



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Marcadores fisiológicos y estado óxido-reductor durante las fluctuaciones térmicas en la dorada (*Sparus aurata*)

Sergio Sánchez Nuño



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Programa de Acuicultura

**MARCADORES FISIOLÓGICOS Y ESTADO OXIDO-REDUCTOR
DURANTE LAS FLUCTUACIONES TÉRMICAS EN LA DORADA
(*Sparus aurata*)**

Memoria presentada por

Sergio Sánchez Nuño

Para optar al grado de

Doctor por la Universitat de Barcelona

Dr. Antonio Ibarz Valls
Director

Dra. Teresa Carbonell Camós
Co-directora y tutora

Sergio Sánchez Nuño
Doctorando

Barcelona, Septiembre de 2018

*A la memoria de
Isabel, Gregorio y Carmen*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer todo el apoyo recibido por parte de mi familia, especialmente a mis padres Juan e Isabel. A lo largo de mi vida han sido de gran apoyo en todo lo que he hecho y sin ellos esta tesis probablemente no existiría.

Largo ha sido el camino hasta llegar a este punto, largo y no siempre fácil. Por suerte a lo largo de este camino siempre he contado con buena compañía, desde el inicio (octubre de 2010), desde aquel día en que Borja (que por aquel entonces estaba de alumno colaborador de la Dra. Gallardo) me comentó que una tal Dra. Carbonell estaba buscando algún alumno para colaborar en el departamento de “fisiología”, hasta el día de hoy (septiembre 2018).

Me gustaría agradecer, y mucho, el esfuerzo y la dedicación de Toni. Desde el primer día que me “fichó” siempre se ha preocupado de que las cosas se hagan de forma correcta y ha intentado evitar que se hagan “tard i malament” y “improvitzant” (aunque no siempre lo consiguió...), eso para un estudiante de doctorado es algo de un valor incalculable. Gracias Toni.

Desde el comienzo en el grupo de Teresa, muchos han sido los buenos momentos que he vivido, desde las mañanas con Juani montando mesas, preparando tampones o descubriendo servicios de la UB que desconocía a los desayunos en la cafetería de “Geo” con Teresa y Norma. Siempre recibí buenos consejos de las tres y me enseñaron a manejarme dentro de un laboratorio, de modo que solo tengo palabras de agradecimiento.

A los chicos de la tercera planta, grupo de incondicionales a la hora de la comida y responsables de que los momentos complicados lo fueran menos, grandes amigos y tamponadores del estrés. Gracias a Carmen nuestra gran animadora de las comidas por su sentido del humor, a las inmunes Sara y Cris y a la chicarrona del norte Garoa por esos ratitos fuera de las cuatro paredes del departamento. Gracias al cada vez más portugués (prácticamente) David por compartir fatigas y legarme “su despacho”, a Juan Gabriel por su compañía en los viajes a Mundet, a Miguel por sus consejos, a Irene por esos buenos momentos en su lab y dando clases (y por sus apuntes de Bio de químicas), a los más recientes Vilches y Marta por hacer del vecindario un sitio mejor, y a todos aquellos que han pasado más o menos tiempo en este maravilloso departamento. Mención especial para Antoñico y para Don Manuel, dos grandes del panorama nacional e internacional. Gracias también a los chicos de la cuarta planta Miquel y Albert por esas charlas y consejos fugaces y a Emilio por compartir nuestras penas en el tramo final. Y gracias a mi compañero de máster y amigo Óscar. Pero sobretodo, y muy especialmente gracias a Raquel por aguantar todo lo que conlleva la escritura de la tesis dentro y fuera del departamento, y por escuchar mis desahogos.

No tener beca también tiene sus ventajas, como por ejemplo dar clases como profesor asociado. Esto me ha permitido hacer un 2x1 y descubrir algo que realmente me gusta, la docencia. A lo largo de estos 5 años esos grandes desconocidos durante la carrera: “los profes” me han tratado como compañero. Me gustaría agradecer a Josep Chillaron su sinceridad; a Encarni por ayudarme durante mi periplo dando teórica; a Ginés y Torrella por su buen sentido del humor, su confianza al delegar y sobre todo por sus libros; al Dr. Palomeque por su cercanía, su estima, su gusto por la cerveza y por la pesca en los lagos escoceses, a “mi tío” Josep Sánchez por esas charlas y seminarios fotográficos y por mostrarme la experiencia en la docencia y gracias a Teresa por ser mi mentora docente y profesional.

Gracias a las chicas de secretaría Marga, Claudia y Pilar, que siempre han dado la talla cuando las he requerido, especialmente a Marga que con tanto muestreo por la geografía española y con tantos pedidos la he mareado en alguna que otra ocasión. También gracias a Merche por su eficiencia y simpatía. Gracias a mis compañeras de despacho Marga y Cris, por aceptarme en su casita, por estar siempre dispuestas a ayudar y a solucionar cualquier problema, además de mostrarme su mejor cara (con permiso de Betty Boop). Especialmente a Cris, que la vi “nacer” y siempre he estado dentro de su radio de acción.

También me gustaría agradecerle a Jordi Guinea las charlas y consejos teórico-prácticos sobre el manejo de los animales dentro del estabulario, y por su apoyo y sus buenas formas. Agradecer también a todos aquellos pececillos que han dado su vida de forma inconsciente para sacar adelante esta tesis. Y a Toffa por las correcciones “in extremis”.

Me gustaría agradecerle a Pedro Guerreiro su amabilidad y la aceptación en su grupo del CCMAR de Faro, así como sus invitaciones a los partidillos de fútbol en Montenegro. Poder realizar esta estancia en Portugal ha supuesto un gran desarrollo tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias a mi “chefinha” Sandra por acogerme tan bien, dentro y fuera del laboratorio, de no ser por ella y por Cazé mi estancia no hubiera sido tan enriquecedora. Gracias también a André por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Muchas gracias al Dr. Mancera, al Dr. Lluís Tort, al Dr. Enric Gisbert, al Dr. Marcelino Herrera, a la Dra. Encarni Capilla y a la Dra. Norma Alva por aceptar la invitación y formar parte del tribunal de esta tesis.

Por último, agradecer a los jinetes del apocalipsis, a mis infatigables compañeros del alma Ignasi, Borja y Laura. Sin vosotros esto no hubiera sido lo mismo (o no Natx?). Empecé con Ignasi, compartiendo esos grandes momentos de Western, esos nachos de los viernes, nuestro timer de youtube, los pókimon y “er grin”, nuestro curso de submarinismo, el tour con Manu y Antoñico, los congresos con camas rotas y los muestreos en honor a la tesis de Borja. Posteriormente se nos unió el alegre y risueño Borja, sí, el mismo que me abrió la puerta de entrada al departamento, y con el que compartí grandes momentos durante la carrera. Con el también he compartido buenos momentos en los muestreos del estabulario húmedo, juntos vimos la inmersión de Arnau y en el borde exterior todavía intentamos conquistar la galaxia. Y la última en incorporarse fue la Dra. Fernández-Alacid, la pieza que ha terminado de ajustar todo el engranaje de la máquina del grupo “NIBIFish”, sin duda un fichaje brillante y de 10. Gracias por tu apoyo y ayuda en momentos no tan buenos, por los audios casual del whatsapp y por hacerme aguantar lenguados de 1Kg a pulso (sin dolor).

Mis disculpas a todos los que se den por aludidos y no aparezcan en los agradecimientos, han sido muchos años de experiencias y muy pocas las líneas destinadas para devolver la gratitud y el cariño recibido durante este periodo de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vix
ABREVIATURAS.....	xiivi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.PERSPECTIVAS DE LA ACUICULTURA	3
1.1.Estado actual de la acuicultura mundial	3
1.2.Estado actual de la acuicultura europea.....	5
1.3.Estado actual de la acuicultura española	6
2.DORADA COMO ESPECIE DE INTERÉS EN LA ACUICULTURA MEDITERRÁNEA.....	7
2.1.Biología	7
2.2 Producción mundial y española.....	7
3. PROBLEMÁTICA EN LA PRODUCTIVIDAD A BAJAS TEMPERATURAS: “GROWTH ARREST”	9
3.1 Alimentación en bajas temperaturas (“Functional foods”).....	11
3.2 Terrenos sin explorar: “GAPS”	13
4.PUNTOS DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DEL BIENESTAR DE LA DORADA	13
4.1.Osmorregulación.....	14
4.2.Metabolismo energético.....	15
4.3.Estado oxido-reductor	18
4.4.Homeostasis proteica.....	20
4.5.Control hipofisario	23
OBJETIVOS.....	27
PLAN DE TRABAJO	30
PUBLICACIONES.....	35
CAPÍTULO I.....	37
CAPÍTULO II	51
CAPÍTULO III.....	81
CAPÍTULO IV.....	101
DISCUSIÓN.....	125
1.CRECIMIENTO DURANTE LA FLUCTUACIÓN TÉRMICA.....	129
2.ESTADO DE LOS ANIMALES A 22°C, ANTES DE LA BAJADA DE LA TEMPERATURA. 130	
2.1Efecto de la dieta sobre los metabolitos plasmáticos	130
2.2.Condicionamiento de la dieta en el metabolismo hepático.....	131
2.3.Estado de los parámetros osmorreguladores previos al frío	133

2.4.Modulación de la respuesta hipofisaria por la dieta a 22°C.....	134
3.ESTADO DE LOS ANIMALES DESPUÉS DE 50 DÍAS DE EXPOSICIÓN A 14°C	135
3.1.Efecto de la bajada de la temperatura sobre los metabolitos plasmáticos	135
3.2.Efecto de la bajada de la temperatura sobre el metabolismo hepático.....	136
3.3.Estado de la homeostasis proteica en el hígado tras la exposición a las bajas temperaturas	137
3.4.Efecto de la bajada de la temperatura sobre los parámetros osmorreguladores	139
3.5.Respuesta hipofisaria a la exposición de baja temperatura.....	140
4.ESTADO DE LOS ANIMALES TRAS LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA.....	141
4.1.Efecto de la recuperación de la temperatura en los metabolitos plasmáticos	141
4.2.Efecto de la recuperación de la temperatura sobre el metabolismo hepático	141
4.3.Efecto de la recuperación de la temperatura sobre la homeostasis proteica en el hígado.....	143
4.4.Efecto de la recuperación de la temperatura sobre los parámetros osmorreguladores.....	144
4.5.Respuesta hipofisaria frente a la recuperación de la temperatura a 22°C.....	145
5.SUMARIO.....	145
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151

ABREVIATURAS

19S	Subunidad reguladora del proteasoma
20S	Subunidad catalítica del proteasoma
4-HNE	4-Hidroxinonenal
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
AOPP	Productos de oxidación avanzada de las proteínas
APROMAR	Asociación Empresarial de Acuicultura de España
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
C	Muestreo al final de la bajada de temperatura (14°C)
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
CS	Citrato sintasa
D14	Dieta con 14% de lípidos en su composición (grupo experimental)
D16	Dieta con 16% de lípidos en su composición (grupo experimental)
D18	Dieta con 18% de lípidos en su composición (grupo experimental)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Muestreo a la semana de recuperar la temperatura (22°C)
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FCR	Tasa de conversión del alimento
FEAP	Federación Europea de Productores Acuáticos
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GH	Hormona del crecimiento
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GR	Receptor de glucocorticoides
GSH	Forma reducida del glutatión
GSSG	Forma oxidada del glutatión
GTH	Hormona gonadotropina
HOAD	Hidroxiacil Co-A deshidrogenasa
HPI	Eje hipotalámico-interrenal
HSI	Índice hepatosomático
HSP	Proteína de choque térmico
IGF	Factor de crecimiento dependiente de insulina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPO	Lipoperoxidación
LR	Muestreo al final de la recuperación de la temperatura (22°C)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NRS	Especies reactivas del nitrógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Muestreo anterior a la bajada de la temperatura (22°C)
POMC	Proopiocorticotropina
PRL	Prolactina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Q₁₀	Coeficiente de temperatura
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SGR	Tasa de crecimiento
SOD	Superóxido dismutasa
T3	Triyodotironina

T4	Tiroxina
TAG	Triacilglicéridos
TBARS	Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico
TC	Colesterol total
tGSH	Glutación total
TH	Hormonas tiroideas
TR	Receptores de hormonas tiroideas
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides
UE	Unión Europea
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma

INTRODUCCIÓN

1.PERSPECTIVAS DE LA ACUICULTURA

La acuicultura como actividad se ha desarrollado desde hace centenares, incluso miles de años principalmente en su forma extensiva o semi-extensiva. Fue a mediados del siglo XX cuando el cultivo intensivo empezó a tener mayor impacto económico y mediático como consecuencia de los avances técnicos y tecnológicos en la industria. Este hecho fue asociado a un incremento en de la progresión de esta actividad dentro del sector en estos últimos años, creando una tendencia en la reducción de la captura de peces salvajes para tratar de comprender y mejorar la cría de un número creciente de especies cultivadas. Si bien la acuicultura proporcionó solo el 7% del pescado para consumo humano en 1974, este porcentaje aumentó al 26% en 1994 y al 39% en 2004. En este sentido, cabe destacar que en 2014 se alcanzó un hito cuando la contribución del sector acuícola al suministro de pescado para consumo humano superó por primera vez la del pescado capturado en el medio natural (FAO, Informe SOFIA 2018).

Estudios recientes de la FAO y la OMS informan sobre la relevancia nutricional del pescado sobre la población mundial, considerándolo una fuente rica en proteínas de alta calidad y fácil digestión que contiene todos los aminoácidos indispensables. De hecho, se estima que en 2015, la ingesta de pescado representó el 17% del total de proteínas ingeridas en la dieta a nivel mundial. El pescado, además proporciona grasas esenciales (ácidos grasos omega 3 de cadena larga), vitaminas (D, A y B) y minerales (como calcio, yodo, zinc, hierro y selenio), especialmente si se consume entero. Además, aporta beneficios para la salud en la protección frente a cardiopatías coronarias y contribuye al desarrollo del cerebro y el sistema nervioso en fetos y niños. Gracias a sus valiosas propiedades nutricionales, puede resultar decisivo para corregir las dietas desequilibradas y para contrarrestar la obesidad.

1.1. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA MUNDIAL

La sobre-explotación de los caladeros y las nuevas tecnologías aplicadas a las flotas de pesca han llevado a alcanzar los máximos de explotación de los recursos pesqueros silvestres desde la década de 1990. Este hecho junto al incremento de la demanda de producto pesquero ha impulsado el desarrollo de la acuicultura, siendo la responsable de cubrir el suministro de pescado para el consumo humano (Fig.1). El potencial que tienen los océanos y las aguas continentales podrían ser fundamentales para la seguridad alimentaria y la nutrición adecuada de la humanidad en los próximos años, debido al incremento demográfico que se espera. De hecho, en 2016 el 88% (más de 151 millones de toneladas) del pescado producido en la acuicultura se destinó al consumo humano, pese a que los subproductos suelen utilizarse para fines no alimentarios (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

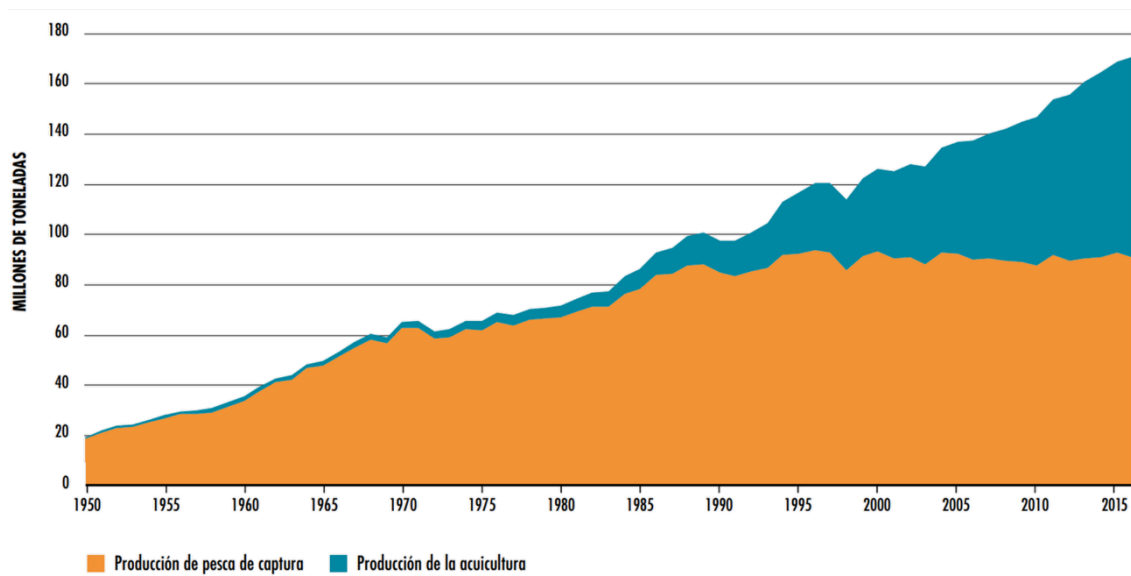


Figura 1. Producción total a nivel mundial de la acuicultura y la pesca de captura. (FAO, Informe SOFIA 2018)

Actualmente, la acuicultura sigue creciendo más rápido que otros sectores principales de producción de alimentos, aunque ya no muestra las elevadas tasas de crecimiento anuales de las décadas de los 80s y 90s. Algunos datos así lo corroboran, por ejemplo, en 2016 la producción de animales acuáticos procedentes de la acuicultura ascendió a 80,0 millones de toneladas. Este total se compuso de 54,1 millones de toneladas de peces de escama, 17,1 millones de toneladas de moluscos, 7,9 millones de toneladas de crustáceos y 938 500 toneladas de otros animales acuáticos (Fig.2). En lo que al tipo de cultivo se refiere, el 54,3% de la producción de acuicultura tuvo lugar en aguas marinas y el 45,7 % en aguas dulces (FAO, Informe SOFIA 2018).

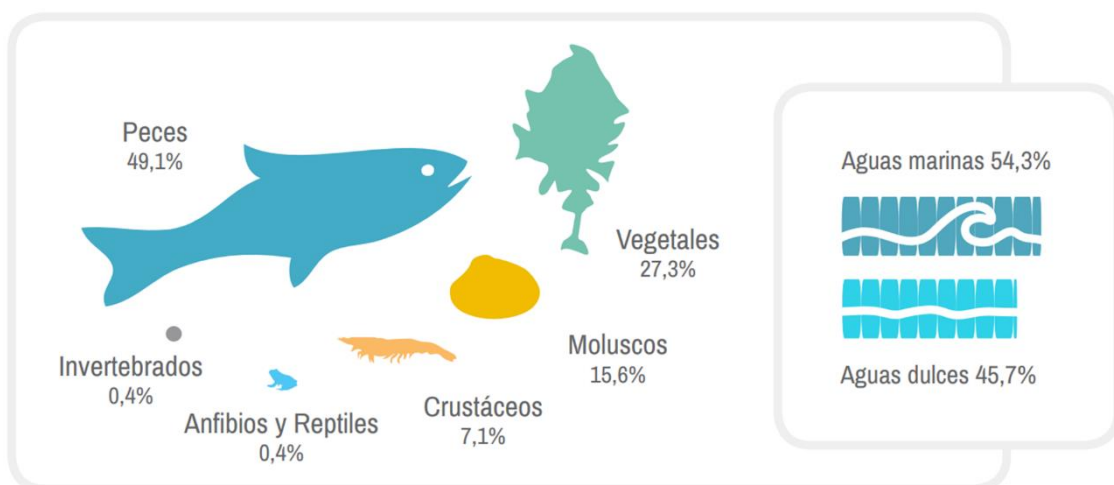


Figura 2. Distribución de la producción acuícola en el año 2016 (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

La distribución demográfica a lo largo del planeta, sumado a la irregular distribución de los océanos y de las costas, ocasiona que tanto la demanda como la productividad actual de la acuicultura a nivel mundial no se distribuya de forma homogénea, existiendo grandes diferencias entre continentes. En este sentido, Asia genera actualmente cerca del 89% del

volumen de la producción acuícola mundial. Por tanto, no es de extrañar que la primera forma de acuicultura datada en el año 3500 a.c., fuera sobre el cultivo de carpas en la antigua China. Precisamente China, fue con diferencia el principal productor de pescado comestible cultivado en 2016, produciendo una cantidad mayor que todo el resto del mundo cada año desde 1991. Los demás productores importantes en 2016 fueron la India, Indonesia y Vietnam, sin embargo, la Unión Europea (UE) constituyó el mayor mercado único de pescado y productos pesqueros, seguida de los Estados Unidos y Japón (FAO, Informe SOFIA 2018).

1.2. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA EUROPEA

En 2016 la Unión Europea produjo 1.292.597 toneladas de productos de acuicultura. Este dato supone un aumento del 2,2% respecto de lo puesto en el mercado en 2015, aunque sigue estando por debajo del máximo de producción de la acuicultura europea que tuvo lugar en 1999, cuando superó las 1.435.350 toneladas. A diferencia de la tendencia mundial, en la Unión Europea la acuicultura representa el 19,7% del volumen de la producción acuática total (acuicultura y pesca), el 80,3% restante de la producción provino de la pesca extractiva (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

España es el Estado miembro de la Unión Europea con un mayor volumen de producción en acuicultura, con 283.831 toneladas en 2016 (22,0% del total de la Unión), seguido por el Reino Unido con 194.492 toneladas (el 15,0%) y Francia con 166.640 toneladas (12,9%) (Fig.3 izq.). Sin embargo, considerando el valor de la producción, el Reino Unido es el principal Estado, mientras que España se sitúa en cuarto lugar. Las principales especies producidas en la UE en 2016 fueron: el mejillón, con 476.388 toneladas, la trucha arco iris, con 185.400 toneladas, y el salmón atlántico, del que se produjeron 181.030 toneladas. La dorada también se encuentra como una de las especies más producidas con 83186 toneladas (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

En lo que respecta a la producción de pescado, en 2016 la Unión Europea obtuvo 688.924 toneladas mediante la acuicultura, un 4,1% más respecto de 2015. Reino Unido es el Estado miembro de la UE con una mayor producción, tanto en peso, 177.604 toneladas (el 25,8% del total a pesar de caer su producción anual en un 5,3 %), como en valor, 880,3 millones de euros (30,7% del valor total y un crecimiento del 4,8 %). Grecia es el segundo productor, con 99.994 toneladas (el 14,5 % del total y un crecimiento del 13,2%) y 457,3 millones de euros (16,0 % del total y un crecimiento del 10,2%), siendo las especies mayoritarias la lubina y la dorada. España es el tercer país productor, con con 64.111 toneladas (9,3% del total y un crecimiento del 3,7%) y 322,6 millones de euros (el 11,3% del valor total de la piscicultura de la UE y un crecimiento del 11,5 %) 59.533 toneladas (el 9,0% del total y un crecimiento interanual del 1,5%), y 317 millones de euros (10,6% del valor total de la piscicultura de la Unión Europea y un crecimiento del 4,6%) (Fig.3 dcha.) (FAO, Informe SOFIA 2018).

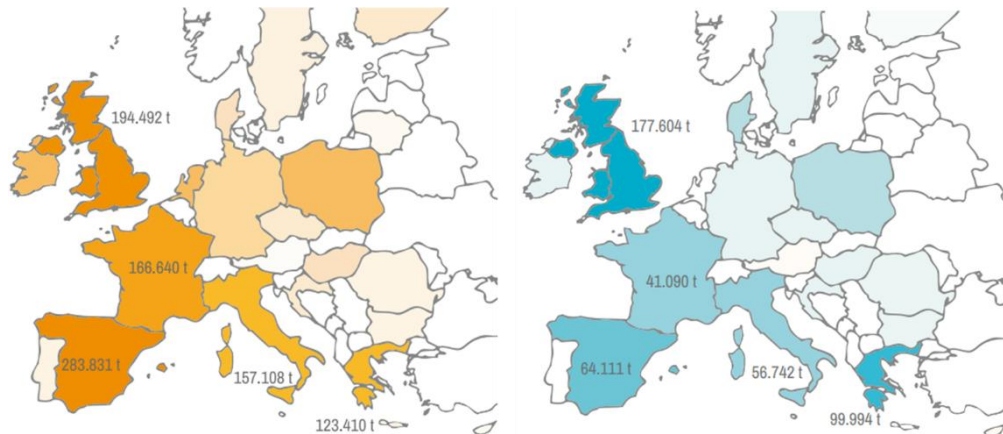


Figura 3. Producción acuícola de la UE en 2016. Producción total (derecha) vs Producción de pescado (izquierda) (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

1.3. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA ESPAÑOLA

A finales de los años 60 del siglo XX, España ocupaba una posición destacada en el escenario mundial de producción de productos acuáticos, basada principalmente en la pesca en aguas de terceros países. A partir de los años 70 el volumen de la actividad extractiva comenzó una progresiva disminución a causa de la reducción de las posibilidades de pesca. La acuicultura, que en España se inició en los mismos años 60, a pesar del progresivo incremento en su peso específico y de las expectativas generadas, no ha sido capaz de compensar la caída de la actividad pesquera ni de contrarrestar la disminución en las capturas. Algunos datos del último estudio de la FAO muestran que en España los productos provenientes del medio acuático mediante la acuicultura y la pesca, disminuyó en 2016 se redujo en un 5,3 % respecto de 2015, hasta quedarse en 1.198.968 toneladas. Este decrecimiento refuerza la tendencia de la última década que ha sido de decrementos anuales del 0,2%. En términos de producción acuícola, la producción en España en 2016 sumó un total de 282.242 toneladas. Las principales especies cultivadas fueron el mejillón (*Mytilus sp.*), del se produjeron 215.855 toneladas (casi la totalidad de la acuicultura española), seguido por la lubina (23.445 toneladas), la trucha arco iris (17.732 toneladas) y la dorada (13.740 toneladas). Por parte de la pesca, la principal especie capturada por la flota española fue el atún listado (*Katsuwonus pelamis*) del que se capturaron 148.396 toneladas en 2016.

En 2015 se utilizaron en España 118.500 toneladas de pienso. Esta cantidad fue un 5,6% superior a la de 2014. El 84% fue administrado a peces marinos: dorada, lubina, corvina, rodaballo, anguila y lenguado; y el 16% restante a especies continentales como trucha y esturión. El pienso utilizado en las granjas de acuicultura localizadas en España es mayoritariamente de tipo extrusionado y de elaboración propia, completándose con importaciones mayoritariamente francesas y portuguesas. La localización de las fábricas de pienso en España facilita la realización de una importante actividad de investigación e innovación en el campo de la nutrición y la alimentación de los peces.

2.DORADA COMO ESPECIE DE INTERÉS EN LA ACUICULTURA MEDITERRÁNEA

2.1.BIOLOGÍA

La especie *Sparus aurata* (Fig.4) es comúnmente conocida en España como dorada y presenta una distribución principalmente mediterránea, aunque su presencia se extiende además a lo largo de las costas europeas y africanas del Atlántico desde el este de Gran Bretaña a Senegal y ocasionalmente en el mar Negro. Al ser una especie potencialmente eurihalina y euritérmica se puede encontrar en ambientes marinos y salobres tales como lagunas costeras y áreas estuarinas, particularmente durante las etapas iniciales de su ciclo de vida.

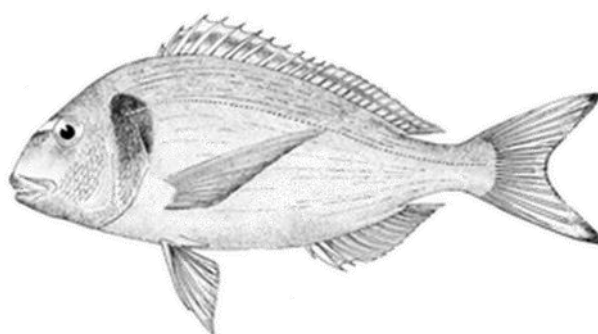


Figura 4. Dorada, *Sparus aurata*; Linnaeus, 1758

Las larvas de esta especie nacen en mar abierto durante octubre-diciembre y los juveniles típicamente migran a principios de la primavera hacia las aguas costeras (hasta los 30m) donde pueden encontrar abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. Pese a tener un rango de tolerancia térmica, esta especie es sensible a las bajas temperaturas (el límite letal más bajo es 5°C según Ravagnan 1978; Barnabé 1990) de modo que a finales de otoño retornan al mar abierto y es en este periodo donde los individuos adultos se reproducen. Las doradas se encuentran usualmente sobre fondos rocosos y praderas de pastos marinos (principalmente de *Posidonia oceanica*) aunque también se pueden mover frecuentemente sobre fondos arenosos, en cualquier caso, en alta mar no es frecuente encontrarlas a más de 50m de profundidad. Sus hábitos alimentarios son de una alta tendencia carnívora con predilección por los moluscos (particularmente mejillones), pequeños crustáceos y peces. Además, la dorada es una especie hermafrodita protándrica, de manera que los adultos se desarrollan sexualmente en machos a los 2 años de edad (20–30cm) y en hembras a los 2–3 años (33–40cm). Las hembras desovan en tandas intermitentes, pudiendo poner 20.000–80.000 huevos cada día por un período de hasta 4 meses. En cultivo, el cambio de sexo está condicionado por factores sociales y hormonales.

2.2 PRODUCCIÓN MUNDIAL Y ESPAÑOLA

Debido a sus cualidades euritérmicas y eurihalinas, anteriormente citadas, permiten cierta plasticidad en su cultivo tanto en aguas salobres como marismas, además de la posibilidad mantenerla en jaulas en mar abierto. Los centros de cría (“hatcheries”) producen huevos a partir de individuos reproductores en condiciones muy controladas. Cada hembra llega a poner 2 millones de huevos de 1 mm de diámetro por kilo de peso. Durante su primer mes de vida en cultivo, las larvas se alimentan de organismos vivos, principalmente rotíferos y

artemia. Después inician una alimentación a base de piensos. Cada dorada tarda entre 18 y 24 meses en alcanzar 400g desde que eclosiona del huevo, siendo el rango de peso comercial recomendado entre los 250g hasta más de 1.500g (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018). Por estos motivos, la dorada se considera una especie de principal interés comercial en nuestras aguas.

En términos de producción acuícola total de dorada en Europa y el resto del Mediterráneo en 2017 se estimó en 207.167 toneladas, según estadísticas de APROMAR, FEAP y FAO. Esta cifra fue prácticamente similar a la de 2016. Para este 2018 se estima un crecimiento del 6 % hasta alcanzar las 220.500 toneladas (Fig.5). La producción de esta especie se distribuye en 20 países, siendo los principales productores Turquía con 72.000 toneladas (que representa el 34,8 % de la producción total), Grecia con 51.000 t. (el 24,6 %), Egipto con 26.000 t (12,6 %) y España con 13.642 t (6,6 %) (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018)

Pese a que el total de cosecha de dorada de acuicultura en España en 2017 ha caído 0,7 % respecto al año anterior, para 2018 la FAO estima un importante crecimiento del 21,6 % hasta superar las 16.500 toneladas (Fig.5 arriba). A nivel autonómico, en 2017 la Comunidad Valenciana ha encabezado la producción de dorada de acuicultura en España con 5.590 t (el 41 % del total), seguida por Murcia (4.356 t, el 32 %), Canarias (2.063 t, el 15 %), Andalucía (980 t, el 7 %) y Cataluña (654 t, el 5 %) (Fig.5 abajo). Pese a que una pequeña cantidad de dorada silvestre sigue siendo capturada por los barcos de pesca españoles (1.130 toneladas en 2016), su volumen permanece relativamente constante en torno a esa cuantía, siendo la dorada de crianza el 91,6 % del total de dorada puesta en el mercado.

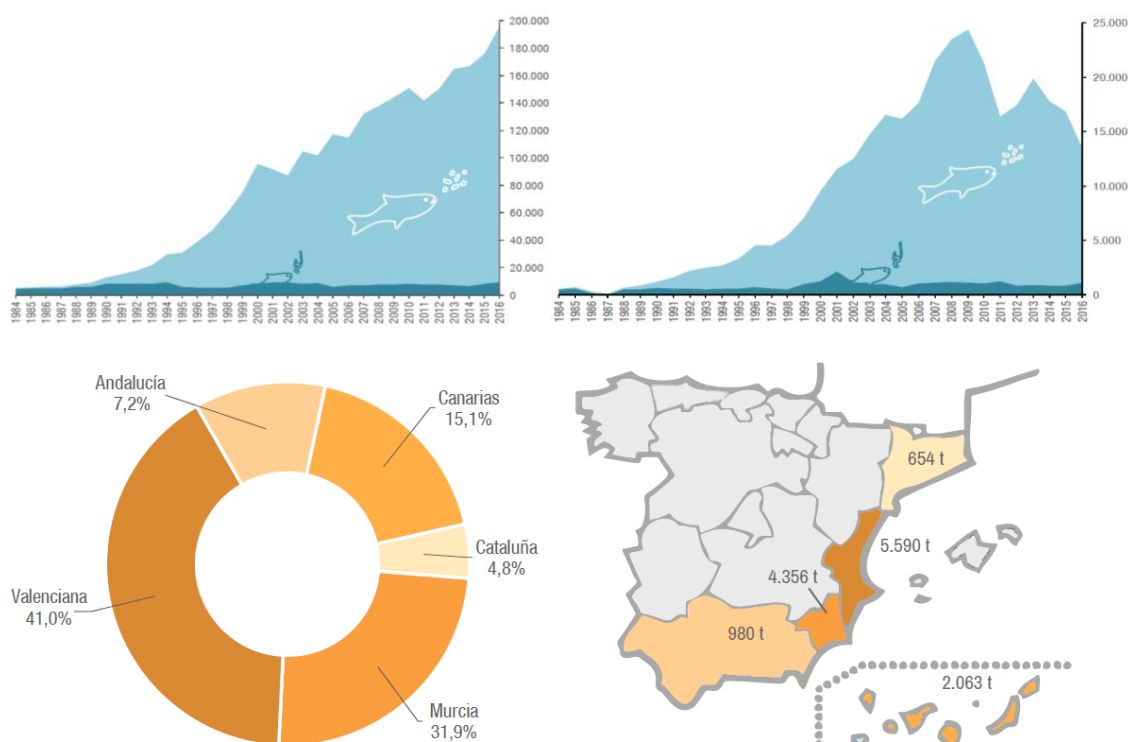


Figura 5. Producción de dorada en 2017. Producción mundial (izquierda) vs producción española (derecha) y distribución de la producción por comunidades autónomas (abajo), valores expresados en miles de toneladas (APROMAR, Informe Acuicultura Española 2018).

3. PROBLEMÁTICA EN LA PRODUCTIVIDAD A BAJAS TEMPERATURAS: “GROWTH ARREST”

El aval de los datos de producción acuícola anteriormente expuestos no refleja la problemática en el cultivo. Como en toda explotación animal, los cultivos de dorada presentan diferentes alteraciones y patologías que ocasionan grandes pérdidas económicas al sector productivo. Si bien se han conseguido adelantos en la mejora de la alimentación y crecimiento para esta especie en el periodo estival, sigue habiendo un grave problema en el periodo de producción durante los meses de invierno. Esta especie es un pez bastante sensible a las bajas temperaturas y su mínimo letal está descrito a temperaturas del orden de 5-7°C (Ravagnan 1978; Barnabé 1990). Dependiendo de la zona de producción, el periodo improductivo de invierno puede incluir desde el mes de noviembre hasta muy entrado el mes de abril (Tort et al., 1998).

Desde el comienzo del cultivo de la dorada en la zona mediterránea, el crecimiento y el estado de salud de esta especie durante los periodos invernales y de bajas temperaturas, siempre ha sido una de las mayores preocupaciones por parte de la industria del sector debido a las grandes pérdidas económicas que esto provoca. Así pues, las variaciones térmicas suponen un reto para los animales poiquilotermos; cuando la temperatura del agua se modifica por debajo, y por encima de los límites de tolerancia intraespecíficos, los animales salvajes pueden responder de diferentes maneras, siendo la huida fisiológica (migración) una de las respuestas más comunes (Donaldson, 2008). Las condiciones de cultivo privan a los animales de esta huida, obligando al animal a hacer frente a estas bajas temperaturas, forzando una adaptación. Se conoce que no sólo el frío es el responsable de estas alteraciones en el bienestar del animal, sino que los cambios o fluctuaciones de temperatura también parecen ser relevantes al provocar importantes cambios fisiológicos. En esta época los animales reducen drásticamente su ingesta de forma que el crecimiento, y por lo tanto la producción, queda estancado (revisado en Ibarz et al., 2010a) llegando incluso a sufrir grandes tasas de mortalidad debido al “síndrome de invierno”. Por este motivo en la zona norte del Mediterráneo las bajas temperaturas históricamente han disminuido el rendimiento de los sistemas de producción.

El término de “síndrome de invierno” se describió por primera vez en Italia en 1994 (Bovo et al., 1995) y durante la década siguiente se describieron varios casos del síndrome en otros países como España, Croacia, Portugal y Grecia. Este cuadro sintomático se caracteriza por una disfunción multiorgánica que conlleva hiposensibilidad, natación errática, palidez hepática acompañada de alteraciones histológicas, músculos necróticos, atrofia del páncreas exocrino y distensión del tracto digestivo. Su etiología compleja implicaría la acción conjunta de varios factores como el estrés térmico, una depresión metabólica y una inmunosupresión acompañada de patógenos ocasionales oportunistas, aunque parece ser que las bajas temperaturas podrían ser la causa inicial de todos estos factores.

Centrándonos en los primeros “síntomas” observados dependientes de la temperatura, la pérdida de apetito sería la primera respuesta al estrés por bajas temperaturas (Elliot, 1991). En la especie que nos ocupa, está descrito que por debajo de 15°C los animales reducen la ingesta gradualmente afectando a la producción durante un largo periodo de tiempo (Tort et al., 1998). Además, cuando la temperatura baja de 12°C a 13°C estos animales pueden cesar la ingesta pese a tener acceso al alimento (Ibarz et al., 2003), permaneciendo en ayuno

mientras se mantengan las bajas temperaturas. Adicionalmente, estudios en condiciones estabuladas demuestran que no existe ningún tipo de aclimatación a esta situación (Ibarz et al., 2007a, b). Si bien es cierto que en condiciones naturales el ayuno puede ser un escenario normal y fisiológico durante los periodos más fríos del año, o durante las migraciones, este contexto provoca importantes pérdidas económicas en la acuicultura.

La Figura 6 hace referencia a una representación esquemática de los efectos reportados de las bajas temperaturas inducidas sobre la fisiología de la dorada (revisado en Ibarz et al., 2010a). En ella se describen los tres efectos inmediatos después de una caída en la temperatura del agua: estrés térmico agudo, ayuno o baja alimentación, y depresión metabólica. Aunque el estrés térmico puede ser una condición transitoria entre 24-48 h (Rotllant et al., 2000), desencadena la liberación de cortisol (revisado en Donaldson et al., 2008), lo que a su vez moviliza las reservas de energía, causando principalmente una movilización aguda de lípidos (Sheridan 1988). Al mismo tiempo, conduce a un fallo en el equilibrio de iones plasmáticos, alterando la funcionalidad de las branquias, riñones e intestino, así como a una mayor reducción en la digestión de las proteínas y en la capacidad de absorción intestinal. Pese a que las consecuencias de la condición de ayuno aparecen más tarde por las bajas temperaturas, también se evidencian otras alteraciones como la movilización hepática de glucógeno (Ibarz et al., 2007b), la degeneración de la membrana digestiva o la exportación de aminoácidos musculares. Adicionalmente, la absorción de lípidos desde el plasma hasta el hígado es relativamente rápida y, en pocos días, se induce una respuesta de retroalimentación, disminuyendo su entrada (Ibarz et al. 2007a). Existen varias explicaciones posibles de por qué el metabolismo lipídico en el hígado y las exportaciones de lípidos están disminuidos o alterados debido al incremento de su entrada: por ejemplo, la depresión del metabolismo global que podría alterar estas vías metabólicas (como las exportaciones de lípidos asociadas con las apoproteínas), y la alta concentración de ácidos grasos esenciales que podrían obstaculizar su propio catabolismo (ofreciendo una tendencia a su conservación). Las evidencias sugieren que las deposiciones de lípidos afectarían a otras vías importantes como a la renovación de proteínas plasmáticas o a la síntesis de componentes inmunes.

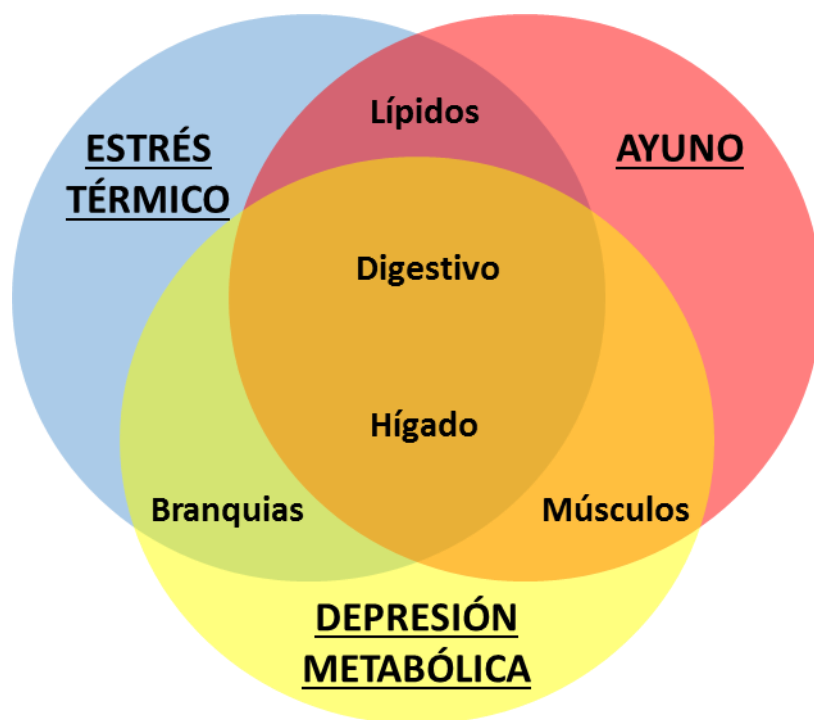


Figura 6. Principales alteraciones relacionadas con el frío en la dorada (adaptado de Ibarz et al., 2010a).

Por lo tanto, parece evidente que las alteraciones de los parámetros fisiológicos en el pez debido a las bajas temperaturas y a su consecuente disminución de la ingesta, conducen a un estado que dista de ser el óptimo. La suma de todas las alteraciones se podría resumir en cuatro principales consecuencias a causa de la exposición al frío: (1) aumento de la susceptibilidad a patógenos causados por la inmunodepresión; (2) colapso metabólico, debido principalmente a insuficiencia hepática (aunque no se pueden descartar problemas en otros órganos como el cerebro o el riñón); (3) disfunción digestiva que alterará la capacidad de recuperación de la ingestión; Y (4) degeneración muscular.

Aunque ni el laboratorio ni bajo condiciones controladas se han podido observar animales afectados por el síndrome de invierno (descrito anteriormente), las alteraciones inducidas por el frío podrían ser el punto de partida para el desarrollo de este. Por tanto, en este sentido y a pesar de los progresos realizados hasta la fecha, todavía quedan muchos aspectos desconocidos de un elevado interés no sólo científico, sino también productivo.

3.1 ALIMENTACIÓN EN BAJAS TEMPERATURAS (“FUNCTIONAL FOODS”)

Actualmente, parece innegable que la alimentación de los cultivos es un elemento clave para la viabilidad y la producción en el sector de la acuicultura, considerándose uno de los pilares maestros. La optimización del uso de las materias primas, el conocimiento sobre los nutrientes y su digestibilidad, así como un manejo más adecuado han sido esenciales para el desarrollo responsable y la optimización de esta actividad.

A día de hoy, una parte de la producción acuícola se destina a la elaboración de piensos, principalmente en forma de harina y aceite de pescado. Estos productos siguen considerándose los ingredientes más nutritivos y digeribles en la formulación de piensos para peces cultivados. Para tratar de compensar su elevado coste, a medida que su demanda ha aumentado, la proporción de harina y aceite de pescado utilizada en la formulación de

piensos compuestos ha seguido una clara tendencia descendente, bien en detrimento de la incorporación de productos de origen vegetal (dietas de sustitución), o bien por un uso más selectivo en forma de ingredientes estratégicos en determinadas fases de la producción, como en la época reproductora o en la ceba final (FAO, Informe SOFIA2018).

Otro de los puntos más relevantes y controvertidos en el tema de la alimentación es el contenido lipídico de los piensos (alto >20%, medio 16-20% o bajo <16%) así como su origen (animal vs vegetal). Debido a la naturaleza carnívora de la mayoría de las especies cultivadas, son los lípidos de origen animal y de elevada calidad (aceite de pescado, ricos en ácidos grasos poliinsaturados) los que más benefician el crecimiento y el bienestar de los animales. No obstante, un contenido elevado de lípidos en la época invernal o pre-invernal parecen favorecer las patologías asociadas a las bajas temperaturas (Ibarz et al., 2010a). De hecho, la práctica establecida de incrementar el contenido de lípidos aportado en los piensos en dietas de invierno debería ser revisado. Estudios realizados en condiciones controladas demuestran que dietas ricas en lípidos alteran el metabolismo hepático, provocando una movilización de las reservas de grasa del animal, principalmente hacia el hígado, provocando hígados friables e incluso esteatóticos por acumulación de ácidos grasos insaturados (Ibarz et al., 2005, 2007b). Además, se ha demostrado la interacción negativa entre elevados niveles de energía dietética, la densidad del cultivo en el crecimiento, el estado metabólico y el estado oxido-reductor.

