactate levels of a group of fish exposed to a waterborne Cd challenge were as low as 1.5  $\mu$ mol ml<sup>-1</sup> (Chowdhury et al., 2004). Morrow et al., 2004 show lactate values of 3.73 and 7.72 mmol l<sup>-1</sup> with different lipid and protein contents. Our high levels could indicate a chronic stress since they had to adjust to new housing conditions. In our study it could be that the effect of muscle exhaustion increased lactate above normal levels in both fasted and fed fish, which minimized any decrease in lactate that could have been observed by fasting, as found in other fish (Vijayan et al., 1996; Polakof et al., 2006; Liew et al., 2012). Results from the current study also showed plasma lactate concentrations were higher in fish at 22.7 °C than fish maintained at 11.1 °C. This increased plasma lactate concentrations are most likely related to the higher metabolic activity at this thermal condition, as seen in other species like gilthead seabream *Sparus aurata* (Vargas-Chacoff et al., 2009a, 2009b).

Strenuous activity will increase the haematocrit value (Reddy and Leatherland, 1988), since there is an increase in metabolic rate, oxygen uptake and release of erythrocytes from the spleen (Wendelaar Bonga, 1997; Gallagher and Farrell, 1998). The lower haematocrit at water temperature of 11.1 °C compared with 22.7 °C, may indicate that trout are less active during low temperatures. Regarding the effect of fasting on haematocrit, it is not affected by food deprivation in sunshine bass (Davis and Gaylord, 2011) or sea bass (Caruso et al., 2011), and there is very little information in rainbow trout. Farbridge and Leatherland (1992b) found very small differences between fasted and fed trout after 4 weeks of food deprivation but Olsen et al. (2005) report slight differences after 3 days of fasting. Our results suggest that fasting has little effect on haematocrit since there were no significant differences among fasted and fed fish after even three days of fasting.

## 5. Conclusions

Water temperature plays a vital role in the physiological stress response of fish to fasting, as described in the present study. According to our results, a higher rate of gut emptying and depletion of reserves

(HSI, plasma glucose) are closely related to a higher number of degree days of fasting (between 22.7 and 68.0 °C days). However, the haematological response of the fish is solely affected by the water temperature, with higher levels in fish subjected to higher temperatures and no apparent effect of the degree of fasting. Thus, the use of days only seems not to be acceptable to calculate the optimum fasting period in trout and we propose the use of degree-days, especially in the Mediterranean regions, where high temperatures may influence the growth performance and the stress response of the fish.

### Acknowledgements

This project was financed by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), project AGL2010-19479.

### References

- Arends, R.J., van der Gaag, R., Martens, G.J.M., Bonga, S.E.W., Flick, G., 1998. Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.* 159, 85–91. <http://dx.doi.org/10.1111/jfb.12331>.
- Barcellos, L., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R.M., Ferreira, D., 2010. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 300, 231–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.013>.
- Barton, B.A., Schreck, C.B., Fowler, L.G., 1988. Fasting and diet content affect stress induced changes in plasma glucose and cortisol in juvenile Chinook salmon. *Prog. Fish Cult.* 50, 16–22. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8640\(1988\)050<0016:FADCAS>2.3.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8640(1988)050<0016:FADCAS>2.3.CO;2).
- Bavcevic, L., Klanjscek, T., Karamarko, V., Anicic, I., Legovic, T., 2010. Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. *Aquaculture* 301, 57–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.009>.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J., 1992. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. *J. Comp. Physiol. B* 162, 539–546. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00264815>.
- Brauge, C., Corraze, G., Medale, F., 1995. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, body composition, nitrogen excretion and plasma glucose levels in rainbow trout reared at 8 or 18°C. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 277–290.
- Caruso, G., Denaro, M.G., Caruso, R., Mancari, F., Genovese, L., Maricchiolo, G., 2011. Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Mar. Environ. Res.* 72, 46–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.04.005>.
- Chatzifotis, S., Papadaki, M., Despoti, S., Roufidou, C., Antonopoulou, E., 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 316, 53–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.044>.
- Chowdhury, M.J., Pane, E.F., Wood, C.M., 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters. *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 163–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.10.006>.
- Compassion in World Farming, CIWF, 2009. The welfare of farmed fish. (Available at [http://www.ciwf.org.uk/resources/publications/fish\\_farming/default.aspx](http://www.ciwf.org.uk/resources/publications/fish_farming/default.aspx) (last accessed 7 April 2015)).
- Davis, K.B., Gaylord, T.G., 2011. Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158, 30–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.08.019>.
- De Pedro, N., Delgado, M.J., Gancedo, B., Alonso-Bedate, M., 2003. Changes in glucose, glycogen, thyroid activity, and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol. B* 173, 475–481. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-003-0355-7>.
- European Food Safety Authority, EFSA, 2008. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. Scientific opinion of the panel on animal health and animal welfare. *EFSA J.* 796, 1–22 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/796.pdf> (last accessed 7 April 2015)).
- European Food Safety Authority, EFSA, 2009. Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish: rainbow trout. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *EFSA J.* 1013, 1–55 (<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1012.pdf> (last accessed 7 April 2015)).
- Farbridge, K.J., Leatherland, J.F., 1992a. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 67–73. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004655>.
- Farbridge, K.J., Leatherland, J.F., 1992b. Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 10, 245–257. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004518>.
- Farmed Animal Welfare Council, FAWC, 1996. Report on the welfare of farmed fish. FAWC Report 2765 (<https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-the-welfare-of-farmed-fish> (last accessed 7 April 2015)).
- Food and Agriculture Organization, FAO, 2011. Small-scale rainbow trout farming. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 561 (<http://www.fao.org/docrep/015/i2125e/i2125e.pdf> (last accessed 7 April 2015)).
- Furné, M., Morales, A.E., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Sanz, A., 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* 182, 63–76. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-011-0596-9>.
- Gallaugh, P., Farrell, A.P., 1998. Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. In: Perry, S.F., Tufts, B.L. (Eds.), *Fish Respiration*. Academic Press, New York, pp. 185–222.
- Gesto, M., Otero-Rodiño, C., Lopez-Patiño, M., Miguez, J.M., Soengas, J.L., 2014. Is plasma cortisol response to stress in rainbow trout regulated by catecholamine-induced hyperglycemia? *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 207–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.002>.
- Hemre, G.I., Lie, O., Lambertsen, G., Sundby, A., 1990. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*). Hormonal response of insulin, glucagon and glucagon-like peptide to diet and starvation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 97, 41–44. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(90\)90719-9](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(90)90719-9).
- Holloway, A.C., Reddy, P.K., Sheridan, M.A., Leatherland, J.F., 1994. Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, cortisol and glucose concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. *Biol. Rhythm. Res.* 25, 415–432. <http://dx.doi.org/10.1080/09291019409360312>.
- Humane Slaughter Association, HSA, 2005. *Humane Harvesting of Salmon and Trout. Guidance Notes no. 5* (Wheatthampstead, UK).
- Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A., Andersen, O., 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 141, 353–358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.06.006>.
- Klontz, G.W., 1993. Environmental requirements and environmental diseases of salmonids. In: Stoskopf, M. (Ed.), *Fish Medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 333–342.
- Kuhn, E.R., Corneille, S., Ollevier, F., 1986. Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 61, 459–468. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90234-0](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(86)90234-0).
- Lefevre, F., Bugeon, J., Auperin, B., Aubin, J., 2008. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. *Aquaculture* 284, 81–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.017>.
- Liew, H.J., Sinha, A.K., Mauro, N., Dirix, M., 2012. Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. *Comp. Biochem. Physiol. A* 163, 327–335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.012>.
- Lines, J.A., Spence, J., 2012. Safeguarding the welfare of farmed fish at harvest. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 153–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9561-5>.
- Lopez-Luna, J., Torrent, F., Villarroel, M., 2013. Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 400–401, 142–147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.009>.
- McMillan, N., Houlihan, D.F., 1992. Protein synthesis in trout liver is stimulated by both feeding and fasting. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 23–34. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004651>.
- Morrow, M.D., Higgs, D., Kennedy, C.J., 2004. The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 137, 143–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.01.001>.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., Planas, J., 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp. Biochem. Physiol. A* 102, 401–407. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90154-1](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(92)90154-1).
- Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M., Karjalainen, J., 2004. Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture* 235, 285–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.017>.
- North, B.P., Turnbull, J.F., Ellis, T., Porter, M.J., Migaud, H., Bron, J., Bromage, N.R., 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout. *Aquaculture* 255, 466–479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.004>.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Ringø, E., 2005. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 250, 480–495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.014>.
- Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Hidalgo, M.C., García-Alcazar, A., Abellán, E., Morales, A.E., 2012. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1145–1157. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9600-2>.
- Peterson, B.C., Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest. Anim. Endocrinol.* 26, 231–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2003.10.005>.
- Polakof, S., Arjona, E.J., Sangiao-Alvarellos, S., Miguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. Comp. Physiol. B* 176, 441–452. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-006-0065-z>.
- Pottinger, T.G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets. *J. Fish Biol.* 53, 728–742. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01828.x>.
- Pottinger, T.G., Prunet, P., Pickering, A.D., 1992. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 454–460. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(92\)90240-K](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(92)90240-K).
- Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., 2003. Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136, 403–417. [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00212-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00212-4).