Cabe destacar que, al margen de las dietas de sustitución, cada vez más se acentúa el interés por usar alternativas ecológicas al uso terapéutico de antimicrobianos, como la inclusión de suplementos y aditivos dietéticos funcionales en la formulación de los piensos (revisado en Hoseinifar et al., 2015), especialmente desde periodos iniciales del desarrollo de los alevines. Los prebióticos definidos como "dieta no digerible, beneficiosa para el huésped para estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o más bacterias intestinales" por Gibson en 2004, son uno de los complementos dietéticos funcionales más estudiados. En este sentido, cada vez más son los estudios realizados sobre el uso de prebióticos en la dieta los que revelan resultados prometedores en el caso de la mejora de la resistencia a enfermedades, del rendimiento del crecimiento, de la regulación hormonal, así como de la inmunoestimulación en peces (revisado en Ringø et al., 2014).

En dorada, para afrontar las bajas temperaturas desde un punto de vista nutricional, se han planteado algunas aproximaciones con distinto éxito: se abordó el uso de piensos formulados con materias primas frescas, ofreciendo una digestibilidad mejorada, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y fosfolípidos (Coutteau et al., 2001), también se incorporó en los piensos la suplementación con vitaminas C, E, colina e inositol (Tort et al., 2004). Recientemente, Silva et al. (2014) propusieron una dieta enriquecida con materias primas como harina de pescado y harina de krill, mejorando el crecimiento de los peces durante las fluctuaciones térmicas naturales en comparación con una formulación comercial de bajo costo. Pese a que los resultados de estos experimentos no fueron excelentes, se consiguió reducir la mortalidad durante la estación fría, se mejoraron las defensas inmunes tales como el complemento y la fagocitosis, y se consiguió aumentar levemente el crecimiento. Sin embargo, a nivel productivo la formulación de estas dietas genera un incremento en el precio del pienso, dificultando así los beneficios económicos pretendidos.

3.2 TERRENOS SIN EXPLORAR: “GAPS”

Hemos visto que actualmente, en dorada el cuadro patológico que acompaña al síndrome de invierno está bien descrito, además, ya existen algunos estudios específicos de los efectos de las bajas temperaturas en distintos aspectos del metabolismo y de la alimentación. Por tanto, ¿qué queda por hacer en el campo de las bajas temperaturas?

Pese a que el bagaje sobre la mejora del estado de los cultivos de dorada durante periodos de invierno es recientemente extenso, no hay estudios que afronten desde un punto de vista global todo el período de frío, proponiendo nuevas estrategias de alimentación para esta época del año: tanto para prepararlos previamente al descenso térmico, para poder soportar mejor el invierno, y especialmente para facilitar su recuperación con el restablecimiento de las temperaturas.

La revisión de Ibarz et al. (2010a) ya sugiere la necesidad del uso de dietas “funcionales” y la reducción del contenido lipídico de la dieta durante el período improductivo invernal, sugiriendo tres subperíodos bien diferenciados: 1) pre-invernal o de preparación a las bajas temperaturas cuando el animal aún tolera unas raciones altas; 2) período de frío donde las bajas temperaturas condicionan una disminución o cese de la ingesta y de la actividad del animal; y 3) período de salida del frío o recuperación de la temperatura, cuando el animal recupera su condición con posibles readaptaciones metabólicas como consecuencia de la depresión mantenida durante el periodo anterior.

Por otro lado, también están descritas alteraciones hepáticas, así como variaciones en su tamaño y consecuencia de la movilización de lípidos. No obstante, poco se sabe de la reorganización metabólica, de la afectación de los sistemas antioxidantes, de los niveles de estrés oxidativo o del papel que juegan los mecanismos de recambio proteico en la reorganización de este tejido. Hay que destacar que ningún estudio analiza el motivo por el cual la hipotermia reduce parcial o totalmente la ingesta. Se conoce que la propia depresión metabólica puede ser la responsable de este proceso, pero nada se sabe sobre la implicación del sistema nervioso desde un punto de vista global.

4.PUNTOS DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DEL BIENESTAR DE LA DORADA

Como era de esperar aún quedan muchas incógnitas sobre como paliar los efectos causados por las bajas temperaturas en la dorada, y sobre todo, queda un terreno prácticamente virgen en lo que respecta al periodo de recuperación de las temperaturas. Por este motivo la presente tesis trata de arrojar algo de luz a algunos aspectos fisiológicos relevantes todavía sin estudiar. ¿Cómo afecta un largo periodo de hipotermia de 50 días a la osmorregulación y al metabolismo energético? ¿Y al estado oxido-reductor? ¿Y a los mecanismos de recambio proteico (“turn-over”)? ¿Y a la actividad hipofisaria? ¿Si se producen alteraciones durante este periodo, se llegan a recuperar los valores fisiológicos al restablecer nuevamente la temperatura? ¿es una recuperación rápida? ¿Influye la composición lipídica de la dieta sobre las posibles respuestas observadas al final de un periodo frío y en la consecuente recuperación de las temperaturas? ¿Vale la pena invertir dinero en piensos altamente energéticos durante todo el proceso, o conviene adaptar el pienso en función del periodo térmico?

4.1.OSMORREGULACIÓN

Podemos definir a la osmorregulación como la capacidad que tienen los organismos vivos para mantener estable su condición interna en función de los cambios que puedan producirse en el exterior a través del intercambio de materia y energía con el mismo. Por este motivo, este proceso tiene una mayor relevancia en seres vivos que habitan ecosistemas acuáticos, como por ejemplo en los peces. Del mismo modo, todas las reacciones metabólicas necesarias para la vida tienen lugar en un medio acuoso o líquido, así que es necesario que las concentraciones de agua y de solutos oscilen dentro de unos márgenes relativamente estrechos.

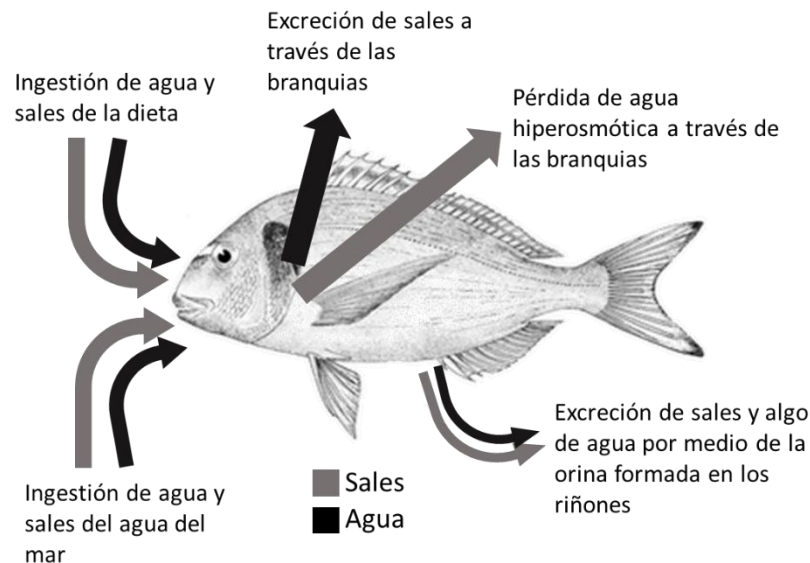


Figura 7. Principales vías de osmorregulación en peces marinos

Como bien describen Baldisserotto et al. (2007) en el libro "Fish Osmoregulation", la osmorregulación en organismos acuáticos difiere entre especies marinas y de agua dulce, dependiendo de la osmolaridad del agua que los rodea (hipertónica para el agua salada e hipotónica para el agua dulce). Es un proceso regulado a nivel hormonal y dependiente de ATP debido al intercambio iónico activo, de hecho, la mayoría de autores coinciden en que una mayor diferencia osmótica, ocasiona un mayor consumo de energía debido a la actividad de las ATPasas Na^+/K^+ . Estas bombas son enzimas unidas a las membranas celulares, y se encargan principalmente del transporte de iones a través de las membranas celulares y, por lo tanto, ayudan a regular el volumen celular, la presión osmótica y la permeabilidad de la membrana. Los tejidos principales que lideran esta regulación osmótica son aquellos que están directamente relacionados con el intercambio de fluidos con el medio (branquias) y con la eliminación de solutos procedentes de la dieta (riñón e intestino) (Fig.7). La otra cara de la moneda de la osmorregulación está liderada por la presencia de iones minerales como el sodio, el cloro, el potasio y el fósforo, ya que juegan un papel importante en el mantenimiento de la presión osmótica y en la regulación del intercambio de agua y solutos en el organismo (influyendo en el funcionamiento de las ATPasas Na^+/K^+), además de en el equilibrio ácido-base y en el control del pH de la sangre y otros fluidos.

Las diferencias en las temperaturas de aclimatación están a menudo relacionadas con las diferencias en la composición lipídica (ácidos grasos, colesterol) de las membranas de los

tejidos osmorreguladores de los peces. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), por ejemplo, no sólo el grado de insaturación de los ácidos grasos de los lípidos de membrana, sino también la longitud de cadena son dependientes de la temperatura, y la exposición al frío aumenta la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados ricos en fosfatidilserina (Hazel, 1984; Maffia et al., 1998). Por su parte, los cambios en el microambiente lipídico pueden afectar la actividad de las enzimas de transporte ligadas a la membrana, tal como se indica para la ATPasa Na^+/K^+ intestinal de la dorada (Almansa et al., 2001). Además, en la gran mayoría de peces (debido a la poiquilothermia), el descenso de la temperatura también afecta directamente a la actividad de estas bombas (Pörtner et al., 1998) que sumado a la privación de alimentos muestran una dependencia estacional en las condiciones de cultivo (Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Polakof et al., 2006). Algunos estudios describen adaptaciones entre la temperatura y la actividad específica de la ATPasa Na^+/K^+ . Por ejemplo, Metz et al. (2003) describió la aclimatación de las ATPasas de la carpa común (*Cyprinus carpio*) a una temperatura de 15°C, observó un descenso de su actividad sin embargo este fue compensada por una mayor expresión de este enzima.

Adicionalmente, se ha demostrado que el frío produce un desequilibrio iónico en el plasma, afectando a las velocidades de difusión de iones a través de las membranas, y a un probable aumento en los flujos difusivos de iones y agua al aumentar la temperatura (Metz et al., 2003) e, inversamente, una disminución esperada de los flujos difusivos de iones a la reducción de la temperatura. A 8°C, la dorada muestra una disminución de los niveles plasmáticos de calcio y potasio, además de un aumento transitorio de la concentración de magnesio en el plasma (Sala-Rabanal et al., 2003). Estos cambios pueden estar relacionados con una alteración del epitelio branquial, reduciendo el número total de microvellosidades de la membrana apical de las células de cloruro, así como con la drástica reducción de la actividad de las ATPasas Na^+/K^+ presentes en branquias, riñón e intestino durante los primeros días de exposición directa al frío. Por contra la exposición prolongada de los animales a aguas frías, deja entrever una inversión parcial de estas alteraciones, sugiriendo una posible adaptación (Ibarz et al., 2010a)

4.2.METABOLISMO ENERGÉTICO

Conocer el estado metabólico del animal frente a los efectos de los cambios ambientales y nutricionales sobre el metabolismo, es fundamental para evaluar el estado real del animal durante la producción. El término metabolismo incluye el conjunto de las reacciones químicas que interconvierten las moléculas biológicas en el interior de las células. Las rutas anabólicas son aquellas reacciones que permiten construir macromoléculas complejas, como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Por el contrario, las rutas catabólicas permiten a las células degradar las macromoléculas en productos que puedan destinarse a otros fines. El metabolismo energético incluye aquellos procesos de las rutas metabólicas que permiten obtener ATP y otras moléculas ricas en energía, proporcionando la energía química necesaria para el mantenimiento celular y la biosíntesis y así, en último término, el crecimiento del organismo.

A diferencia de otros vertebrados, los peces necesitan un menor aporte energético para su mantenimiento y crecimiento, no obstante, presentan mayores requerimientos proteicos y aminoacídicos. Esto se debe a que los hidratos de carbono no son esenciales en la dieta de peces, y su ausencia como combustible se suple con aminoácidos y lípidos, siendo capaces de oxidar hasta un 40% de los aminoácidos de la dieta con fines energéticos, demostrando

su capacidad de conversión proteica para la obtención de energía. Tejidos como las branquias, el músculo rojo y el hígado son los más oxidativos, siendo este último el principal órgano de destino de los aminoácidos de la dieta.

En la Figura 8 se muestran las vías principales del metabolismo energético propio de los hepatocitos. Así pues, las células producen energía mayoritariamente a través de dos vías, la glucólisis y la fosforilación oxidativa, pese a que también se puede generar a través de la β -oxidación y de la fermentación láctica. La mayoría de combustibles celulares (azúcares, lípidos y varios aminoácidos) pueden convertirse en una molécula denominada acetil-CoA. Cuando el acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs por medio de la citrato sintasa (CS), se oxida para producir equivalentes de reducción (NADH y FADH_2). Es la oxidación de estos compuestos en la cadena transportadora de electrones la que permite generar ATP en el proceso de la fosforilación oxidativa, donde entra en juego el enzima ciclooxygenasa (COX).

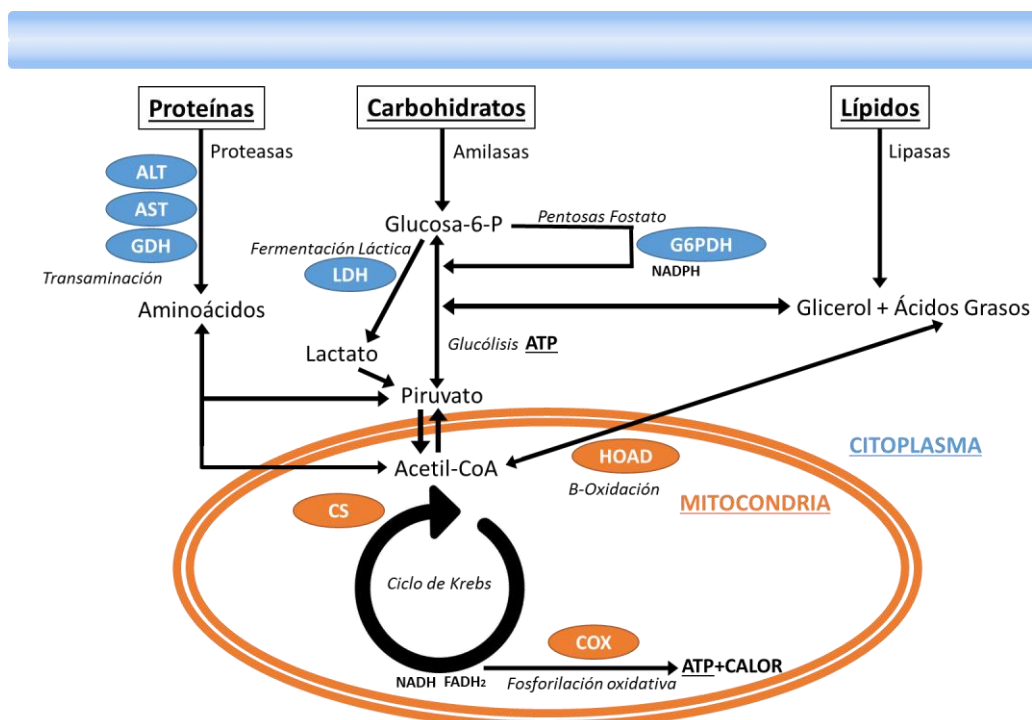


Figura 8. Principales vías del metabolismo energético en hepatocitos de peces.

Está descrito que la principal forma de reserva de glúcidos en los animales es el glucógeno, acumulándose en hígado y músculo principalmente. Entrando un poco más en detalle en el catabolismo de los hidratos de carbono, se observa como la glucosa se puede metabolizar aeróbicamente por medio de la glucólisis formando ácido pirúvico, mientras la lactato deshidrogenasa (LDH) regula la formación anaeróbica de lactato. La glucólisis en peces tiene más importancia como suministradora de productos biosintéticos que como una vía de producción de piruvato para su posterior oxidación. Otra vía de degradación de la glucosa, que además se incrementa en periodos de exposición a bajas temperaturas, es el "shunt" de las hexosas-monofosfato o vía de las pentosas, la cual genera la ribosa necesaria para la síntesis de los ácidos nucleicos mediante la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y a la vez genera NADPH. Este metabolito constituye el poder reductor necesario para la síntesis de lípidos, además de contribuir al poder antioxidante de la célula. Se sabe que su actividad puede estar incrementada cuando la ingesta lipídica es baja, asociándose con su función

lipogénica en diferentes especies como esturión (Hung et al., 1989), trucha arco iris (Hung y Storebakken, 1994), carpa común (Shikata et al., 1994) o lubina (Enes et al., 2006).

La movilización de los lípidos endógenos en esta especie conduce a una gran deposición lipídica en el hígado (Gallardo et al., 2003; Ibarz et al., 2005, 2007a, b). En lo que respecta al catabolismo lipídico, la oxidación de ácidos grasos en las células se da por la β -oxidación mitocondrial mediante la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HOAD), la cual está condicionada por el transporte de estos sustratos al interior de la mitocondria. Un exceso de energía se acumula preferentemente en la grasa perivisceral antes que en el hígado (Spisni et al., 1998, Company et al., 1999). Por otro lado, Sheridan (1988) demostró que las fracciones lipídicas plasmáticas en los peces son un reflejo de la composición lipídica de la dieta.

El primer paso en el catabolismo de aminoácidos consiste en una reacción de transaminación que tiene lugar en el citoplasma celular, donde el grupo amino es transferido al alfa-cetoglutarato para formar glutamato. Las transaminasas más importantes son la alanina aminotransferasa (GPT/ALT) y la aspartato aminotransferasa (GOT/AST) que además de ser buenos marcadores del metabolismo proteico, también informan del daño hepático disparando su actividad. En sentido inverso, el glutamato obtenido puede regenerar el alfa-cetoglutarato liberando ión amonio por acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) de origen mitocondrial. Esta última se encuentra en mayor concentración en peces que en vertebrados superiores, teniendo por tanto una gran importancia en el metabolismo de los aminoácidos.

La trayectoria investigadora del grupo de “Energètica i Nutrició en Peixos” (perteneciente al “Grup de Recerca Consolidat” de la Generalitat de Catalunya, SGR2014: “Regulació i Optimització del Creixement en Espècies de Peixos d’Interès en Aqüicultura”) en el cuál se ha realizado la presente tesis se ha centrado en conocer la respuesta de esta especie al desafío de las bajas temperaturas. Así, el primer efecto del descenso térmico correlaciona con una depresión metabólica global manifiesta acompañado de una reducción de la ingesta, independientemente de la velocidad de la transición en el cambio de la temperatura del agua (Ibarz et al., 2003). Por contra, cualquier variación térmica al alza también provoca una rápida recuperación de la actividad, con un restablecimiento gradual del apetito.

Las temperaturas extremas (frío y calor) producen una reducción fisiológica de los mecanismos de suministro de oxígeno (ventilación y circulación), generando una un proceso hipóxico en los peces (Pörtner y Knust, 2007). La dorada, a diferencia de otras especies euritérmicas, no muestra una aclimatación de la tasa metabólica de enzimas aeróbicas cuando se produce un descenso térmico (Ibarz et al., 2003, 2007b). De hecho, Fry (1971) demostró que los peces son capaces de ajustar su metabolismo para compensar los efectos de los cambios de temperatura. El coeficiente de temperatura (Q_{10}) indica las capacidades compensatorias del sistema analizado (Brett, 1995). A temperaturas cálidas, la dorada compensa totalmente su metabolismo de mantenimiento, mostrando Q_{10} de 20 a 28°C similar a 1,0 (Requena et al., 1997), pero a bajas temperaturas este efecto compensatorio no se encontró. Así, frente a una caída de temperatura, esta especie muestra un estricto termoconformismo. La depresión metabólica se relaciona directamente con la caída de la temperatura del agua (con Q_{10} entre 18 y 8°C del consumo total de oxígeno entre 2,2 y 2,5), independientemente de la tasa de cambio de temperatura (Ibarz et al., 2003).

Valores similares de Q_{10} también se han observado en otras especies de esta familia cuando se expusieron a bajas temperaturas (Du Preez et al., 1986), lo que indica una incapacidad para aclimatarse al frío. Además, Tort et al., 2004 demostró un descenso en la ingesta cuando la temperatura del agua cae por debajo de 13°C, evidenciando un déficit para cubrir las necesidades energéticas. Por lo tanto, la dorada utilizaría sus propias reservas energéticas, lo que explica la detención del crecimiento observado en el cultivo a bajas temperaturas. Teniendo en cuenta la condición de ayuno inducida en frío, junto con la bajada tasa metabólica, el agotamiento de la energía del cuerpo debe ser mayor cuando la temperatura del agua ronda los 12°C que a temperaturas más bajas.

4.3. ESTADO OXIDO-REDUCTOR

En los organismos vivos con metabolismo aeróbico, bajo estados fisiológicos no alterados, existe un balance entre 1) los productos oxidativos que se forman fruto de la propia actividad metabolismo y 2) los sistemas encargados de retirar estos productos. A nivel metafórico, podríamos considerar a este equilibrio como una balanza. En el momento en el que se descompensa, bien por un exceso de productos oxidantes o bien por una caída del potencial antioxidante, hablaremos de estrés oxidativo. La consecuencia de este estrés es la oxidación a las principales biomoléculas: proteínas, ADN y lípidos, llegando a producir la muerte celular en casos extremos (Martínez-Alvarez 2005; Halliwell y Gutteridge, 2000).

Por tanto, los productos derivados de la actividad metabólica, generan sustancias altamente oxidantes, conocidas como pro-oxidantes o radicales libres. Los radicales libres son moléculas, iones o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su estructura, lo que los convierte en sustancias inestables y con gran capacidad reactiva, generando reacciones en cadena. Se entiende como radicales libres principalmente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) pese a que también estén implicadas las especies reactivas del nitrógeno (NRS). La principal vía de producción de radicales se da en las mitocondrias como consecuencia de la actividad de la enzima citocromo oxidasa, que es la encargada de reducir el oxígeno al final de la cadena de transporte de electrones. Cuando la oxidación es completa se produce agua, pero entre un 5-10% de las reducciones son incompletas, dando lugar a la fuga de radicales como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) (Fig.9). No obstante, a nivel fisiológico existen otras vías de producción de ROS. Las reacciones electromagnéticas y fotoquímicas, las reacciones endógenas de dismutación y de Fenton, la fagocitosis e incluso la unión del oxígeno a la hemoglobina serían unos ejemplos (Beckman y Ames, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000).

Cadena de transporte de electrones

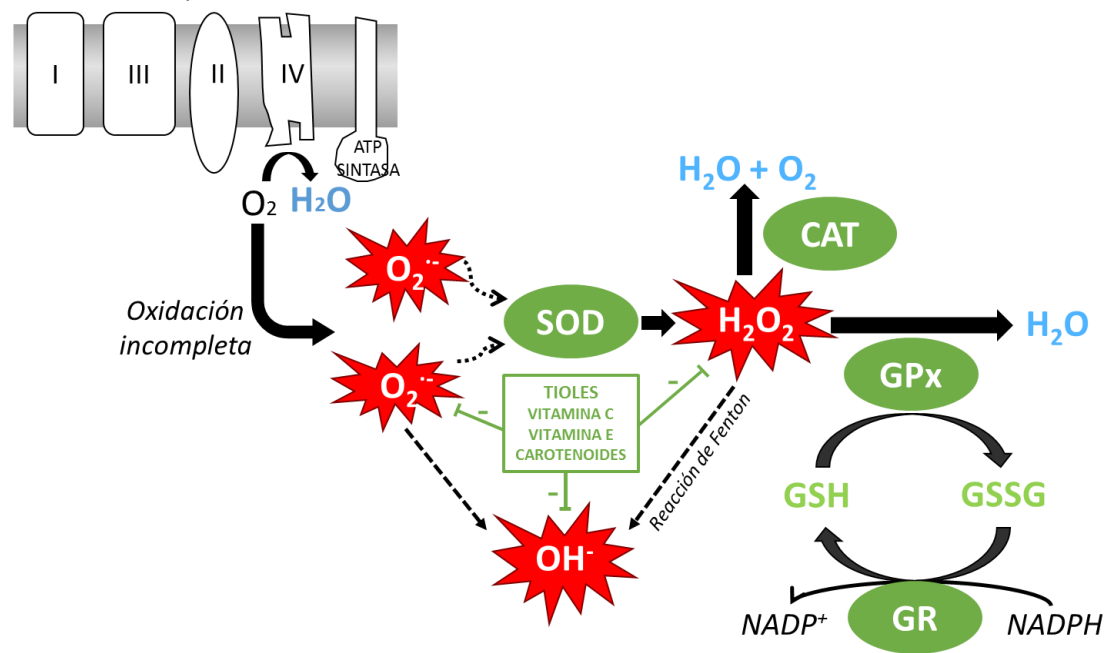


Figura 9. Esquema de la generación de los principales ROS, y la actuación de los principales mecanismos antioxidantes.

Algunos estudios apuntan a que la lipoperoxidación (LPO) de lípidos insaturados de las membranas celulares parece ser el mecanismo principal de lesión de los ROS (Mathews et al., 1994). Esto produce hidroperóxidos lipídicos inestables, cuyos productos, al descomponerse, son altamente reactivos, amenazando la integridad celular. Los productos generados por la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de la membrana (como por ejemplo malonaldehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (4-HNE)) son por sí mismos agentes oxidantes que generan una reacción en cadena ampliando el efecto lesivo a toda la membrana, comprometiendo la correcta función celular. Como parte de este daño oxidativo en cadena, las proteínas y otras biomoléculas como los ácidos nucleicos, sufren alteraciones debidas al ataque de los radicales libres. Pese a que habitualmente el daño en las proteínas se analiza a través de la evaluación de los niveles de grupos carbonilos, en los últimos años el daño oxidativo en las proteínas se puede evaluar a través del estudio los productos avanzados de la oxidación proteica (AOPP) (Hanasand et al., 2012; Witko-Sartat et al., 1996).

A nivel tisular, tanto en peces como en mamíferos, la LPO es más frecuente en los tejidos bien irrigados y con capacidad de almacenamiento de lípidos, como el hígado (Martín-Alvarez et al., 2005). Además, en *Solea senegalensis*, las células sanguíneas y el plasma fueron reconocidos como un vector conveniente para el análisis del ataque oxidativo, ya que la sangre periférica refleja el estado de salud global del individuo (Costa et al., 2011).

Existen varias líneas de defensa frente a los radicales libres, por un lado las sustancias antioxidantes y por otro lado las enzimas antioxidantes. Las sustancias antioxidantes junto con las enzimas constituyen lo que se llama "antioxidantes primarios" (Cadenas et al., 1995). Entre los antioxidantes no enzimáticos encontramos aquellas moléculas que pueden ser aportadas a través de la dieta como la vitamina C, la vitamina E, el ácido úrico o los carotenoides y las que tienen una síntesis celular, como proteínas con grupos tioles (-SH) o

el glutatión (GSH) (Fig.9). Este último, es un tripéptido (γ -glutamato-cisteína-glicina (γ -Glu-Cys-Gly)), producido principalmente en el hígado, y se considera la defensa celular más importante contra ROS y otros productos inducidos por daño ROS (Srikanth et al., 2013). Las enzimas antioxidantes son cruciales en el esfuerzo para contrarrestar la toxicidad del oxígeno cuando el suministro de otros compuestos antioxidantes es escaso o agotado (Ahmad, 1995), interceptando e inactivando los ROS. Tanto en mamíferos, como en la mayoría de las especies de peces investigadas hasta la fecha se han detectado enzimas especialmente adaptadas, como la superóxido dismutasa (SOD), que transforma el anión superóxido en agua oxigenada, la catalasa (CAT) que transforma el agua oxigenada en agua, y las enzimas que forman parte del ciclo antioxidante del glutatión (glutatión peroxidasa, GPx y glutatión reductasa, GR) (Rudneva, 1997). Las enzimas antioxidantes actúan generalmente de manera coordinada para asegurar la protección óptima contra el estrés oxidativo (Bangnyukova et al., 2006). En peces, las defensas antioxidantes pueden ser influenciadas por factores intrínsecos como la edad, el comportamiento alimentario, el consumo de alimentos, el tipo de dieta y también por factores extrínsecos como las toxinas presentes en el agua, los cambios estacionales y diarios en oxígeno disuelto y la temperatura del agua (Martínez- Álvarez et al., 2005; Cunha Bastos et al., 2007; Aras et al., 2009; Solé et al., 2009).

En dorada el estrés oxidativo se ha evaluado desde varias perspectivas, la principal ha sido la de intentar mejorar los periodos de frío a través de la alimentación: suministrando diferentes suplementos (Pérez-Jiménez et al., 2012), a partir de dietas de sustitución (Sanz et al., 2012; Saera-Vila et al., 2009; Sitja-Bobadilla et al., 2005), incorporando suplementos antioxidantes como por ejemplo la vitamina E (Tocher et al., 2002, Mourente et al., 2002) o, recientemente, modificando la cantidad de carbohidratos (Castro et al., 2015). Al margen de la dieta, Ibarz et al. (2010d) en un estudio del proteoma hepático a tras una semana de estrés térmico a 8°C describieron una menor expresión de proteínas relacionadas con mecanismos antioxidantes, como es el caso de la CAT y de la Glutatión-S transferas, así como una posible afectación de las vías de biosíntesis del glutatión. Sin embargo, pocos estudios evalúan el estado oxido-reductor del animal durante una fluctuación térmica, evaluando la entrada al frío, el periodo de frío y la salida.

4.4.HOMEOSTASIS PROTEICA

El término de recambio proteico o “protein turn-over” lo definieron Waterlow et al. (1978) y va ligado al concepto de equilibrio dinámico (homeostasis). Todas las proteínas celulares experimentan síntesis y degradación continuas para mantener un proteoma funcional y permitir cambios rápidos en los niveles de proteínas específicas con fines reguladores (Kaushik y Cuervo, 2012). Factores clave en el desarrollo de los animales como son la alimentación, la distribución de aminoácidos, el crecimiento o el estado de bienestar del animal, tienen una gran influencia en la regulación del recambio proteico. De forma permanente y especialmente en condiciones de estrés, la degradación de proteínas puede ir asociada a varias vías, pudiendo ser recicladas o destruidas completamente. Alternativamente también encontramos vías de reparación de proteínas mal formadas, que pueden converger con las vías de degradación si el daño proteico es irreparable no se pueden reparar. Como principales vías de degradación y de reparación de las proteínas celulares tenemos la vía dependiente de ATP de ubiquitina-proteasoma (UPS), la vía de proteasas lisosomales (catepsinas) y la vía de las caspasas, estando esta última la relacionada con el proceso de apoptosis.

Tanto la síntesis de proteínas como su degradación son procesos muy regulados y conservados, ya que son esenciales para muchos procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, la regulación de la expresión génica y la respuesta frente al estrés oxidativo. El ataque oxidativo de las proteínas mediante ROS se considera la principal vía de daño proteico, así pues, tejidos con una gran actividad metabólica como el hígado, tienen asociados grandes mecanismos de control en el funcionamiento enzimático y defensas antioxidantes, ofreciendo grandes tasas de reparación o de reposición de las mismas. No obstante, pese a la variación del índice hepatosomático, a la baja tasa metabólica y al daño oxidativo en los lípidos durante los periodos de invierno (Ibarz et al., 2007; 2010a,b), pocos estudios se han realizado en relación con la maquinaria de regulación proteica en el hígado.

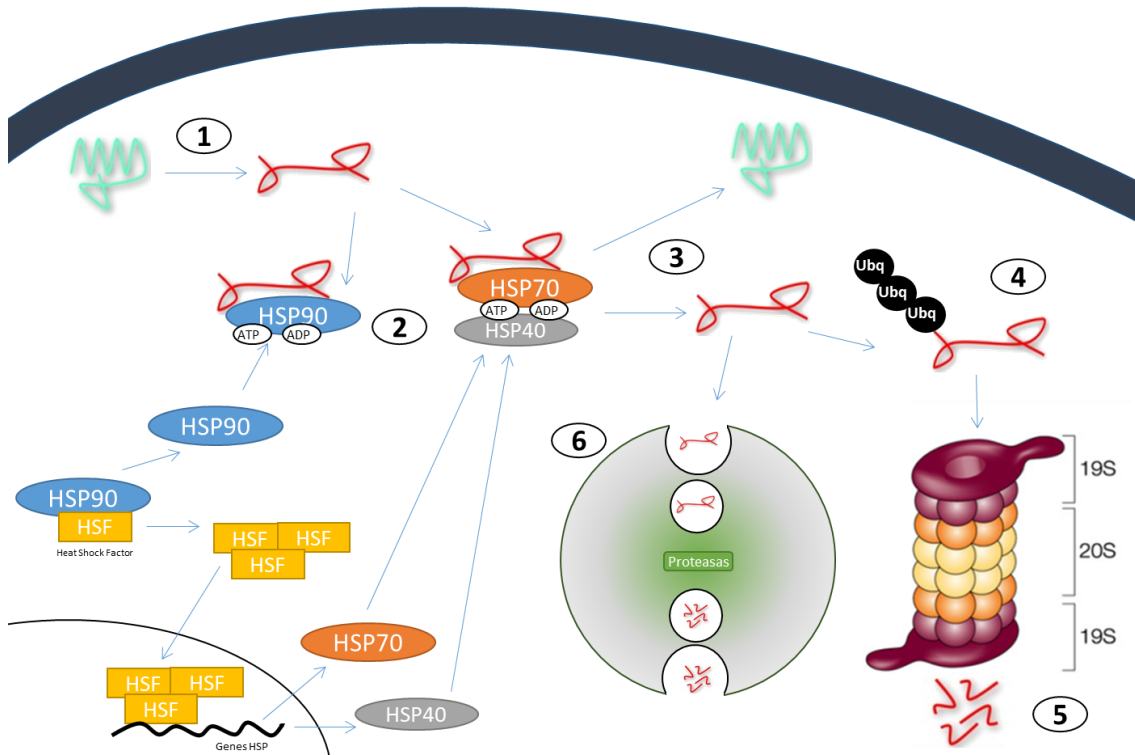


Figura 10. Mecanismo de acción de las diferentes HSP, y las principales vías proteolíticas frente al daño proteico (adaptado de Benarroch, 2011). 1, Daño proteico producido por estrés; 2, Estabilización de proteínas dañadas con HSPs; 3, Reparación del daño proteico o a vías proteolíticas; 4, Ubiquitinación de proteínas no reparadas, proceso dependiente de ubiquitin-ligasas; 5, Degradación proteasomal en el complejo 26S; 6, Degradación de proteínas por la vía lisosomal.

Pese a la complejidad de los sistemas celulares en respuesta al daño proteico, la mayoría de autores proponen modelos simplificados en los cuales se pueden integrar las “heat-shock proteins” (HSPs), el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la vía lisosomal (Fig.10), partiendo de la acumulación de proteínas mal plegadas y/o dañadas durante periodos de estrés celular. Previo a la degradación de las proteínas, en el citoplasma celular se expresa una familia de proteínas de choque térmico (HSP), producidas por las células en respuesta a la exposición a condiciones estresantes. Pese a que se describieron por primera vez en relación con el choque térmico por altas temperaturas, actualmente está descrita su expresión frente a cualquier tipo de estrés, incluido la exposición al frío (Matz et al., 1995) o incluso en la remodelación de los tejidos (Laplante et al., 1998). Muchos miembros de este grupo tienen función chaperona, estabilizando nuevas proteínas para asegurar su

plegamiento correcto o ayudando a reparar (replegamiento) proteínas que fueron dañadas por el estrés celular (De Maio, 1999). Las HSPs se denominan según su peso molecular. Por ejemplo, las HSP60, HSP70 y HSP90 (las más ampliamente estudiadas) se refieren a familias de proteínas de choque térmico del orden de 60, 70 y 90 KDa de tamaño, respectivamente. Por tanto, tras un daño proteico las HSP90 tratan de estabilizar las proteínas dañadas mediante su actividad chaperona. Seguidamente, la activación de las HSP90 estimularía la transcripción de algunos genes, activando la producción de HSP70, HSP40 y otros pequeños grupos de HSPs. Las HSP40 interactuarían con las HSP70 tratando de estabilizar nuevamente las proteínas dañadas, y en este punto, tratar de reparar el daño.

Siguiendo el modelo anteriormente propuesto, cuando las chaperonas no pueden reparar la proteína plegada erróneamente o dañada, sufren un marcaje selectivo dependiente de ATP que las conduce hacia la degradación por la vía UPS o, dependiendo de su procedencia, por la vía lisosomal mediada por las catepsinas (Jung et al., 2009). Los proteasomas son grandes complejos proteicos situados en el citoplasma y en núcleo de células eucariotas. Su función principal es degradar proteínas intracelulares anómalas o innecesarias por medio de la rotura de los enlaces peptídicos (múltiples funciones proteasa). Para este propósito, las proteínas son marcadas con proteínas de pequeño tamaño conocidas como ubiquitinas (Peters et al., 1994). El proceso de señalización está catalizado por tres enzimas con actividad ubiquitina ligasa. Una vez señalizadas, las proteínas son capaces de atraer a más ubiquitinas, obteniendo como resultado una cadena de poliubiquitina. Esta cadena será reconocida por el proteasoma, donde se integrará y será degradada. Las diversas formas de proteasoma con actividad catalítica se caracterizan por ser un complejo proteico con una morfología cilíndrica, compuesto por un núcleo de cuatro anillos formados alrededor de un poro central. Cada uno de estos anillos se compone de 7 proteínas. Los dos anillos centrales poseen la función proteasa, y los dos anillos más exteriores son los encargados de anclar la proteína ubiquitinizada al complejo. De esta forma la proteína señalizada entra por el poro hacia el interior, donde se degrada a lo largo de todo el proteasoma para ser expulsada por el otro extremo (Gomes et al., 2006). Las subunidades del proteasoma se clasifican mediante su coeficiente Svedberg de sedimentación (marcado con una S). La forma más común del proteasoma se conoce como proteasoma 26S, que tiene un peso aproximado de 2000 kilodaltons (KDa). Este proteasoma lo forman dos subunidades reguladoras 19S (anillos exteriores) dependientes de ATP (Köhler et al., 2001) que facilitan la entrada de la proteína marcada a la subunidad catalítica central llamada 20S (Liu et al., 2006), teniendo una proporción 2:1. El proteasoma identifica las proteínas que han sido objeto de degradación por su "etiqueta" ubiquitina, aunque la ubiquitinación no es un requisito previo para su degradación. Por lo tanto, el UPS se considera la principal vía no lisosomal encargada de la degradación intracelular de las proteínas y debido a su marcaje selectivo, desempeña un papel importante en la regulación de muchos procesos celulares. Estos incluyen el ciclo celular, la señalización celular, la apoptosis, la respuesta inmune, y además, el recambio de proteínas (Powell y Divald, 2009).

La otra gran vía proteolítica intracelular es el lisosoma. El sistema lisosomal se considera un orgánulo celular, también asociado con procesos de autofagia (Mizushima, 2007). La funcionalidad de la vía lisosomal está ampliamente reconocida, siendo de vital importancia en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, incluida la función de supervivencia (revisado en Turk et al., 2012). Su capacidad para degradar proteínas es muy elevada y a diferencia del proteasoma no es selectiva. Esta gran capacidad es debida a la acción

combinada, aleatoria y limitada de múltiples hidrolasas y proteasas, siendo la familia de las catepsinas una de las proteasas lisosomales con actividad cisteína más relevantes tanto en mamíferos (Kaushik y Cuervo 2012) como en peces (Brooks et al., 1997).

En dorada, las variaciones agudas en las temperaturas, pueden conducir a estructuras de proteínas no nativas “in vivo” y, por lo tanto, al reclutamiento de HSP para su reparación (Kyprianou et al., 2010). De hecho, la expresión de las proteínas de estrés molecular HSP70 y HSP90 en esta especie se observa en exposiciones agudas a temperaturas inferiores a 18°C (Kyprianou et al., 2010), y son fundamentales para el plegamiento y el montaje de otras proteínas celulares, además de en la regulación de la división cinética, en el plegamiento, la translocación y la agregación dentro de la célula, debido a su función como chaperonas (Feder y Hofmann 1999; Iwama et al., 2004). No obstante, actualmente se reconoce la expresión de las diferentes HSPs como respuesta genérica al estrés, y no se limita al estrés dependiente de temperatura. Por lo tanto, otros factores como la anoxia, la isquemia, las toxinas, la degradación de las proteínas, la hipoxia, la acidosis y el daño microbiano también conducirán a su incremento en los tejidos (Stewart y Pickwell 1993; Sanders y Martins, 1993). Incluso algunos autores han determinado su importancia como marcadores de estrés en estudios nutricionales en peces (salmónidos), demostrando que dietas formuladas con diferentes tipos de maíz modificaba la expresión de HSP70 en el hígado (Sagstad et al., 2007).

En peces el estudio de las vías de degradación y de reparación proteica en hígado es prácticamente un campo de estudio virgen. En esta especie el estudio de la homeostasis proteica está más focalizado en el tejido muscular, relacionando las diferentes actividades proteasas como índices de evaluación en el desarrollo y en el crecimiento del tejido. En este sentido la gran mayoría de trabajos se focalizan en condiciones de ayuno. Por ejemplo, en trucha se observó una mayor expresión génica de los sistemas de ubiquitinación después de un periodo de ayuno, y una caída de esta expresión tras la recuperación de la alimentación (Rescan et al., 2007). En bacalao Guderley et al., (2003) describieron una mayor expresión de catepsina D en hígado en condiciones de ayuno. Recientemente, algunos estudios han demostrado la presencia de subunidades del proteasoma en el mucus epidérmico de dorada (Jurado et al. 2015; Sanahuja e Ibarz, 2015).

4.5. CONTROL HIPOFISARIO

La glándula pituitaria (también llamada hipófisis) es una glándula endocrina situada en el sistema nervioso central, cuya función es regular numerosos procesos fisiológicos mediante la liberación de hormonas. Se sitúa entre el hipotálamo y los órganos periféricos, y actúa como un regulador clave durante el crecimiento, el estrés, la reproducción y otros procesos fisiológicos. El eje hipotálamo-hipófisis es considerado el principal punto de control dentro del organismo, teniendo capacidad para integrar todos los inputs provenientes del exterior del animal, del estado interno y con la capacidad de ofrecer una respuesta a esta información recibida. Por tanto, se postula como núcleo central de regulación y ejecución de respuestas sobre comportamiento periférico. La morfología de esta glándula está diferenciada en dos regiones bien tipificadas en base al origen embrionario del tejido que las componen: la región posterior o neurohipófisis y la región anterior conocida como adenohipófisis, de mayor tamaño. Esta última posee una alta capacidad de síntesis y liberación a la circulación de diversas hormonas con actividades bien caracterizadas y descritas, tales como la hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), somatolactina (SL),

proopiomelanocorticotropina (POMC), hormona estimulante tiroidea (TSH) y gonadotropina (GTH) entre otras (Fig.11).

Clásicamente, la mayoría de los estudios endocrinos abordan la respuesta de un eje endocrino completo, analizando conjuntamente los tejidos diana evaluando sus receptores y los niveles de hormonas circulantes. En peces son muy pocos los estudios centrados en observar el comportamiento de la pituitaria, evaluando su actividad y reactividad frente a condiciones de estrés térmico. Por consiguiente, ningún estudio se centró en comprobar la funcionalidad hipofisaria de la dorada durante las fluctuaciones de temperatura del agua, así como su implicación en el estancamiento del crecimiento a bajas temperaturas y el posible papel que ejerce en la depresión metabólica descrita durante este periodo (revisado en Ibarz et al., 2010a).

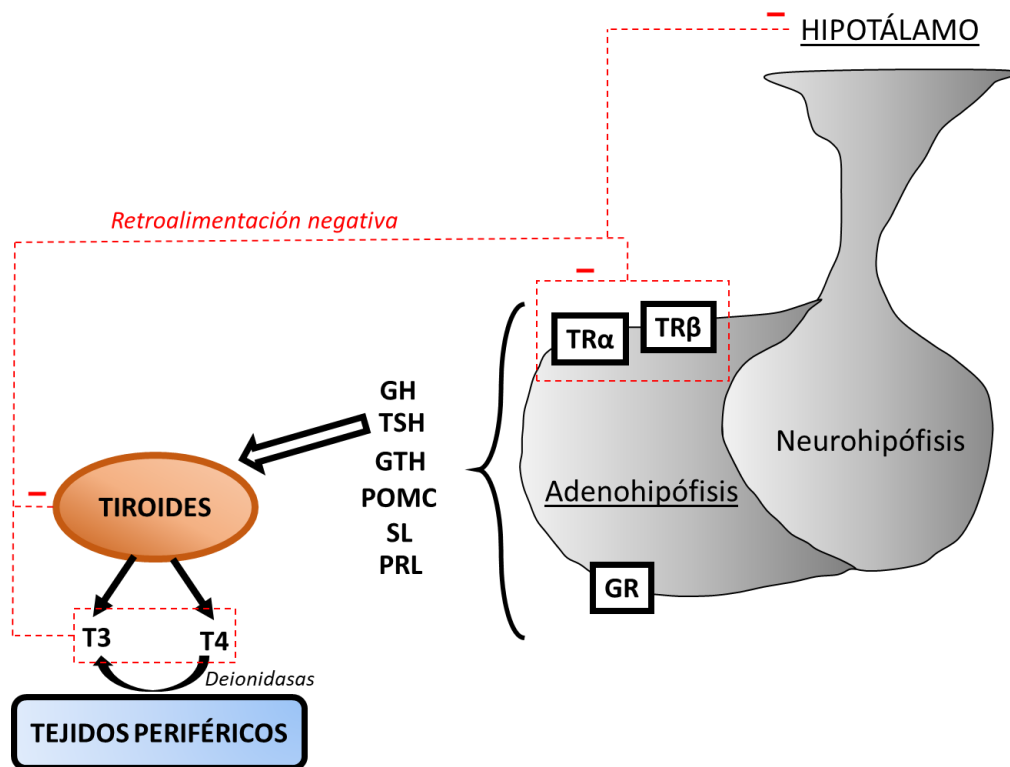


Figura 11. Liberación hormonal en adenohipófisis y regulación de los niveles de hormonas tiroideas.

El papel de la hipófisis en el control del crecimiento está muy bien descrito en la literatura, y habitualmente se realiza a través del eje de los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) y de GH (Reindl y Sheridan, 2012). Un gran número de factores ambientales como el estado nutricional, el fotoperiodo, el estrés y la temperatura modifican la expresión y la actividad del sistema GH/IGF en la dorada (Pérez-Sánchez, 2000). Sin embargo, nuevamente, muy pocos estudios se refieren a la influencia que tiene sobre las bajas tasas de alimentación debido a periodos de bajas temperaturas y su relación con el crecimiento. En el artículo de Mingarro et al. (2002) se afirma que la activación del eje somatotrópico precede siempre a brotes de crecimiento a temperaturas cálidas, mientras que los niveles circulantes de somatolactina tienden a aumentar a fines del otoño, en concordancia con niveles bajos de cortisol en plasma.

Por su parte, las hormonas tiroideas son las principales reguladoras del metabolismo y participan tanto en el crecimiento como en el desarrollo de los peces (Power et al., 2000). Su liberación y su regulación son mediados por la glándula pituitaria. La TSH favorece su síntesis y liberación estimulando a la tiroides. No obstante, es un proceso muy bien regulado, y el feed-back proporcionado por los receptores de tiroides (TRs) a estas hormonas contribuyen al control de este eje inhibiendo su liberación (Fig.11). Las dos hormonas tiroideas que son liberadas al torrente sanguíneo son la Tri-iodotironina (T3) y la Tiroxina (T4). T3 se considera la forma activa mientras que T4 necesita ser desiodada a nivel local por las células de los tejidos periféricos, principalmente en hígado. Al igual que en otras especies de peces, en la dorada los niveles circulantes de T3 y T4 se ven reducidos como consecuencia de una restricción alimentaria inducida, mientras que únicamente se recuperan los niveles de T3 tras una semana de recuperar el ritmo normal de alimentación (Power et al., 1999). No obstante, no existen datos sobre cómo puede verse afectado el eje tiroideo de esta especie en el periodo de fluctuación térmica por bajas temperaturas.

Dentro de los ejes en los cuales está integrada la hipófisis, el encargado de analizar y dar respuesta a las condiciones de estrés es el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI). Elliot, 1991 describió la disminución en la ingesta como el primer signo de estrés por frío en estos animales, por lo tanto, las bajas temperaturas y el ayuno inducido, de forma gradual o aguda, se postulan como factores estresantes (Ibarz et al., 2010a). La respuesta al estrés es impulsada por la hipófisis principalmente a través de la expresión de los péptidos derivados de proopiomelanocorticotropina (POMC) (Power y Canario, 1992). Para la especie que nos ocupa, Cardoso et al. (2010) describió varios péptidos POMC siendo la forma sbPOMC-alfa la más expresa en pituitaria. Considerando que la literatura vincula principalmente el eje de estrés con las condiciones de confinamiento de peces, la densidad de peces, la manipulación, etc., pocos estudios se centran en la repercusión del frío sobre el eje HPI. Solo un estudio hace referencia a la interacción entre las bajas temperaturas y el eje HPI en dorada, mostrando una rápida pero transitoria liberación de cortisol y adenocorticotropina después de una bajada de la temperatura del agua de 18 a 9°C (Rotllant et al., 2000). La activación del eje HPI tiene como una de sus primeras respuestas debido al estrés la liberación de ACTH a nivel hipofisario, seguido de la liberación de cortisol por las células inter-renales del riñón. En teleósteos, la regulación de este eje esta mediado principalmente por los receptores de glucocorticoides (GR) caracterizados en dorada por Acerete et al. (2007). En este mismo trabajo se describió el incremento de GR en diversos tejidos, incluido el cerebro, como respuesta al estrés producido 72 horas después de una inyección de LPS. Clásicamente, los cambios en los niveles de cortisol (Pickering y Pottinger 1985), en la glucemia plasmática (Palti et al., 1999) e incluso en la concentración de proteínas séricas como la albúmina y la globulina (Adham et al., 1997) se consideran indicadores de estrés.

OBJETIVOS

La acuicultura se ha convertido en una alternativa real y rentable a la pesca extractiva para proporcionar un alimento de un elevado valor nutritivo. Entre las especies de mayor relevancia en la producción acuícola marina del área Mediterránea, la dorada (*Sparus aurata*) es de las más abundantes. Pese a la mejora de la alimentación y crecimiento de los cultivos, sigue habiendo un grave problema en el periodo invernal para esta especie. En este periodo la dorada reduce drásticamente su ingesta de forma que el crecimiento, y por lo tanto la producción, queda parada, además de presentar varias patologías asociadas (revisado en Ibarz et al., 2010a). Los estudios de esta tesis se enmarcan dentro de esta problemática siendo el objetivo principal:

- Obtener un conjunto completo de marcadores del estado fisiológico y celular y establecer su relación con la respuesta a los cambios de temperatura controlados asociados al período invernal. Todo ello mediante el estudio de los parámetros de crecimiento, la respuesta osmorreguladora, los efectos en el metabolismo hepático, el estado oxido-reductor, la homeostasis proteica y el control hipofisario. Para poder, de este modo, proporcionar datos reales que contribuyan significativamente a la mejora del cultivo y a la nutrición sostenible de la dorada.

Objetivos concretos:

- 1) Evaluar el crecimiento, la función osmorreguladora y el metabolismo intermediario hepático de la dorada de un periodo de bajas temperaturas y tras un periodo de recuperación (**Capítulo I**).
- 2) Evaluar el efecto de la reducción de los lípidos de la dieta en el crecimiento, la función osmorreguladora y el metabolismo intermediario hepático de la dorada previa y posteriormente de un periodo de bajas temperaturas y tras un periodo de recuperación (**Capítulo I**).
- 3) Determinar el estado óxido-reductor hepático y plasmático de la dorada antes, durante y después de un periodo de bajas temperaturas (**Capítulo II**).
- 4) Determinar el efecto de la reducción de los lípidos de la dieta en el estado óxido-reductor hepático y plasmático de la dorada antes, durante y después de un periodo de bajas temperaturas.
- 5) Describir y relacionar las principales vías de degradación y recambio proteico en el hígado con el daño causado por el estrés oxidativo durante un periodo de fluctuación térmica (**Capítulo III**).
- 6) Caracterizar y evaluar el efecto de la temperatura durante una fluctuación térmica y su recuperación sobre la actividad de la pituitaria mediante el estudio de la expresión génica de hormonas y receptores (**Capítulo IV**).
- 7) Caracterizar y evaluar el efecto de la reducción de los lípidos durante una fluctuación térmica y su recuperación sobre la actividad de la pituitaria mediante el estudio de la expresión génica de hormonas y receptores (**Capítulo IV**).

PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos anteriormente descritos, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Para realizar los objetivos 1) y 2), los animales se alimentaron con tres dietas isoproteicas con distinto porcentaje en su contenido lipídico: 18%, 16% y 14% (D18, D16 y D14 respectivamente). Se determinaron los parámetros de crecimiento y de conversión del alimento, así como la actividad de enzimas relacionadas con la producción de energía, y de las ATPasas encargadas de la osmorregulación. Además, se determinó la presencia de metabolitos plasmáticos. De esta manera se estableció una relación directa entre marcadores de metabolismo intermediario en hígado y el desarrollo de los peces para cada uno de los periodos de estudio y para cada una de las dietas (**Capítulo I**).
- En el tercer y cuarto objetivo se analizó la capacidad hepática antioxidante a lo largo de una fluctuación térmica simulada, mediante el estudio de la actividad de los principales enzimas antioxidantes, y mediante los niveles de glutatión. Paralelamente se comprobaron los niveles de lipoperoxidación y de daño proteico. Para evaluar el efecto de la reducción de lípidos en la dieta, los peces se alimentaron con dos dietas isoproteicas con diferente contenido lipídico: 18% y 14% (D18 y D14 respectivamente). (**Capítulo II**).
- La realización del quinto objetivo se llevó a cabo mediante el análisis de la homeostasis proteica en el hígado. Se evaluó la presencia de daño oxidativo, y mediante Western Blot, se midió la expresión de la vía de protección y reparación proteica (heat-shock proteins) y las dos vías principales de proteólisis: el complejo UPS (subunidades reguladoras 19S y catalítica 20S) con su correspondiente marcaje con ubiquitina, y el lisosoma a través de la catepsina. (**Capítulo III**).
- Para el sexto y séptimo objetivo se determinó la actividad de la pituitaria frente a cambios térmicos del agua mediante la expresión génica por qPCR de diferentes marcadores hipofisarios (hormonas y receptores), y además se determinaron los niveles circulantes de hormonas tiroideas T3 y T4 mediante ELISA. Nuevamente se estudió el efecto de dos dietas con diferente contenido lipídico: 18% y 14% (D18 y D14 respectivamente). (**Capítulo IV**).

INFORME DE LOS DIRECTORES



Edifici Ramón Margalef (plantas 3-A & 4-A)
Av. Diagonal, 643
E-08071 Barcelona
Tel: +34 934021531 Fax: +34 934110358
e-mail: dept-fisiologia@ub.edu

El Dr. Antonio Ibarz i Valls y la Dra. Teresa Carbonell i Camós, como directores de la tesis doctoral presentada por Sergio Sánchez Nuño titulada “Marcadores fisiológicos y estado oxido-reductor durante las fluctuaciones térmicas en la dorada (*Sparus aurata*)” manifiestan la veracidad del factor de impacto y la implicación del doctorado en los artículos científicos publicados o pendientes de publicación presentados en esta tesis.

Sergio Sánchez Nuño ha participado de forma muy activa en la elaboración de los artículos en todos los aspectos, tal y como queda reflejado en la relación de los autores, constando como primer autor en todos los artículos presentados. Asimismo, Sergio ha contribuido de manera principal en la realización de los experimentos, obtención de datos, análisis de resultados, así como en la redacción y elaboración de dichos artículos. El artículo 3 deriva de dos estancias realizadas por Sergio en el laboratorio del Dr. Pedro M. Guerreiro en el Centro de Ciências Marinhas de la Universidade do Algarve (Faro, Portugal).

Capítulo I:

“Cold-induced growth arrest in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): metabolic reorganisation and recovery”.

Autores: S. Sánchez-Nuño, O. T. Eroldogan, I. Sanahuja, I. Özşahinoğlu, J. Blasco, J. Fernández-Borràs, R. Fontanillas, P. M. Guerreiro, A. Ibarz

Revista: Aquaculture Environment Interactions

DOI: In Press **Year:** 2018

ISSN: 1869-215X **Impact Factor:** 2,105 JCR (2017) Q1

Capítulo II:

“Redox challenge in a cultured temperate marine species during low temperature and temperature recovery”.

Autores: S. Sánchez-Nuño, I. Sanahuja, L. Fernández-Alacid, B. Ordóñez-Grande, R. Fontanillas, J. Fernández-Borràs, J. Blasco, T. Carbonell and A. Ibarz

Revista: Frontiers in Physiology

DOI: 10.3389/fphys.2018.00923

Volume: 9 **Pages:** 923 **Year:** 2018

ISSN: 1664-042X **Impact Factor:** 3,394 JCR (2017) Q1

Capítulo III:

“Liver protein homeostasis of gilthead sea bream was compromised by temperature fluctuation challenge”

Autores: S. Sánchez-Nuño, Ignasi Sanahuja, Laura Fernández-Alacid, Borja Ordóñez-Grande, Teresa Carbonell, Antoni Ibarz

Revista: Frontiers in Physiology

DOI: Pendiente de enviar

ISSN: 1664-042X **Impact Factor:** 3,394 JCR (2017) Q1

Capítulo IV:

“Modulation of pituitary response throughout a temperature fluctuation challenge on gilthead sea bream.”

Autores: S. Sánchez-Nuño, S. Silva, I. Sanahuja, B. Ordóñez, L. Fernández-Alacid, P. M. Guerreiro, A. Ibarz

Revista: Journal of Thermal Biology

DOI: Pendiente de enviar

ISSN: 0306-4565 **Impact Factor:** 2,093 JCR (2017) Q1

Barcelona, Septiembre de 2018

Dr. Antonio Ibarz Valls

Dra. Teresa Carbonell Camós

PUBLICACIONES

CAPÍTULO I



Redox Challenge in a Cultured Temperate Marine Species During Low Temperature and Temperature Recovery

Sergio Sánchez-Nuño¹, Ignasi Sanahuja¹, Laura Fernández-Alacid¹, Borja Ordóñez-Grande¹, Ramon Fontanillas², Jaume Fernández-Borràs¹, Josefina Blasco¹, Teresa Carbonell¹ and Antoni Ibarz^{1*}

¹ Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Skretting Aquaculture Research Centre, Stavanger, Norway

OPEN ACCESS

Edited by:

Leonardo Julián Magnoni,
Centro Interdisciplinar de Pesquisa
Marine e Ambiental (CIIMAR),
Portugal

Reviewed by:

Mikko Juhani Nikinmaa,
University of Turku, Finland
Tsong-Han Lee,
National Chung Hsing University,
Taiwan

*Correspondence:

Antoni Ibarz
tibarz@ub.edu

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 07 April 2018

Accepted: 25 June 2018

Published: 17 July 2018

Citation:

Sánchez-Nuño S, Sanahuja I,
Fernández-Alacid L,
Ordóñez-Grande B, Fontanillas R,
Fernández-Borràs J, Blasco J,
Carbonell T and Ibarz A (2018)
Redox Challenge in a Cultured
Temperate Marine Species During
Low Temperature and Temperature
Recovery. *Front. Physiol.* 9:923.
doi: 10.3389/fphys.2018.00923

Aquaculture is a growing industry that is increasingly providing a sizable proportion of fishery products for human consumption. Dietary energy and temperature fluctuations affect fish health and may even trigger mortality, causing great losses in fish production during winter. To better understand this unproductive winter period in aquaculture, the redox status in a cultured marine species, the gilthead sea bream, was analyzed for the first time by inducing controlled temperature fluctuations and reducing dietary lipid content. Two groups of fish (by triplicate), differing in their dietary lipid content (18% vs. 14%), were subjected to 30 days at 22°C (Pre-Cold), 50 days at 14°C (Cold) and then 35 days at 22°C (Recovery). Plasma and liver redox metabolites (oxidized lipid, oxidized protein and thiol groups), liver glutathione forms (total, oxidized and reduced) and liver antioxidant enzyme activities were measured. Reducing dietary lipid content did not affect gilthead sea bream growth, glutathione levels or enzyme activities, but did reduce the amount of oxidized lipids. A sustained low temperature of 14°C showed a lack of adaptation of antioxidant enzyme activities, mainly catalase and glutathione reductase, which subsequently affected the glutathione redox cycle and caused an acute reduction in total hepatic glutathione levels, irrespective of diet. Antioxidant enzyme activities were gradually restored to their pre-cold levels, but the glutathione redox cycle was not restored to its pre-cold values during the recovery period used. Moreover, the lower lipid diet was associated with transiently increased liver oxidized protein levels. Thus, we propose that fish should be fed a low lipid diet during pre-cold and cold periods, which would reduce oxidized lipid levels without affecting fish growth, and a higher energy diet during the recovery period. Moreover, diets supplemented with antioxidants should be considered, especially during temperature recovery.

Keywords: redox, dietary lipids, gilthead sea bream, glutathione redox cycle, fish culture, temperature fluctuation

INTRODUCTION

Global aquaculture production has increased in recent decades to meet the increased demand for seafood and is predicted to become the most reliable supply of seafood in the future. Lipids are the main source of energy in aquaculture nutrition and are included in high amounts in fish feed (Bell and Wolfang, 2010). The development of high-energy diets in aquaculture has reduced production

time and increased growth rates sparing dietary protein dietary protein content, thus decreasing feed costs (Leaver et al., 2008). However, the increase in dietary lipid content is associated with increases in fish fat deposition and changes in the redox balance. In addition to fish nutrition, fluctuation in water temperature is one of the most important problems in aquaculture, with critical temperatures triggering serious thermal stress-induced problems when such variations approach either upper or lower limits that can be fatal to some species. Indeed, increased fish mortality during winter has been reported to affect a large number of fish species (Hurst, 2007).

Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is one of the most common marine species in the Mediterranean area and one of the most appreciated seafood species in Europe. Cultured gilthead sea bream normally experiences water temperatures ranging from 11°C in winter to 26°C, and under intensive culture, fish are unable to perform natural migration (Davis, 1988) or escape and the temperature fall becomes critical (Ibarz et al., 2010c). Below 13°C, fish activity and growth are minimal and a drastic reduction in nourishment is observed leading to growth arrest and a halt in production (Tort et al., 1998; Sarusic, 1999; Ibarz et al., 2007b; Richard et al., 2016). Although extreme cold shock is, in some cases, the direct cause of mortality, growing evidences indicate thermal stress and starvation as the major underlying physiological conditions of the mortality of over-wintering fishes (Donaldson et al., 2008). Moreover, there is no significant thermal compensation on metabolism under cold conditions on gilthead sea bream at temperatures below 13–14°C (Ibarz et al., 2010c). In this species, when fish metabolism was directly depressed by temperature a concomitant liver oxidant insult was present; lipid peroxidation (LPO) products appeared and nitric oxide production increased in a few days (Ibarz et al., 2010a). Fish diet formulation at low temperatures is still relevant and controversial concern in sea bream. High quality lipids (fish oil rich in polyunsaturated fatty acids) promote fish growth, but diets with high lipid content in the winter or pre-winter season appear to increase the incidence of pathologies associated with low temperatures (Ibarz et al., 2010c). Previous studies on this species under controlled conditions have demonstrated that diets with high lipid content alter liver metabolism, mobilizing fat from lipid reserves to the liver and causing friable and even steatotic livers due to the accumulation of unsaturated fatty acids (Sarusic, 1999; Donaldson et al., 2008). Therefore, revising the established practice of using higher lipid contents in winter diets has already been suggested, but still not implemented (Ibarz et al., 2010c).

In gilthead sea bream, food restriction and fasting increase the activities of the main redox enzymes at warm temperatures (Pascual et al., 2003), while an acute drop in temperature increases nitric oxide production and lipid peroxidation which also affect redox pathways (Ibarz et al., 2010b). In other species, plasma and blood have been used to analyze changes in the redox pathways, since peripheral blood reflects the global health status of the individual (Costa et al., 2011). However, to the best of our knowledge, no study to date has investigated changes in redox pathways in the plasma of gilthead sea bream. It was recently reported that advanced oxidation protein products (AOPPs) form from the direct oxidation of the amino acid side chains

of proteins as a consequence of the damage caused by reactive oxygen species (ROS) (Bochi et al., 2014). In freshwater fish, AOPPs have been reported to act as markers of metal toxicity in the kidney and liver (Stanca et al., 2013; Hermenean et al., 2015). There are currently no data on AOPPs and their role as markers of oxidative damage in marine species.

This work aimed to study for the first time in gilthead sea bream (1) the redox status during temperature fluctuations and (2) the benefits of reducing dietary lipid content (from 18 to 14%). Since the high content of fish oil in commercial sea bream feed might affect the oxidative status, we focused on analyzing redox metabolites in the plasma and liver (oxidized lipids, oxidized proteins, and liver glutathione) and the main antioxidant enzymes in the liver (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase). Our findings will contribute to the little knowledge currently available on the redox response to temperature fluctuations in fish and help improve the unproductive winter period in culture conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animal Conditions

Gilthead sea bream, with an average body weight of 145 ± 0.1 g, were obtained from a local fish farm and acclimated indoors at the Centre d'Aquicultura (CA-IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain) at 22°C for 2 weeks, using a standard commercial fish feed (Skretting ARC). Following this period, they were randomly distributed into two groups per triplicate (30 fish per tank) into a water-recirculating system IRTAmar™. Fifteen 500-L fiberglass tanks with solid and biological filters were used. Water temperature and oxygen concentration were monitored, while nitrite, nitrate and ammonia concentrations were maintained at initial levels throughout the experimental period. Two isoproteic diets formulated by Skretting ARC reducing their lipid content from 18 to 14% (D18 and D14, respectively) by increasing nitrogen free extract as is indicated in **Table 1**, resulting to a “crude energy” of 20.2 and 21.0 MJ/kg

TABLE 1 | Diets formulation and chemical composition.

Components (%)	D18	D14
Wheat	21.4	26.4
Wheat gluten	18.8	17.9
Soya concentrate	20.0	20.0
Fish meal	25.0	25.0
Fish oil	13.3	9.2
Premix vitamin and minerals	1.5	1.5
Dry matter (g/100 g)	92.4	91.8
Nutrients (g/100 g DM)		
Crude protein	47.0	47.0
Crude fat	18.0	14.0
NFE (nitrogen free extract)	26.0	30.0
Crude energy (MJ/kg DM)	21.0	20.2

Information provided by Skretting ARC.

dry matter, respectively. Fish were fed to satiation twice a day, 7 days a week for 115 days in total. Feed was automatically delivered during 30-min sessions at 08:00 and 16:00. Satiation was ensured throughout the experimental period by calculating the estimated daily feed intake and providing a ration that was 20% above this amount. The experimental period (115 days) consisted of four periods (Figure 1): pre-cold (PC), during which the fish were maintained at 22°C for 30 days; cold (C), during which the temperature was cooled to 14°C over 5 days and maintained at this temperature for a total of 50 days (including the cooling down period); early recovery (ER), during which the temperature was restored to 22°C over 5 days and measurements were taken 7 days after the start of the temperature recovery period; and late recovery (LR), for which measurements were taken 35 days after the start of temperature recovery.

Fish Sampling

At the end of each temperature period, fish were fasted overnight before sampling and nine fish (3 per replicate tank and diet) were captured at random and anaesthetized with 2-phenoxyethanol (100 ppm) diluted in seawater. Body weight and length were measured, blood samples were taken from the caudal vessels using EDTA-Li as the anticoagulant, and the fish were sacrificed by severing the spinal cord. Plasma was obtained by centrifuging the blood at $13,000 \times g$ at 4°C for 5 min and samples were kept at -80°C until analysis. The weights of the livers were recorded before the samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis. The study complied with the guidelines of the European Union Council (86/609/EU), the Spanish Government (RD 1201/2005) and the University of Barcelona (Spain) regarding the use of laboratory animals.

Redox Metabolites

Lipid peroxidation was analyzed using the TBARS assay and quantified by determining the concentration of the end reactive

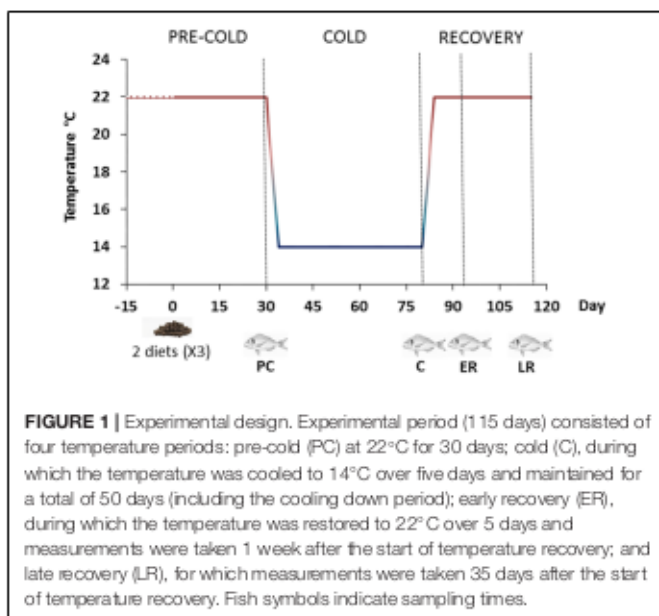
product malondialdehyde (MDA), according to Gamacho-Castaño et al. (2016). Briefly, liver was homogenized in 10% (w/v) RIPA solution [50 M Tris (pH 7.4), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 M NaF, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 1% sodium deoxycholate] containing a commercial protease inhibitor cocktail. Suspensions were centrifuged at $2,000 \times g$ for 5 min, with the resulting pellet discarded. Plasma samples for TBARS assays were pre-diluted in PBS (10% w/v). The formation of the MDA-TBA adduct was fluorometrically measured at an excitation wavelength of 515 nm and an emission wavelength of 550 nm. The calibration curve was determined with tetraethoxypropane (Slikker et al., 2001). Values are expressed as MDA in nanomoles per gram of total lipids in the plasma or per mg of fresh liver weight.

AOPPs in liver homogenates were assayed using a modified version of Witko-Sarsat et al. (2003). For sample preparation, the tissue was homogenized in PBS (10% w/v) and centrifuged at $5,000 \times g$ at 4°C for 10 min. Before testing, the liver and plasma samples were pre-diluted in PBS until a maximum concentration of 25 mg of protein per mL was obtained. AOPP formation was spectrophotometrically measured at 340 nm, involving a standard calibration curve using 100 μ L of chloramine-T solution (0–100 μ mol/L). AOPP concentration was expressed as chloramine-T nanomoles per mg of protein in the plasma or per mg of fresh liver weight.

Concentrations of plasma and liver total protein sulfhydryl groups or thiol groups (-SH) were determined with an adaptation of a protocol developed by Sedlak and Lindsay (1968). Samples were diluted in cold 0.25 M Tris-Base (pH 7.4) and centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min at 4°C. Total thiol groups were quantified from the supernatant aliquot after the addition of 150 μ l of 1 mM Tris-EDTA, 10 μ l of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 800 μ l of methanol. The mixture was homogenized and incubated at room temperature for 15 min. The endpoint reading was at 414 nm and total thiols were expressed as nanomoles per dL of plasma or nanomoles per mg of fresh liver weight.

Hepatic levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were evaluated using the procedure described by Hissin and Hilf (1976) and modified by Alva et al. (2013). Liver samples were homogenized in cold buffer containing 5 mM phosphate-EDTA buffer (pH 8.0) and 25% HPO₃ (3.75:1). The homogenates were ultracentrifuged at $100,000 \times g$ at 4°C for 30 min and the resulting supernatants were used to determine GSH and GSSG concentrations, using the fluorescent probe o-phthalaldehyde (OPA). GSSG was previously incubated with N-ethylmaleimide to avoid interference with GSH complexes. After 15 min of incubation, fluorescence was determined at an emission wavelength of 420 nm (excitation at 350 nm) and data are shown as GSH nanomoles or GSSG nanomoles per g of fresh weight and as total glutathione (TGSH = GSH + GSSG) and glutathione power (GSH/GSSG ratio).

The total amount of proteins in the liver and plasma was determined using the (Bradford and Williams, 1976) protein assay adapted for a 96-well plate, with the Bradford reagent obtained from Bio-Rad (CA, United States) and using albumin to derive the standard curve.



Redox Enzyme Activities

Liver samples for enzyme analyses were pulverized in liquid nitrogen and homogenized with a 1:9 (w/v) cold buffer (100 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100 (v:v), pH 7.8). Homogenates were centrifuged at $25,000 \times g$ at 4°C for 30 min. After centrifugation, supernatants containing the protein extract were aliquoted and kept at -80°C until analysis.

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) hepatic activity was determined using the enzymatic method of McCord and Fridovich (1969) and adapted for fish (Fumé et al., 2009). A diluted aliquot was mixed with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mM EDTA, 1 mM cytochrome C, 1 mM xanthine, 0.5 IU/ml xanthine oxidase and sodium hydrosulphite. Enzyme activity was determined by increasing optical density at 550 nm in 180-s periods. Arbitrary units were defined as one activity unit corresponding to the amount of enzyme required to produce a 50% inhibition of the ferricytochrome-C reduction rate.

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) hepatic activity was analyzed by following (Aebi, 1984) with minor modifications, measuring the decrease in the optical density of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm. The medium used for reading CAT activity was 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and a fresh solution of 10.6 mM H_2O_2 .

Glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) activity was assayed by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm (Bell et al., 1985). Measurements were performed in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide, 0.5–1 U/ml glutathione reductase, 2 mM reduced glutathione and 0.1 mM NADPH.

Glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7) activity was measured by analyzing NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1985). Assays were performed in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 0.63 mM NADPH and 3.25 mM oxidized glutathione.

All enzymatic analyses were performed in 96-well microplates at $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with the Tecan M200 spectrophotometer (Tecan Trading AG, Switzerland). All reagents, substrates, coenzymes and purified enzymes were from Sigma (Unites States) and Bio-Rad Laboratories, Inc. (Unites States). Except for SOD (explained before), enzymatic activities are shown as IU (CAT) or mIU (GPX and GR) per g of fresh liver weight, where one unit is defined as the amount of enzyme required to transform $1 \mu\text{mol}$ of the substrate per minute under the assay conditions.

Statistical Analysis

Statistical differences between the temperature periods for each diet were analyzed by one-way nested analysis of variance (ANOVA), with tank as the random factor to test for the possible tank effect. When there was no tank effect, ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's *post hoc* test was performed when variances were uniform or not, respectively. To compare diets within each period, Student's *t*-tests were performed. Differences were considered statistically significant when the *p*-values were <0.05 . The Shapiro-Wilk test was first used to ensure the normal distribution of the data, while the uniformity of the variances

was determined by Levene's test. All statistical analyses were undertaken with commercial software (PASW version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, United States).

RESULTS

Effects of Temperature Fluctuations on Body Parameters and Plasma Metabolites

Body weight, body length, condition factor as well as hepatosomatic (HSI) and mesenteric fat (MFI) index were recorded (Table 2). There were no morphological differences at the end of each period between those fed the D18 diet and those on the D14 diet, showing that lowering dietary lipid content from 18 to 14% did not affect growth. Cold-induced growth arrest was observed in the animals maintained at 14°C for 50 days, with growth recovering after restoring the temperature to 22°C . The HSI increased at the end of the cold period and while the D18 diet had no effect during the recovery period, the D14 diet significantly lowered the HSI by half.

To evaluate the plasma redox status, oxidized lipid levels (TBARS), oxidized protein levels (AOPPs) and total thiol groups were analyzed (Table 2). Plasma oxidized lipid levels were twofold higher in the animals fed the D18 diet at the end of the pre-cold period. By contrast, oxidized protein levels in the plasma did not differ between the diets. At the end of the cold period, plasma oxidized lipid and oxidized protein levels were reduced by half and around 25%, respectively, for both diets. Temperature recovery increased TBARS levels to pre-cold levels in 7 days (early recovery). Animals fed the D18 diet presented a higher concentration of circulating thiol groups at the end of the pre-cold period (twofold, $p < 0.05$). However, prolonged exposure to the cold produced different responses between the fish fed the different diets, with values decreasing in those on the D18 diet and increasing in those on the D14 diet, which reverted during late recovery.

Effects of Temperature Fluctuations on Hepatic Redox Status

Redox metabolites in the liver during temperature fluctuations were also analyzed (Table 2). A reduction in the dietary lipid content of 4% decreased lipid peroxidation in the liver by 30% (during the pre-cold period), whereas no effects were found on protein oxidation and total thiol groups. In contrast to plasma, low temperatures did not reduce oxidized lipid levels in the liver, while D18 diet also significantly increased the amount of oxidized proteins. Gradual temperature restoration after the cold period transiently reduced oxidized lipid levels (by fourfold) for both diets, which could have been related to the presence of more oxidized lipids in the plasma, and increased (more than twofold) liver oxidized protein levels in those on the D14 diet.

At the end of the pre-cold period for both diets, total glutathione (tGSH) levels were around 2,000–2,100 nmols per gram of fresh liver weight, the reduced form (GSH) composing

TABLE 2 | Growth performance and redox-related metabolites in plasma and liver of gilthead sea bream throughout temperature fluctuation.

	DIET	Pre-cold (Day 30)	Cold (Day 80)	Early recovery (Day 87)	Late recovery (Day 115)
Growth Parameters					
Body weight (g)	D18	192.4 ± 9.9a	208.8 ± 4.4a	216.8 ± 5.7a	265.3 ± 11.4b
	D14	191 ± 3.7a	207.89 ± 5.4a	213.4 ± 8.7a	263.6 ± 7.5b
Body length (cm)	D18	18.8 ± 0.3a	19.6 ± 0.1b	19.4 ± 0.2b	21.3 ± 0.2c
	D14	18.8 ± 0.2a	19.77 ± 0.20b	19.63 ± 0.26b	21.08 ± 0.12c
Condition factor	D18	2.85 ± 0.04	2.78 ± 0.05	2.83 ± 0.05	2.74 ± 0.10
	D14	2.91 ± 0.06a	2.69 ± 0.06b	2.81 ± 0.04ab	2.87 ± 0.09ab
HSI	D18	1.91 ± 0.08	2.34 ± 0.14	2.15 ± 0.11*	1.79 ± 0.26
	D14	2.17 ± 0.12a	2.31 ± 0.10a	2.52 ± 0.13a	0.98 ± 0.15b*
MFI	D18	1.13 ± 0.17	0.88 ± 0.04	1.14 ± 0.12	1.78 ± 0.10
	D14	1.09 ± 0.14a	0.98 ± 0.17a	1.17 ± 0.08a	1.78 ± 0.12b
Plasma Metabolites					
Oxidized lipids	D18	91.18 ± 11.66a	48.76 ± 2.53b	105.8 ± 6.69a	76.61 ± 14.46ab
	D14	42.04 ± 3.25a*	20.74 ± 4.30b*	40.67 ± 2.42a*	28.33 ± 5.6ab*
Oxidized proteins	D18	10.66 ± 0.67	7.54 ± 0.33	7.92 ± 0.79	10.23 ± 0.92
	D14	10.65 ± 1.07a	8.31 ± 0.82b	7.84 ± 1.07b	8.19 ± 0.27b
Total thiols	D18	1.47 ± 0.12a	0.88 ± 0.08b	1.34 ± 0.07ab	1.37 ± 0.24ab
	D14	0.67 ± 0.18a*	1.19 ± 0.08b*	1.03 ± 0.13ab*	0.99 ± 0.1ab
Liver Metabolites					
Oxidized lipids	D18	18.75 ± 2.12a	18.02 ± 3.59a	4.44 ± 0.51b	5.29 ± 1.68b
	D14	11.43 ± 1.44a*	19.39 ± 3.73a	5.73 ± 0.68b	12.62 ± 3.11a*
Oxidized proteins	D18	2.10 ± 0.31a	3.50 ± 0.26b	3.05 ± 0.45ab*	2.74 ± 0.98ab
	D14	2.51 ± 0.15a	2.48 ± 1.10ab	5.62 ± 0.52b	3.25 ± 0.61ab
Total Thiols	D18	9.08 ± 2.85	13.09 ± 0.66	15.26 ± 1.54	15.11 ± 0.72
	D14	8.67 ± 2.04	14.65 ± 0.54	10.38 ± 3.16	15.84 ± 0.95

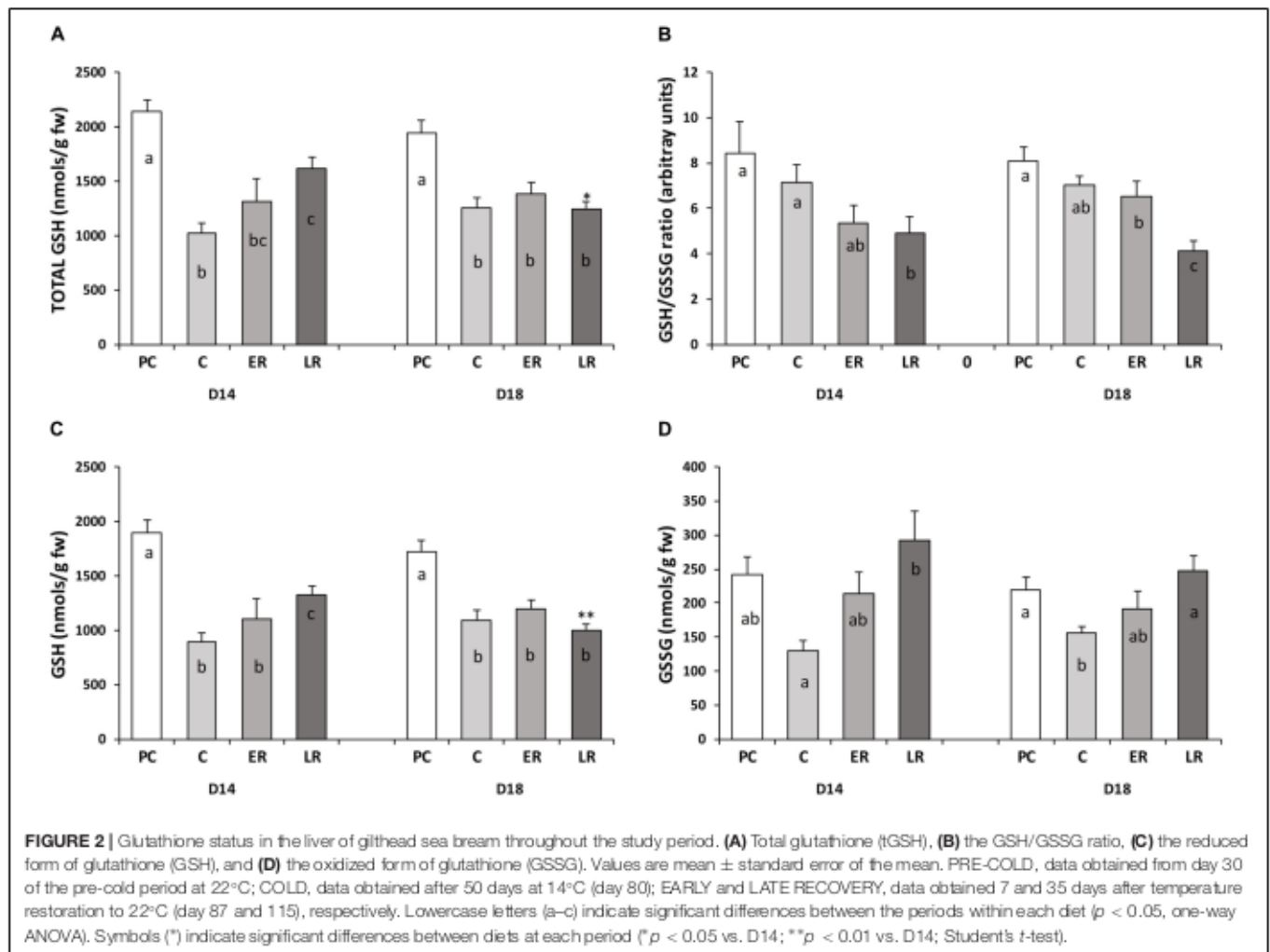
Significant differences between thermal periods within each diet are indicated by lowercase letters ($p < 0.05$, One-Way ANOVA). Significant differences between diets at each thermal period are indicated by * (Student's *t*-test). Growth parameters: Condition Factor (Body weight/Body length 3×100), HSI, Hepatosomatic Index (Liver weight/Body weight); MFI, Mesenteric Fat Index (Mesenteric fat weight/Body weight); Plasma metabolites: oxidized lipids measured as nmols MDA/g total plasma lipid, oxidized proteins measured as nmols chloramine-T/mg total plasma protein, total thiols (nmols -SH/dl plasma); Liver metabolites: oxidized lipids measured as nmols MDA/mg fw, oxidized proteins measured as nmols chloramine-T/mg fw, Total thiols (nmols -SH/mg fw).

90% of this amount and the oxidized form (GSSG) 10%, with a high equivalent GSH/GSSG ratio of around eight irrespective of diet. At the end of the cold period, tGSH levels decreased by half for both diets (Figure 2A). The GSH/GSSG ratio (Figure 2B) was maintained, indicating that the reduced (Figure 2C) and oxidized (Figure 2D) forms were proportionally depleted. Temperature recovery did not completely restore tGSH levels to pre-cold values, showing reductions of 25 and 40% ($p < 0.05$) for the D14 and D18 diet, respectively. Moreover, tGSH levels were significantly lower in the fish on the D18 diet than in those on the D14 diet. The GSH/GSSG ratio decreased during the late recovery period due to a gradual rise in GSSG levels because of oxidative stress that was not compensated by glutathione production.

Effects of Diet and Temperature Fluctuations on Hepatic Enzyme Activities

Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GR, and GPX) in response to temperature changes are shown in Figure 3. Liver enzyme activities were not different between the diets during the pre-cold period, except for the lower (10%) GPX activity

observed in the animals fed the D18 diet that resulted in a higher GR/GPX ratio. Changes in the enzyme activities in response to the drop in temperature were due to the lack of adaptation to the cold, with no increases in the enzyme levels to compensate for the reduced metabolism caused by the low temperature. CAT and GR maximal activities were reduced by 50 and 25%, respectively, for both diets. Together with the lower tGSH amounts, these values indicate that low temperatures reduced antioxidant protection in the liver, especially in the fish fed the D18 diet, in which the GR/GPX ratio was reduced (by half), indicating an acute alteration in glutathione biosynthesis and turnover, respectively. Temperature recovery gradually restored CAT activity; however, GR activity was not fully restored to pre-cold levels. GPX activity increased during temperature recovery, its activity being 15–20% higher than during the pre-cold period. As a result, the glutathione redox cycle was not restored to its pre-cold state, the GR/GPX ratio still being lower than during the pre-cold period based on the changes observed in the GSH/GSSG ratio. The glutathione redox power, measured by both ratios (GSH/GSSG and GR/GPX), presented great variation throughout the study period, suggesting that 50 days of hypothermia at 14°C strongly affected the glutathione redox status and that 30 days of temperature recovery were not



enough to mitigate the changes caused in the glutathione redox cycle.