- Reddy, P.K., Leatherland, J.F., 1988. Stress physiology. In: Leatherland, J.F., Woo, P.T.K. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders Non-infectious Disorders Vol. III*. C.A.B. International, Wallingford, UK, pp. 279–302.
- Reddy, P.K., Vijayan, M.M., Leatherland, J.F., Moon, T.W., 1995. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? *J. Fish Biol.* 46, 341–359. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb05973.x>.
- Robb, D., 2008. Welfare of fish at harvest. In: Branson, J. (Ed.), *Fish Welfare*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 217–242.
- Schurmann, H., Steffensen, J.F., Lomholt, J.P., 1991. The influence of hypoxia on the preferred temperature of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 157, 75–86.
- Skov, P.V., Larsen, B.K., Frisk, M., Jokumsen, A., 2011. Effects of rearing density and water current on the respiratory physiology and haematology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* at high temperature. *Aquaculture* 319, 446–452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.008>.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W., 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, 810–821. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00115.2006>.
- Soengas, J.L., Strong, E.F., Fuentes, J., Veira, J.A.R., Andres, M.D., 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 491–511. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01874923>.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F., 1991. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 94–102. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90109-J](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(91)90109-J).
- Trenzado, C.E., Carrick, T.R., Pottinger, T.G., 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 332–340. [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00191-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00191-6).
- Usher, M.L., Talbot, C., Eddy, F.B., 1991. Effects of transfer to seawater on growth and feeding in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture* 94, 309–326. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90176-8](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90176-8).
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Polakof, S., Martín del Río, M.P., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2009b. Interactive effects of environmental salinity and temperature on metabolic responses of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 154, 417–424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.07.015>.
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Páscoa, I., Gonçalves, O., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., 2009a. Seasonal variation in osmoregulatory and metabolic parameters in earthen pond cultured gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Aquac. Res.* 40, 1279–1290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02226.x>.
- Vijayan, M.M., Morgan, J.D., Sakamoto, T., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1996. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. *J. Exp. Biol.* 199, 2467–2475.
- Weber, T.E., Bosworth, B.G., 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture* 246, 483–492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.032>.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

**Bermejo-Poza R.**, Fernández-Muela M., De la Fuente J., Díaz M.T., Pérez C., González de Chávarri E., Lauzurica S., Torrent F., Villarroel M. 2016. Was the European Food Safety Authority right about the optimal pre-slaughter fasting period for rainbow trout? Aquaculture Europe 2016. Edimburgo, Reino Unido.

**Bermejo-Poza R.**, Fernández-Muela M. 2016. Impacto de los grados día de ayuno sobre el bienestar animal y la calidad de la carne en trucha arcoíris. VIII Congreso de estudiantes universitarios de ciencia, tecnología e ingeniería agronómica. Madrid, España.

Villarroel M., **Bermejo-Poza R.**, Torrent F., González de Chavarri E., Pérez C., De la Fuente J. 2016. Welfare and flesh quality of Spanish rainbow trout when electrically stunned. Aquaculture 2016. Las Vegas, Nevada, EEUU.

**Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Pérez C., González de Chavarri E., Torrent F., Villarroel M. 2015. Effect of degree days of fasting before slaughter on stress response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Europe 2015. Rotterdam, Países Bajos.

**Bermejo-Poza R.**, Angulo-Cerezo R., De la Fuente J., González de Chavarri E., Pérez C., Torrent F., Villarroel M. 2015. Efecto de la mezcla de lotes y del ayuno pre-sacrificio sobre el bienestar animal de la trucha arcoíris. XV Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Acuicultura. Huelva, España.

Jerez I., **Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Mancera J.M., Villarroel M. 2015. Efecto de los patrones de alimentación y el ayuno previo al sacrificio sobre el metabolismo intermediario de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). XV Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Acuicultura. Huelva, España.

Villarroel M., **Bermejo-Poza R.** 2015. ¿Dónde y cuánto publicamos? XV Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Acuicultura. Huelva, España.

**Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Pérez C., Lauzurica S., González de Chávarri E., Díaz M.T., Villarroel M. 2015. Reducing the effect of pre-slaughter fasting on the flesh quality of rainbow trout. 66th EAAP Annual Meeting. Varsovia, Polonia.

**Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Pérez C., Lauzurica S., González de Chávarri E., Díaz M.T., Villarroel M. 2015. Efecto de la frecuencia de alimentación en el último mes de engorde sobre la calidad de la carne y las reservas de glucógeno en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). I Jornadas de investigación en doctorado (VETINDOC). Madrid, España.

**Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Pérez C., Lauzurica S., González de Chávarri E., Díaz M.T., Torrent F., Villarroel M. 2015. Efecto de los grados día de ayuno y del hacinamiento previos al sacrificio sobre el contenido estomacal y respuesta de estrés en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). XVI Jornadas sobre Producción Animal (AIDA). Zaragoza, España.

**Bermejo-Poza R.**, De la Fuente J., Pérez C., Lauzurica S., González de Chávarri E., Díaz M.T., Villarroel M. 2014. Manejo de la alimentación al final del engorde de la trucha arcoíris: Repercusiones sobre la calidad de la carne. I Semana de la biotecnología en la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Madrid, España.