DISCUSSION

A relationship has been recently reported between a winter bottleneck in fish culture and oxidative stress induced by low temperatures (Ibarz et al., 2010b,c; Richard et al., 2016). However, it is still not known whether temperature fluctuations or dietary lipid content influence the redox balance. This study analyzed, for the first time, gilthead sea bream redox status in response to a reduced dietary lipid content (from 18 to 14%) and temperature fluctuations (from 22° to 14°C and recovery from 14° to 22°C) corresponding to temperature changes that occur during a crucial period in gilthead sea bream culture (Ibarz et al., 2010c). Under our experimental conditions, fish presented similar body weight and condition factor at the end of each period regardless of diet, indicating that the animals had compensated for their lower lipid intake to maintain their energy balance. Some studies, testing the effects of increasing dietary lipid content on gilthead sea bream usually at higher temperatures (from 24° to 27°C), have

reported that lipid content alone does not significantly affect fish growth (Velázquez et al., 2006; Bonaldo et al., 2010; Mongile et al., 2014). As expected, low temperatures induced “winter growth arrest,” reducing growth and ingestion, while increasing the HSI, which has also been reported by the very few studies in this field (Hurst, 2007). Some studies have highlighted the importance of understanding the recovery mechanisms in this species after a cold fasting period (Tort et al., 2004; Ibarz et al., 2007b). Our data show that a 4% decrease in dietary lipid did not modify growth parameters, although the apparent dependence of HSI on dietary energy may suggest the relevance of a higher energy supply during this period. Along these lines, our previous findings in sea bream fasted at 18°C compared to cold-induced fasting at 8°C (Ibarz et al., 2007b) demonstrated the total use of hepatic glycogen after 35 days of food deprivation at warm temperatures, whereas the lipid amount did not differ throughout the cold fasting period. In addition, 15 days of recovery from an extremely cold temperature of 8°C reverted the lipid accumulation and the HSI values to pre-cold levels. The diet used for food restoration at 18°C was formulated with 21% of lipids. Comparing those results with the present study, we could assume that well-formulated higher-energy diets would prevent changes in liver

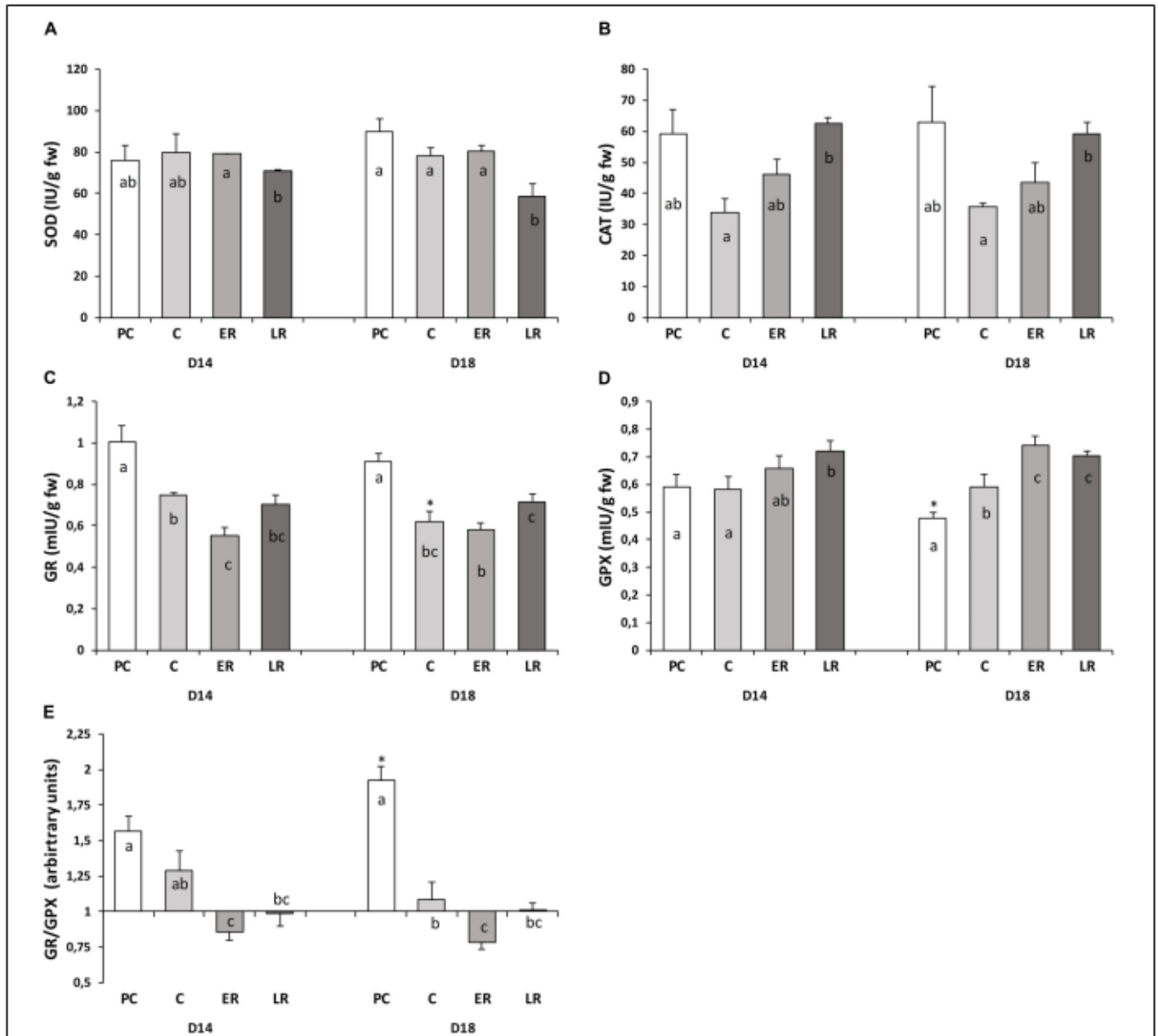


FIGURE 3 | Activity of redox-associated enzymes (**A**: SOD, **B**: CAT, **C**: GR, **D**: GPX, and **E**: the GR/GPX ratio) throughout the study period. Values are mean \pm standard error of the mean. PRE-COLD, data obtained from day 30 of the pre-cold period at 22°C; COLD, data obtained after 50 days at 14°C (day 80); EARLY and LATE RECOVERY, data obtained 7 and 35 days after temperature restoration to 22°C (day 87 and 115), respectively. Lowercase letters (a–c) indicate significant differences between the periods within each diet ($p < 0.05$, one-way ANOVA). Symbols (*) indicate significant differences between diets at each period (* $p < 0.05$ vs. D14; Student's *t*-test).

size and composition during recovery from low temperatures. Lipid peroxidation is considered a good marker of oxidative damage in fish (Tocher et al., 2002; Castro et al., 2012; Lushchak, 2016). Higher levels of dietary lipids have been associated with greater susceptibility to peroxidation-induced damage in mammals, especially for diets rich in fish oil (containing high levels of polyunsaturated fatty acids) (Sies et al., 2005). However, this has not been conclusively demonstrated in fish. In red drum (*Sciaenops ocellatus*), increasing dietary lipid content (0, 7, 14, and 21%) was shown to significantly increase oxidative stress

in the liver and plasma (Craig et al., 1999), while in sole (*Solea senegalensis*), TBARS levels increased in fish fed diets with high lipid content (21 vs. 11%) (Rueda-Jasso et al., 2004). In several salmonid species, tissue oxidized lipid levels have been observed to increase following intake of high PUFA amounts (Skonberg et al., 1994; Olsen et al., 1999). Furthermore, a recent study in gilthead sea bream (Castro et al., 2016) suggested that dietary vegetable oils had a protective role against lipid peroxidation in the liver and intestine compared to fish oils. In this study, reducing dietary lipid content from 18 to 14% lowered oxidized

lipid levels by half in both the plasma and liver of gilthead sea bream during the pre-cold period, decreasing the putative effects of lipid peroxidation. It is important to note that these results were obtained in animals maintained in indoor conditions. In sea cage culture, the basal levels of stress are higher because of high densities, crowding, or handling (Montero et al., 1999), which negatively impact on the growth and oxidative status of fish (Suárez et al., 2015).

Proteins are also targets of oxidation (Berlett and Stadtman, 1997) and although proteins are susceptible to greater oxidative damage than lipids, the elimination of oxidized proteins is more regulated and their accumulation is usually less evident (Gutteridge and Halliwell, 2000; Valko et al., 2007). In freshwater fish, increased amounts of AOPPs in the liver and kidney of chub (*Leuciscus cephalus*) have been linked to aquatic environmental heavy metal toxicity (Hermenean et al., 2015), whereas AOPP toxicity in gibel carp (*Carassius gibelio*) has been associated with quantum dots (nanoparticles) (Stanca et al., 2013). Our analysis of AOPPs as an oxidative stress marker is the first to be conducted in marine fish. We detected AOPP in both the plasma and liver, as has been reported for mammals (Garnacho-Castaño et al., 2016). Reducing dietary lipid content did not significantly affect AOPP levels in the plasma or liver at warm temperatures despite producing differences in the level of lipid peroxidation.

To cope with the oxidative damage resulting from metabolism, animals use non-enzymatic defenses, such as thiol groups and glutathione, and enzymes with antioxidant activity (Martínez-Álvarez et al., 2005). Higher dietary lipid content doubled the total thiol levels in the plasma, but did not boost the available glutathione levels (total glutathione) in the liver. Our observed values of around 2,000 nmols per gram of fresh liver weight are within the range reported for gilthead sea bream (Sitjà-Bobadilla et al., 2005; Pérez-Jiménez et al., 2012). Whereas total glutathione values are associated with antioxidant activity, the GSH/GSSG ratio is considered to be more indicative of the intracellular redox state, corresponding to oxidative stress in fish too (Srikanth et al., 2013). In the present study, the GSH/GSSG ratio was not affected by dietary lipid changes at 22°C, suggesting that a difference of 4% in the dietary lipid content did not elicit an imbalance in the liver glutathione forms.

Antioxidant enzyme activities in the liver of gilthead sea bream were also assessed. The relationship between dietary lipids and antioxidant enzymes has been previously demonstrated by the higher liver activities of CAT and SOD in sole fed diets containing higher lipid levels (by 10%) (Rueda-Jasso et al., 2004) and in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on diets with increased (by 6%) lipid content (Babaei et al., 2017). However, a 4% change in the dietary lipid content in our study did not alter hepatic activities of SOD, CAT, or GR, although it slightly affecting GPX hepatic activity. Our data suggest that modifying the lipid content by only 4% does not affect both non-enzymatic (mainly glutathione) and enzymatic antioxidant defenses in gilthead sea bream. Thus, the observed increase in oxidized lipid products in the D18 diet at 22°C should be taken as evidence of an incipient decoupled redox status between free-radicals and antioxidant liver enzymes, which slightly disfavors the fish fed higher amounts of dietary lipids. As diets with higher lipid

content (over 18%) are currently used to improve growth in fish farms, further studies focusing on the oxidative status and glutathione synthesis of these fish are required.

The Effect of Low Temperatures

The effects of low temperatures on gilthead sea bream have been largely studied by our group (Ibarz et al., 2010c) and are associated with reduced food intake and an overall metabolic depression proportional to the rate of temperature variation (Sala-Rabanal et al., 2003; Ibarz et al., 2007a). Exposure to a thermal shift provokes a rapid oxidant insult, marked by increased levels of liver TBARS and nitric oxide, as well as the increases of protein oxidation and proteolysis levels after acute exposure at 8°C (Ibarz et al., 2010a). Cold also provokes an associated fasting condition, and it is well known that long-term fasting causes a higher peroxidation rate in sea bream (Pascual et al., 2003). However, liver lipid mobilization and proteinaemia are both reduced at sustained low temperatures (Ibarz et al., 2010c), explaining the lower amounts of both TBARS and AOPPs in the plasma. If an early oxidative attack by ROS had occurred as a result of acute cold stress, this was reverted after 50 days at the low temperature. Arctic char subjected to a low temperature for 70 days do not display increased liver peroxidation (Olsen et al., 1999), which is consistent with our results. To our knowledge, there are no data on the effects of low temperature on liver protein oxidation. Our results show that higher dietary lipid content significantly increased AOPP levels by over 50% after 50 days at 14°C.

Increased enzymatic activities are a compensatory response for adapting to low temperatures, in what is called metabolic cold adaptation (White et al., 2012). However, animals adapting to low temperatures can increase their oxidative capacity without increasing antioxidant enzyme activities (Speers-Roesch and Ballantyne, 2005; Grim et al., 2010). We noted a lack of acclimation of antioxidant enzymes to low temperatures (14°C)

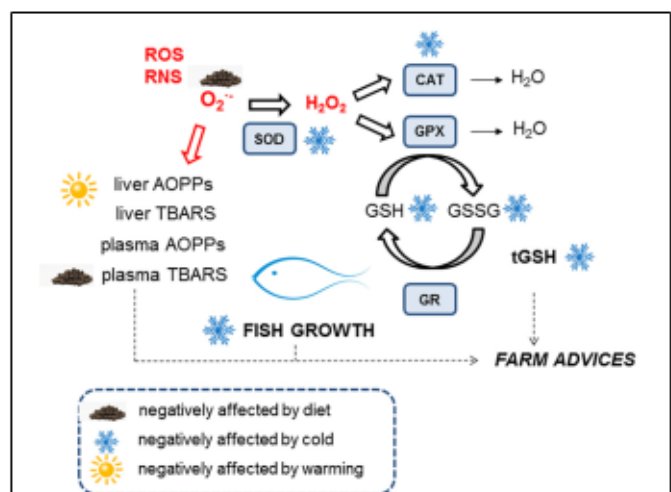


FIGURE 4 | Summary of redox response throughout temperature fluctuation of gilthead sea bream. Explanation is provided in the Discussion section.

in gilthead sea bream. Gilthead sea bream showed decreased oxidative and antioxidative metabolism during long-term exposure to the cold, especially CAT and GR activities, which decreased by 40 and 20%, respectively. CAT, BHMT, and GST have been reported to be downregulated in the gilthead sea bream liver proteome after an acute drop in temperature (Ibarz et al., 2010b). Moreover, we observed a significant drop in total glutathione levels (50% in both reduced and oxidized forms) at the low temperature irrespective of diet, compromising the defense against oxidative stress. Furthermore, animals on the D18 diet presented greater amounts of liver AOPP, which is of particular concern during the cold period.

Temperature Recovery

Previous studies have highlighted the importance of understanding the recovery mechanisms in gilthead sea bream after a cold fasting period (Tort et al., 2004; Ibarz et al., 2007a). Temperature recovery coincides with a progressive restoration of the pre-cold metabolic rate (Ibarz et al., 2007a) and the activation of the energy-producing machinery that results in ROS production (Gutteridge and Halliwell, 2010). In marine fish, warming to higher temperatures (to 18°–28°C) often elicits oxidative stress due to an imbalance in the generation and removal of ROS (Feidantsis et al., 2015). Hepatic levels of oxidized lipid decreased during temperature recovery, irrespective of the diet, indicating a capacity to detox oxidized lipids accumulated during cold period. Thus, increased plasma values, mainly in early recovery, should indicate an extra-liver origin of these metabolites, which are transient and reversible later in recovery. Further studies should focus on the muscle, gut or adipose tissues as the origin of these lipid-oxidized forms in response to heat stress. There were no changes in plasma AOPP levels during the recovery period and higher liver protein oxidation in the fish on the D14 diet. In mammals, the liver is the main organ clearing AOPPs produced by the whole body and can be used to monitor oxidative stress in acute-on-chronic liver failure (Liu et al., 2012; Garnacho-Castaño et al., 2016). Thus, high liver AOPP levels during the early recovery period in fish fed the D14 diet indicate that fish on the lower energy diet suffered greater protein oxidative stress during the early stages of recovery.

Regarding liver antioxidant defenses during recovery, total glutathione levels and the GSH/GSSG ratio were not restored to pre-cold levels at the end of the recovery period because concentrations of the oxidized forms had increased. In fish, recovery from a deleterious or harmful condition, such as starvation, presents varying dynamics according to the tissues or functions studied (Nicieza and Metcalfe, 1997; Metcalfe et al., 2002; Ali et al., 2003). Glutathione synthesis from three specific amino acids (glutamate, lysine, and glycine) might be crucial for recovery in gilthead sea bream. The imbalance between the reduced and oxidized forms of glutathione (the GSH/GSSG ratio) during temperature recovery coincided with increased GPX activity, which generates the oxidized form of glutathione. During temperature recovery, SOD activity remained unchanged, CAT and GPX activities increased, and GR activity occurred at

low levels corresponding to that of the cold period. Except for GR, our results agree with the data that show greater gene expression of the antioxidant enzymes at high temperatures in gilthead sea bream (Feidantsis et al., 2015). Since enzyme activity levels were provided per milligram of fresh liver weight and given that fish on the D14 diet presented a twofold lower HSI than those on the D18 diet, total hepatic antioxidant capacities were markedly reduced during the recovery period. In view of the crucial role that the glutathione redox cycle played during both the cold and recovery periods, further studies are required to explore the capacity of the liver to modify glutathione levels examining not only the glutathione oxidation-reduction cycle but also its turnover, via its specific degradation to a short-peptide and via its specific two-step enzymatic biosynthesis. The recovery period of 35 days apparently was not enough to revert redox status to the pre-cold condition. Whether this incomplete recovery is attributable to the short period or to the inadequacy of the diet during this recovery period, as seems to be the case for D14, cannot be concluded from the present study. So, paying special attention to productive conditions in this species, more experiments are necessary to better know the period of recovery from low temperatures.

CONCLUSION

In summary, reducing dietary lipid content did not affect the growth and condition factor of gilthead sea bream grown indoors during controlled temperature fluctuations, which maintained their antioxidant defenses (glutathione and enzymes) and showed reduced oxidized lipid levels (Figure 4). Metabolic depression inevitably occurred at 14°C, which also affected antioxidant enzyme activities and total hepatic glutathione levels. Low energy demands at low temperatures were met by a low-fat well-balanced diet, but recovery from the cold showed a critical redox challenge due to an incomplete restoration of the glutathione redox cycle. We propose that diets with lower lipid content should be provided to cultured fish during pre-cold and cold periods to avoid excessive fat deposition and putative oxidative stress. Furthermore, protective diets containing high quality nutrients and antioxidants (including some amino acids) should be formulated.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS-N, IS, LF-A, BO-G, TC, and AI performed the experiments. RE, JF-B, JB, TC, and AI designed the trial and diets. All authors revised the manuscript, agreed to be accountable for the content of the work, and agreed to be listed and approved the submitted version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Ministerio de Economía y Competitividad of the Spanish Government (AGL2011-49873).

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-5013
- Ali, M., Nicieza, A., and Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish Fish.* 4, 147–190. doi: 10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x
- Alva, N., Cruz, D., Sanchez, S., Valentin, J. M., Bermudez, J., and Carbonell, T. (2013). Nitric oxide as a mediator of fructose 1,6-bisphosphate protection in galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Nitric Oxide* 28, 17–23. doi: 10.1016/j.niox.2012.09.004
- Babaei, S., Abedian-Kenari, A., Hedayati, M., and Yazdani-Sadati, M. A. (2017). Growth response, body composition, plasma metabolites, digestive and antioxidant enzymes activities of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) fed different dietary protein and carbohydrate: lipid ratio. *Aquac. Res.* 48, 2642–2654. doi: 10.1111/are.13096
- Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W., and Shanks, A. M. (1985). Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 53, 149–157. doi: 10.1079/BJN19850019
- Bell, J. G., and Wolfgang, K. (2010). “Lipids in aquafeeds,” in *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, eds G. M. Turchini, W. K. Ng, and D. R. Tocher (Boca Raton, FL: CRC Press), 21–60. doi: 10.1201/9781439808634-c2
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316. doi: 10.1074/jbc.272.33.20313
- Bochi, G. V., Torbitz, V. D., Cargnin, L. P., De Carvalho, J. A. M., Gomes, P., and Moresco, R. N. (2014). An alternative pathway through the fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators. *Inflammation* 37, 512–521. doi: 10.1007/s10753-013-9765-9761
- Bonaldo, A., Isani, G., Fontanillas, R., Parma, L., Grilli, E., and Gatta, P. P. (2010). Growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed to satiation and restrictively at increasing dietary energy levels. *Aquac. Int.* 18, 909–919. doi: 10.1007/s10499-009-9312-9310
- Bradford, M. M., and Williams, W. L. (1976). New, rapid, sensitive method for protein determination. *Fed. Proc.* 35:274.
- Carlberg, I., and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13062-4
- Costa, P. M., Neuparth, T. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., et al. (2011). Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: laboratory versus in situ studies. *Environ. Res.* 111, 25–36. doi: 10.1016/j.envres.2010.09.011
- Castro, C., Diógenes, A. F., Coutinho, F., Panseerat, S., Corraze, G., Pérez-Jiménez, A., et al. (2016). Liver and intestine oxidative status of gilthead sea bream fed vegetable oil and carbohydrate rich diets. *Aquaculture* 464, 665–672. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.08.005
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., and Oliva-Teles, A. (2012). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 163, 372–378. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.07.003
- Craig, S. R., Washburn, B. S., and Gatlin, D. M. III (1999). Effects of dietary lipids on body composition and liver function in juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 249–255. doi: 10.1023/A:1007843420128
- Davis, P. S. (1988). Two occurrences of the gilthead, *Sparus aurata* Linnaeus 1758, on the coast of Northumberland, England. *J. Fish Biol.* 33:951. doi: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05545.x
- Donaldson, M. R., Cooke, S. J., Patterson, D. A., and Macdonald, J. S. (2008). Cold shock and fish. *J. Fish Biol.* 73, 1491–1530. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Antonopoulou, E., and Michaelidis, B. (2015). Synergistic effects of acute warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Comp. Physiol. B* 185, 185–205. doi: 10.1007/s00360-014-0875-873
- Fumé, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J., et al. (2009). Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 15, 587–595. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00626.x
- Garnacho-Castaño, M. V., Alva, N., Sánchez-Nuño, S., Bardallo, R. G., Palomeque, J., and Carbonell, T. (2016). Hypothermia can reverse hepatic oxidative stress damage induced by hypoxia in rats. *J. Physiol. Biochem.* 72, 615–623. doi: 10.1007/s13105-016-0500-x
- Grim, J. M., Miles, D. R., and Crockett, E. L. (2010). Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J. Exp. Biol.* 213, 445–452. doi: 10.1242/jeb.036939
- Gutteridge, J. M., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x
- Gutteridge, J. M., and Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–564. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071
- Hermenean, A., Damache, G., Albu, P., Ardelean, A., Ardelean, G., Puiu Ardelean, D., et al. (2015). Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the tur river, North Western Romania. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 198–205. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.05.029
- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214–226. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-90322
- Hurst, T. P. (2007). Causes and consequences of winter mortality in fishes. *J. Fish Biol.* 71, 315–345. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01596.x
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borrás, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., and Blasco, J. (2007a). Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.11.008
- Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M. A., and Fernández-Borrás, J. (2010a). Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 155, 319–326. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.012
- Ibarz, A., Blasco, J., Sala-Rabanal, M., Gallardo, A., Redondo, A., and Fernández-Borrás, J. (2007b). Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting and their capacity for recovery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 1034–1042. doi: 10.1139/f07-079
- Ibarz, A., Martín-Pérez, M., Blasco, J., Bellido, D., de Oliveira, E., and Fernández-Borrás, J. (2010b). Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. *Proteomics* 10, 963–975. doi: 10.1002/pmic.200900528
- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M. A., Fernández-Borrás, J., Blasco, J., and Tort, L. (2010c). Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and “winter syndrome.” *Rev. Fish Biol. Fish.* 20, 539–556. doi: 10.1007/s11160-010-9159-9155
- Leaver, M. J., Bautista, J. M., Björnsson, B. T., Jönsson, E., Krey, G., Tocher, D. R., et al. (2008). Towards fish lipid nutrigenomics: current state and prospects for fin-fish aquaculture. *Rev. Fish. Sci.* 16, 73–94. doi: 10.1080/10641260802325278
- Liu, H., Han, T., Tian, J., Zhu, Z. Y., Liu, Y., Li, Y., et al. (2012). Monitoring oxidative stress in acute-on-chronic liver failure by advanced oxidation protein products. *Hepatol. Res.* 42, 171–180. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00911.x
- Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. doi: 10.1007/s10695-015-0171-175
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., and Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88. doi: 10.1007/s11160-005-7846-7844
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. *J. Biol. Chem.* 244, 6056–6063.
- Metcalfe, N. B., Bull, C. D., and Mangel, M. (2002). Seasonal variation in catch-up growth reveals state-dependent somatic allocations in salmon. *Evol. Ecol. Res.* 4, 871–881.
- Mongile, F., Bonaldo, A., Fontanillas, R., Mariani, L., Badiani, A., Bonvini, E., et al. (2014). Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 30–34. doi: 10.4081/ijas.2014.2999

- Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L., and Vergara, J. M. (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53–60. doi: 10.1023/A:1007719928905
- Nicieza, A. G., and Metcalfe, N. B. (1997). Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* 78, 2385–2400. doi: 10.1890/0012-9658(1997)078[2385:GCIJAS]2.0.CO;2
- Olsen, R. E., Løvaas, E., and Lie, Ø. (1999). The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Fish Physiol. Biochem.* 20, 13–29. doi: 10.1023/A:1007767827996
- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., and Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biol. Interact.* 145, 191–199. doi: 10.1016/S0009-2797(03)00002-4
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V. C., and Oliva-Teles, A. (2012). The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 155, 506–16. doi: 10.1016/j.cbpc.2011.12.005
- Richard, N., Silva, T. S., Wulff, T., Schrama, D., Dias, J. P., Rodrigues, P. M., et al. (2016). Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. *J. Proteomics* 142, 1–14. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.037
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L. E. C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J. F., et al. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231, 417–433. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00537-534
- Sala-Rabanal, M., Sanchez, J., Ibarz, A., Fernandez-Borras, J., Blasco, J., and Gallardo, M. A. (2003). Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 105–115. doi: 10.1023/B:FISH.0000035904.16686.b6
- Sarusic, G. (1999). Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19:113.
- Sedlak, J., and Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-90094
- Sies, H., Stahl, W., and Sevanian, A. (2005). Recent advances in nutritional sciences: nutritional, dietary and postprandial. *J. Nutr.* 135, 969–972. doi: 10.1093/jn/135.5.969
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., and Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.031
- Skonberg, D. L., Rasco, B. A., and Dong, F. M. (1994). Fatty acid composition of salmonid muscle changes in response to a high oleic acid diet. *J. Nutr.* 124, 1628–1638. doi: 10.1093/jn/124.9.1628
- Slikker, W., Desai, V. G., Duhart, H., Feuers, R., and Imam, S. Z. (2001). Hypothermia enhances bcl-2 expression and protects against oxidative stress-induced cell death in Chinese hamster ovary cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 405–411. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00593-7
- Speers-Roesch, B., and Ballantyne, J. S. (2005). Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 140, 487–494. doi: 10.1016/J.CBPB.2005.02.014
- Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A. C., and Ahmad, I. (2013). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 2133–2149. doi: 10.1007/s11356-012-1459-y
- Stanca, L., Petrache, S., Serban, A., Staicu, A., Sima, C., Munteanu, M., et al. (2013). Interaction of silicon-based quantum dots with gibel carp liver: oxidative and structural modifications. *Nanoscale Res. Lett.* 8:254. doi: 10.1186/1556-276X-8-254
- Suárez, M. D., Trenzado, C. E., García-Gallego, M., Furné, M., García-Mesa, S., Domezain, A., et al. (2015). Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Eng.* 67, 59–66. doi: 10.1016/J.AQUAENG.2015.06.001
- Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Bell, J. G., et al. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Nutr.* 8, 195–207. doi: 10.1046/j.1365-2095.2002.00205.x
- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., et al. (2004). Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture* 229, 55–65. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00403-404
- Tort, L., Rotllant, J., and Rovira, L. (1998). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 120, 175–179. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10027-10022
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Velázquez, M., Zamora, S., and Martínez, F. J. (2006). Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac. Nutr.* 12, 127–133. doi: 10.1111/j.1365-2095.2006.00391.x
- White, C. R., Alton, L. A., and Frappell, P. B. (2012). Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. *Proc. Biol. Sci.* 279, 1740–1747. doi: 10.1098/rspb.2011.2060
- Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Nguyen, A.-T., Touam, M., Drüeke, T., Santangelo, F., et al. (2003). AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 64, 82–91. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00044.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sánchez-Nuño, Sanahuja, Fernández-Alacid, Ordóñez-Grande, Fontanillas, Fernández-Borras, Blasco, Carbonell and Ibarz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO II

Cold-induced growth arrest in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): metabolic reorganisation and recovery

Sergio Sánchez-Nuño¹, Orhan Tufan Eroldogan², Ignasi Sanahuja¹, Ilgın Özşahinoğlu³, Josefina Blasco¹, Jaume Fernández-Borràs¹, Ramon Fontanillas⁴, Pedro M. Guerreiro⁵, Antoni Ibarz^{1*}

¹Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

²Faculty of Fisheries, Department of Aquaculture, University of Çukurova, 01330 Adana, Turkey

³Feke Vocational School, University of Çukurova

⁴Skretting Aquaculture Research Centre (ARC), P.O. Box 48, 4001, Stavanger, Norway

⁵Centro de Ciências do Mar, CCMAR, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

*Corresponding author: tibarz@ub.edu; tel.: +34 934039632; fax: +34 934110358

Abstract

There are currently no standard diets or practices to counteract or ameliorate the growth arrest and extremely poor feed conversion rates (FCR) caused by low water temperatures in gilthead sea bream. The present study analysed the effects of reducing dietary lipid content from 18% to 14% during a temperature fluctuation period involving a temperature drop to 14°C, maintenance of this low temperature (14°C) and temperature recovery to 22°C under controlled conditions, avoiding the dispersed factors present in cage culture conditions. Decreasing dietary lipid content at an elevated temperature (22°C) did not significantly affect the standard growth rate or FCRs, indicating a possibility to reduce the dietary energy during the months before winter. Although cold-induced growth arrest and metabolic depression were unavoidable, a well-formulated low lipid diet adequately met the low energy demands at low temperatures. Analysis of plasma metabolites and liver enzyme activities demonstrated a reorganisation of liver metabolism, mainly in fish on a low-lipid diet. The recovery from low temperatures was delayed, with a higher dietary lipid content required for optimal liver condition, mineral supplementation to maintain osmoregulation and bone formation. Thus, our results suggest that dietary lipid contents should be reduced to cope with low temperatures and that improved diets with higher lipid content are required for recovery from low temperatures, which might be useful information for fish producers and researchers.

Keywords

Cold challenge, dietary lipid, metabolism, osmoregulation, *Sparus aurata*.

Introduction

Fish from temperate latitudes are usually exposed to broad fluctuations in water temperatures. However, when such variations exceed the thermal tolerance range of the species, the consequences can be highly deleterious or even fatal. Acute drops in water temperature or persistent low temperatures during the winter often cause “winter mortalities”, a phenomenon that has been reported for a large number of fish species (Hurst 2007). Acute thermal stress and starvation have traditionally been linked to mortalities in overwintering wild fish populations (Donaldson et al. 2008), with accumulating evidence additionally indicating that susceptibility to disease and handling disturbances in cultured species are also related to low temperatures (Toranzo et al. 2005, Ibarz et al. 2010a).

Gilthead sea bream is one of the most common marine species in the Mediterranean Sea and one of the most consumed seafood species in Europe. Its lower temperature limit is around 5°C (Ravagnan 1978, Barnabé 1990), but a drastic reduction in food intake has been observed at temperatures below 13°C, greatly affecting fish production (Tort et al. 1998, Sarusic 1999). The reduced food intake at low temperatures has also been observed under laboratory-controlled conditions. For example, sea bream has been reported to stop feeding below 13°C (Ibarz et al. 2003) and not resume feeding during extended periods of constantly low temperatures, such as during 20 days at 12°C or 35 days at 8°C (Ibarz et al. 2007a, b). Although natural fasting is common during the cold season for several fish species, this produces economic losses in fish farming. Determining the mechanisms underlying food acceptance and its effects on starved fish could be important in enhancing fish production during the cold season. Furthermore, growth arrest may persist even after water temperatures start to rise in the spring, as feeding and feed conversion efficiency do not immediately recover in both indoor and culture conditions (reviewed in Ibarz et al. 2010a).

There is a lack of understanding regarding the origin of cold-induced growth arrest and the physiological changes occurring during the cold season. Moreover, there are currently no specific diets for fish in the winter period. Several attempts have been made to prepare fish for winter conditions, such as trying to enhance their nutritional status mainly during and after the cold season. In indoor culture facilities, Ibarz et al. (2007a) studied the recovery of sea bream after prolonged exposure to a low temperature (8°C), fasting at a warm temperature (18°C) and during temperature fluctuations in relation to the growth parameters, metabolic rates and liver composition of fed animals at a warm temperature (18°C). Although the effects of fasting were delayed by low temperatures, changes were observed such as hepatic glycogen mobilisation, digestive membrane degeneration and the export of amino acids from muscle tissues. Moreover, the improvement during transient warm periods promoted fish health by minimising cold-induced arrested growth and hepatic alterations, such as lipid deposition in the liver. Furthermore, short periods of re-feeding resulted in lower expenditure on tissue repair, with the growth rate recovering earlier than under sustained cold conditions. Tort et al. (2004) observed that an enhanced dietary formulation (more palatable and supplemented with vitamins and minerals, as well as containing higher amounts of digestible proteins and unsaturated lipids) produced some improvement in the immune status of sea bream at a low temperature (11°C). Likewise, Silva et al. (2014) reported that a diet enriched with raw materials, such as fish meal and krill meal, enhanced fish performance during a natural temperature regime when compared

to a low-cost commercial formulation. In our view, current commercial fat-enriched diets should not be recommended for pre-winter and winter periods (Ibarz et al. 2010a). Recent studies have demonstrated that dietary energy levels and culture density negatively correlate with growth performance and metabolic and oxidative statuses (Suárez et al., 2015).

The present study analysed the effects of reducing dietary lipid content during a temperature fluctuation period simulating the temperature changes that occur during the winter. The temperature was dropped to 14°C, maintained at this temperature and then restored to 22°C under controlled conditions. In this way, the dispersed factors present in cage culture conditions were avoided and valuable data on growth performance, osmoregulation and liver intermediary metabolism could be obtained for gilthead sea bream. To assess the effects of the controlled temperature fluctuation, we analysed fish weight gain, food intake, growth indices and feed conversion rates, as well as plasma biochemistry, branchial and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities and the activities of key enzymes associated with liver metabolism. Plasma biochemistry parameters indicate the nutritional status of healthy juvenile gilthead sea bream (Peres et al. 2013), with the plasma levels of glucose, lactate, protein and lipid fractions strongly correlating with low temperatures in this species (reviewed in Ibarz et al. 2010a). Osmoregulation is also influenced by low temperatures, with food deprivation in euryhaline species showing seasonal dependence in culture conditions (Sangiao-Alvarellos et al. 2003, Polakof et al. 2006). Finally, liver intermediary metabolism was assessed by studying the activities of the enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), lactate dehydrogenase (LDH), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glutamate dehydrogenase (GDH), citrate synthase (CS) and cytochrome-C oxidase (COX), focusing on their recovery from low temperatures, their temperature coefficients (Q₁₀) and the enzyme ratios as indicators of metabolic reorganisation.

Material and Methods

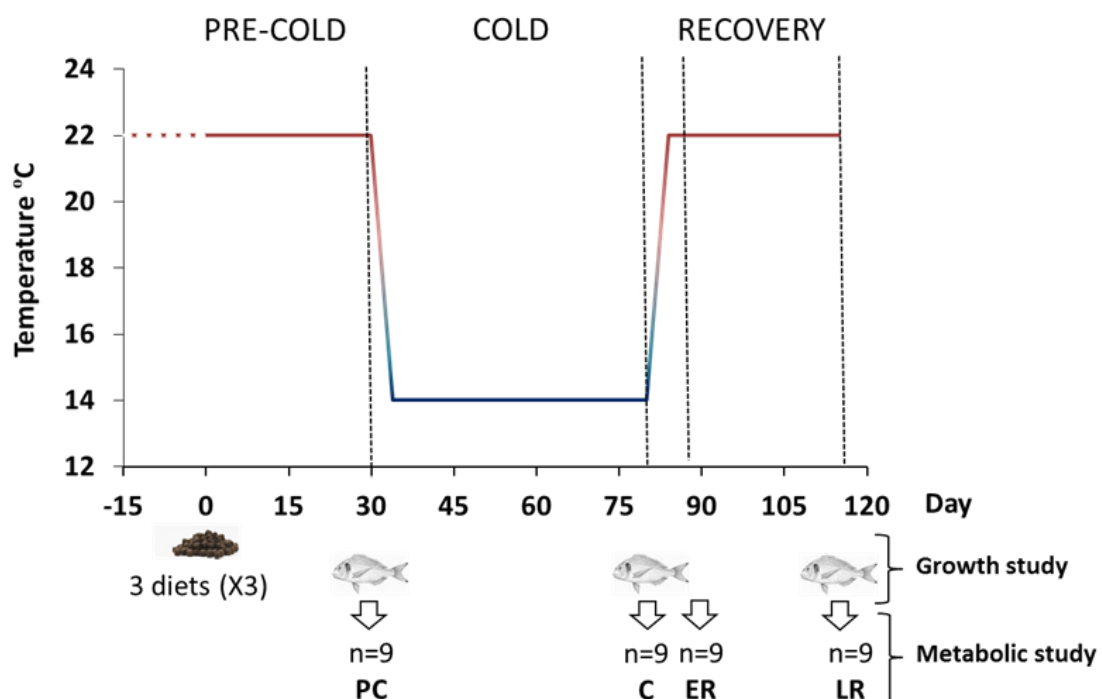
Rearing conditions, experimental diets, design and sampling

Gilthead sea bream, with an average body weight of 145 g, from a local fish farm were acclimated indoors at the Centre d'Aquicultura (CA-IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain) at 22°C for two weeks, using a standard commercial fish feed. The initial weight was selected to match the typical weight of sea bream affected by the cold season under culture conditions: 100-400 g (reviewed in Ibarz et al. 2010a). Moreover, the experiment was started in November to mimic the photoperiod of the cold season in cultures. Following this period, the fish were randomly distributed into 3 experimental groups per triplicate (30 fish per tank) into a water recirculating system, IRTAmar™. Fifteen 500-L fibreglass tanks were used that were supported by solid and biological filters, maintaining nitrite, nitrate and ammonia concentrations at initial levels throughout the experimental period. Water temperature and oxygen concentration were closely monitored. Three isoprotein (47% of crude protein) diets were obtained from the Skretting Aquaculture Research Centre that differed only in their lipid content: 14% (the D14 diet), 16% (the D16 diet) and 18% (the D18 diet), with a corresponding "crude energy" of 20.2, 20.6 and 21.0 MJ/kg of dry matter, respectively. Fish were fed to satiation twice a day, 7 days per week for 115 days. Feed was automatically delivered (30 min) at 08:00 and 16:00.

Satiation was ensured throughout the experimental period by calculating the estimated daily feed intake and providing a ration that was 20% above this value. Feed delivery was recorded daily, with the uneaten feed collected daily by the system and then manually dried and weighed to calculate the actual feed intake.

The total experimental period (115 days) consisted of three periods: the “Pre-cold” period (PC), during which the temperature was at 22°C for 30 days; the “Cold” period (C), during which the temperature was cooled to 14°C over five days and maintained at this temperature for 45 days (50 days in total); and the “Recovery” period, during which the temperature was increased to 22°C over seven days and maintained for 28 days at 22°C (35 days in total) (Fig. 1). The total biomass from the triplicate tanks was recorded at the end of each period (days 30, 80 and 115) to evaluate weight gain and the feed conversion rate (FCR, feed intake per fish/increase in biomass). To monitor growth, the weight and length of the fish from each tank were individually measured at day 0 and at the end of each temperature period. The specific growth rates (SGR) of each tank were calculated as follows: $SGR (\%/day) = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / t$, where W_i and W_e are the initial and final biomass, respectively, and t is the number of days (period).

Figure 1. Experimental design. Experimental period (115 days) consisted of three temperature periods: the Pre-Cold (PC) period, during which the temperature was at 22°C for 30 days; the Cold (C) period, during which the temperature was cooled to 14°C over five days and maintained for another 45 days (50 days in total); and the Recovery (R) period (including early recovery (ER) and late recovery (LR)), during which the temperature was raised to 22°C over seven days and maintained for another 28 days (35 days in total). The fish growth study was performed using the total biomass of each individual tank (3 x diet) from days 30, 80 and 115. The metabolic study was performed using 9 fish (3 fish per replicate tank in each diet). Fish symbols indicate sampling times and the number of fish (n) per diet.



For the metabolic study, three fish from each tank (9 fish for each group) were captured at random from each dietary condition and anaesthetised with 2-phenoxyethanol (100 ppm) diluted in seawater. Sampling was performed during the Pre-Cold, and Cold periods, as well as on day 87 (for Early Recovery (ER)) and day 115 (for Late Recovery (LR)) during the recovery period (Fig. 1). Fish were fasted for 24 h before sampling. Body weight and length were individually measured, and blood samples were taken from the caudal vessels, using EDTA-Li as the anticoagulant. The fish were sacrificed by severing the spinal cord. Plasma was obtained by centrifuging the blood at 13,000 g at 4°C for 5 min, and stored at -80°C until analysis. The weights of the perivisceral fat (the white adipose mass surrounding the gut) and the liver were also recorded. Liver samples were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. Gill and intestinal samples were placed in ice-cold sucrose-EDTA-imidazole (SEI) buffer (150 mM sucrose, 10 mM EDTA and 50 mM imidazole, pH 7.3) and frozen at -80°C. The study complied with the guidelines of the European Union (86/609/EU), the Spanish Government (RD 1201/2005) and the University of Barcelona (Spain) regarding the use of laboratory animals.

Osmolality, electrolytes and gill and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities

Plasma osmolality (mOsm/kg) was measured with a vapour pressure osmometer (Wescor Vapro 5520, Logan, UT, USA). Plasma concentrations of sodium and potassium were determined in duplicate heat-denatured pre-diluted plasma samples, using a BWB XP flame photometer (BWB Technologies Ltd, Newbury, UK). Chloride and phosphorus concentrations were determined with endpoint colorimetric assays (commercial kits from Spinreact, Girona, Spain), modified for microtiter plates and measured in a Benchmark microplate reader (Bio-Rad Laboratories Lda, Amadora, Portugal). Gill and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activity was determined using the microassay method (McCormick 1993) modified for gilthead sea bream (Mancera et al. 2002), in which samples were homogenised in 125 ml of SEI buffer with 0.1% deoxycholic acid and then centrifuged at 2,000 g for 30 sec. The homogenate extracts were then added to the assay mixture in the presence or absence of 0.5 mM ouabain in 96-well microplates at 25°C and read at 340 nm for 10 min with intermittent stirring by vibration in a Benchmark microplate reader (Biorad Laboratories Lda, Amadora, Portugal). Ouabain-sensitive ATPase activity was detected by the enzymatic coupling of ATP dephosphorylation to NADH oxidation and expressed in μmol ADP/mg protein/hr.

Plasma metabolites and liver enzyme activities

Plasma levels of glucose, lactate, triacylglycerides (TAG), phospholipids (PL), total cholesterol (TC) and non-esterified fatty acids (NEFA) were analysed with respective commercial kits (from Spinreact, Girona, Spain and Wako Chemicals, Neuss, Germany). Metabolites were measured in triplicate in pre-diluted plasma samples when necessary, using an endpoint colorimetric assay and each internal standard of the respective kit. Protein concentrations in the plasma were measured using the method of Bradford & Williams (1976) with bovine serum albumin used as a standard. Plasma concentrations are expressed in mM (glucose and lactate), mg of lipid fraction per dL (TAG, PL, TC and NEFA) or mg per L (protein). Total lipid levels in the plasma were obtained by the sum of the lipid fractions.

Liver samples for enzyme assays were pulverised in liquid nitrogen and homogenised in 9 volumes of ice-cold lysis buffer (1.24 mM Triton X-100, 1 mM EDTA and 1 mM NaHCO₃) with stabilising solution (37 mM EDTA and 5 mM 2-β-mercaptoethanol), 1:1 v/v, as described in Blasco et al. (2015). Corresponding homogenates for measuring cytoplasmic enzyme activities were centrifuged at 3,000 g at 4°C for 10 min, while homogenates for measuring mitochondrial enzyme activities were centrifuged at 1,000 g at 4°C for 10 min. The resulting supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analysis. The respective commercial kits (Spinreact, Barcelona, Spain) to measure AST, ALT, LDH and G6PDH activities were adapted for sea bream liver measurements from the respective commercial kits (Spinreact, Barcelona, Spain). Analyses of CS and COX activities were performed following the method described by Srere (1969) that was adapted for sea bream by Martin-Perez et al. (2012). GDH and HOAD activities were analysed using the methods adapted for sea bream as reported by Furné et al. (2009). All enzyme assays were carried out at 25°C using a UV/Vis spectrophotometer (Infinity 200Pro, Tecan, Spain) and were run in duplicate in semi-micro cuvettes. The optimal substrate and protein concentrations for measuring enzyme activities were preliminarily assayed. The change in absorbance of NADH and NADP at 340 nm and the reduction of DTNB at 412 nm were monitored. The millimolar extinction coefficients used were 6.22 for NADH and NADP and 13.6 for DTNB. COX activity was determined by the decrease in ferrocytochrome c absorbance at 550 nm. Enzyme activities are reported in milliunits (nmol of substrate transformed per minute) per mg of fresh liver weight (mIU/mg fw). Temperature coefficients (Q₁₀) were calculated as the thermal sensitivity of the enzyme activities between the temperature periods of the study, using the formula provided by Prosser (1991):

$$Q_{10} = (K_2/K_1)^{10(t_2-t_1)}$$

where K₁ and K₂ are the mean enzyme activity at temperatures t₁ and t₂, respectively.

Statistical analysis

Statistical differences (1) throughout the temperature periods within each diet and (2) between the diets were analysed by a one-way nested analysis of variance (ANOVA), with tank as the random factor to test for a possible effect. A tank effect was not found. Thus, an ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's posthoc test was conducted when variances were uniform or not, respectively. Statistical differences were considered significant when p-values were less than 0.05. The Shapiro-Wilk test was first used to ensure the normal distribution of the data, while Levene's test was applied to check the uniformity of the variances. All statistical analyses were performed using commercial software (PASW 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Effects of temperature fluctuation on growth performance

Growth performance and feed parameters are summarised in Table 1, which compares each diet during the three temperature periods and all the diets within each period (diet effect). During the Pre-Cold period, decreasing dietary lipid content from 18% to 14% at 22°C did not significantly affect body weight, body length or condition factor. Accordingly, weight gain and the SGRs did not differ, although the SGRs appeared to increase with higher dietary lipid contents. Other body indices, such as the hepatosomatic index (HSI) and the

mesenteric fat index (MFI), showed significant differences, with the HSI and MFI being the highest in D14-fed and D16-fed fish, respectively (Tukey, $p < 0.05$).

Table 1. Effects of dietary lipid contents on fish growth and feed parameters throughout the temperature periods.

	Day 30 (Pre-Cold)			Day 80 (Cold)			Day 115 (Recovery)		
	D14	D16	D18	D14	D16	D18	D14	D16	D18
Body weight (g)	185 a	185 a	189 a	206 b	205 b	210 b	266 c	263 c	269 c
S.E.M.	2.5	2.4	2.5	3.2	1.6	3.0	4.4	2.4	2.5
Diet effect									
Body length (cm)	18.5 a	18.6 a	18.7 a	19.5 b	19.6 b	19.6 b	20.9 c	21.0 c	21.0 c
S.E.M.	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Diet effect									
CF (%)	2.91	2.85	2.87	2.77	2.74	2.77	2.89	2.78	2.88
S.E.M.	0.02	0.01	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.05	0.02
Diet effect									
Weight gain/fish (g)	40.0	40.2	43.5	20.9	19.7	21.3	60.6	58.1	58.6
S.E.M.	3.1	3.0	3.1	3.2	0.9	0.9	1.7	2.2	0.8
Diet effect									
Feed intake/fish (g)	52.6	57.2	57.7	53.9	51.7	54.1	104	104	103
S.E.M.	3.5	0.9	2.3	5.2	2.5	2.5	5.0	0.5	1.9
Diet effect									
SGR (% bw gain/day)	0.86 a	0.91 a	0.97 a	0.24 b	0.20 b	0.22 b	0.74 c	0.70 c	0.70 c
S.E.M.	0.05	0.04	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
Diet effect									
FCR (g feed/g bw)	1.32 a	1.43 a	1.33 a	2.48 b	2.63 b	2.54 b	1.72 c	1.85 c	1.76 c
S.E.M.	0.02	0.07	0.06	0.22	0.06	0.06	0.03	0.04	0.04
Diet effect							A	B	AB
HSI (%)	2.17 a	1.82 a	1.83 ab	2.31 a	2.43 b	2.35 a	0.98 b	1.19 c	1.79 b
S.E.M.	0.11	0.17	0.11	0.10	0.13	0.13	0.28	0.08	0.24
Diet effect	A	B	B				A	A	B
MFI (%)	1.08 a	1.95 a	1.13 a	0.98 a	0.89 b	0.88 a	1.78 b	1.53 a	1.80 b
S.E.M.	0.1	0.4	0.2	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
Diet effect	A	B	AB						

Growth parameters are expressed as mean \pm S.E.M. and were obtained from the total biomass of each individual tank ($n = 3$ per diet). Initial body weight (day 0) was 145 ± 0.1 g, initial body length was 17.3 ± 0.0 cm and initial condition factor was 2.90 ± 0.01 .

CF, condition factor; **SGR**, standard growth rate; **FCR**, feed conversion rate. **HSI** (hepatosomatic index) and **MFI** (mesenteric fat index) were calculated from the fish ($n = 9$) sampled for the metabolic study.

Significant differences between the temperature periods within each diet are indicated by lowercase letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$, or Dunnett's *posthoc* $p < 0.05$ only for MFI data).

"Diet effect" or significant differences between the diets during each period are indicated by capital letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$, or Dunnett's *posthoc*, $p < 0.05$ only for MFI data)

The drop in water temperature to 14°C and the maintenance of this temperature (50 days in total) drastically reduced daily growth and hampered food conversion. Thus, the growth arrest induced by the low temperature of 14°C was evidenced by the drastic reduction in the SGRs (around four-fold) and the doubling of the FCRs, with the condition of the D14-fed fish being the least affected. In parallel, the cold challenge increased the HSI significantly (Tukey, $p < 0.05$) for the fish on the D16 diet, with a concomitant mobilisation of mesenteric fat (Dunnett, $p < 0.05$). At the end of the recovery period (day 115), there were no significant differences in the final body weight between the different diets. However, growth performance was not completely restored, with the SGRs from the recovery period being lower (between 0.70-0.74 body weight (bw) gain/day) than those from the Pre-Cold period, and the FCR values still being higher (between 1.72-1.85 g feed/g bw). The main difference between the fish on the different diets was observed in the HSI values, which were restored in D18-fed fish, but significantly reduced in the D14 and D16-fed fish when compared to the D18-fed fish (Tukey, $p < 0.05$) and the Pre-Cold values (35% and 55%, respectively; Tukey, $p < 0.05$).

Effects of temperature fluctuation on plasma metabolites

The plasma levels of glucose, lactate, protein and lipid fractions (Table 2) were measured after overnight fasting and corresponded to basal levels before the intake of the morning ingesta. Circulating lipid fractions, TAG, TC and PL were significantly higher in D14-fed fish, producing a 40% increase in lipaemia (expressed as the “sum of plasma lipids”), than in D18-fed fish (1.45 ± 0.06 g/dL for D14 vs 1.08 ± 0.06 g/dL for D18, Dunnett, $p < 0.05$). Differences in glycaemia between the diets during the Pre-Cold period did not correspond to dietary energy levels. Other plasma metabolites, such as lactate, total protein and NEFAs, did not differ between the diets. During the Cold period, glycaemia was reduced two-fold, irrespective of diet, while hyperlipaemia was observed in the fish on the D14 and D16 diets and hypoproteinaemia in those on the D18 diet. At the end of the recovery period, most of the plasma metabolites were restored to their Pre-Cold levels, except glucose. Figure 4 summarises the changes in the plasma metabolites in response to temperature fluctuations, illustrating that the differences in plasma metabolite levels between the diets were maintained throughout the whole experimental period, while the effects of temperature were transitory, although the SGRs and FCRs were partially reverted and the HSI for D16-fed and D14-fed fish indicated delayed recovery in these animals.

Effects of temperature fluctuation on osmoregulation

Plasma osmolality, plasma ions (sodium, chloride, potassium and phosphorus) and gill and intestinal (proximal section) Na⁺/K⁺-ATPase activities were also measured to evaluate the effects of a low temperature and temperature recovery on the osmoregulatory capacity of sea bream (Table 3). The highest osmolality values (around 500 mOsm/kg) were recorded during the Pre-Cold period, irrespective of diet, which were significantly reduced (Tukey, $p < 0.05$) at the end of both the Cold and Recovery periods (to around 450 mOsm/kg). The fish on the D14 diet showed higher Pre-Cold levels of sodium and chloride than those on the D16 and D18 diets (Tukey, $p < 0.05$). However, the sum of the sodium plus chloride ions could not explain the higher values of osmolality for any of the diets. Plasma potassium (2.5-3.0 mM) and phosphorus (3.0-3.5 mM) levels were not affected by diet during the Pre-Cold period (22°C). The low temperature of 14°C significantly reduced (Tukey, $p < 0.05$) plasma chloride and phosphorus levels for all the three diets and sodium levels for the D14 and D16

diets. Although plasma sodium levels reverted during the recovery period, plasma chloride levels did not increase, while plasma phosphorus levels were even lower. Curiously, plasma potassium levels significantly increased from 3.0 mM to 3.5-4.0 mM (Tukey, $p < 0.05$).

While Na⁺/K⁺-ATPase activities were not significantly affected by the cold challenge, plasma ion concentrations were lower during the Cold period and only partially reverted during the recovery period, irrespective of diet. Both branchial and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities were evaluated during the temperature fluctuation. Despite higher variance, intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activity was lower in D14-fed fish than in D16-fed and D18-fed fish. Diet did not affect branchial Na⁺/K⁺-ATPase activity. Branchial and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities were not affected by the Cold period, with only intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activity in the D16-fed fish being significantly reduced during the recovery period (Tukey, $p < 0.05$).

Table 2. Plasma metabolites in juvenile sea bream feeding on diets with different lipid contents throughout the temperature fluctuation.

	Day 30 (Pre-Cold)			Day 80 (Cold)			Day 115 (Recovery)		
	D14	D16	D18	D14	D16	D18	D14	D16	D18
<i>Glucose (mM)</i>	7.6 a	5.8 a	8.6 a	3.2 c	3.3 b	4.4 c	5.5 b	5.9 a	6.1 b
S.E.M.	0.8	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5	0.5
Diet effect	A	B	A	A	A	B			
<i>Lactate (mM)</i>	2.8	2.7 a	3.0	2.3	2.4 a	3.3	2.3	1.4 b	3.2
S.E.M.	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.9	0.3	0.2	0.2
Diet effect							A	B	C
<i>Protein (mg/mL)</i>	39.3	39.7	32.2 ab	39.6	38.1	22.7 b	50.3	37.8	33.2 a
S.E.M.	2.7	3.0	2.9	1.5	2.3	3.4	3.7	2.2	2.0
Diet effect				A	A	B	A	AB	B
<i>NEFA (mEq/dL)</i>	0.44 a	0.45 a	0.54 a	0.65 b	0.78 b	0.65 b	0.49 a	0.55 ab	0.74 b
S.E.M.	0.04	0.05	0.03	0.04	0.01	0.05	0.05	0.06	0.06
Diet effect				A	B	A	A	AB	B
<i>TAG (mg/dL)</i>	461	319 a	334 a	535	704 c	426 b	322	444 b	289 a
S.E.M.	40	29	31	115	100	43	8	21	26
Diet effect	A	B	B	AB	B	A	A	B	A
<i>CT (mg/dL)</i>	263	177	83 a	277	220	87 a	269	236	163 b
S.E.M.	4	22	17	14	14	19	14	5	19
Diet effect	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>PL (mg/dL)</i>	725 a	614 a	648	876 b	878 b	618	812 b	896 b	673
S.E.M.	35	59	26	57	25	36	31	64	30
Diet effect	A	B	AB	A	A	B	A	A	B
<i>Sum of Lipids (g/dL)</i>	1.45 a	1.16 a	1.08	1.80 b	1.82 c	1.15	1.33 a	1.46 b	1.15
S.E.M.	0.06	0.08	0.06	0.12	0.09	0.09	0.05	0.03	0.06
Diet effect	A	B	B	A	A	B	A	A	B

Data are expressed as mean \pm S.E.M.

Significant differences between the periods within each diet are indicated by lowercase letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$, or Dunnett's *posthoc*, $p < 0.05$ only for "sum of lipids" data)

Significant differences between the diets during each period are indicated by capital letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$, or Dunnett's *posthoc*, $p < 0.05$ only for "sum of lipids" data).

Effects of temperature fluctuation on liver enzyme activities

The activities of key enzymes associated with the pentose shunt (G6PDH), the glycolytic pathway (LDH), aerobic metabolism (CS and COX), β -oxidation (HOAD) and protein catabolism (ALT, AST and GDH) are shown in Figure 2. To better understand the recovery process, sampling was performed twice during the Recovery period, on day 7 to measure early recovery (day 87 of the study period) and on day 35 to measure late recovery (day 115 of the study period). The effect of low temperature and recovery on the metabolic rate was calculated by the temperature coefficient Q10 between the Pre-Cold and Cold periods and between the Cold and Early and Late Recovery periods (Table 4). Q10 values of around 1.0 indicate temperature independence of the enzyme activity, while higher Q10 values indicate higher temperature dependence and values less than 1.0 indicate negative or inverse temperature dependence. Finally, the following enzyme ratios were used to assess metabolic reorganisation in the liver (Fig. 3): the LDH/CS ratio as indicator of anaerobic component of metabolism vs aerobic pathway the HOAD/CS ratio for the preference for the oxidation of fuels (fatty acids vs carbohydrates), the COX/CS ratio for mitochondrial rates; and the AST/ALT ratio for protein catabolism and liver damage.

Table 3. Osmoregulation-related parameters in juvenile sea bream feeding on diets with different lipid contents throughout the temperature fluctuation.

	Day 30 (Pre-Cold)			Day 80 (Cold)			Day 115 (Recovery)		
	D14	D16	D18	D14	D16	D18	D14	D16	D18
Plasma									
<i>Osmolality (mOsm/kg)</i>	507 a	512 a	482 a	435 b	442 b	436 b	416 b	437 b	438 b
S.E.M.	11.4	10.7	8.1	7.3	11.5	8.5	7.0	8.9	13.0
Diet effect									
<i>Sodium (mM)</i>	220.8 a	198.2 a	180.1 a	174.1 c	170.4 b	170.7 b	192.6 b	204.8 a	197.7 a
S.E.M.	7.12	8.81	5.28	3.53	3.68	7.44	4.6	5.60	3.78
Diet effect	A	AB	B						
<i>Chloride (mM)</i>	159.0 a	147.9 a	147.8 a	121.2 b	121.9 b	119.6 b	125.1 b	119.7 b	118.0 b
S.E.M.	1.96	2.77	1.89	2.46	3.40	3.20	2.74	2.41	1.64
Diet effect	A	B	B						
<i>Potassium (mM)</i>	2.70 a	2.40 a	3.04	3.01 ab	2.98 a	2.95	3.59 b	4.00 b	3.72
S.E.M.	0.202	0.275	0.196	0.239	0.228	0.300	0.191	0.148	0.099
Diet effect									
<i>Phosphorus (mM)</i>	3.15 a	3.47 a	3.37 a	2.85 ab	2.85 b	2.82 b	2.45 b	2.50 c	2.30 c
S.E.M.	0.166	0.129	0.194	0.108	0.060	0.137	0.091	0.091	0.098
Diet effect									
Na⁺/K⁺-ATPase activity									
<i>Branchial</i>	3.37	2.90	2.18	3.52	1.91	1.74	1.29	2.64	1.68
S.E.M.	0.442	0.672	0.735	1.090	0.438	0.281	0.672	0.600	0.183
Diet effect									
<i>Intestinal</i>	12.36	33.89 a	26.42	21.42	36.93 a	17.39	8.74	15.57 b	20.73
S.E.M.	2.942	7.73	3.917	5.642	5.095	3.787	2.642	5.121	6.360
Diet effect	A	B	AB	AB	B	A			

Data are expressed as mean \pm S.E.M. ATPase activities are expressed as μ gADP/mg protein/hour.

Significant differences between the periods within each diet are indicated by lowercase letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$).

Significant differences between the diets during each period are indicated by capital letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$).

After 30 days of feeding at 22°C during the Pre-Cold period, the hepatic activities of G6PDH, LDH, CS and COX were greater with higher dietary lipid contents (D18>D16>D14), whereas the activities of the hepatic transaminases (AST and ALT) and GDH were lower in

the fish on the D18 diet (Tukey, $p < 0.05$). The activity of HOAD, which is involved in β -oxidation, was not affected by dietary lipid content. Despite these differences in enzyme activities, the enzyme ratios demonstrated that the relative importance of metabolic pathways did not significantly differ between the diets, with liver metabolism adapting to the dietary condition (Fig. 3). Only the HOAD/CS ratio showed a significant difference, a two-fold higher value in the D14-fed fish, indicating a relatively higher contribution of lipids to aerobic metabolism in these animals.

A compensatory effect through increases in enzyme activities was not observed during the Cold period. G6PDH, CS, ALT and AST activities were globally reduced in all the fish, irrespective of diet, as well as COX and GDH activities in D14-fed fish. CS and AST were the most sensitive to low temperatures, their Q10 values increasing similarly for all the three diets. Hence, liver metabolism was reorganised mainly in the D14-fed fish (which presented increased LDH/CS and HOAD/CS ratios) and was slightly affected in the fish on the D16 and D18 diets.

During Early Recovery, most of the enzyme activities reduced during the Cold period were not restored to initial levels, not even partially, except for CS activity in D16-fed fish and LDH activity in D18-fed fish (as demonstrated by the Q10 values of over 1.7; Table 4). During Late Recovery, enzyme activities, Q10 values and enzyme ratios indicated the total restoration of Pre-Cold liver metabolism, with the over-response of G6PDH in D14-fed fish and AST in D18-fed fish being particularly remarkable.

Figure 4 summarises the liver intermediary metabolism at the end of each period. Most enzymes showed similar activities during the Pre-Cold and Recovery periods. Although differences between the diets seemed to be reduced (fewer diet symbols), important metabolic reorganisation was observed in D14-fed fish, due to lower CS activity, with the enzyme ratios being significantly higher than those in the D16- and D18-fed fish (Tukey, $p < 0.05$).

Discussion

Growth performance during temperature fluctuation

The growth arrest during winter may last from 4-6 months and represents a critical production bottleneck for gilthead sea bream cage farming that could affect its commercial sustainability. However, there is little information on winter growth from fish farms and there are no publicly available values or reference points regarding typical parameters of growth performance. The present study is the first to simulate winter temperature fluctuations under controlled conditions to determine the effects of different dietary lipid contents. Previous studies investigating the effects of low temperatures on gilthead sea bream (reviewed in Ibarz et al. 2010a) applied three temperature periods to counteract negative effects: a pre-cold period, a cold period mimicking winter conditions and a temperature recovery period. The studies investigating the effects of increasing dietary lipid contents on gilthead sea bream, usually at higher temperatures, reported that lipid content alone did not significantly affect fish growth (Velázquez et al. 2006, Bonaldo et al. 2010, Mongile et al. 2014). In agreement, our results from the Pre-Cold period (22°C for 30 days) suggested that reducing dietary lipid content did not affect weight gain, SGRs, feed intake or FCRs, indicating that it is possible to reduce dietary lipid content during the months before winter without detrimentally affecting fish performance, as previously

stated (Ibarz et al. 2010a). We also provide, for the first time, data on gilthead sea bream growth during an extended period of a moderately cold temperature (14°C for 50 days) and temperature recovery. Since gilthead sea bream has been reported to stop feeding at temperatures below 13°C (Tort et al. 1998, Ibarz et al. 2003, 2007b), we chose the temperature of 14°C for the Cold period. As expected, the cold challenge induced “winter growth arrest”, with a four-fold decrease in the SGRs and a two-fold increase in the FCRs. Liver weight also increased, elevating the HSI and demonstrating that 14°C for 50 days did not reduce liver weight, which would have occurred with fasting at higher temperatures (Power et al. 2000, Ibarz et al. 2007a, Melis et al. 2017). To the best of our knowledge, only two studies have examined the effects of dietary modifications on gilthead sea bream performance during cold months. Tort et al. (2004), testing a commercial feed and a specifically prepared “winter” feed in indoor conditions, reported no differences in body weight gain between the diets. Silva et al. (2014), assessing the effects of a “fortified” diet on fish performance during a natural temperature regime in outdoor tanks, also observed growth arrest during the coldest months irrespective of diet. Tort et al. (2004) formulated a “winter diet” with fresh raw materials and enhanced digestibility, providing supplementary doses of vitamins C and E, as well as choline and inositol. The previous study compared a “low-cost commercial formulation” with a “high-cost commercial formulation” enriched with raw materials such as fish meal and krill meal. Our study also demonstrated that reduced dietary lipid content did not affect growth parameters at lower temperatures and that fish on the lowest energy diet (D14) showed adequate performance.

Fish nourishment during the spring months after the cold season has also been poorly studied in gilthead sea bream even though higher mortality rates are observed during this period (reviewed in Ibarz et al. 2010). A few studies have highlighted the importance of understanding the recovery mechanisms of this species after a cold fasting period at 11°C (Tort et al. 2004) or 8°C (Ibarz et al. 2007a). Moreover, Bavcevic et al. (2006) studied the benefits of controlled fasting during temperature recovery, while Silva et al. (2014) indicated the importance of good raw nutrients during temperature recovery. Our data demonstrated that differences in dietary lipid contents did not modify growth parameters, although the apparent dependence of the HSI on dietary lipid content suggests the importance of higher lipid supplies during the recovery period, which is in agreement with the results of Silva et al. (2014). However, 35 days were not enough to recover SGRs and FCRs to their Pre-Cold values, demonstrating delayed recovery from low temperatures, irrespective of dietary energy levels.

Osmoregulatory response

It is well known that suboptimal temperatures affect the osmoregulatory capacity of teleost species (Staurnes et al. 2001, Imsland et al. 2003, Metz et al. 2003, Sardella et al. 2004, 2008), including gilthead sea bream (Vargas-Chacoff et al. 2009a,b). Osmoregulation is influenced by food deprivation in euryhaline fish since an osmotic balance is maintained by the energy available (Sangiao-Alvarellos et al. 2003, Polakof et al. 2006). Gilthead sea bream encounter both low temperatures and cold-induced food deprivation during the course of the culture period. Vargas-Chacoff et al. (2009a), studying juvenile gilthead sea bream cultured in earthen ponds under natural photoperiod and temperature conditions, reported that plasma osmoregulation parameters (osmolality, sodium and chloride levels) showed a similar pattern of variation between the seasons, with the highest values occurring in the

summer and the lowest in winter. In our experiment, fish also showed the highest values for osmolality, sodium and chloride at the higher temperature of 22°C. Surprisingly, the osmolality values were quite high and could not be explained solely by the osmolyte concentrations. It is well known that many stressors affect the hydromineral balance in fish (Wendelaar Bonga 1997), with plasma cortisol levels the main marker for stress and other metabolites, such as glucose and lactate, being released into the plasma in response to stress (Barton 2002). Although additional stress was not expected under our indoor conditions, the high osmolality values together with relatively higher plasma glucose levels during the Pre-Cold period might reflect inherent stress. Further studies are needed to evaluate, for instance, plasma cortisol levels to clarify these higher osmotic responses in gilthead sea bream maintained under indoor conditions. Similarly, high osmolarities were recorded in a different group of sea bream using a freezing point osmometer (unpublished data), which is interestingly in line with those observed in sea bream infected with *Karlodinium* spp (Fernández-Tejedor et al. 2007). In the present study, none of the fish was affected by pathogens, with the sodium levels and especially the low chloride levels not indicating any toxin-related or even temperature-related changes in membrane permeability.

Reduced plasma sodium and chloride concentrations at 14°C were in accordance with previous results obtained in controlled temperature drops (Sala-Rabanal et al. 2003) or in ponds (Vargas-Chacoff et al. 2009a). Plasma potassium and phosphorus levels showed opposite trends during the temperature fluctuation, but there were no differences between the dietary treatments. The highest potassium and phosphorus levels were recorded during the recovery period (22°C), which were even higher than those measured during the Pre-Cold period (also at 22°C), possibly due to metabolic reorganisation.

The increased plasma potassium levels during the recovery period (by 70% compared to initial values) should be taken into account given the importance of this ion in cellular processes. Increased potassium levels in plasma samples could be caused by contamination due to haemolysis (Mirghaed et al. 2017), which did not occur in the present study during sampling and analysis. Generally, potassium levels in fish plasma either rise or are maintained at a constant level with increasing temperature (Burton 1986). Plasma potassium levels have been reported to increase in rainbow trout just before maximum exercise, especially at elevated temperatures, as high intensity exercise elicits potassium loss from the muscle (Jain & Farrell, 2003). It is possible that the elevated potassium levels observed in sea bream during the recovery period might reflect a transient mismatch between the lack of an adequate nutritional status and the increased metabolism and overall activity induced by the rise in temperature.

Changes in the osmoregulatory capacity in fish exposed to low temperatures have been associated with alterations in relevant tissues such as the gills, kidneys and intestine. Generally, fish increase Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills to cope with low temperatures (Gabbianelli et al. 1996, Packer and Garvin 1998, Imsland et al. 2003, Metz et al. 2003). However, Vargas-Chacoff et al. (2009a) and Ibarz et al. (2010a) could not confirm this in sea bream. We did not observe changes in branchial and intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities in response to low temperatures. Such changes in activities have been observed to be accompanied by morphological modifications, such as reduced numbers of apical membrane microvilli and chloride cells (Ibarz et al. 2010a) in the first days of a cold challenge at 8°C. However, temperature maintenance at 8°C for 20 days has been reported

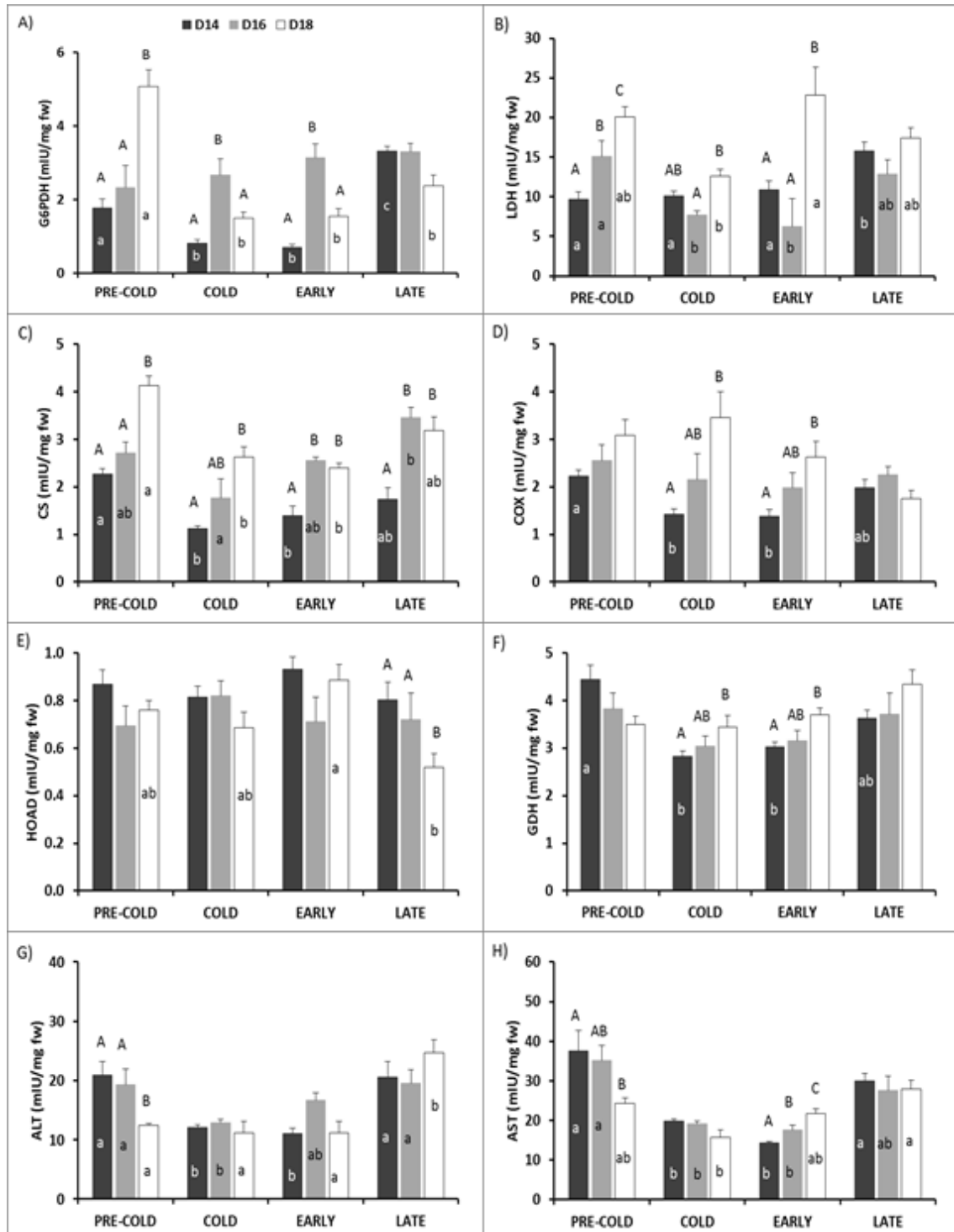
to partially reverse the changes and cause homeoviscous adaptation that increases membrane unsaturation (Ibarz et al. 2005). The rapid and necessary recovery of crucial ATPase activity could explain why low temperatures did not significantly affect both branchial and intestinal ATPase activities in the present study. Additionally, branchial Na⁺/K⁺-ATPase activity was already rather low, even at 22°C, when compared to other studies on sea bream (Laiz-Carrión et al. 2005, Vargas-Chacoff et al. 2009a), which might be partly related to the high plasma osmolality and, thus, a reduced gradient with external water.

In contrast to branchial Na⁺/K⁺-ATPase activity, intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activities were variable and showed diet-related differences. Although dietary lipid levels did not affect the overall osmoregulatory capacity, intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activity was lower (2-3 fold) in D14-fed fish than in D16-fed and D18-fed fish during the Pre-Cold period. The activity of ouabain-sensitive intestinal Na⁺/K⁺-ATPase in sea bream is segment-dependent and related to both ion osmoregulation and nutritional processes (Díaz et al. 1998, Almansa et al. 2001, Gregório et al. 2013). It has an Arrhenius breakpoint temperature at around 15°C, but with similarly low activation energies above and below the discontinuity (Díaz et al. 1998). This temperature is close to the lowest temperature used in our study, which might explain the lack of changes in enzyme activities between the temperature periods. Since we observed no significant differences in the osmotic parameters, Na⁺/K⁺-ATPase activity could indirectly reflect the intestinal absorption ability of fish, as some nutrients (amino acids and glucose) are absorbed in association with Na⁺ via the action of Na⁺/K⁺-ATPases (Klein et al. 1998; Rhoads et al. 1994). In this sense, a medium energy diet would favour absorption. However, the absence of significant differences in growth parameters does not support the notion that changes in intestinal Na⁺/K⁺-ATPase activity caused major diet-specific changes, with further studies required to tackle the relationship between dietary energy levels and Na⁺/K⁺-ATPase activity. It is known, however, that the polar lipid fatty-acid composition of the intestinal mucosa correlates with the Arrhenius plot breakpoint, suggesting a regulatory role of the lipid microenvironment on enzyme activity (Díaz et al. 1998) and that enterocytes are susceptible to diet-induced lipid alterations (Díaz et al. 2016).

Metabolic reorganisation

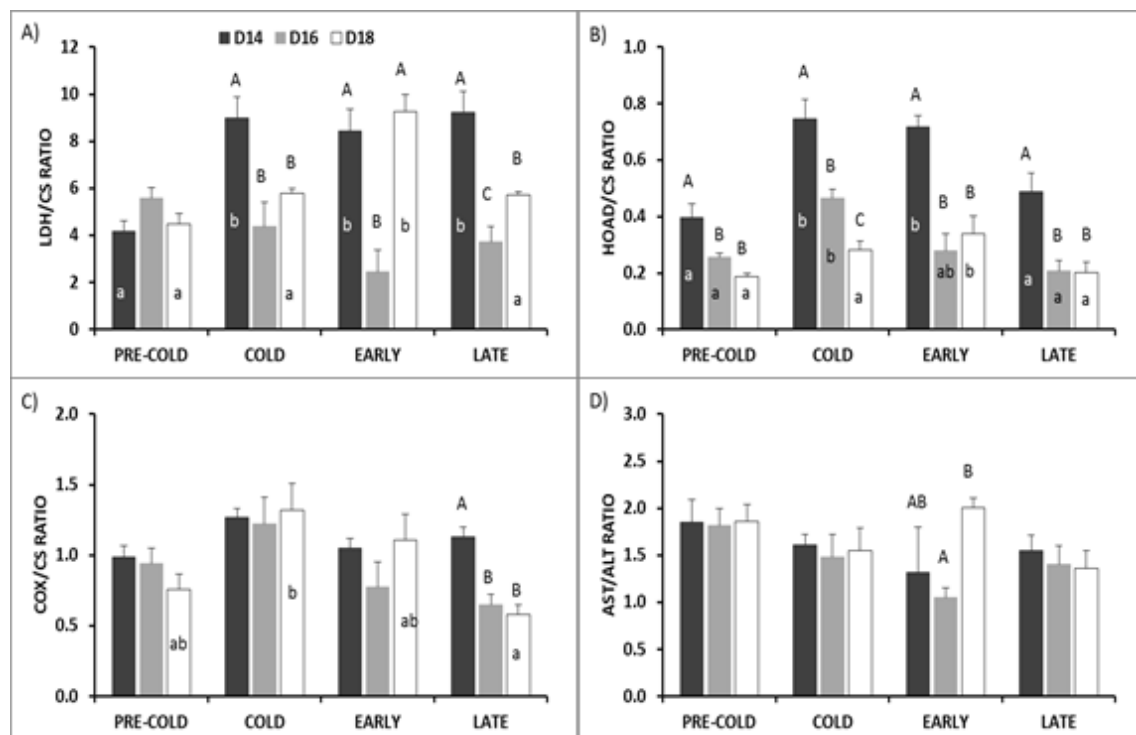
Blood analysis is performed routinely to evaluate physiological changes in mammals (Knox et al. 1998). Recently, several plasma metabolites and enzymes were used to evaluate the nutritional status of healthy juvenile gilthead sea bream (Peres et al. 2013). Here, we analysed glucose, lactate, protein and lipid fractions, which are strongly associated with responses to low temperatures in gilthead sea bream (reviewed in Ibarz et al. 2010a). During the Pre-Cold period, plasma levels of TAG, PL and TC inversely correlated with dietary lipid content, the sum of plasma lipids being the highest in the D14-fed fish and reflecting pre-feeding levels (Polakof et al. 2007). Thus, plasma lipid fractions are more precise indicators of nutritional status than glucose or proteins at 22°C, as suggested by Peres et al. (2013) in their study of nutritional statuses.

Figure 2. Maximal activities of enzymes associated with energy production (G6PDH, LDH, CS, COX and HOAD) and amino acid metabolism (AST, ALT and GDH) throughout temperature fluctuations. PRE-COLD: data from samples collected on day 30 at 22°C; COLD: data from samples collected after 50 days at 14°C (day 80); EARLY and LATE: data from samples collected 7 and 35 days (experimental days 87 and 115) after the start of temperature recovery to 22°C, respectively. Lowercase letters within the bars (a, b and c) indicate significant differences between the periods within each diet (Tukey, $p < 0.05$). Capital letters above the bars (A, B and C) indicate significant differences between the diets during each period (Tukey, $p < 0.05$).



It is well known that acute cold shock (from 18°C to 8°C) induces both hyperglycaemia (Sala-Rabanal et al. 2003) and hyperlipidaemia (Ibarz et al. 2007a). Higher glucose levels and cortisol secretion have been linked to stress (Rotllant et al. 2001), while higher lipid levels have been associated with the release of lipids from perivisceral fat (Ibarz et al. 2007a). Although we observed hyperlipidaemia in fish on the D14 and D16 diets during the Cold period, glycaemia decreased two-fold, irrespective of diet. These changes were reverted when the water temperature increased. Our results were in agreement with the annual inverse variation in plasma glucose and TAG levels reported by Vargas-Chacoff et al. (2009a), who noted that the highest glucose levels and lowest TAG levels occurred during the summer and the opposite during winter. The low glucose levels at low temperatures might be due to a decrease in the capacity of the liver to produce glucose, while the higher lipid levels have been linked to reduced feeding and increased mobilisation of lipid stores (Vargas-Chacoff et al. 2009b, Ibarz et al. 2010a). The transitory changes in TAG and glucose levels in response to low temperatures can therefore be used as indicators of a cold challenge.

Figure 3. Enzyme ratios in the liver throughout temperature fluctuations. PRE-COLD: data from samples collected on day 30 at 22°C; COLD: data from samples collected after 50 days at 14°C (day 80); EARLY and LATE: data from samples collected 7 and 35 days (experimental days 87 and 115) after the start of temperature recovery to 22°C, respectively. Lowercase letters within the bars (a, b and c) indicate significant differences between the periods within each diet (Tukey, $p < 0.05$). Capital letters above the bars (A, B and C) indicate significant differences between the diets during each period (Tukey, $p < 0.05$).

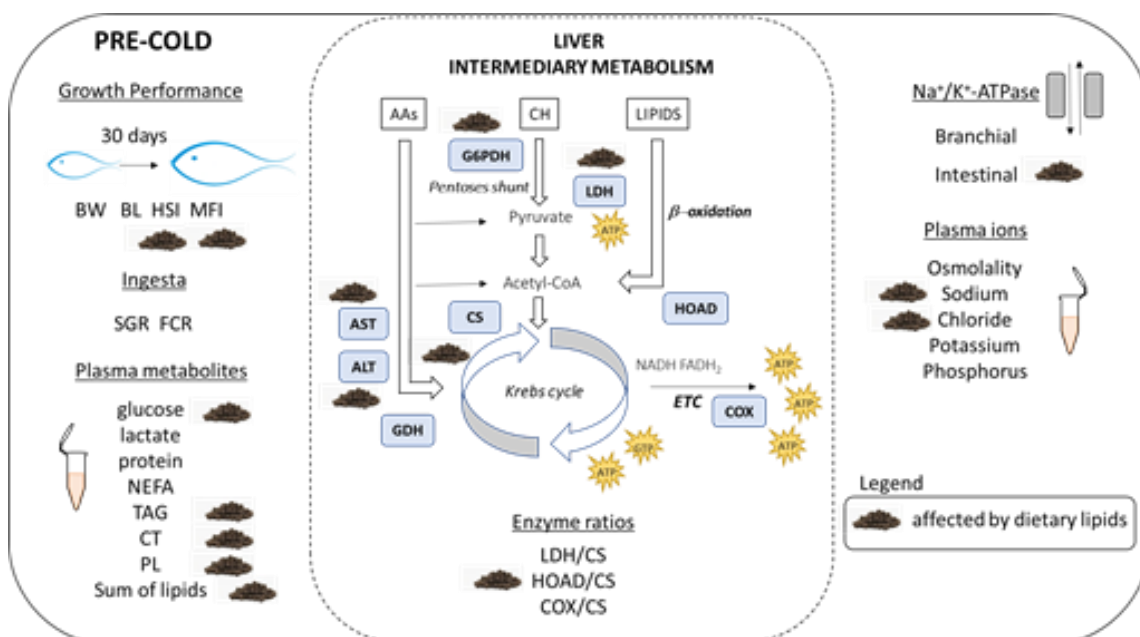


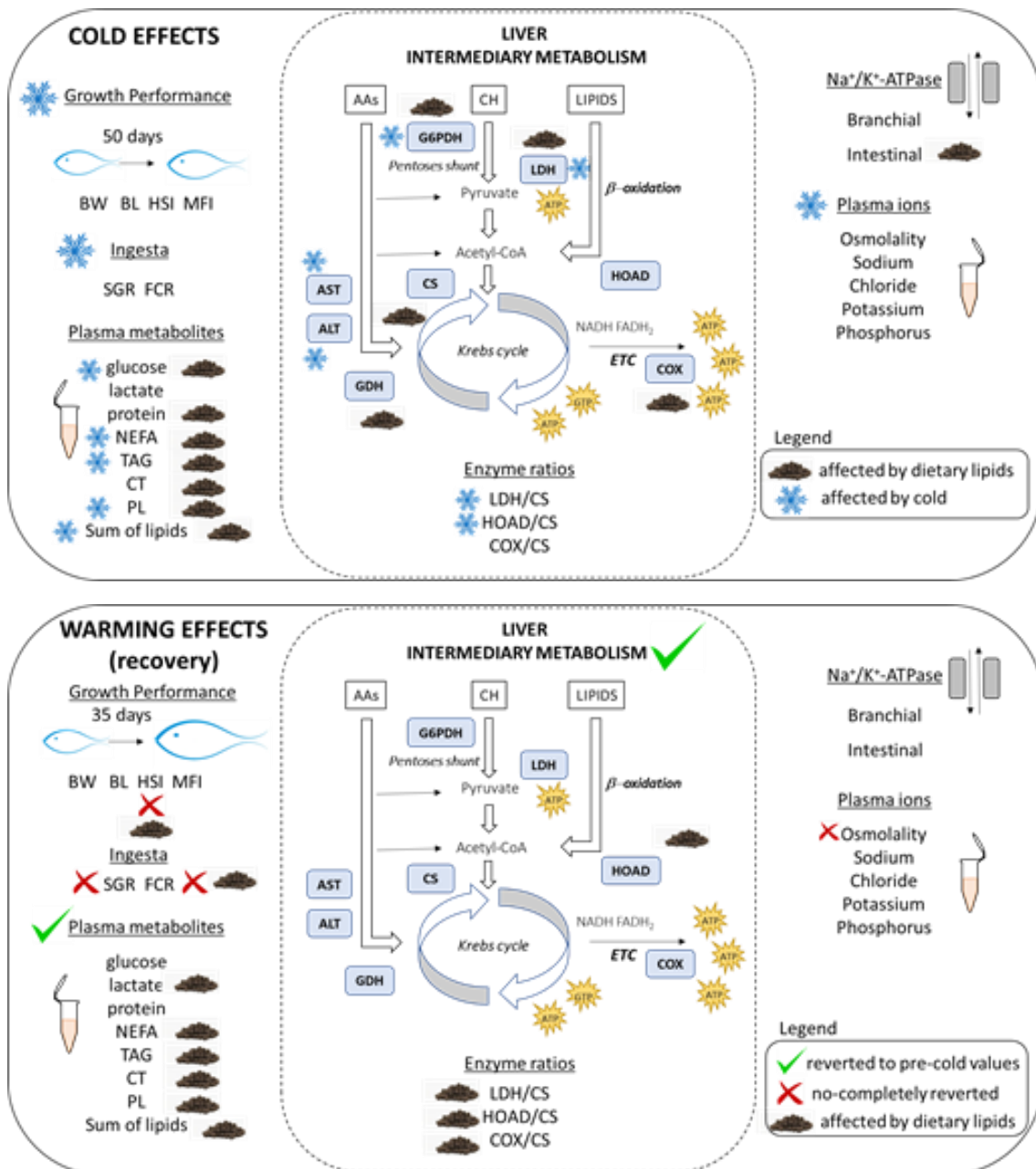
Liver function has been widely examined in studies investigating cold challenges due to its importance in blood composition and osmo/ion regulation, immune function, reproduction, detoxification and many other processes related to energy metabolism. We focused on the capacity of the liver to recover from low temperatures, analysing key enzymes of intermediary metabolism, their temperature coefficients (Q10) and ratios that could be used to indicate metabolic reorganisation. Feidantsis et al. (2018), under culture conditions, reported seasonal metabolic patterns involving oxidative stress during the summer and winter. Lipid oxidation is induced by low temperatures, while metabolic activation and carbohydrate oxidation are also elicited at higher temperatures. Accordingly, the glutathione redox cycle and liver antioxidant enzyme activities have been reported to be strongly affected by low temperatures under indoor conditions (Sánchez-Nuño et al. 2018). Evaluating metabolic patterns when dietary lipid intake was reduced, our results from the Pre-Cold period demonstrated that dietary lipids modified hepatic enzyme activities according to energy intake, as expected for sea bream at 22°C. Diets with higher lipid contents were associated with higher activities of energy-related enzymes (CS, COX and LDH) and lower activities of enzymes involved with amino acid metabolism (AST, ALT and GDH), possibly to preserve amino acids for use as energy fuel. G6PDH activity also increased with higher dietary lipid intake. In general, liver G6PDH activity in fish increases with food availability to provide NADPH (Bastrop et al. 1992), which is essential for reductive biosynthesis, nucleic acid synthesis and cell protection against oxidants. The clearly increased metabolism in the livers of D18-fed fish would involve higher free radical production and more oxidant attacks. Thus, higher G6PDH activity would provide the reducing power for the antioxidant system. Sánchez-Nuño et al. (2018) reported that reducing dietary lipid content from 18% to 14% lowered oxidised lipid levels by half in both the plasma and liver of gilthead sea bream, thereby decreasing the putative effects of lipid peroxidation at 22°C. Surprisingly, we did not observe lipid dependency for HOAD activity despite this enzyme being directly associated with lipid catabolism. Usually, fish fed high-fat diets show increased levels of mitochondrial HOAD (Antonopoulou et al. 2014, Librán-Pérez et al. 2015). Our results therefore suggest that liver lipid metabolism was not affected by a 4% reduction in dietary lipid content. However, using enzyme ratios as indicators of metabolic reorganisation, we did observe that the HOAD/CS ratio was higher in the fish on the D14 diet than in those on the D16 and D18 diets, indicating that lipid entrance into the Krebs cycle was greater in D14-fed fish. The preference for fatty acid vs carbohydrate oxidation and the mitochondrial index (the COX/CS ratio) were similar, irrespective of diet, demonstrating the high plasticity of liver metabolism at 22°C. Considering all the data on growth, ingesta, plasma metabolites, the osmoregulatory capacity and liver metabolism (see Fig. 4), a 4% reduction in dietary lipid content did not affect fish growth and metabolism was modulated accordingly in gilthead sea bream grown indoors.

We have studied changes in the metabolic rate (Ibarz et al. 2003), liver composition and enzyme activities in gilthead sea bream exposed to low temperatures (Ibarz et al. 2007a, 2010b,c), which have demonstrated that this species has little capacity to acclimate to temperatures under 12-13°C. Exposing sea bream to 14°C for an extended period (50 days) revealed their inability to compensate for low temperatures in their enzyme activities, even when feeding. Moreover, some enzymes, such as G6PDH, CS, AST and ALT, showed greatly reduced activities, as previously reported for lower temperatures (Ibarz et al. 2010b). Several studies, evaluating annual changes in glucose intermediary metabolism in

caged adult gilthead sea bream (Gómez-Milán et al. 2007) and the osmoregulatory and metabolic capacities of immature animals in earthen ponds (Vargas-Chacoff et al. 2009a), reported the lack of seasonal changes in the activities of fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase), AST, pyruvate kinase (Gómez-Milán et al. 2007), FBPase and G6PDH (Vargas-Chacoff et al. 2009a). Indoor studies, with animals exposed to 12°, 19° and 26°C for 35 days (Vargas-Chacoff et al. 2009b) and to 8°C or 12°C (Ibarz et al. 2007b), corroborated the lack of compensation in enzyme activities during temperature acclimation. The concomitant increase in LDH and CS activities also indicated an increased conversion of carbohydrates into lactate.

Figure 4. Summary of the effects of diet and temperature on juvenile gilthead sea bream maintained under indoor conditions during temperature fluctuations. This figure summarises all the parameters analysed at the end of: (A) the Pre-Cold period; (B) the Cold period; and (C) the Late Recovery period. The schematic on liver intermediary metabolism highlights the enzymes analysed. The symbol for the effects of diet indicates significant differences for a parameter between the diets, irrespective of the direction of the change. The effects of temperature are shown as: a snowflake symbol to indicate a significant reduction in a parameter at 14°C with respect to its pre-cold level; a green tick to indicate recovery to pre-cold values; and a red cross to indicate incomplete reversion.





The current study aimed to further analyse the effects of reducing dietary lipid content during a cold challenge, evaluating temperature coefficients and metabolic ratio indicators. Our group recently reported a lack of acclimation of antioxidant enzymes to low temperatures (14°C) and increased levels of oxidised proteins in animals fed higher dietary lipids (Sánchez-Nuño et al. 2018), which are consistent with the increased oxidised lipids during the cold season reported by Feidantsis et al. (2018). G6PDH activity in D18-fed fish was strongly affected, with a Q10 of around 4, which, together with lower glutathione levels at low temperatures (Sánchez-Nuño et al. 2018), indicated that diets with higher lipid contents are not recommendable for low temperatures. The Q10 values demonstrated that the overall decrease in enzyme activity did not show a similar pattern for all the diets. For example, G6PDH, CS, AST and ALT activities decreased by half in D14-fed fish. Kyprianou et al. (2010) reported that LDH and HOAD activities increased in sea bream maintained at low temperatures, suggesting increased anaerobic metabolism together with higher oxidation of free fatty acids that contributed to ATP turnover. These changes elicit a reorganisation of

liver metabolism, which was highly evident in D14-fed fish via the increased LDH/CS and HOAD/CS ratios.

To better understand the recovery in liver metabolism from low temperatures and reduced dietary intake, we performed two samplings during the Recovery period. Feidantsis et al. (2015) reported tissue-dependent and time-dependent responses of LDH, HOAD and CS activities to acute warming in gilthead sea bream. For example, during a transition from 18°C to 24°C, HOAD and CS activities increased and LDH activity decreased during the first week, indicating enhanced liver aerobic metabolism in response to an increased energy demand. Our results indicated that the recovery from lower temperatures was different from acute warming in sea bream. The decreased enzyme activities were still not restored 7 days after the start of temperature recovery, with Q10 values still near 1 and only LDH activity for D18-fed fish and CS activity for D16-fed fish showing higher Q10 values. The higher LDH activity in D18-fed fish increased the LDH/CS ratio, which indicated the uncoupling of anaerobic processes during the first days of recovery. The higher CS activity in D16-fed fish suggested that this diet was more favourable during early recovery. Thirty-five days after the start of temperature recovery (late recovery), most of the enzyme activities had reverted to their Pre-Cold levels, showing the delay in the recovery process. Since enzyme activities were presented per milligram of fresh liver weight and given that the HSI was two-fold lower in D14-fed fish than in D18-fed fish, the D14 diet could further affect liver capacities, considerably reducing “enzymatic power” during recovery from low temperatures. Moreover, it has been reported that the glutathione redox cycle is not fully restored after recovery from 50 days at 14°C, with fish on the low-lipid diet presenting higher liver protein oxidation than those on diets with higher lipid contents (Sánchez-Nuño et al. 2018). Thus, although fish growth was not significantly affected, the D14 diet did not adequately meet the energy demands for the recovery from low temperatures.

Conclusion

In conclusion, reducing dietary lipids and, consequently, dietary energy does not affect gilthead sea bream performance during temperature fluctuation in indoor conditions. However, to cope with low temperatures in culture, we propose different diets for the pre-cold, cold and recovery based on real energy needs. We would recommend diets with reduced lipid contents during the pre-cold and cold culture periods, especially since high dietary energy levels and culture densities have been reported to have deleterious effects on physiology and growth in other fish species (Suárez et al. 2015). Although cold-induced growth arrest and metabolic depression are unavoidable, a well-formulated low lipid diet would be enough to meet the low energy demands at low temperatures. The recovery from low temperatures is different from acute warming in sea bream and requires diets with increased energy contents to guarantee good liver condition, mineral supplementation to maintain osmoregulation and bone formation. Furthermore, higher protein contents would be desirable to improve tissue restoration and possibly improve growth during the recovery from low temperatures. However, further studies are needed to comprehensively assess the temperature recovery period and the dietary needs of gilthead sea bream in commercial cage culture conditions.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Spanish government (AGL2011-29873). O.T. Eroldogan and I. Özşahinođlu received fellowships from the Erasmus Turkish Program.

Table 4. Temperature coefficients: Q_{10} value

T ^a interval	Diet	G6PDH	LDH	CS	COX	HOAD	GDH	AST	ALT						
COLD	D14	2.71 ± 0.29	A	1.25 ± 0.25	A	2.42 ± 0.18	1.77 ± 0.37	A	1.09 ± 0.11	1.76 ± 0.10	A	2.33 ± 0.36	A	1.99 ± 0.23	A
	D16	0.84 ± 0.25	B	2.97 ± 0.32	B	2.26 ± 0.72	1.23 ± 0.21	AB	0.81 ± 0.03	1.33 ± 0.16	B	2.16 ± 0.23	A	1.64 ± 0.69	AB
22°C → 14°C (50 days)	D18	4.07 ± 1.06	A	1.53 ± 0.17	A	1.76 ± 0.17	0.89 ± 0.17	A	1.14 ± 0.04	1.11 ± 0.05	B	1.74 ± 0.22	B	1.29 ± 0.30	B
	<i>EARLY</i>														
RECOVERY	D14	0.84 ± 0.07	1.10 ± 0.13	A	1.22 ± 0.05	0.96 ± 0.07	1.18 ± 0.05	1.09 ± 0.15	0.69 ± 0.03	A	0.91 ± 0.22				
	D16	1.23 ± 0.18	0.92 ± 0.13	A	1.89 ± 0.71	0.90 ± 0.12	0.84 ± 0.09	1.05 ± 0.10	0.92 ± 0.18	A	1.31 ± 0.25				
14°C → 22°C (7 days)	D18	0.84 ± 0.14	1.74 ± 0.34	B	0.92 ± 0.13	0.74 ± 0.18	1.37 ± 0.16	1.21 ± 0.08	1.26 ± 0.01	B	1.05 ± 0.43				
	<i>LATE RECOVERY</i>														
RECOVERY	D14	5.15 ± 0.25	A	1.58 ± 0.18	1.73 ± 0.10	1.52 ± 0.13	0.98 ± 0.11	1.40 ± 0.19	1.75 ± 0.08	1.96 ± 0.10	AB				
	D16	1.28 ± 0.33	B	1.87 ± 0.30	2.54 ± 1.10	1.05 ± 0.08	0.85 ± 0.12	1.28 ± 0.33	1.54 ± 0.15	1.57 ± 0.15	B				
14°C → 22°C (35 days)	D18	1.40 ± 0.15	B	1.34 ± 0.40	1.28 ± 0.29	0.43 ± 0.03	0.70 ± 0.14	1.33 ± 0.10	2.11 ± 0.50	2.38 ± 0.15	A				

Data are expressed as mean ± S.E.M
Significant differences between the diets during each period are indicated by capital letters (Tukey's *posthoc*, $p < 0.05$).

References

- Almansa E, Sanchez J, Cozzi S, Casariego M, Cejas J, Díaz M (2001) Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na⁺-K⁺-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 171:557–567
- Antonopoulou E, Kousidou E, Tserga E, Feidantsis K, Chatzifotis S (2014) Dietary lipid levels in meagre (*Argyrosomus regius*): Effects on biochemical and molecular indicators of liver. *Aquaculture* 428–429:265–271
- Barnabé G (1990) Rearing bass and gilthead sea bream. *Aquaculture* 2:647–686
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids 1. *42:517–525*
- Bastrop R, Jürss K, Wacke R (1992) Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 102:151–161
- Bavcevic L, Petrovic S, Crnica M, Corazzin E (2006) Effects of feeding strategy on growth of sea bream (*Sparus aurata* L.) during winter-spring and possible implications for »winter disease« syndrome. *Ribarstvo* 64:1–17
- Blasco J, Moya A, Millán-Cubillo A, Vélez EJ, Capilla E, Pérez-Sánchez J, Gutiérrez J, Fernández-Borrás J (2015) Growth-promoting effects of sustained swimming in fingerlings of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *J Comp Physiol B* 185:859–868
- Bonaldo A, Isani G, Fontanillas R, Parma L, Grilli E, Gatta PP (2010) Growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed to satiation and restrictively at increasing dietary energy levels. *Aquac Int* 18:909–919
- Bradford MM, Williams WL (1976) New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination. *Fed Proc* 35:274
- Burton RF (1986) Ionic regulation in fish: the influence of acclimation temperature on plasma composition and apparent set points. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 85:23–8
- Díaz M, Cozzi S, Almansa E, Casariego M, Bolaños A, Cejas J, Lorenzo A (1998) Characterization of intestinal Na⁺-K⁺-ATPase in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a tissue-specific heterogeneity. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 121:65–76
- Díaz M, Dópido R, Gómez T, Rodríguez C (2016) Membrane lipid microenvironment modulates thermodynamic properties of the Na⁺-K⁺-ATPase in branchial and intestinal epithelia in euryhaline fish in vivo. *Front Physiol* 7:589
- Donaldson MR, Cooke SJ, Patterson DA, Macdonald JS (2008) Cold shock and fish. *J Fish Biol* 73:1491–1530
- 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*. *J Comp Physiol B* 185:185–205
- Feidantsis K, Pörtner HO, Vlachonikola E, Antonopoulou E, Michaelidis B (2018) Seasonal Changes in Metabolism and Cellular Stress Phenomena in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Physiol Biochem Zool* 91(3):878–895

- Fernández-Tejedor M, Soubrier-Pedreño M, Furones M (2007) Mitigation of lethal effects of *Karlostidium veneficum* and *K. armiger* on *Sparus aurata*: changes in haematocrit and plasma osmolality. *Dis Aquat Organ* 77:53–59
- Furné M, García-Gallego M, Hidalgo MC, Morales AE, 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*). *Aquac Nutr* 15:587–595
- Gabbianelli R, Falcioni G, Mazzanti L, Bertoli E, Zolese G (1996) Seasonal variations of physical and biochemical membrane properties in trout erythrocytes (*Salmo irideus*). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 114:275–279
- Gómez-Milán E, Cardenete G, Sánchez-Muros MJ (2007) Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 147:49–55
- Gregório SF, Carvalho ESM, Encarnação S, Wilson JM, Power DM, Canário AVM, Fuentes J (2013) Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). *J Exp Biol* 216:470–9
- Hurst TP (2007) Causes and consequences of winter mortality in fishes. *J Fish Biol* 71:315–345
- Ibarz A, Beltrán M, Fernández-Borràs J, Gallardo MA, Sánchez J, Blasco J (2007b) Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262:470–480
- Ibarz A, Blasco J, Beltrán M, Gallardo MA, Sánchez J, Sala R, Fernández-Borràs J (2005) Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249:477–486
- Ibarz A, Blasco J, Gallardo MÁ, Fernández-Borràs J (2010c) Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 155:319–326
- Ibarz A, Blasco J, Sala-Rabanal M, Gallardo Á, Redondo A, Fernández-Borràs J (2007a) Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting and their capacity for recovery. *Can J Fish Aquat Sci* 64:1034–1042
- Ibarz A, Fernández-Borràs J, Blasco J, Gallardo MA, Sánchez J (2003) Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiol Biochem* 29:313–321
- Ibarz A, Martín-Pérez M, Blasco J, Bellido D, Oliveira E de, Fernández-Borràs J (2010b) Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. *Proteomics* 10:NA-NA
- Ibarz A, Padrós F, Gallardo MÁ, Fernández-Borràs J, Blasco J, Tort L (2010a) Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-induced alterations and “Winter Syndrome.” *Rev Fish Biol Fish* 20:539–556
- Imslund AK, Gunnarsson S, Foss A, Stefansson SO (2003) Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture* 218:671–683
- Jain KE, Farrell AP (2003) Influence of seasonal temperature on the repeat swimming performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* 206:3569–79

- Knox SS, Siegmund KD, Weidner G, Ellison RC, Adelman A, Paton C (1998) Hostility, social support, and coronary heart disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Cardiol* 82:1192–6
- Klein S, Cohn SM, Alpers DH (1998). The alimentary tract in nutrition. In: Shils, M.E., Olson, A.J., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, pp. 605–630.
- Kyprianou TD, Pörtner HO, Anestis A, Kostoglou B, Feidantsis K, Michaelidis B (2010) Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: An analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 180:1005–1018
- Laiz-Carrión R, Guerreiro PM, Fuentes J, Canario AVM, Martín Del Río MP, Mancera JM (2005) Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*. *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol* 303A:563–576
- Librán-Pérez M, Geurden I, Dias K, Corraze G, Panserat S, Soengas JL (2015) Feeding rainbow trout with a lipid-enriched diet: effects on fatty acid sensing, regulation of food intake and cellular signaling pathways. *J Exp Biol* 218:2610–9
- Martin-Perez M, Fernandez-Borras J, Ibarz A, Millan-Cubillo A, Felip O, Oliveira E De, Blasco J (2012) New Insights into Fish Swimming: A Proteomic and Isotopic Approach in Gilthead Sea Bream.
- McCormick SD (1993) Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Can J Fish Aquat Sci* 50:656–658
- Melis R, Sanna R, Braca A, Bonaglini E, Cappuccinelli R, Slawski H, Roggio T, Uzzau S, Anedda R (2017) Molecular details on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sensitivity to low water temperatures from (1)H NMR metabolomics. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 204:129–136
- Metz JR, Burg EH van den, Bonga SEW, Flik G (2003) Regulation of branchial Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *J Exp Biol* 206:2273–80
- Miguel Mancera J, Laiz Carrión R, Pilar Martín del Río M del (2002) Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen Comp Endocrinol* 129:95–103
- Mirghaed AT, Ghelichpour M, Hoseini SM, Amini K (2017) Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. *Fish Physiol Biochem* 43:1143–1151
- Mongile F, Bonaldo A, Fontanillas R, Mariani L, Badiani A, Bonvini E, Parma L (2014) Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Ital J Anim Sci* 13:30–34
- Packer RK, Garvin JL (1998) Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na⁺/K⁺-ATPase. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 120:777–783
- Peres H, Santos S, Oliva-Teles A (2013) Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *J Appl Ichthyol* 29:630–636
- Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Martín del Río MP, Mancera JM, Soengas JL (2006) Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Comp Physiol B* 176:441–452
- Polakof S, Míguez JM, Soengas JL (2007) Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 147:363–374

- Power DM, Melo J, Santos CRA (2000) The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J Fish Biol* 56:374–387
- Prosser CL (1991) Environmental and metabolic animal physiology. In: *Comparative animals physiology*, 4th edn. Wiley-Liss, University of Illinois (USA), p 109–175
- Ravagnan G (1978) Elementi di vallicoltura moderna; proposte operative per la ristrutturazione e lo sviluppo della itticoltura salmastra italiana. In: *Bologna (Italy) Edagricole*, p 283
- Rhoads J, Chen W, Chu P, Berschneider H, Argenzio R, Paradiso A (1994) L-glutamine and L-asparagine stimulate Na^+ - H^+ exchange in porcine jejunal enterocytes. *Am. J. Phys.* 266, G828–838.
- Rotllant J, Balm PHM, Pérez-Sánchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L (2001) Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen Comp Endocrinol* 121:333–342
- Sala-Rabanal M, Sanchez J, Ibarz A, Fernandez-Borras J, Blasco J, Gallardo MA (2003) Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 29:105–115
- Sánchez-Nuño S, Sanahuja I, Ferández-Alacid L, Ordóñez-Grande B, Fontanillas R, Fernández-Borràs J, Blasco J, Carbonell T, Ibarz A (2018) Redox challenge in a cultured temperate marine species during low temperature and temperature recovery. *Front Physiol* 9:923
- Sangiao-Alvarellos S, Laiz-Carrión R, Guzmán JM, Martín del Río MP, Miguez JM, Mancera JM, Soengas JL (2003) Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 285:R897–R907
- Sardella BA, Matey V, Cooper J, Gonzalez RJ, Brauner CJ (2004) Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in “California” Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *J Exp Biol* 207:1399–413
- Sardella BA, Sanmarti E, Kültz D (2008) The acute temperature tolerance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) and the effect of environmental salinity. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 309A:477–483
- Sarusic G (1999) Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 19:113
- Silva TS, Costa AMR da, Conceição LEC, Dias JP, Rodrigues PML, Richard N (2014) Metabolic fingerprinting of gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver to track interactions between dietary factors and seasonal temperature variations. *PeerJ* 2:e527
- Srere PA (1969) [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol* 13:3–11
- Staurnes M, Sigholt T, Åsgård T, Baevefjord G (2001) Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture* 201:153–159
- Suárez MD, Trenzado CE, García-Gallego M, Furné M, García-Mesa S, Domezain A, Alba I, Sanz A (2015) Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Eng* 67:59–66
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37–61

Tort L, Rotllant J, Liarte C, Acerete L, Hernández A, Ceulemans S, Coutteau P, Padros F (2004) Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture* 229:55–65

Tort L, Rotllant J, Rovira L (1998) Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 120:175–179

Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Polakof S, Río MPM del, Soengas JL, Mancera JM (2009b) Interactive effects of environmental salinity and temperature on metabolic responses of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 154:417–424

Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Ruiz-Jarabo I, Páscoa I, Gonçalves O, Martín del Río MP, Mancera JM (2009a) Seasonal variation in osmoregulatory and metabolic parameters in earthen pond-cultured gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Aquac Res* 40:1279–1290

Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ (2006) Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac Nutr* 12:127–133

Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591–625

CAPÍTULO III

Liver protein homeostasis of gilthead sea bream was compromised by temperature fluctuation challenge

Sergio Sánchez-Nuño, Ignasi Sanahuja, Laura Fernández-Alacid, Borja Ordóñez-Grande, Teresa Carbonell, Antoni Ibarz*

Departament Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

*Corresponding author. E-mail: tibarz@ub.edu

Abstract

Seasonal variations in water temperature are a natural stressor on gilthead sea bream culture, globally affecting growth performance, ingesta, and liver metabolism. Liver has been described as one of the most affected tissues by thermal shift being its metabolism with lack of adaptation capacity. However, the affectation on protein turn-over mechanisms on winter thermal fluctuation is scarce studied. In this work, the relationship between liver oxidative status and protein homeostasis pathways has been performed through low temperature period of 50 days at 14°C and its recovery at two interval times, 7 days or early recovery (ER) and 30 days or late recovery (LR). Liver redox status was determined measuring oxidised lipids, oxidised proteins, glutathione forms (total, oxidised and reduced) and main antioxidant enzymes activities. Protein turn-over main pathways were analysed via liver expression of heat shock proteins 70 and 90 (HSP70 and HSP90), related to liver protein folding ability; proteasome subunits 19S, 20S and protein polyubiquitination as markers of the ubiquitin-proteasome system (UPS); and cathepsin D as lysosomal protease. The sustained low temperature of 14°C showed a lack of adaptation of antioxidant enzyme activities, mainly catalase and glutathione reductase, which subsequently affected the glutathione redox cycle and caused an acute reduction in total hepatic glutathione levels. In consequence oxidised proteins accumulated in liver. Ubiquitination tagging was depending on proteins molecular weight and was transiently modified during low temperatures and early recovery. By its way, proteasomal activity was also reduced by losing 20S subunit expression and lysosomal cathepsin D was drastically depressed at low temperatures. However, temperature recovery reverted most of the cold consequences at late recovery. All these findings, together with known effects on liver metabolism of gilthead sea bream at cold, demonstrated that protein liver homeostasis was compromised at low temperatures at would be in the origin of the reported liver affectations related with cold season.

Keywords: Redox status, ubiquitin, proteasome, HSP, protein turn-over, aquaculture, temperature fluctuation, cathepsin.

Introduction

Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is one of the most common marine species in the Mediterranean area and one of the most appreciated seafood species in Europe. However, below 13°C, fish activity and growth are minimal and a drastic reduction in nourishment is observed leading to growth arrest and a halt in aquaculture production (reviewed in Ibarz et al., 2010a). Liver is one of the main targets of cold challenge, being affected by lipid

accumulation (Gallardo et al., 2003; Ibarz et al., 2007a), oxidant insult (Abele and Puntarulo, 2004; Feidantsis et al., 2018; Ibarz et al., 2010b; Sánchez-Nuño et al., 2018a; Viarengo et al., 1995) and with lack ability to adapt its metabolism to the low temperatures (Ibarz et al., 2003, 2007a,b). Whereas the liver affectation has been studied extensively for its metabolism capacities, scarce data exist on protein refolding and degradation pathways (protein homeostasis) against low temperature and posterior recovery in this tissue.

Protein homeostasis represents the fundamental process which allows the preservation of all the functional cellular proteins and it has a great impact on the life of marine habitats. All cellular proteins undergo continuous synthesis and degradation to maintain a functional proteome and to allow rapid changes in levels of specific proteins with regulatory purposes (Kaushik and Cuervo, 2012). However, there are several intrinsic and extrinsic factors that are continuously damaging proteins, mainly causing protein oxidation by oxidative stress (Chondrogianni et al., 2014). Thus, the study of the antioxidant system (enzymatic and non-enzymatic) affectation by stressor conditions is crucial to understand the protein oxidation susceptibility. According to Benarroch (2011), in response of protein damage and/or misfolding due to a redox shift or oxidative stress, heat shock proteins (HSPs) were activated firstly because of its chaperone activity (Feder and Hofmann, 1999; Iwama et al., 2004). Nevertheless, protein oxidation is very common and there are many damage sources, thus HSPs refolding capacity is limited and proteins need to be repaired by its elimination in order to avoid diseases and cellular death (Chondrogianni et al., 2014; Kassahn et al., 2009; Kaushik and Cuervo, 2012). Protein degradation is a major intracellular function, which is crucial for protein turnover and cellular viability, being the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the lysosome two of the main proteolytic systems (Chondrogianni et al., 2014; Ciechanover, 2012; Jung et al., 2009; Shang and Taylor, 2011; Turk et al., 2012). The ubiquitin proteasome system is a large protein complex located in cytoplasm and nucleus, formed by a catalytic central structure (20S) with multiple protease functions capped by two subunits (19S) that selectively regulate the entry of proteins (Glickman and Ciechanover, 2002; Jung et al., 2009). To be recognized, proteins are tagged by ubiquitin, a small-sized protein (Peters et al., 1994). The lysosomal system is considered a cellular organelle, also associated with autophagy processes (Mizushima, 2007) which has an elevated non-selective protein degradation capacity as a result of the combined random and limited action of various proteases, being the cathepsins family one of the most relevant in mammals (Chondrogianni et al., 2014; Kaushik and Cuervo, 2012) and also in fish (Salmerón et al., 2015a). If protein damage exceeds the repairing cell capacity or main protein degradation pathways are affected, accumulation of higher-molecular protein aggregates and impaired protein functions it is described, compromising cell viability, leading to cell death (Chondrogianni et al., 2014; Galluzzi et al., 2016).

In gilthead sea bream, Ibarz et al. (2010b), reported increased levels of liver lipoperoxidation and nitric oxide, as well as the increase of proteolysis after acute exposure at 8°C. Moreover, in seasonal studies in cages Richard et al., (2016) reported, in liver proteome, main affectation by winter season on intracellular oxidative stress related with disruption of endoplasmic reticulum protein folding. In the same way Mininni et al. (2014) described on liver transcriptome a scenario of oxidative stress and protein denaturation leading to cell death after 21 days at 6.8°C. As proteins are the major constituents of cellular organization and metabolism, effects on protein structure, stability and protein folding at transient low temperatures need broad consideration in this fish species. However, scarce data exist on protein turnover in liver related with temperature challenges. Kyprianou et al. (2010) described on several tissues increased HSP70 and HSP90 after 10 days of exposure at temperatures below 18°C. While, seasonal challenge in sea cages reported higher HSP

expression and activation of mitogen-activated protein kinases during warming in spring (Feidantsis et al., 2013). Regarding degradation pathways, Feidantsis et al. (2018), demonstrate gradual increase in ubiquitin conjugates when increasing water temperature and two peaks of increased autophagy pathway at the lowest and highest water temperatures during seasonal temperature variations. Due to the interests of the farming industry, the vast majority of protein turnover studies were performed in muscle. Salmerón et al. (2015) reported on gilthead that the main proteolytic pathways genes are coordinately regulated during ontogeny to control muscle growth and feeding regimes can modulate their expression. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fasting studies evidenced increased proteasome activity (Salem et al., 2007) whereas the mRNA expression of several UPS members were lower with re-feeding (Rescan et al., 2007; Seiliez et al., 2008). Also fasting and re-feeding respectively increased and decreased the mRNA expression of cathepsins B, D and S (Rescan et al., 2007).

In the present study, we aimed to determine the relationship between oxidative stress and protein homeostasis pathways in gilthead sea bream liver during low temperatures and recovery. To fulfil this aim, we focused on analysing 1) the oxidative stress via oxidised lipids and oxidised proteins 2) the antioxidant liver capacity via total glutathione and oxidised and reduced forms, and the main antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD, catalase, CAT, glutathione peroxidase, GPX and glutathione reductase, GR); 3) the refolding ability via the liver expression of HSP70, HSP90; and 4) some markers of the most relevant proteolytic pathways such as the ubiquitin-proteasome system (expression of 19S and 20S subunits of the proteasome and the polyubiquitination) and the lysosomal degradation (cathepsin D expression). Our results demonstrated that protein liver homeostasis was compromised at low temperatures and reverted after 30 days of temperature recovery.

Overall, our work will contribute to enlarge the scarce knowledge on the protein repairing/protection machinery and protein turnover in liver during low temperatures and recovery in fish and would improve in how to cope with the unproductive winter period at culture conditions.

Material and Methods

Animal maintenance and thermal fluctuation

Gilthead sea bream, 145 g body weight average, from a local fish farm were acclimated indoors at the Centre d'Aquicultura (CA-IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain) at 22 °C for two weeks using a standard commercial fish feed (Skretting_ARC). Following this period, they were randomly distributed in three 500-L fiberglass tanks (30 fish per tank) into a water recirculating system IRTAmar™, monitoring solid and biological filters, water temperature, and oxygen concentration and maintaining throughout the experimental period, nitrite, nitrate and ammonia concentrations at initial values. Feed was automatically delivered for 30 min in each feed session at 8:00 am and 16:00 pm, diet was provided from Skretting Aquaculture Research Centre (ARC) containing 47% of crude protein and 16% of lipid fraction. Satiety was ensured throughout experimental period by calculating estimated daily feed intake and allowing a ration 20% above this value. Feed delivery was recorded daily and uneaten feed was collected daily by the system and then manually dried and weighed to calculate real feed intake.

The experimental period (115 days) was comprised by three thermal periods: pre-cold (PC), during which the fish were maintained at 22°C for 30 days; cold (C), during which

the temperature was cooled to 14°C over five days and maintained at this temperature for a total of 50 days (including the cooling down period); and recovery, where fish were warming from 14°C to 22°C in five days. During recovery two sampling points were determined: the early recovery (ER) at day 7 of starting recovery and late recovery (LR) at day 35.

Sampling

At the end of each period, fish were overnight fasted before sampling. Nine fishes (3 per replicate tank) were captured at random and anesthetized with 2-phenoxyethanol (100 ppm) diluted in seawater. Body weight and length were measured, blood samples were taken from the caudal vessels, using EDTA-Li as anticoagulant, and fish were sacrificed by severing the spinal cord. Plasma was obtained by centrifuging the blood at 13000 g at 4 °C for 5 min, and then kept at -80 °C until analysis. Livers were removed and frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until homogenization. The experimental procedures complied with the Guidelines of the European Union Council (86 / 609 / EU), the Spanish Government (RD 1201 / 2005) and the University of Barcelona (Spain) for the use of laboratory animals.

Redox Metabolites

Lipid peroxidation was analysed using the TBARS assay and quantified by determining the concentration of the end reactive product malondialdehyde (MDA), according to (Sánchez-Nuño et al., 2018a). Briefly, liver was homogenised in 10% (w/v) RIPA solution (50 M Tris (pH 7.4), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 M NaF, 0.1% sodium dodecyl sulphate and 1% sodium deoxycholate) containing a commercial protease inhibitor cocktail. Suspensions were centrifuged at 2,000 g for 5 min, with the resulting pellet discarded. Plasma samples for TBARS assays were pre-diluted in PBS (10% w/v). The formation of the MDA-TBA adduct was fluorometrically measured at an excitation wavelength of 515 nm and an emission wavelength of 550 nm. The calibration curve was determined with tetraethoxypropane (Slikker et al., 2001). Values are expressed as MDA in nanomoles per gram of total lipids in the plasma or per mg of fresh liver weight.

AOPPs in liver homogenates were assayed using a modified version of Witko-Sarsat et al. (2003) adapted for fish (Sánchez-Nuño et al., 2018a). For sample preparation, the tissue was homogenised in PBS (10% w/v) and centrifuged at 5,000 g at 4°C for 10 min. Before testing, the liver samples were pre-diluted in PBS until a maximum concentration of 25 mg of protein per mL was obtained. AOPP formation was spectrophotometrically measured at 340 nm, involving a standard calibration curve using 100 µL of Chloramine-T solution (0–100 µmol/L). AOPP concentration was expressed as Chloramine-T nanomoles per mg of protein in liver.

Glutathione

Hepatic levels of reduced glutathione (GSH) and oxidised glutathione (GSSG) were evaluated using the procedure described by Hissin and Hilf, (1976) and adapted for gilthead sea bream (Sánchez-Nuño et al., 2018a). Liver samples were homogenised in cold buffer containing 5 mM phosphate-EDTA buffer (pH 8.0) and 25% HPO₃ (3.75:1). The homogenates were ultracentrifuged at 100,000 g at 4°C for 30 min and the resulting supernatants were used to determine GSH and GSSG concentrations, using the fluorescent probe o-phthalaldehyde (OPA). GSSG was previously incubated with N-ethylmaleimide to avoid interference with GSH complexes. After 15 min of incubation, fluorescence was determined at an emission wavelength of 420 nm (excitation at 350 nm) and data are shown

as GSH nanomoles or GSSG nanomoles per g of fresh weight and as total glutathione (TGSH = GSH + GSSG) and glutathione power (GSH/GSSG ratio).

Protein determination

The total amount of proteins in the liver and plasma was determined using the Bradford and Williams, (1976) protein assay adapted for a 96-well plate, with the Bradford reagent obtained from Bio-Rad (CA, USA) and using albumin to derive the standard curve.

Redox enzyme activities

Liver samples for enzyme analyses were pulverised in liquid nitrogen and homogenised with a 1:9 (w/v) cold buffer (100 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100 (v:v), pH 7.8). Homogenates were centrifuged at 25,000 g at 4°C for 30 min. After centrifugation, supernatants containing the protein extract were aliquoted and kept at -80°C until analysis.

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) hepatic activity was determined using the enzymatic method of McCord and Fridovich, (1969) and adapted for fish (Furné et al., 2009). A diluted aliquot was mixed with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mM EDTA, 1 mM cytochrome C, 1 mM xanthine, 0.5 IU/ml xanthine oxidase and sodium hydrosulphite. Enzyme activity was determined by increasing optical density at 550 nm in 180-second periods. Arbitrary units were defined as one activity unit corresponding to the amount of enzyme required to produce a 50% inhibition of the ferricytochrome-C reduction rate.

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) hepatic activity was analysed by following Aebi, (1984) with minor modifications, measuring the decrease in the optical density of hydrogen peroxide (H₂O₂) at 240 nm. The medium used for reading CAT activity was 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and a fresh solution of 10.6 mM H₂O₂.

Glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) activity was assayed by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm (Bell et al., 1985). Measurements were performed in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide, 0.5-1 U/ml glutathione reductase, 2 mM reduced glutathione and 0.1 mM NADPH.

Glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7) activity was measured by analysing NADPH oxidation at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1985). Assays were performed in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM EDTA, 0.63 mM NADPH and 3.25 mM oxidised glutathione.

All enzymatic analyses were performed in 96-well microplates at 25 ± 0.5°C with the Tecan M200 spectrophotometer (Tecan Trading AG, Switzerland). All reagents, substrates, coenzymes and purified enzymes were from Sigma (USA) and Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA). Except for SOD (explained before), enzymatic activities are shown as IU (CAT) or mIU (GPX and GR) per g of fresh liver weight, where one unit is defined as the amount of enzyme required to transform 1 µmol of the substrate per minute under the assay conditions.

Western Blot

Whole liver cell lysates were prepared by homogenizing the livers in: 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, supplemented with DTT, and protease inhibitors (final concentrations were 10 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL pepstatin, 2 µg/mL leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The samples were then centrifuged at 12,000 g for 10 min and the protein concentration measured in the supernatant. Supernatants were

treated with Laemmli loading buffer and 34 μg of proteins resolved on SDS-polyacrylamide (10%) gels and transferred to nitrocellulose. Membranes were then blocked for 1 h or overnight (depending on the antibody affinity) with 4% Non-Fat Dry Milk (BioRad) in Trisbuffered saline (TBS) (pH 7.4) containing 0.05% (w/v) Tween 20 (TTBS). Membranes were washed three times in TTBS and probed overnight or for 1 hour depending on the following primary antibodies: anti-HSP90, anti-HSP70, anti-4HNE (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-ubiquitin (Sigma-Aldrich), anti-cathepsin D (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany), anti-Rpt1 from 19S, and 20S proteasome core subunits ($\alpha 5/\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 5i$, and $\beta 7$) (Enzo life sciences). Detection was performed with anti-IgG-HRP for mouse, rabbit and goat (Santa Cruz Biotechnology). The blots were visualized with enhanced chemiluminescence (Clarity from Bio-Rad) and detected and scanned on Fujifilm LAS-3000 Imager (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). Digital images were quantified using Quantity One software (BioRad) and normalized by the total amount of protein detected by Ponceau S staining (Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

Statistical differences between the temperature periods for each diet were analysed by one-way nested analysis of variance (ANOVA), with tank as the random factor to test for the possible tank effect. When there was no tank effect, ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's post-hoc test was performed when variances were uniform or not, respectively. To compare diets within each period, Student's t-tests were performed. Differences were considered statistically significant when the p values were less than 0.05. The Shapiro-Wilk test was first used to ensure the normal distribution of the data, while the uniformity of the variances was determined by Levene's test. All statistical analyses were undertaken with commercial software (PASW version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Effects of temperature fluctuations on body parameters

Body weight, body length, condition factor as well as liver weight and hepatosomatic index (HSI) were summarized in Table 1. Body weight values showed no differences between Cold sampling (Day 80) and Pre-Cold (Day 30) evidencing a cold-induced growth. Concomitantly, higher liver weight and higher HSI were present during cold maintenance. Both, growth arrest and higher HSI reverted when temperature was recovered (Late Recovery).

Effects of temperature fluctuations on liver redox metabolites

Oxidised lipids, oxidised proteins and glutathione forms (total glutathione, reduced glutathione and oxidised glutathione) were also recorded in Table 1. Sustained low temperature of 14°C reduced the amount of oxidised lipids in liver by half, whereas oxidised proteins levels significantly increased a 50 %. Total glutathione was also reduced, significantly affecting its reduced form. Temperature recovery return higher values of oxidised proteins and lower values of oxidised lipids to pre-cold values at Late recovery sampling (30 days of recovery) while glutathione forms were early recovered. However, GSH/GSSG ratio was not completely reverted at the end of temperature fluctuation indicating a possible lower antioxidant power when comparing to pre-cold condition.

Effects of temperature fluctuations on hepatic enzyme activities

Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GR and GPX) in response to temperature changes are shown in Figure 1. Changes in the enzyme activities in response to the drop in temperature were due to the lack of adaptation to cold, with the only increase of GPX in the

enzyme levels to compensate for the reduced metabolism expected at low temperatures. CAT and GR maximal activities were reduced more than 50% in both cases. Together with the lower tGSH amounts, these results indicated that low temperatures reduced antioxidant protection in the liver. Temperature recovery gradually restored CAT activity; however, SOD activity drastically decreased by around 40% at the end of recovery period, and GR activity was not restored to pre-cold levels. GPX activity was maintained during temperature recovery, its activity was 30% higher than during the pre-cold period. As a result, GR/GPX ratio, an indicative of glutathione cycle, was reduced by half at low temperatures and did not restored after temperature warming. These results suggested a great alteration by low temperatures on glutathione cycle, affecting related-enzymes GR and GPX together with lower presence of total glutathione (GSH+GSSG). Although total glutathione amount was reverted, enzymes activities were not restored altering both GR/GPX and GSH/GSSG ratios.

Table 1. Morphometric parameters and hepatic redox metabolites of juvenile gilthead sea bream throughout temperature fluctuation.

	Pre-Cold (Day 30)		Cold (Day 80)		Early Recovery (Day 87)		Late Recovery (Day 115)	
Morphometric parameters								
<i>Body Weight</i>	179.4 ± 5.5	a	205.2 ± 5.9	ab	216.3 ± 9.1	b	271.8 ± 8.5	c
<i>Body Length</i>	18.1 ± 0.1	a	19.6 ± 0.3	b	19.5 ± 0.2	b	21.4 ± 0.2	c
<i>Condition Factor</i>	3.0 ± 0.1	a	2.7 ± 0.1	b	2.9 ± 0.1	ab	2.8 ± 0.1	ab
<i>Hepatosomatic Index</i>	1.8 ± 0.2	a	2.4 ± 0.1	b	2.4 ± 0.1	b	1.2 ± 0.1	c
Hepatic redox metabolites								
<i>Oxidised lipids</i>	10.1 ± 2.8	ab	4.4 ± 0.7	a	4.9 ± 1.7	a	15.0 ± 4.1	b
<i>Oxidised proteins</i>	3.0 ± 0.2	a	4.6 ± 0.3	b	4.9 ± 0.8	b	2.6 ± 0.9	ab
<i>Total GSH</i>	1316.9 ± 87.2	a	975.3 ± 54.1	b	1134.3 ± 56.6	ab	1243.3 ± 52.8	a
<i>GSH</i>	1125.2 ± 72.1	a	855.0 ± 57.8	b	940.3 ± 47.1	ab	1025.4 ± 49.6	ab
<i>GSSG</i>	191.7 ± 18.5	ab	169.9 ± 13.3	a	194.0 ± 15.2	ab	217.8 ± 11.4	b
<i>GSH/GSSG</i>	6.1 ± 0.4	a	5.1 ± 0.3	b	5.0 ± 0.3	b	4.8 ± 0.3	b

Data are expressed as Mean ± S.E.M.

Lowercase letters indicate significant differences between thermal periods within each diet ($p < 0.05$, One-Way ANOVA).

Growth parameters: Body weight (g), Body length (cm), Condition Factor (Body weight/Body length $^3 \times 100$), HSI = Hepatosomatic Index (Liver weight/Body weight);

Hepatic redox metabolites: Oxidised lipids (nmols MDA/mg fw), oxidised proteins (nmols chloramine-T/mg fw), total glutathione, GSH and GSSG (nmols/mg fw), GSH/GSSG (arbitrary units).

Liver expression of turn-over related proteins during thermal fluctuation

In this study, HSP70 and HSP90 liver expression were determined as related-refolding proteins with chaperone activity (Figures 2A and 2B) and proteasome 19S regulatory (Rpt1-19S) and proteasome 20S (Core 20S) catalytic subunits were determined as proteasomal activity (Figures 2C and 2D). At the end of the cold condition no changes were observed on relative expression of HSPs or proteasomal proteins, indicating again the lack of adaptation in response to low temperatures via up-regulated expressions. Interestingly, the ratio of 19S/20S (Figure 2E), an indicator of proteasome conformation, were modified from 2.23 ± 0.675 , to 4.22 ± 0.86 by cold, and being significant for Early recovery sampling by a reduction of 20S expression. That changes were reverted at the end of Late recovery.

Parallely to proteasome subunits expression a polyubiquitination study of liver proteins were performed for the first time in fish submitted to thermal fluctuations. Figure 3 showed a reference gel (10% SDS-PAGE) with polyubiquitinated-detected bands for the four samplings (PC, C, ER, LR). We determined the presence of 12 main bands with polyubiquitination response presents for all animals and samplings to be further analysed. Whereas total levels of polyubiquitination (Figure 3A) did not modified by temperature

fluctuations, three specific bands showed significant differences on their polyubiquitin-labelling. A high molecular weight band of 150kDa showed a doubled ubiquitination-label at low temperatures with respect pre-cold labelling (Figure 3B). Two bands with lower corresponding MWs (around 40kDa and 30kDa) evidenced lower labelling at low temperatures (Figures 3C and 3D, respectively). Early recovery did not revert the reported changes on UPS system of these specific labelled bands, and at late recovery only high-MW band reverted cold affectation while 40-kDa and 30kDa-bands did not resume labelling values of pre-cold sampling. These differences on polyubiquitin-labelling evidenced specific changes on protein turn-over at low temperatures and recover that could depend on specific protein MW.

Finally, protein degradation via lysosomal pathways was evaluated by the expression of liver cathepsin D. Figure 2F showed a greater affectation on liver cathepsin expression by temperature shift. Five weeks at low temperatures reduced five folds expression levels which are not able to be early increased by temperature warming. At the end of 30-days of recovery period liver cathepsin D expression were resumed to pre-cold values.

Discussion

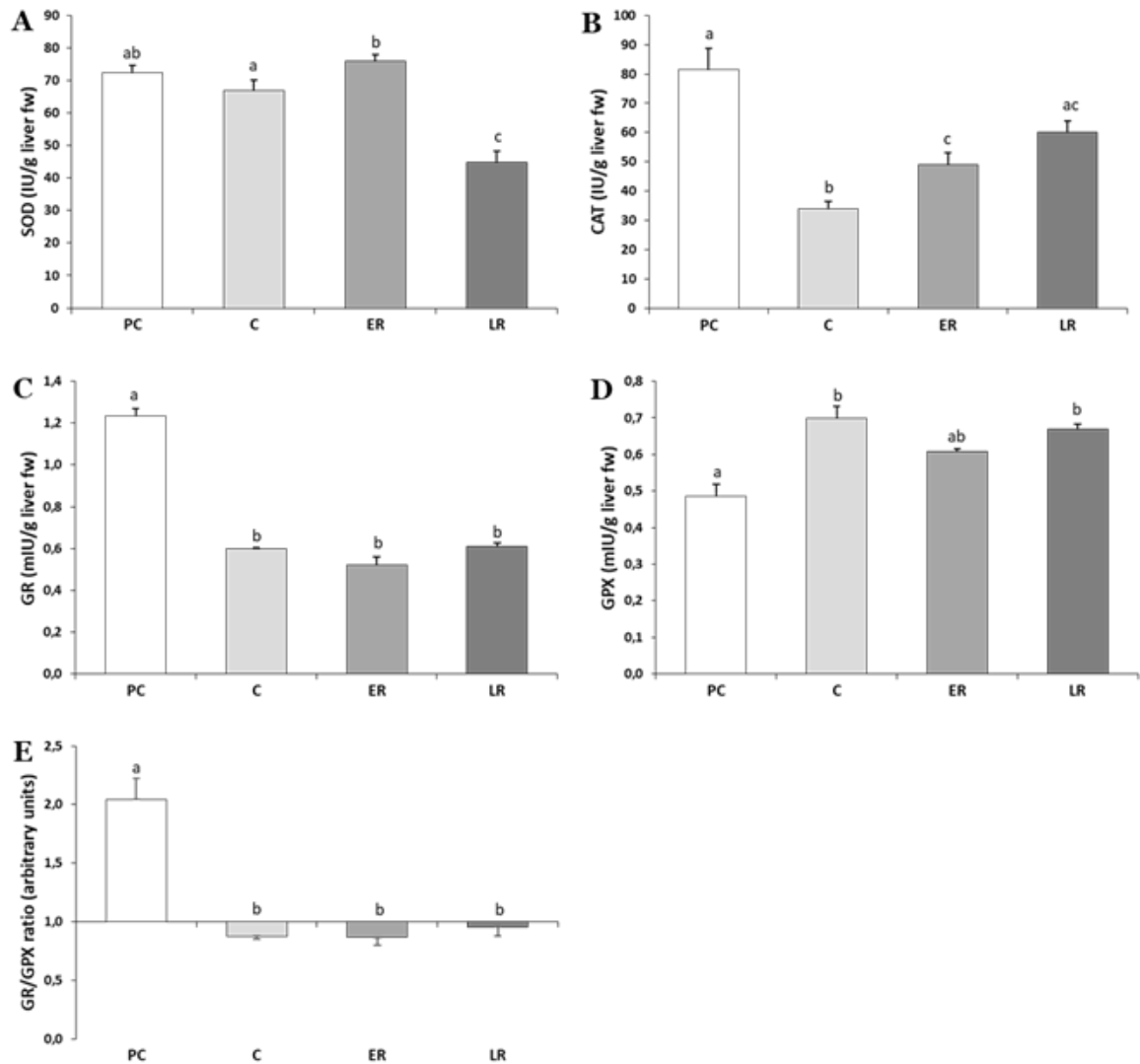
Gilthead sea bream is considered a strict poikilotherm specie, evidencing lack of metabolism adaptation to sustained induced cold temperatures affecting its aquaculture production and sustainability Ibarz et al., (2010a). In sea-cages productive conditions, seasonal low temperatures are unavoidable, and recent studies demonstrated that temperature restoration after cold season is a crucial period on the recovery of physiological condition and redox status (Richard et al., 2016; Sánchez-Nuño et al., 2018). Otherwise, thermal shift stress is related on triggering changes on liver proteome (Ibarz et al., 2010b) and liver transcriptome (Mininni et al., 2014). Latest authors described several cellular and organismal responses leading to the activation of a cascade of events that may provoke pathological conditions and ultimately to death, being the protein damage crucial on described affectations (Mininni et al., 2014). However, scarce studies referred to liver redox status and the analyses of protein damage, and its degradation and repairing pathways, which are the main focus of the current study.

Sustained low temperatures effects on liver protein homeostasis

The redox status is defined as the balance between oxidants (or pro-oxidants) and antioxidants. When this equilibrium is disrupted, tilting the equilibrium toward an oxidised state, oxidative stress is produced. Acute cold challenge in temperate fish could produce increased liver TBARS amounts (Ibarz et al., 2010b) or increased liver AOPPs amounts as a result of cold maintenance (Sánchez-Nuño et al., 2018). Current chronic low temperatures agree with previous results, being oxidised proteins accumulated in liver at the end of cold period in yeast (Isasa et al., 2015), in mammals (Carbonell et al., 2016; Selman et al., 2002) and also in fish (Sánchez-Nuño et al., 2018). In order to maintain low levels of oxidants, both enzymatic and non-enzymatic antioxidants are present in liver, also in fish (Martínez-Álvarez et al., 2005). Glutathione levels is the main endogenous non-enzymatic antioxidant (Masella et al., 2005) which resulted 20% diminished levels at current induced cold, mainly due to a fall in glutathione reduced form (GSH), as it was previously reported in gilthead sea bream (Sánchez-Nuño et al., 2018). By its way, main antioxidants enzymes, SOD, CAT, GR and GPX, analysed here evidenced again the lack of adaptation on liver enzyme activities, being CAT and GR two-fold reduced whereas SOD and GPX did not increase. Both lower

levels of non-enzymatic (glutathione) and enzymatic antioxidants would be on the origin of accumulative oxidised proteins in gilthead sea bream liver at cold.

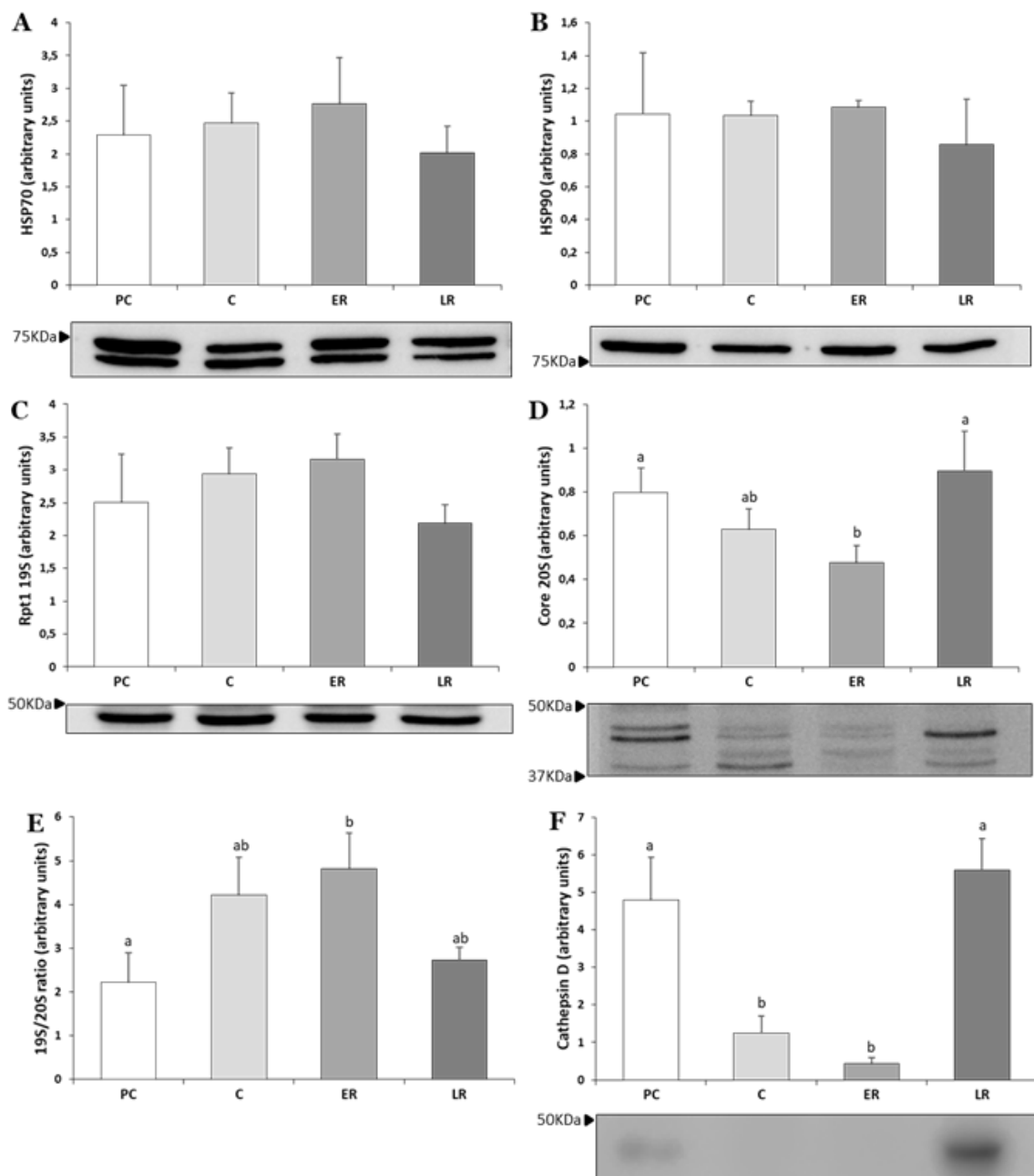
Figure 1. Activity of redox-associated enzymes throughout the study period. Values are mean \pm standard error of the mean. A) SOD; B) CAT; C) GR; D) GPX; E) GR/GPX ratio. Pre-Cold (PC), data obtained from day 30 of the pre-cold period at 22°C; Cold (C), data obtained after 50 days at 14°C (day 80); Early and Late Recovery (ER and LR respectively), data obtained 7 and 35 days after temperature restoration to 22°C (day 87 and 115), respectively. Lowercase letters indicate significant differences between the periods within each diet ($p < 0.05$, one-way ANOVA).



As proteins are very sensitive to oxidation, several cellular pathways to repair and eliminate damaged proteins exists in order to prevent its accumulation and aggregation (Berlett and Stadtman, 1997), since the aggregation of proteins is associated with large pathologies leading to cell death. One of the first mechanisms to cope with protein damage is binding with heat shock proteins (HSPs). Scarce data exist on liver HSPs expression in fish species, possible due to the lower hepatic expression of these chaperones (mainly HSP70) compared with other tissues such as muscles and gills (Feidantsis et al., 2013; Place and Hofmann, 2005). Our results evidenced that current chronic exposition to 14°C did not evidences changes on HSP70 and HSP90 liver expressions coinciding with a seasonal study performed in sea cages by Feidantsis et al., (2013) where authors reported no increments

on both chaperones, even lower levels of HSP90. According to cold-induced hepatic depression (reviewed in Ibarz et al., 2010a), same levels of chaperones would imply lower ability to refolding or, at least, this refolding would succeed at lower velocity.

Figure 2. Expression of chaperone HSPs, UPS and Cathepsin D. Western blot was normalised by the total protein amount with Ponceau staining. Data are shown as arbitrary units as mean \pm standard error of mean. A) HSP70; B) HSP90; C) Rpt1 19S proteasome regulatory subunit; D) 20S proteasome core; E) 19S/20S ratio; F) Cathepsin D. Pre-Cold (PC), data obtained from day 30 of the pre-cold period at 22°C; Cold (C), data obtained after 50 days at 14°C (day 80); Early and Late Recovery (ER and LR respectively), data obtained 7 and 35 days after temperature restoration to 22°C (day 87 and 115), respectively. Lowercase letters indicate significant differences between thermal periods ($p < 0.05$, One-Way ANOVA)



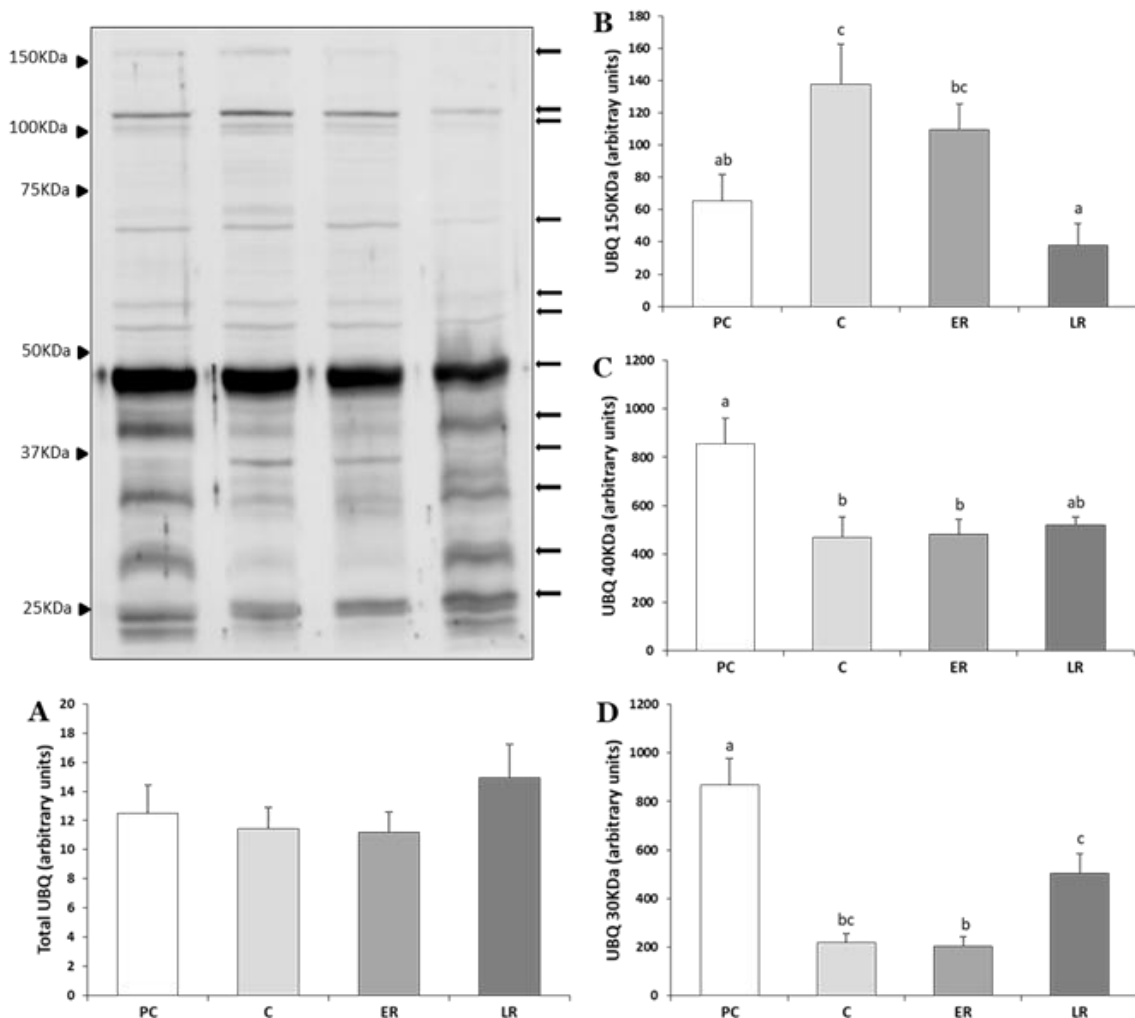
If a protein was irretrievably damaged its fate is to be recycled via ubiquitin proteasome system (UPS) degradation pathways, or to be removed/autophaged via lysosomal degradation process. Degradation of a protein via UPS involves two discrete and successive steps: tagging of the substrate protein by the covalent attachment of multiple ubiquitin molecules and the subsequent degradation of the tagged protein by the 26S proteasome, composed of the catalytic 20S core and the 19S regulator (Hershko and Ciechanover, 1998). The removing capacity of damaged proteins by proteasome may prevent oxidative stress and it has been suggested to be also part of the antioxidant defense (Jung et al., 2009). In fish, this enzymatic complex could play a key role in the antioxidant defense systems in fish inhabiting permanently cold marine environments (Gogliettino et al., 2016). Here we analysed both polyubiquitination and proteasomal subunits 20S and 19S functions on gilthead sea bream in response to low temperatures. Total amount of liver ubiquitinated proteins was not altered after 50 days of cold exposure. These results agreed with those obtained for cultured sea bream during cold season (Feidantsis et al., 2018). According to our results, it has been described that marine fish adapted to polar temperatures exhibit high levels of ubiquitin-conjugated proteins (Todgham et al., 2007).

In order to achieve the real scope of this process, we performed the analysis of the most relevant individual polyubiquitinated bands for the first time in fishes. In the view of our results a different pattern of ubiquitination depending on the molecular weight would exist on liver under cold, being the high-MW proteins (100kDa) more tagged, than low-MW proteins whose were significantly lower tagged at cold. No literature on fishes tackled on specific ubiquitination of proteome bands and further knowledge should be necessary to elucidate the relevance of higher labelling of higher-MW proteins. In mammals existed a controversy on the relationship of protein mass and the rate of its turn-over; classically, it was considered that suggested that high molecular weight proteins tend to be turned over more rapidly than low molecular weight proteins (Dice and Goldberg, 1975). However, recent studies using dynamic label techniques, such as SILAC, suggested that the degree of disorder in a protein was a dominant determinant of protein stability (Belle et al., 2006; Doherty et al., 2009). To regard specific degradation via proteasomal complex, we determined that the classical value for the ratio 19S/20S subunits of 2 forming the 26S proteasome (Peters et al., 1994) were also present in gilthead sea bream but were drastically modified in response to cold by the reduction of the catalytic subunit 20S. Again, in response to low temperatures a depressed condition was evidenced in any metabolic activity, here for the 20S proteasomal subunit. Gogliettino et al. (2016) performed a comparative analysis, in a variety of tissues collected from an Antarctic fish, *T. bernacchii*, and temperate fish, *Dicentrarchus labrax*, reporting a better efficiency of its degradation machinery in the cold-adapted fish. This was not the case of gilthead sea bream submitted at low temperatures, which manifested lower antioxidant capacity, higher oxidant attack on liver proteins, lack of acclimation response of HSPs chaperone activity and lower expression on catalytic 20S proteasomal subunit.

Finally, in this study we analysed the lysosomal degradation pathways via cathepsin D expression, an aspartic peptidase classed in the pepsin family of proteases, considered as a major lysosomal endopeptidase in the liver of many species, including fish (Brooks et al., 1997). Our results showed a drastic reduction on cathepsin D expression in liver at the end of the cold period. In fish the vast majority of studies on the lysosomal pathway have been focused in muscle tissue and, mainly studying fasting conditions. Salmerón et al., (2015) in gilthead sea bream or Cassidy et al. (2018) in Arctic charr reported higher expression of distinct cathepsins under fasting, including cathepsin D in muscle, and Guderley et al. (2003) reported in cod higher expression of cathepsin D also in liver under fasting.

Although, the induced cold-temperatures in gilthead sea bream provoked lower ingesta, even fasting below 13°C (reviewed in Ibarz et al., 2010a), current study demonstrated that low temperatures drastically reduced cathepsin D activity and in consequence, the cell autophagy pathway of the liver.

Figure 3. Expression of protein ubiquitination labelling in liver during thermal fluctuation. Total ubiquitination as well as the 12 major bands were analysed (arrows indicate the analysed bands). Total ubiquitin and each selected band of the Western blot were normalised by the total protein amount with Ponceau staining. Data are shown as arbitrary units as mean \pm standard error of mean. A) Total ubiquitin; B) Ubiquitinated 150KDa band; C) Ubiquitinated 40KDa band; D) Ubiquitinated 30KDa band. Pre-Cold (PC), data obtained from day 30 of the pre-cold period at 22°C; Cold (C), data obtained after 50 days at 14°C (day 80); Early and Late Recovery (ER and LR respectively), data obtained 7 and 35 days after temperature restoration to 22°C (day 87 and 115), respectively. Lowercase letters indicate significant differences between thermal periods ($p < 0.05$, One-Way ANOVA).



Temperature recovery effects on liver protein homeostasis

Previous studies have highlighted the importance of focusing on the recovery mechanisms in gilthead sea bream after the cold season (Ibarz et al., 2007a, 2010a; Tort et al., 2004). In previous works, we demonstrated that whereas liver intermediary metabolism is restored after cold season antioxidant mechanisms showed an incomplete recovery after 30 days at

22°C (Sánchez-Nuño et al., 2018). In the same way, current study showed the reversion of cold effects on redox status (oxidised lipids, oxidised proteins and glutathione) at late recovery sampling, except for the GR/GPX ratio, conditioning the glutathione cycle, which remained diminished with respect pre-cold values.

To regard specific mechanisms related to protein homeostasis, all of them seemed to be reverted or recovered at the end of recovery period. Since HSP70 and HSP90 expressions were not modified by cold, we assumed that their activity was only depending of temperature during warming. Curiously, HSPs family were firstly described as protective against thermal stress due to a temperature increase. In our study, warming from 14°C to 22°C did not increase liver chaperones. In contrast, red muscle, white muscle and heart of gilthead sea bream under indoor conditions evidenced higher HSP70 and HSP90 expressions against higher temperatures (Feidantsis et al., 2009), as well as in a seasonal experiment under culture conditions reaching its highest levels in early spring or peaked in early May after temperature was increased (Feidantsis et al., 2013). The reduction of oxidised proteins seems to be time depending, being seven days insufficient to revert cold oxidative attack in liver. In consonance, ubiquitin tagged proteins during Early Recovery did not modify with respect Cold. At the end of recovery time, ubiquitin-tagging of high-MW proteins reverted but low-MW proteins were still lower destined to be recycled. Feidantsis et al. (2018) on a seasonal trial in cages reported a gradual increase of total ubiquitin conjugates from April to June in heart and liver due to a higher metabolic activity. Again, more studies will be necessary to better understand the specific response of ubiquitin tagging with respect to protein MW. As other enzymes activities, proteasomal 20S subunit expression, depressed at low temperatures, was recovered at late recovery, restoring liver recycling capacity via proteasome pathway. Scarce data exist on proteasome expression in liver during warming in fish. Dorts et al. (2012) described in *Cottus gobio* increased proteasome activity in liver and gill after the exposure to elevated temperature and Lamarre et al. (2010) observed increased activity in liver of the wolffish (*Anarhichas minor*) acclimated to high temperature. Finally, the lysosomal activity was also lately reverted, recovering cathepsin D expression to pre-cold values. In agreement, Feidantsis et al. (2018) reported that liver lysosomal autophagy activities follow seasonal dynamics being the highest values in June after the temperature recovery. All these findings suggest that altered protein homeostasis during cold-induced temperatures would be a transient condition for gilthead sea bream. However, the disturbances on protein turn-over could affect the key functions of liver during cold season and would be on the basis of the liver associated pathologies of gilthead sea bream culture (reviewed in Ibarz et al., 2010a).

Our findings suggest an enhanced response on protein protection and degradation in front of thermal variations. In this way some authors suggested enhanced and crosslinked responses between HSPs, UPS and lysosomes: HSP70 has been related with dissociation and re-association of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress (Grune et al., 2011) and in mammals some authors coincide with the linked action of UPS and lysosome (Chondrogianni et al., 2014; Ciechanover, 2012). Thus, further studies will be necessary to establish links between proteolytic pathways in fish and to elucidate its relevance on hepatic protein homeostasis and redox during thermal fluctuations.

Conclusions

This study evidenced for the first time in fish that of 50 days of cold exposure at 14°C compromised protein homeostasis after cold period, reverting after 30 days of temperature recovery. Cold exposure depressed enzymatic antioxidant defenses and glutathione redox cycle, and downregulated the expression of proteasome 20S core subunit (altering its

normal formation) and lysosomal cathepsin D protease expression. Recovery of temperatures contributed to revert the cold altered situation in liver, being necessary one month of warming.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Spanish government (AGL2011-29873).

References

- Abele, D., and Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 138, 405–415. doi:10.1016/j.cbpb.2004.05.013.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W., and Shanks, A. M. (1985). Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 53, 149. doi:10.1079/BJN19850019.
- Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R., and O’Shea, E. K. (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13004–9. doi:10.1073/pnas.0605420103.
- Benarroch, E. E. (2011). Heat shock proteins: Multiple neuroprotective functions and implications for neurologic disease. *Neurology* 76, 660–667. doi:10.1212/WNL.0b013e31820c3119.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313.
- Bradford, M. M., and Williams, W. L. (1976). New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination. *Fed. Proc.* 35, 274.
- Brooks, S., Tyler, C. R., Carnevali, O., Coward, K., and Sumpter, J. P. (1997). Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* 201, 45–54. doi:10.1016/S0378-1119(97)00426-5.
- Carbonell, T., Alva, N., Sanchez-Nuño, S., Dewey, S., and Gomes, A. V. (2016). Subnormothermic Perfusion in the Isolated Rat Liver Preserves the Antioxidant Glutathione and Enhances the Function of the Ubiquitin Proteasome System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–12. doi:10.1155/2016/9324692.
- Carlberg, I., and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Cassidy, A. A., Blier, P. U., Le François, N. R., Dionne, P., Morin, P. J., and Lamarre, S. G. (2018). Effects of fasting and refeeding on protein and glucose metabolism in Arctic charr. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 226, 66–74. doi:10.1016/J.CBPA.2018.08.010.
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., et al. (2014). Molecular Aspects of Medicine Protein damage , repair and proteolysis. *Mol. Aspects Med.* 35, 1–71. doi:10.1016/j.mam.2012.09.001.
- Ciechanover, A. (2012). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin–proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 3–13. doi:10.1016/J.BBAPAP.2011.03.007.

- Dice, J. F., and Goldberg, A. L. (1975). A statistical analysis of the relationship between degradative rates and molecular weights of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 213–219. doi:10.1016/0003-9861(75)90112-5.
- Doherty, M. K., Hammond, D. E., Clague, M. J., Gaskell, S. J., and Beynon, R. J. (2009). Turnover of the Human Proteome: Determination of Protein Intracellular Stability by Dynamic SILAC. *J. Proteome Res.* 8, 104–112. doi:10.1021/pr800641v.
- Dorts, J., Bauwin, A., Kestemont, P., Jolly, S., Sanchez, W., and Silvestre, F. (2012). Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 318–324. doi:10.1016/j.cbpc.2011.10.003.
- Feder, M. E., and Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Lazou, A., Kostoglou, B., and Michaelidis, B. (2009). Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata* during long-term exposure to increasing temperatures. *Mar. Biol.* 156, 797–809. doi:10.1007/s00227-009-1135-z.
- Feidantsis, K., Antonopoulou, E., Lazou, A., Pörtner, H. O., and Michaelidis, B. (2013). Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 183, 625–639. doi:10.1007/s00360-012-0735-y.
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Vlachonikola, E., Antonopoulou, E., and Michaelidis, B. (2018). Seasonal Changes in Metabolism and Cellular Stress Phenomena in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Physiol. Biochem. Zool.* 91(3), 878–895. doi:10.1086/697170.
- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J., et al. (2009). Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 15, 587–595. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00626.x.
- Gallardo, M. Á., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padrós, F., Blasco, J., Fernández-Borràs, J., et al. (2003). Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223, 15–27. doi:10.1016/S0044-8486(03)00164-9.
- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., and Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 44, 221–231. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.020.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428. doi:10.1152/physrev.00027.2001.
- Gogliettino, M., Balestrieri, M., Riccio, A., Facchiano, A., Fusco, C., Palazzo, V. C., et al. (2016). Uncommon functional properties of the first piscine 26S proteasome from the Antarctic nototheniid *Trematomus bernacchii*. *Biosci. Rep.* 36, BSR20160022. doi:10.1042/BSR20160022.
- Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A. M., Ngo, J. K., et al. (2011). HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1355–1364. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.06.015.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., and Dutil, J. D. (2003). Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 135, 347–356. doi:10.1016/S1095-6433(03)00089-8.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.

- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., and Sánchez, J. (2003). Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 313–321. doi:10.1007/s10695-004-3321-8.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., and Blasco, J. (2007a). Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.008.
- Ibarz, A., Blasco, J., Sala-Rabanal, M., Gallardo, Á., Redondo, A., and Fernández-Borràs, J. (2007b). Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting and their capacity for recovery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 1034–1042. doi:10.1139/f07-079.
- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M. Á., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., and Tort, L. (2010a). Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-induced alterations and “Winter Syndrome.” *Rev. Fish Biol. Fish.* 20, 539–556. doi:10.1007/s11160-010-9159-5.
- Ibarz, A., Martín-Pérez, M., Blasco, J., Bellido, D., de Oliveira, E., and Fernández-Borràs, J. (2010b). Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. *Proteomics* 10, NA-NA. doi:10.1002/pmic.200900528.
- Isasa, M., Rose, C. M., Elsasser, S., Navarrete-Perea, J., Paulo, J. A., Finley, D. J., et al. (2015). Multiplexed, Proteome-Wide Protein Expression Profiling: Yeast Deubiquitylating Enzyme Knockout Strains. *J. Proteome Res.* 14, 5306–5317. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00802.
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., and Nakano, K. (2004). Are hsp90s suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.* 207, 15–9. doi:10.1242/JEB.00707.
- Jung, T., Catalgol, B., and Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* 30, 191–296. doi:10.1016/j.mam.2009.04.001.
- Kassahn, K. S., Crozier, R. H., Pörtner, H. O., and Caley, M. J. (2009). Animal performance and stress: Responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biol. Rev.* 84, 277–292. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x.
- Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417. doi:10.1016/j.TCB.2012.05.006.
- Kyprianou, T. D., Pörtner, H. O., Anestis, A., Kostoglou, B., Feidantsis, K., and Michaelidis, B. (2010). Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: An analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 180, 1005–1018. doi:10.1007/s00360-010-0481-y.
- Lamarre, S. G., Blier, P. U., Driedzic, W. R., and Le François, N. R. (2010). White muscle 20S proteasome activity is negatively correlated to growth rate at low temperature in the spotted wolffish *Anarhichas minor*. *J. Fish Biol.* 76, 1565–1575. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02581.x.
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., and Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88. doi:10.1007/s11160-005-7846-4.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16, 577–586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). The Utility of Superoxide Dismutase Studying Free Radical Reactions. *J Biol Chem* 244, 6056–6063.

- Mininni, A., Milan, M., Ferraresso, S., Petochi, T., Di Marco, P., Marino, G., et al. (2014). Liver transcriptome analysis in gilthead sea bream upon exposure to low temperature. *BMC Genomics* 15, 765.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–73. doi:10.1101/gad.1599207.
- Peters, J. M., Frankie, W. W., and Kleinschmidt, J. A. (1994). Distinct 19-S and 20-S Subcomplexes of the 26-S Proteasome and their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269, 7709–7718.
- Place, S. P., and Hofmann, G. E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, *hsp70*, in phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biol.* 28, 261–267. doi:10.1007/s00300-004-0697-y.
- Rescan, P.-Y., Montfort, J., Ralli re, C., Le Cam, A., Esquerr e, D., and Hugot, K. (2007). Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule. *BMC Genomics* 8, 438. doi:10.1186/1471-2164-8-438.
- Richard, N., Silva, T. S., Wulff, T., Schrama, D., Dias, J. P., Rodrigues, P. M. L., et al. (2016). Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: Associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. *J. Proteomics* 142, 1–14. doi:10.1016/j.jprot.2016.04.037.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C. E., and Yao, J. (2007). Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8, 328. doi:10.1186/1471-2164-8-328.
- Salmerón, C., Navarro, I., Johnston, I. A., Gutiérrez, J., and Capilla, E. (2015). Characterisation and expression analysis of cathepsins and ubiquitin-proteasome genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) skeletal muscle. *BMC Res. Notes* 8. doi:10.1186/s13104-015-1121-0.
- Sánchez-Nu o, S., Sanahuja, I., Fer ndez-Alacid, L., Ord n ez-Grande, B., Fontanillas, R., Fernández-Borr s, J., et al. (2018). Redox challenge in a cultured temperate marine species during low temperature and temperature recovery. *Front. Physiol.* 9, 923. doi:10.3389/FPHYS.2018.00923.
- Seiliez, I., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Fricot, A., Vachot, C., Kaushik, S., et al. (2008). Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J. Nutr.* 138, 487–491. doi:138/3/487 [pii].
- Selman, C., Grune, T., Stolzing, A., Jakstadt, M., McLaren, J. S., and Speakman, J. R. (2002). The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis*. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 259–265. doi:10.1016/S0891-5849(02)00874-2.
- Shang, F., and Taylor, A. (2011). Ubiquitin–proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 5–16. doi:10.1016/j.FREERADBIOMED.2011.03.031.
- Slikker III, W., Desai, V. G., Duhart, H., Feuers, R., and Imam, S. Z. Hypothermia enhances *bcl-2* expression and protects against oxidative stress-induced cell death in chinese hamster ovary cells.
- Todgham, A. E., Hoaglund, E. A., and Hofmann, G. E. (2007). Is cold the new hot? Elevated ubiquitin-conjugated protein levels in tissues of Antarctic fish as evidence for cold-denaturation of proteins in vivo. *J. Comp. Physiol. B* 177, 857–866. doi:10.1007/s00360-007-0183-2.
- Tort, L., Balasch, J. C., and Mackenzie, S. (2004). Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contrib. to Sci.* 2, 443–454.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., et al. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 68–88. doi:10.1016/j.bbapap.2011.10.002.

Viarengo, A., Canesi, L., Garcia Martinez, P., Peters, L. D., and Livingstone†, D. R. (1995). Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 111, 119–126. doi:10.1016/0305-0491(94)00228-M.

Witko-Sarsat, V., Gausson, V., Nguyen, A.-T., Touam, M., Drüeke, T., Santangelo, F., et al. (2003). AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: A potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 64, 82–91. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00044.x.

CAPÍTULO IV

Modulation of pituitary response throughout a temperature fluctuation challenge on gilthead sea bream.

Sergio Sánchez-Nuño¹, Pedro M. Guerreiro², Sandra Silva², Ignasi Sanahuja¹, Borja Ordóñez-Grande¹, Laura Fernández-Alacid¹, Antoni Ibarz^{1*}

¹Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain.

²Centre for Marine Sciences, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal.

*corresponding author: tibarz@ub.edu

Abstract

Low temperatures provoke drastic reduction in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) activity and nourishment, leading to growth arrest and a halt in production. Despite some recent studies focused on understanding metabolism and redox affectation on sea bream aquaculture, scarce data exist on the implication of central core control at cold season. The aim of this work was to study the effects of low temperature and its recovery on the pituitary activity of sea bream juveniles fed with two isoproteic diets reducing dietary lipid content (from 18% to 14%). A controlled indoor trial was performed simulating natural temperature fluctuation for an extended interval of 115 days, comprising a pre-cold period (35 days at 22°C, a cold period (50 days at 14°C) and a recovery period (30 days at 22°C). To fulfil this objective, we determined the regulatory role of pituitary analysing the gene expression by RT-PCR of some pituitary hormones and hormone receptors, after an overnight fasting to avoid daily rhythms. Plasma metabolites (glucose, lactate, non-esterified fatty acids and triacylglycerides) as well as plasma levels of thyroidal hormones were analysed as peripheral response together with the known data on growth and metabolism. In response to higher dietary lipids, pituitary expression of growth hormone (GH), thyroid stimulating hormone (TSH), and proopiomelanocorticotrophin peptides (POMCA and POMCB) were up-regulated before the morning ingesta, at each thermal period. However, plasma markers, growth and metabolism did not reflect that higher pituitary activity. Induced low temperatures and associated reduced ingesta modulated pituitary function up-regulating GH and TSH and thyroid receptors alpha (TR α) and beta (TR β) and glucocorticoid receptor (GR). These results would demonstrate pituitary ability to respond to external and internal inputs at cold, despite the drastic fall of the peripheral tissues responses and the growth arrest. Gradual reestablishment of the temperature to 22°C were studied as early recovery (7 days) and late recovery (30 days). Temperature and ingesta recovery reverted cold TSH up-regulation in 7 days whereas GH and thyroid receptors expression reversion were delayed. Interestingly, a transitory POMC peptides up-expression were evidenced for lower lipid diet at early recovery together with sustained levels of three studied receptors, which could be related to the stressor condition reported for this diet with respect to fed higher lipid amount. All these findings evidenced the capacity of pituitary to recognize and modulate its response to external inputs such as the temperature fluctuation and dietary energy and the internal inputs such as metabolism depression. However, growth performance, peripheral tissues and metabolism were unlinked or disconnected to pituitary function at low temperatures which open an

interesting field of study to interpret hypothalamus-pituitary-targets axis during temperature fluctuation in fish.

Keywords: Low temperatures, recovery, pituitary, *Sparus aurata*

Introduction

Fish are directly exposed to fluctuations of water temperature, which can be dramatic and fatal according to the range of their thermotolerance, even causing winter mortalities, a phenomenon already reported for a large number of fish species (reviewed by Hurst, 2007). Although extreme cold shock is, in some cases, the direct cause of mortality, growing evidence indicate thermal stress and starvation as the major underlying physiological conditions of the mortality of over-wintering fishes (Donaldson et al., 2008). In aquaculture, despite the significant bottleneck created by cold suppressed appetite and growth, relatively few studies exist. In the Mediterranean Sea, wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) normally experience water temperatures ranging from 11°C in winter to 26°C in summer and they migrate to greater depth and warm waters when surface temperatures start to decline (Davis, 1988). However, in intensive culture, fish are unable to escape and the temperature decrease during winter becomes critical (reviewed by Ibarz et al., 2010a); at low temperatures, fish activity and growth are minimal (Ibarz et al., 2003; Sarusic, 1999; Tort et al., 1998a) and a drastic reduction in nourishment is observed leading to growth arrest and a halt in production (Tort et al., 1998b). Although compensatory responses have been demonstrated in many fish, there is no significant thermal compensation under cold conditions on gilthead sea bream at temperatures below 13-14°C (reviewed in Ibarz et al., 2010a). The first sign of cold stress in fishes is the reduced food intake (Elliot, 1991), in sea bream the reluctance to feed did not depend on the rate of temperature drop and feeding did not recover during extended periods at constant low temperatures (Ibarz et al., 2007a, b). Both global metabolic rate and hepatic enzymes activities were greatly depressed at low temperatures (Ibarz et al., 2003, 2005, 2007a). The osmoregulatory capacity was also impaired showing a seasonal dependence in culture condition with higher values of osmolality and main ions concentration in summer than in winter (Polakof et al., 2006; Sangiao-Alvarellos et al., 2003). Moreover, induced temperature fluctuations of water temperature in indoor studies determined an increased dietary energy during temperature recovery to guarantee liver condition and a mineral supplementation to maintain osmoregulatory and bone formation (Sánchez-Nuño et al., 2018)

The master control of external inputs, internal condition and body response is mediated by hypothalamus-pituitary axis as a central core which regulates the peripheral behaviour. The pituitary gland is an intermediary organ for physiological signal exchanges between the hypothalamus and the peripheral organs, and acts as a key regulator during development, stress, and other physiological processes. However, scarce studies refer to the winter hormonal inhibition of feeding and growth in gilthead sea bream and, from our knowledge, none studies tackled on winter growth arrest and recovery of gilthead sea bream. Mingarro et al. (2002) reported an increased release of somatotropic hormones preceded always warm growth spurts, whereas somatolactin circulating levels rose at late autumn in concurrence with low plasma cortisol levels. In gilthead sea bream, as in other

fish species, the circulatory levels of both thyroid hormones, triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine or thyroxine (T4), are reduced during induced food restriction whereas only T3 recovered after one-week refeeding (Power et al., 2000a), but not data exists on low temperatures affectations for this species. Moreover, low temperatures and the induced fasting are described also as a stressor factor, gradually or acutely achieved (reviewed in Ibarz et al., 2010a). The stress response is also driven by pituitary via expression of proopiomelanocorticotrophin(POMC)-derived peptides. Whereas extended literature linked the stress axis to fish confinement conditions, fish density, crowding, handling, etc., only one study under laboratory conditions reported in sea bream the interaction between low temperatures and the pituitary-inter-renal axis, showing a rapid, but transient, release of cortisol and adrenocorticotropin after a drop in water temperature from 18 to 9°C (Rotllant et al., 2000). By all explained below, no data existed on the direct pituitary response to environmental challenges such as low temperatures and recovery in culture conditions, one of the main concerns of gilthead sea bream production (Ibarz et al., 2010a).

Fish diet formulation at low temperatures is still relevant and controversial concern in sea bream. High quality lipids (fish oil rich in polyunsaturated fatty acids) promote fish growth, but diets with high lipid content in the winter or pre-winter season appear to increase the incidence of pathologies associated with low temperatures (Ibarz et al., 2010b). We recently observed that reducing dietary lipids and, consequently dietary energy, did not affect gilthead sea bream performance during thermal fluctuation in indoor conditions but altered both intermediary metabolism and redox status in liver (Sánchez-Nuño et al., 2018). However, there is some evidence that despite not observing changes in growth, there may be changes in hormonal gene expression concerning dietary formulation in several fishes. Ganga et al. (2006) suggested that the synthesis and secretion of ACTH-induced cortisol in interrenal cells of sea bream is conditioned by some essential lipids, and Gómez-Requeni et al. (2012) evidenced in pejerrey juveniles (*Odontesthes bonariensis*) a differential response of GH-IGF system to cope changes in dietary lipid composition despite the lack of (or in advance to) a clear response of somatic growth.

Most of the studies above-mentioned tackled on circulatory levels of target hormones but not on regulatory role of pituitary by itself, and no studies reported the pituitary functionality during low temperatures and recovery challenge and their implication on winter growth arrest of the gilthead sea bream culture. The present study aims to approach, for the first time, the gilthead sea bream pituitary modulation in response to an induced temperature fluctuation, divided in three thermal periods, pre-cold (30 days at 22°C), cold (50 days at 14°C), and recovery (35 days at 22°C), and under two dietary regimens reducing the lipid amount from 18% to 14%. To fulfil these aims, the pituitary function was approached by measuring hormone expression and receptors expression via RT-PCR, as indicators of central response to dietary lipid change and temperature fluctuation. The selected hormones were the thyroid stimulating hormone, the growth hormone and two forms of proopiomelanocorticotrophin (POMC): the so-called sbPOMC α 1 or POMCA and sbPOMC α 2 or POMCB (described in gilthead sea bream by Cardoso et al., 2011). The selected pituitary receptors were the glucocorticoid receptor and the thyroid receptors TR α and TR β . Moreover, plasma metabolites and thyroid hormones T3 and T4 levels were also measured. The thermal fluctuation trial provoked the expected growth arrest at low temperatures and revealed the capacity of pituitary to modulate its response

to both diet and temperature challenges, being apparently unlinked to the depressed peripheral response.

Material and Methods

Animal conditions and sampling

Gilthead sea bream, 145 g body weight average, from a local fish farm were acclimated indoors at the Centre d'Aquicultura (CA-IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain) at 22°C for two weeks using a standard commercial fish feed (Skretting ARC). Following this period, they were randomly distributed into 2 experimental groups per triplicate (30 fish per tank) into a water recirculating system IRTAmar™. Fifteen 500-L fiberglass tanks were used monitoring solid and biological filters, water temperature, and oxygen concentration and maintaining throughout the experimental period, nitrite, nitrate and ammonia concentrations at initial values. Two isoproteic diets formulated by Skretting ARC reducing their lipid content (from 18% to 14% of lipid content, diets D18 and D14, respectively) were used, corresponding to a “crude energy” of 20.2 and 21.0 MJ/kg dry matter, respectively. Fish were fed to satiation twice a day, 7 days per week for 115 days-total extended period. Feed was automatically delivered for 30 min in each feed session at 8:00 am and 16:00 pm. Satiation was ensured throughout experimental period by calculating estimated daily feed intake and allowing a ration 20% above this value. Feed delivery was recorded daily and uneaten feed was collected daily by the system and then manually dried and weighed to calculate real feed intake.

The experimental period (115 days) consisted of three thermal periods (Fig. 1): pre-cold (PC), during which the fish were maintained at 22°C for 30 days; cold (C), during which the temperature was cooled to 14°C over five days and maintained at this temperature for a total of 50 days (including the cooling down period); to better understand the recovery period we performed two sampling moments, early recovery (ER), during which the temperature was restored to 22°C over five days and measurements were taken seven days after the start of the temperature recovery; and late recovery (LR), for which measurements were taken 35 days after the start of temperature recovery.

Fish sampling

At the end of each temperature period, fish were fasted overnight before sampling and nine fish (3 per replicate tank and diet) were captured at random and anaesthetised with 2-phenoxyethanol (100 ppm) diluted in seawater. Body weight and length were measured, blood samples were taken from the caudal vessels using EDTA-Li as the anticoagulant, and the fish were sacrificed by severing the spinal cord. Plasma was obtained by centrifuging the blood at 13,000 g at 4°C for 5 min and samples were kept at -80°C until analysis. Liver and perivisceral weight were also recorded. The study complied with the guidelines of the European Union Council (86/609/EU), the Spanish Government (RD 1201/2005) and the University of Barcelona (Spain) regarding the use of laboratory animals.

Plasma metabolites and thyroid hormones

Plasma levels of glucose, lactate, triacylglycerides (TAG), and non-esterified fatty acids (NEFA) were analysed using respective commercial kits (from Spinreact, Girona, Spain and Wako Chemicals, Neuss, Germany). Metabolites were measured in triplicate in pre-diluted plasma when necessary, using an endpoint colorimetric assay and each internal standard of

the respective kit. Plasma concentrations are expressed as mM (glucose and lactate), mg of lipid fraction per dL (TAG) or mEq of lipid fraction per dL (NEFA).

Thyroid hormones triiodothyronine, (T3) and thyroxine, (T4) were measured in plasma by ELISA following the guidelines of the commercial kits (Cusabio Biotech Co., USA). These assays employ the competitive inhibition enzyme immunoassay technique using microtiter plates pre-coated with specific T3 and T4 antibodies, respectively. Plasma levels of hormones T3 and T4 were obtained as ng/mL.

Transcript expression quantification

Total pituitary RNA was extracted from tissues conserved in RNA later using a total RNA purification kit (E.Z.N.A. Total RNA kit 1, Omega bio-tek, USA), after the tissue mechanical disruption. Total RNA was treated with DNase (DNA-free kit, Ambion, UK), quantified by NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and cDNA synthesis were carried out in a volume of 20 μ l, containing 250 ng of DNase-treated RNA and 200 ng of random hexamers (Jena Biosciences, Germany), 100 U of RevertAid reverse transcriptase and 8U of Ribo-Lock RNase Inhibitor (Fermentas, Thermo Fisher) following Martins et al. (2014). Reactions were incubated for 10 min at 25°C and then 60 min at 42°C, followed by enzyme inactivation during 10 min at 70°C, and stored at -20°C until use. Transcript abundances of pituitary hormones (thyroid stimulating hormone, TSH; growth hormone, GH; proopiomelanocorticotrophin peptides, POMCA, POMCB) and pituitary receptors (thyroid receptor alpha, TR α ; thyroid receptor beta, TR β ; glucocorticoid receptor, GR) were measured by quantitative real time RT-PCR (qPCR) using the relative standard curve method and the EvaGreen chemistry. Each reaction contained 1x Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 300 nM of each specific primer (Table 1) and 2 μ L of each cDNA (diluted 1:25 for POMCA and 1:5 for the other genes) in a final volume of 15 μ L. It was performed a technical duplicate for each cDNA sample. Reactions were run on a StepOnePlus qPCR thermocycler (Applied Biosystems, UK) for 40 cycles using the cycling conditions recommended by the supplier and the optimized annealing temperatures for each set of primers (Table 1). All qPCR reactions had a single peak melt curve and primer specificity was confirmed by sequencing the amplicons. No amplification products were obtained when reverse transcriptase was omitted from the cDNA syntheses reactions (-RT control), confirming the absence of genomic DNA contamination. Standard curves prepared from serial dilutions of quantified amplicons for each gene were included in all qPCR plates to permit product quantification and for determination of primers efficiency, which ranged between 91 and 105% with R² > 0.99.

The reference gene tested to normalise gene expression data was 18S ribosomal RNA sub-unit (18S) according to the low cDNA amount. The stability of the reference gene was evaluated by analysing the C_ts (threshold cycles) using BestKeeper software (Pfaffl et al., 2004). Copy number of target or reference genes was calculated as described in Pinto et al. (2013) using the equation: number of copies = $(X / NA) / (Y \times 1 \times 10^9 \times 650)$, where X is the initial template amount (ng of the amplicon fragment), NA is the Avogadro's number, Y is the template length (bp of each amplicon), and 650 (Da) is the average weight of a base pair. Since 18S was stable all gene copy number data was normalized by the mean of the technical replicate of the reference gene. Relative expression levels were calculated for each individual as the fold change compared to the Pre-cold period sampling of low-lipid diet (D14).

Table 1. List of the amplified genes and the primers used for analysis of gene expression by quantitative RT-PCR.

	Gene name and abbreviation	Fw/Rv ^a	Primer sequence (5'-3')	Ta ^b	bp ^c
Hormones	Growth Hormone (GH)	Fw	CCGAGGAACCAGATTTACCCAA	62	110
		Rv	TGGAGGGCGGAGCTATCAGGGA		
	Thyroid stimulating hormone (TSH)	Fw	GTGTTCCCTTTCTGGCTCTTTTTTC	52	100
		Rv	ACTCACACTCTGGTCTCTCCACGTA		
	Proopiomelanocortin A (POMCA)	Fw	CTTGAAGAAACCAATGAACATC	60	162
		Rv	GAAACAGCCAATGAAGACCTAA		
Proopiomelanocortin B (POMCB)	Fw	GCTCGTTAGCAGACCAAT	62	76	
	Rv	CAAAACACTCTCTCTCATCTCT			
Receptors	Thyroid receptor alfa (TR α)	Fw	GAGGCCGGAGCCAAACAC	60	124
		Rv	GCCGATATCATCCGACAGG		
	Thyroid receptor beta (TR β)	Fw	ACCGACTGGAGCCACACAG	60	129
		Rv	CCTTCACCCAGCTGCACT		
	Glucocorticoid receptor (GR)	Rv	CCATCACCTCTGCCGCATCTG	64	195
		Fw	TCTGGAGGAAGCTGCTGCTGAACC		
Reference gene	18S ribosomal RNA (18s)	Fw	TGACGGGAGGGCACCACCAG	60	158
		Rv	AATCGCTCCACCAACTAAGAACGG		

^a Forward (Fw) or reverse (Rv) primers.

^b Optimized annealing temperature used for each pair of primers.

^c Amplicon size in base pairs (bp).

Statistical analysis

Statistical differences between periods for each individual diet were analysed by nested one-way analysis of variance (ANOVA) with tank as random factor to test possible tank effect. When tank effect was not found, an ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's posthoc test was used when variances were uniform or not, respectively. To compare diets within each period a t-Student tests were performed. Statistical differences were considered significant when p-values were less than 0.05. The Shapiro-Wilk test was previously used to ensure the normal distribution of data, and the uniformity of variances was determined by the statistical Levene's test. All statistical analyses were done using commercial software (PASW 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Effects of thermal fluctuation on body parameters and plasma markers

Changes observed throughout experimental periods in body weight and length, condition factor, hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic fat (VSF) are shown in Table 2. Comparing body performance at the end of each temperature period, fish did not evidence growth differences between diets. The dietary lipid reduction from 18% (D18 diet) to 14% (D14 diet) resulted with equivalent final weight, length and condition factor values within each experimental period. Only HSI showed different response between diets. Initially, HSI was significantly higher for D14, during cold period HSI rose for both diets and it was kept higher during early recovery. At late recovery, whereas for D18 the HSI recovered initial value, D14 liver weight was markedly reduced.

Plasma metabolites levels were measured after overnight fasting and they corresponded to expected basal levels before morning ingesta (Table 3). At the end of Pre-cold period (35 days feeding respective diets at 22°C) plasma glucose and lactate did not show differences whereas diet effect was evident for plasma lipids. Circulating levels of TAG were significantly higher for D14 than D18, whereas NEFA values were lower for D14.

Induced cold for 50 days, with the corresponding reduced ingesta, caused a hypoglycaemia by a half together with an evident hyperlipemia, irrespective to diets. The most of these plasma affectations were transitory and temperature recovery reverted partially or completely to initial levels.

Table 2. Body parameters of juvenile gilthead sea bream throughout temperature fluctuation feeding different dietary lipid levels.

	Pre-Cold (Day 30)		Cold (Day 80)		Early Recovery (Day 87)		Late Recovery (Day 115)		
<i>Body Weight (g)</i>									
D14	194.2 ± 4.4	a	207.9 ± 5.0	b	213.4 ± 8.2	b	263.5 ± 7.1	c	
D18	192.4 ± 9.3	a	208.8 ± 4.2	b	216.8 ± 5.4	b	265.3 ± 10.7	c	
<i>Body Length (cm)</i>									
D14	18.8 ± 0.2	a	19.8 ± 0.2	b	19.6 ± 0.2	b	21.0 ± 0.2	c	
D18	18.8 ± 0.3	a	19.6 ± 0.1	b	19.4 ± 0.2	b	21.3 ± 0.3	c	
<i>Condition Factor</i>									
D14	2.91 ± 0.06		2.69 ± 0.05		2.81 ± 0.04		2.87 ± 0.08		
D18	2.88 ± 0.05		2.78 ± 0.05		2.97 ± 0.10		2.74 ± 0.10		
<i>Hepatosomatic Index</i>									
D14	2.17 ± 0.11	a	2.31 ± 0.10	a	2.52 ± 0.12	a	0.98 ± 0.28	b	
D18	1.83* ± 0.11	a	2.35 ± 0.13	b	2.15* ± 0.10	b	1.79* ± 0.24	a	
<i>Visceral Fat (%)</i>									
D14	1.08 ± 0.13	a	0.98 ± 0.32	a	1.20 ± 0.25	a	1.78 ± 0.11	b	
D18	1.13 ± 0.16	a	0.88 ± 0.04	a	1.14 ± 0.11	a	1.80 ± 0.24	b	

Body parameters are expressed as Mean ± S.E.M. Initial body weight (Day 0) was 145 ± 0.1 g; Initial body length was 17.3 ± 0.0 cm; and Initial Condition Factor was 2.90 ± 0.01.

Lowercase letters indicate significant differences between thermal periods within each diet (p<0.05, One-Way ANOVA). Significant differences between diets at each thermal period are indicated by * (t-Student test).

Circulating thyroidal hormones were measured by respective ELISA tests and values corresponded to levels after an overnight fasting and before the first daily ingesta. Levels of the active form triiodothyronine (T3), the prohormone thyroxine (T4), as well as the ratio T4/T3, as an indicator of peripheral transformation of T4 to T3 were shown in Table 3. Data of fish maintained at 22°C showed circulating levels around 19-21 ng/mL for T4 and 4-5 ng/mL for T3, resulting a T4/T3 ratio between 4-4.5, irrespective to dietary lipid amount. Low temperatures provoked a significant rise of T4/T3 ratio due to lower levels of circulating T3 after an overnight fasting, suggesting a reduced peripheral transformation at low temperatures with respect pre-cold values. Again, this effect was not diet depending. Temperature and ingesta recovery partially restored levels of circulating hormones in a week (Early Recovery) being more evident in T4 and provoked an over-release at the end of recovery period (Late Recovery). This recovery period significantly affected T4/T3 ratio, restoring its pre-cold values.

Effects of thermal fluctuation on pituitary expression

Expression of pituitary hormones TSH, GH, POMCA and POMCB and the hormone receptors TRalpha, TRbeta, and GR have been used as indicators of central response to dietary lipid change and temperature variations. Daily rhythms interactions in these pituitary markers were avoided obtaining pituitary samples always at same morning hour before the first daily ingesta. Thus, pituitary expression levels could be compared between all the samplings moments. Hormones and hormone receptors relative expressions were normalised by D14 pre-cold values in all cases. Figure 1 shows the pituitary ability to adapt at dietary lipid, D14 and D18, with the concomitantly energy differences. After 30 days at 22°C (PC) the pituitary of the animals fed with D18 up-regulated the expression of hormones in response of higher amount of lipids in diet formulation. TSH and GH, both hormones directly related to metabolism, increased for six and three folds, respectively

(Figure 1). By its way, the melanocortin system measured by POMCs peptides (POMCA and POMCB) were also significantly increased four and six folds respectively. In addition to the hormonal expression, the pituitary has multiple receptors allowing the response in front of the received inputs. The response of three pituitary hormone-receptors to the amount of dietary lipid levels are shown on Figure 2. The glucocorticoid receptor was up-expressed by feeding the D18 diet, in the same way of hormones expression. With regard to both thyroid hormone receptors, their expression differed: TRbeta was up-regulated for 3 folds in D18 group and TRalpha did not change its relative expression in response to dietary lipids.

Table 3. Plasma markers and thyroidal hormones levels of juvenile gilthead sea bream throughout temperature fluctuation feeding different dietary lipid levels.

	Pre-Cold (Day 30)		Cold (Day 80)		Early Recovery (Day 87)		Late Recovery (Day 115)		
Plasma metabolites ⁺									
<i>Glucose (mM)</i>									
D14	7.6 ± 0.8	a	3.2 ± 0.2	c	5.9 ± 0.3	ab	5.5 ± 0.4	b	
D18	8.6 ± 0.2	a	4.4* ± 0.2	c	6.2 ± 0.3	b	6.1 ± 0.5	b	
<i>Lactate (mM)</i>									
D14	2.8 ± 0.4	a	2.3 ± 0.3	ab	1.2 ± 0.2	b	2.3 ± 0.3	a	
D18	3.0 ± 0.4		3.3 ± 0.9		1.9 ± 0.3		3.2* ± 0.2		
<i>NEFA (mEq/dL)</i>									
D14	0.44 ± 0.04	a	0.65 ± 0.04	b	0.44 ± 0.04	a	0.49 ± 0.05	a	
D18	0.54 ± 0.03	a	0.65 ± 0.05	b	0.54 ± 0.03	ab	0.74* ± 0.06	b	
<i>TAG (mg/dL)</i>									
D14	461 ± 40	a	535 ± 115	b	374 ± 38	ab	322 ± 8	a	
D18	334* ± 31		426 ± 43		321 ± 26		289 ± 26		
Thyroidal hormones									
<i>T3 (ng/mL)</i>									
D14	4.4 ± 0.9	a	2.2 ± 0.4	a	3.7 ± 0.6	a	6.9 ± 1.1	b	
D18	5.1 ± 0.8	ab	2.5 ± 0.4	a	4.1 ± 0.7	ab	7.2 ± 2.0	b	
<i>T4 (ng/mL)</i>									
D14	19.2 ± 0.5	a	19.9 ± 0.2	a	21.1 ± 0.4	b	22.5 ± 0.4	c	
D18	20.8 ± 0.5		20.9* ± 0.2		20.7 ± 0.5		20.5* ± 0.3		
<i>Ratio T4/T3</i>									
D14	4.5 ± 0.7	ab	8.9 ± 0.3	c	6.4 ± 0.9	b	3.3 ± 0.4	a	
D18	4.0 ± 0.1	a	7.7 ± 0.8	b	6.0 ± 1.2	ab	3.9 ± 1.3	a	

⁺Data extracted from Sanchez-Nuño et al. (unpublished data).

Data are expressed as Mean ± S.E.M.

Lowercase letters indicate significant differences between thermal periods within each diet ($p < 0.05$, One-Way ANOVA)

Significant differences between diets at each thermal period are indicated by * (t-Student test).

The performance of pituitary activity during thermal fluctuation is shown in Figure 3 (hormones) and Figure 4 (hormone-receptors). Despite the expected metabolic depression due to low temperatures (14°C), pituitary was able to modulate hormones expression up-regulating TSH and GH at the end of 50 days maintenance at 14°C, showing a clear cold acclimation response irrespective to diet (Figure 3 a,b). Differently, both POMCs peptides expression levels were not modified (Figure 3 c,d). To regard the studied hormone-receptors, cold maintenance influenced differently depending on diet being for D14 all studied receptors significantly increased (Figure 4). For high lipid diet, only TRbeta was up-regulated significantly. In summary, despite the lower intake observed during cold period, more lipids in the diet caused up-expression of analysed pituitary hormones whereas dietary lipid reduction provoked a higher expression of pituitary hormone receptors.

Figure 1. Relative gene expression of pituitary hormones of gilthead sea bream juveniles fed two dietary regimes for 35 days at 22°C. Data are shown as arbitrary units referred to relative expression for D14 as Mean \pm Standard error of mean. Hormones analysed were: Growth Hormone, GH; Thyroid Stimulating Hormone, TSH; Proopiomelanocorticotrophin peptides A and B, POMCA and POMCB. * indicate significant differences between D14 and D18 (Student's t- test).

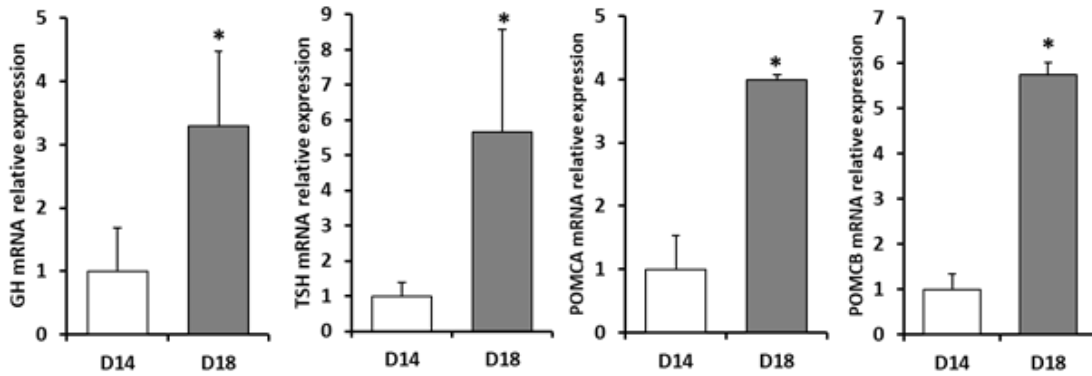
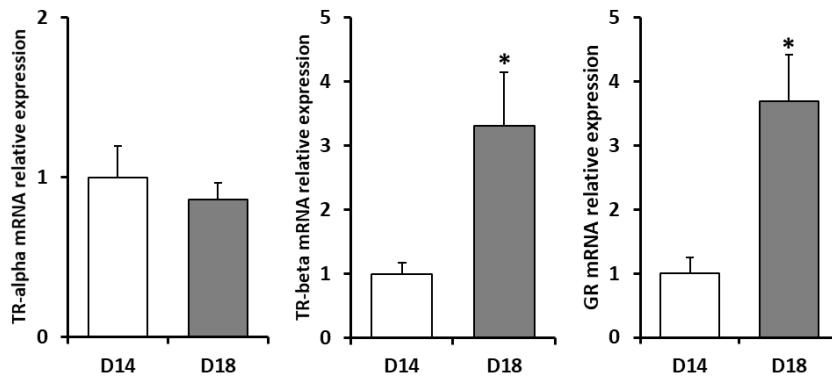


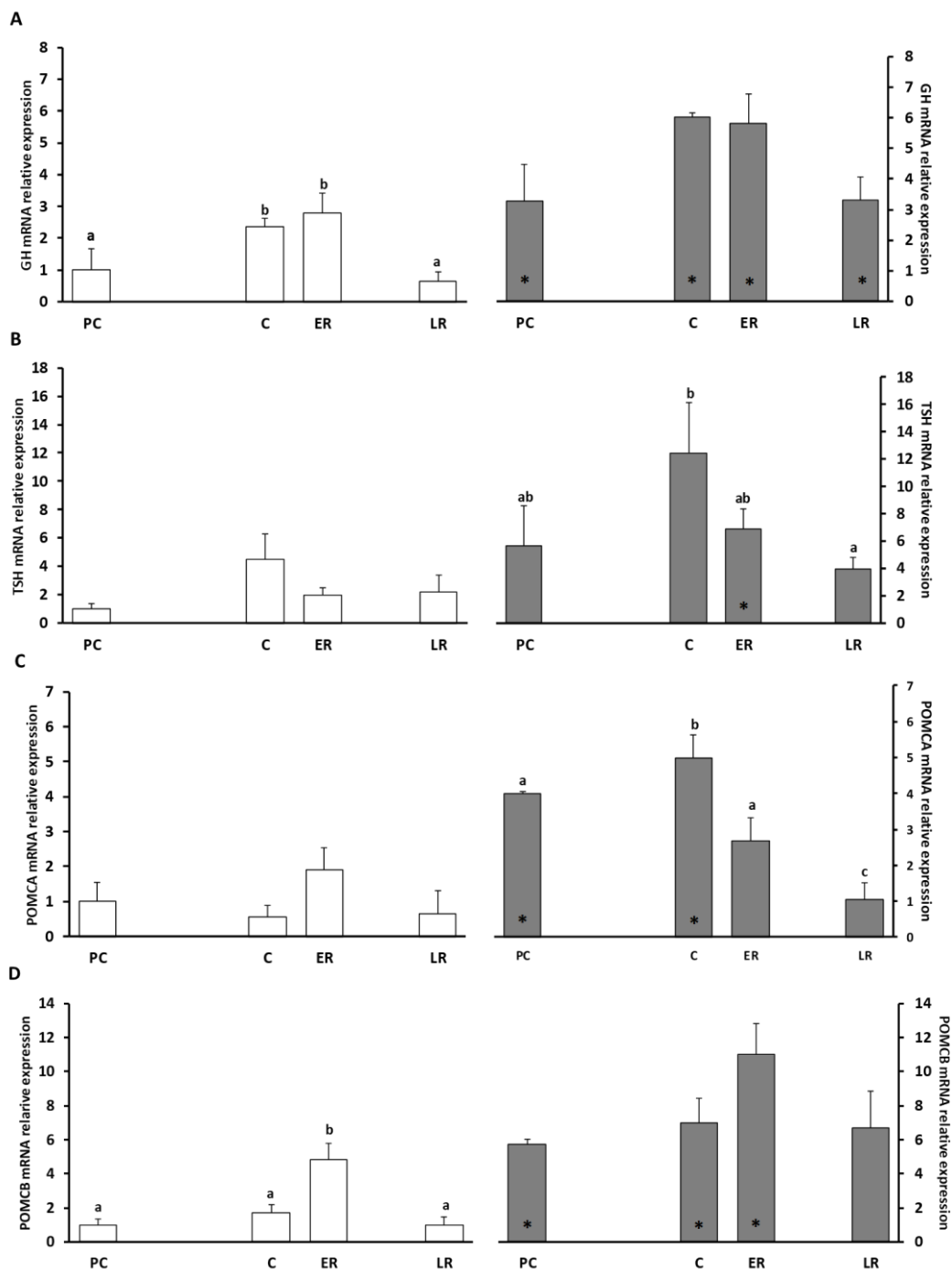
Figure 2. Relative gene expression of pituitary receptors of gilthead sea bream juveniles fed two dietary regimes for 35 days at 22°C. Data are shown as arbitrary units referred to relative expression for D14 as Mean \pm Standard error of mean. Receptors analysed were: Thyroid hormone Receptors alpha and beta, TR-alpha and TR-beta; Glucocorticoid Receptor, GR. * indicate significant differences between D14 and D18 (Student's t- test).



To better understand the recovery process at pituitary level from low temperatures and low ingesta, two sampling times were performed during recovery period: at day 7 of start the recovery process (Early recovery) and after 35 days at 22°C (Late Recovery). Whereas the TSH up-expressed values during cold, flipped to pre-cold values already at early recovery, the GH expression were still higher than the pre-cold at early recovery and levels were lately recovered, again irrespective to diet (Fig.3). By its way POMCs peptides responded to temperature rose differently according diets. Thus, for D14 diet both expressions were increased over two-fold on early recovery, whereas for D18 POMCA was down-regulated and POMCB was not significantly increased. These data would evidence a diet effect on the pituitary response to cope the thermal restoration during the early recovery. The hormone expression changes were all reverted to pre-cold values for both diet at late recovery. Thyroid hormone receptors and glucocorticoid receptor were lately reverted for D14, being the expression levels higher at early recovery, even the TRalpha till

increased. Curiously, for D18 the TRAlfa expression levels did not revert at the end of the trial, and transcripts were over two folds higher than pre-cold condition.

Figure 3. Relative gene expression of pituitary hormones of gilthead sea bream juveniles fed two dietary regimes during temperature fluctuation. Data are shown as arbitrary units referred to relative expression for D14 as Mean \pm Standard error of mean. PC: Pre-Cold; C: Cold; ER: Early Recovery; LR: Late Recovery. Diets are represented by white bars: D14 and grey bars: D18. Hormones analysed were A) Thyroid Stimulating Hormone, TSH; Proopiomelanocorticotrophin peptides A and B, POMCA and POMCB; Growth Hormone, GH. Lower-cases letters indicate significant differences between periods (one-way ANOVA); * indicate significant differences between D14 and D18 (Student's t- test).



Integrating pituitary modulation by the external and internal inputs

Figure 5 summarises, to be further discussed, the pituitary response to cope with water temperature changes and dietary lipids inclusion measured by some hormones and hormone receptors relating to peripheral effects on growth and metabolism. Moreover, the feed-back loop from the whole body to pituitary was also approached. For the pre-cold condition (Figure 5a), the unique external factor modulating pituitary was dietary lipid. A difference of 4% in lipid dietary inclusion increased pituitary activity, via the up-expression of studied hormones. However, no effects were derived in growth, main plasma metabolites or plasma thyroid hormones, which difficult the interpretation of the relevance of those higher hormonal up-expressions. From other studies (included in the Figure 5 to improve the understanding of peripheral effects), dietary lipids increase determined higher liver metabolism with higher oxidative attack. Pituitary receptors are indicative of body feed-back to pituitary; both GR and TRalpha increased in response to higher dietary lipids. At cold sampling (Figure 5b), two external factors were mainly affecting pituitary response: low water temperature and dietary lipids. Despite to well-known metabolic depression at low temperatures, both GH and TSH increased their expressions as well as the three receptors analysed. Thus, pituitary is able to integrate low temperature whereas ingesta, growth, plasma metabolites and liver metabolism were depressed. Again, the pituitary modulation and body response seems to be unlinked. Finally, during the recovery period (Figure 5c) two external factors were present; warming from 14°C to 22°C and dietary lipid. Pituitary modulated its response by reverting GH and TSH expressions but stimulating transitorily the POMC peptides expression mainly for D14 diet. Growth arrest and lower ingested were reverted and liver metabolism were gradually recovered. Although TSH expression were reduced plasma T3 were increased.

Discussion

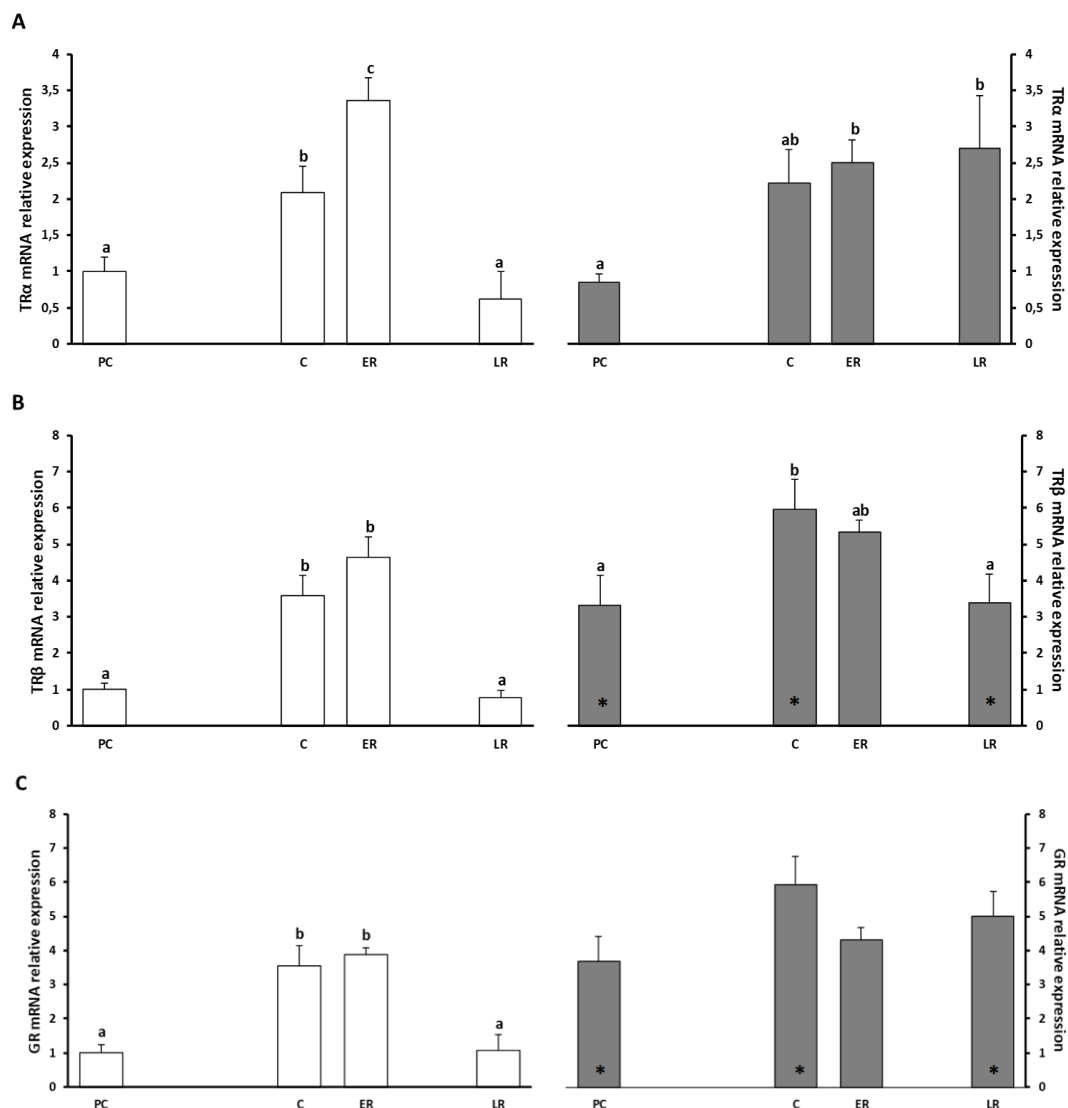
To study the effects of cold season on the pituitary capacity of gilthead sea bream to face up environmental changes we performed an indoor and controlled trial simulating natural thermal fluctuation composed by three periods: the winter entrance (Pre-cold period), the winter season (Cold period) and the winter exit (Recovery period). Two isoproteic diets reducing dietary lipid content (from 18% to 14%) were introduced to evaluate the effects of dietary energy throughout temperature performance. This study is focused on the regulatory role of pituitary by itself, analysing the gene expression of some pituitary markers by RT-PCR and the plasmatic levels of thyroidal hormones by ELISA-Kit. To avoid daily rhythms occurrences on these expressions and circulating hormones all samplings were performed after an overnight fasting, before morning feed intake.

Dietary modulation of pituitary response at warm temperature

Feed is the greatest single cost in fish farming, and as efficiency increases, feed costs become even more important. Beyond feed cost, fish diet should also be an active way to cope with seasonal challenges on culture. Recent studies demonstrated the negative interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status (Suárez et al., 2015) whereas for gilthead sea bream, to reduce dietary lipid before cold season has been proposed to cope with liver affectations (Bonaldo et al., 2010; Ibarz et al., 2010b; Mongile et al., 2014; Velázquez et al., 2006). We previously demonstrated that reducing dietary lipid from 18% to 14% resulted with a

similar body weight, condition factor, SGR and FCR with an improved redox status (Sánchez-Nuño et al., 2018), suggesting a more efficient metabolism when sea bream have been fed with low lipids. The study of pituitary function of the pre-cold period evidenced that dietary lipids intake is able to modify the pituitary expression of GH, TSH and both POMC hormones together with receptors TR-beta and GR. Thus, pituitary responded to dietary inputs showing higher expression for the diet with higher lipids and energy, measured before the expected morning ingesta.

Figure 4. Relative gene expression of pituitary receptors of gilthead sea bream juveniles fed two dietary regimes during temperature fluctuations. Data are shown as arbitrary units referred to relative expression for D14 as Mean \pm Standard error of mean. PC: Pre-Cold; C: Cold; ER: Early Recovery; LR: Late Recovery. Diets are represented by white bars: D14 and grey bars: D18. Receptors analysed were: Thyroid hormone Receptors alpha and beta, TR-alpha and TR-beta; Glucocorticoid Receptor, GR. Lower-cases letters indicate significant differences between periods (one-way ANOVA); * indicate significant differences between D14 and D18 (t-Student test).

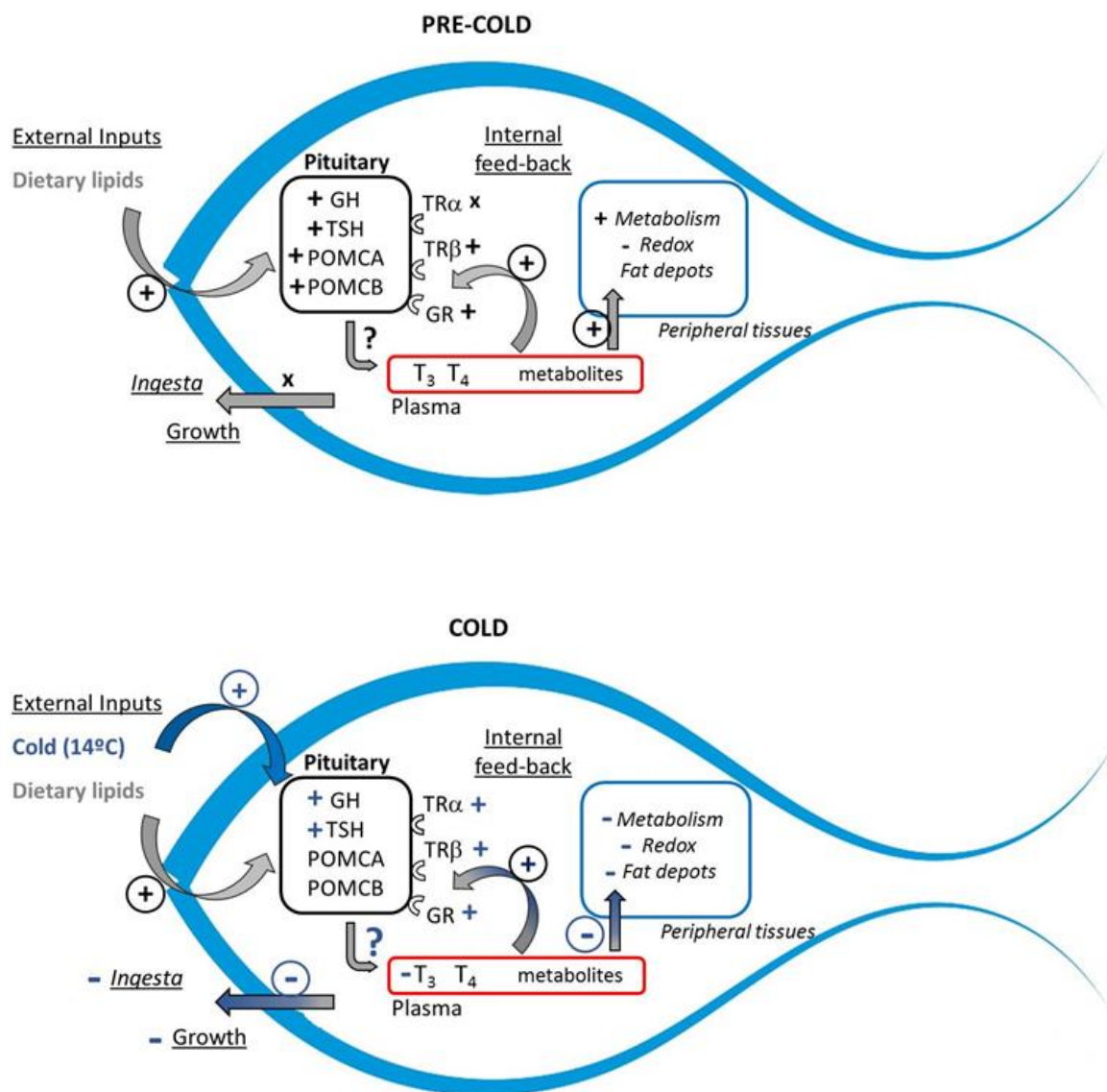


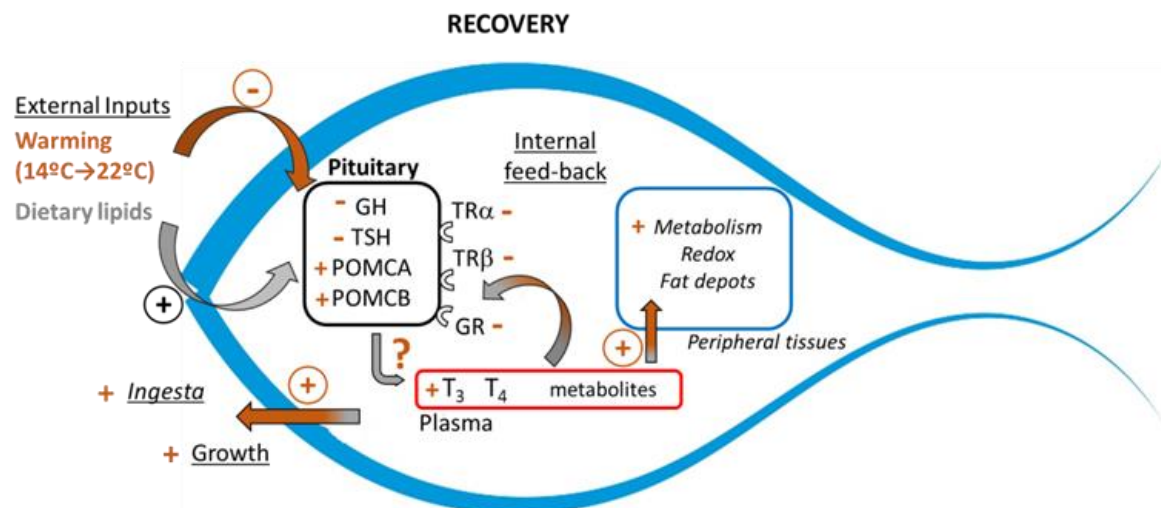
As far as we know there is scarce information on the gene expression and its regulation on our selected pituitary markers, and no data exists for dietary response and temperature fluctuation. In a previous study we determined and increased cellular activity of pituitary in response to amino acid supplementation, measured by proteome expression profile (Ibarz et al., 2010c). However, to relate peripheral effects with pituitary expression would contribute to better understanding of the present results. For instance, in the present study GH expression was up-regulated when feeding with D18 which is in agreement with the increased circulating levels of GH observed in gilthead fingerlings fed with 17% lipid with respect to 9% (Company et al., 1999). By its way, TSH are critical regulating post-prandial response in fish, by the release of thyroid hormones. Despite markedly differences between TSH expression between D18 vs D14, circulating levels of T3 and T4 did not differed, possible relating to pre-ingesta condition where the eating signal was not still present, as it was reported in mammals (McGuire et al., 1991; Ryg and Jacobsen, 1982). Moreover, in red drum (*Sciaenops ocellatus*), Cohn et al. (2010) suggested that TSH follows a dynamically regulated 24-h period rhythm and, in sea bream, Montoya et al. (2010) described the presence of plasmatic T3 and T4 peaks influenced by the feeding moment. Similarly to thyroid hormone levels, we observed that plasma metabolites such as glucose, lactate or proteins did not shows differences after overnight fasting for fish fed 18% or 14% of dietary lipids (Sánchez-Nuño unpublished data). To regard POMC transcripts, Cardoso et al. (2011) described for sea bream a differential distribution on the expression of POMC transcripts in pituitary (POMC-alfa or POMCA and POMC-beta or POMCB). In our study both transcripts of POMC have an up-regulated expression in response of higher lipid input by diet. Because of the derived responses from POMC peptide expressions are depending on the production of many biological peptides such as melanocyte-stimulating hormones (MSHs), corticotrophin (ACTH) and β -endorphin (Millington, 2007), to distinguish the interesting role of each POMC and the role of their products in response to dietary modifications would needs of further attention.

The amounts of specific hormone receptors are crucial for hormone release regulation on nervous central control by via feedback-loop (Chiamolera and Wondisford, 2009; Czeisler and Klerman, 1999). In response to higher dietary lipid, TR beta and GR expressions increased, whereas TR alpha was the unique pituitary marker with no differences between D18 and D14 at pre-cold. In fish, TR are related with multiple physiological processes and presented some isoforms (Nelson and Habibi, 2009), whereas in mammals TR beta transcripts showed higher levels than TR alpha in anterior pituitary (Bradley et al., 1989). This finding would explain the higher sensitive of TR beta modulation by diet compared with TR alpha in the current study, in agreement with the idea that, in mammals, TR beta gene products may mediate thyroid hormone feedback regulation of TSH (Bradley et al., 1989). By its way, GR expression in sea bream is suggested to be tissue-specific and with correlation to plasma cortisol levels (Acerete et al., 2007). This could not be the case of our pre-cold conditions where changes in a dietary lipid for a 4% has not been proved as a stressor condition (Sánchez-Nuño et al., 2018). As it was described for the pituitary modulation by the amino acid supplementation (Ibarz et al., 2010c), dietary lipids were also recognized conditioning pituitary function by the expression of both hormones and receptors studied. However, as it is shown in the Figure 5, whereas the external input by diet have been evidenced on the pituitary, whole animal response seems to compensate the higher energy entrance adapting its metabolism which resulted in no differences on

growth (Sánchez-Nuño unpublished data). Further studies are necessary to better determine the effects of that pituitary modulation and the lack of growth differences between dietary regimes.

Figure 5. Integratory view of pituitary modulation by the temperature fluctuation and the relationship with peripheral response. Each scheme aimed to approach current data on pituitary hormones and receptors response in relationship with peripheral responses of growth, ingesta, plasma levels and metabolism. Linking arrows indicate external and internal inputs to pituitary. + and - symbols indicate up- and down- regulation, respectively. Encircled symbols indicate a positive, negative or lack of relationship. An interrogation symbol indicates the unlinked response between pituitary and plasma evidences. To better understand information from known effects on ingesta, plasma metabolites and liver metabolism and redox status were appointed (from Sánchez-Nuño et al., 2018a,b).





Cold effect

For gilthead sea bream, the growth arrest at cold season and the cold-induced metabolic depression are unavoidable at rearing conditions, affecting globally to whole animal (reviewed in Ibarz et al., 2010a) and specifically liver intermediary metabolism (Sánchez-Nuño unpublished data) and redox metabolism (Sánchez-Nuño et al., 2018). However, the central core mechanisms underlying that overall response are still unknown. The present study is the first attempt in gilthead sea bream to elucidate if pituitary is able to detect the inputs from water temperature descend. Despite the drastic fall of the peripheral tissues responses against maintained cold exposure, pituitary markers revealed a generalized up-regulation in their gene expression, irrespective to diet. As cold and reduced ingesta are given at the same time, it is difficult to know how pituitary, or more on top, the hypothalamus, interpret both concomitantly signals. Deane and Woo, (2006) described in silver sea bream (*Sparus sarba*) higher amounts of pituitary GH transcript and content in chronic acclimation of at 12°C in comparison to those maintained at 25°C. In rabbitfish (*Siganus guttatus*), Ayson et al. (2007) reported higher GH mRNA levels on pituitary after 15-days of starvation. In agreement with these results, gilthead sea bream at 14°C for 50 days doubled GH pituitary expression for both dietary regimes. To regard TSH expression, our results indicated more than two-fold upregulation irrespective to diet at the end of the Cold-period. Although there are no data on pituitary TSH expression in sea bream, Arslan et al. (2016) described that 45 days of cold exposure at 6°C decreased plasma TSH in common carp (*Cyprinus carpio*), reporting that plasmatic hormonal changes due to cold stress are already evident at day 15. Beyond low temperatures, starvation seems to provoke lack of thyroid tissue sensitivity to TSH, eliminating plasma TH daily patterns and monodeiodinase activity (De Pedro et al., 2003; Gaylord et al., 2001; Power et al., 2000). We evidenced that circulating T3 was diminished by low temperatures, increasing the T4 / T3 ratio. This ratio has been proposed as a marker of peripheral deiodinase activity (De Pedro et al., 2003) transforming T4 on the active hormone T3 (Blanton and Specker, 2007). Thus, according to described peripheral enzymatic depression after 50 of cold exposure (Sánchez-Nuño et al., 2018), low temperatures of 14°C should unbalances T4/T3 ratio by also diminishing peripheral tissue deionidase activity, again irrespective to dietary lipids. Although further

studies should be necessary, the reduction of circulating T3 could explain the increment of both thyroidal receptors in pituitary at low temperatures, indicating that pituitary are able to integrate internal inputs (feed-back) as well as the external outputs.

Although temperature fluctuations are natural for fish, abrupt changes may become an effective stressor, inducing classical stress responses mediated by POMCs pituitary expression. (Barton and Schreck, 1987) reported a cortisol peak after acute or chronic stress in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) acclimated to three different temperatures. Sumpter et al. (1986) demonstrated that acute temperature changes amplified the endocrine response to handling and confinement, while Staurnes et al. (1994), studying the acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water, stated that cold water exposure caused a marked increase in secondary response such as plasma cortisol and glucose concentrations. However, after 50 days at 14°C, sea bream did not show up-expression of POMCs peptides, and no secondary effects of HPI axis were neither evidenced. These controversial results could be in accordance with the scarce data on cold stress in sea bream, where Rotllant et al. (2000) reported a transitory and not sustained release of cortisol and ACTH after a drop in water temperature from 18 to 9°C. In contrast, pituitary GR increased at low temperatures which would supposed the presence of higher amounts on circulating cortisol (Acerete et al., 2007). Further studies on the chronic effects of low temperatures should relate stress axis with the scarce signals of stress response when the fish metabolism is inhibited by the cold conditions.

Temperature recovery

The capacity of fishes to recover from cold periods is another focus point for fish farmers, and sea bream producers in particular (Ibarz et al., 2010a), although few studies have addressed the recovery dynamics of growth and fish physiology, and none on pituitary functionality. In this work we analyzed for the first time in fish, the effect of temperature recovery on pituitary response and plasmatic T3 and T4. To better understand the recovery process, two samplings were carried out to evaluate the pituitary response and circulating thyroid hormones performance. As occurs during exposure to low temperatures, pituitary detected the external input of warming and ingesta restoration. It is striking that unlike the previous periods, the gradual reestablishment of the temperature to 22°C modulate differently each of the analyzed pituitary markers: whereas TSH expression recovered the pre-cold expression levels in 7 days; GH, both TR and GR expression recovered at the end of 35 days of recovery; and POMC showed differently response between D14 and D18. The recovery of TSH expression was achieved in one week at 22°C, suggesting the high relevance on early-recovering the normal TSH release, although the consequences of this mechanism are not yet described in fish (reviewed on Blanton and Specker, 2007). The GH down-regulation were delayed with respect TSH. The increase in temperatures also increases the fish intake and the restoration (Sánchez-Nuño et al., 2018) which is strongly related with both TSH and GH up-regulation due to higher ingesta and energy intake. Plasma levels of T3 showed an overcompensation at the end of recovery period, evidencing the relevance of thyroidal hormones on recovery process, and could be a signal of the presence of compensatory growth (Blanton and Specker, 2007). On the other hand, the expression of the TRs suggested the inherence of diet effect. In D14 both TRs were still up-expressed in ER returning to initial values at the end of the recovery.

With regard to the expression of POMCs, the recovery process elucidates different patterns on POMCA and POMCB down-regulation and they were diet depending. Due to the lack of knowledge in the regulatory mechanisms of POMC transcripts expression, again it is difficult to define its behavior. Warming caused an increment of POMC transcripts in D14 indicating an stressor effect for this diet in agreement to previous data on lower capacity of animals fed lower lipids to cope with temperature restoration (Sánchez-Nuño et al., 2018). Moreover, pituitary expression of GR for D14 was delayed restored than D18, supporting the feed-back signal of a stressor condition for that diet.

Conclusion

This is the first study tackling the pituitary response of thermal fluctuations in fishes. It was evidenced the capacity of pituitary to recognize external inputs such as dietary energy and water temperature, mediated by hypothalamus, and to modulate its response via the expression of keys hormones and receptors. Herein, we analysed the expression of some hormones and hormone receptors as markers of pituitary activities and relating them to overall fish response. At warm temperatures whereas pituitary activity depends on dietary lipids/energy, fish are able to compensate a 4% of lipid reduction maintaining growth. In response to cold, pituitary over-expressed TSH and GH and some receptors indicating their reluctance to cold global depression and its capacity to integrate both external and internal inputs. In spite of pituitary response, low temperatures would block pituitary signals and growth and metabolism were arrested. The mechanism underlying the gap between pituitary and whole body are still unknown and further studies would elucidate if the unlinked response existed at pituitary hormone release level, at target tissue levels or at cell cold-depressed response level. All the cold effects are transitory and reverted when temperatures and ingesta restored. However, and in agreement to metabolism and redox data, animals fed lower lipid (D14) would experience a higher stressed condition which difficult or delays their recovery from low temperatures.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Spanish government (AGL2011-29873).

References

- Acerete, L., Balasch, J. C., Castellana, B., Redruello, B., Roher, N., Canario, A. V., et al. (2007). Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 148, 32–43. doi:10.1016/j.cbpb.2007.04.015.
- Arslan, G., Sahin, T., Hisar, O., and Hisar, S. A. (2016). Effects of low temperature and starvation on plasma cortisol, triiodothyronine, thyroxine, thyroid-stimulating hormone and prolactin levels of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). 4, 5–9.
- Ayson, F. G., de Jesus-Ayson, E. G. T., and Takemura, A. (2007). mRNA expression patterns for GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II during altered feeding status in rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 196–204. doi:10.1016/j.ygcen.2006.08.001.

- Barton, B. A., and Schreck, C. B. (1987). Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 62, 299–310. doi:10.1016/0044-8486(87)90172-4.
- Blanton, M. L., and Specker, J. L. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 97–115. doi:10.1080/10408440601123529.
- Bonaldo, A., Isani, G., Fontanillas, R., Parma, L., Grilli, E., and Gatta, P. P. (2010). Growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed to satiation and restrictively at increasing dietary energy levels. *Aquac. Int.* 18, 909–919. doi:10.1007/s10499-009-9312-0.
- Bradley, D. J., Young, W. S., and Weinberger, C. (1989). Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7250–4.
- Cardoso, J. C. R., Laiz-Carrión, R., Louro, B., Silva, N., Canario, A. V. M., Mancera, J. M., et al. (2011). Divergence of duplicate POMC genes in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 396–404. doi:10.1016/j.ygcen.2010.12.001.
- Chiamolera, M. I., and Wondisford, F. E. (2009). Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. *Endocrinology* 150, 1091–1096. doi:10.1210/en.2008-1795.
- Cohn, W. B., Jones, R. A., Valverde, R. A., Leiner, K. A., and MacKenzie, D. S. (2010). Molecular cloning and regulation of mRNA expression of the thyrotropin β and glycoprotein hormone α subunits in red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 1277–1290. doi:10.1007/s10695-010-9408-5.
- Company, R., Caldach-Giner, J. ., Kaushik, S., and Pérez-Sánchez, J. (1999). Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279–292. doi:10.1016/S0044-8486(98)00495-5.
- Czeisler, C. A., and Klerman, E. B. (1999). Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Prog. Horm. Res.* 54, 97-130; discussion 130–2.
- Davis, P. S. (1988). Two occurrences of the gilthead, *Sparus aurata* Linnaeus 1758, on the coast of Northumberland, England. *J. Fish Biol.* 33, 951–951. doi:10.1111/j.1095-8649.1988.tb05545.x.
- De Pedro, N., Delgado, M. J., Gancedo, B., and Alonso-Bedate, M. (2003). Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 173, 475–481. doi:10.1007/s00360-003-0355-7.
- Deane, E. E., and Woo, N. Y. S. (2006). Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: Effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1077–1082. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.069.
- Donaldson, M. R., Cooke, S. J., Patterson, D. A., and Macdonald, J. S. (2008). Cold shock and fish. *J. Fish Biol.* 73, 1491–1530. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x.
- Elliot, J. (1991). Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Freshw Biol* 25, 61–70.
- Ganga, R., Tort, L., Acerete, L., Montero, D., and Izquierdo, M. S. (2006). Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.* 190, 39–45. doi:10.1677/joe.106770.
- Gaylord, T. G., MacKenzie, D. S., and Gatlin III, D. M. (2001). Growth performance, body composition and plasma thyroid hormone status of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to short-term feed deprivation and refeeding. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 73–79. doi:10.1023/A:1011199518135.

- Gómez-Requeni, P., Kraemer, M. N., and Canosa, L. F. (2012). Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182, 517–530. doi:10.1007/s00360-011-0640-9.
- Hurst, T. P. (2007). Causes and consequences of winter mortality in fishes. *J. Fish Biol.* 71, 315–345. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01596.x.
- Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., and Sánchez, J. (2003). Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 313–321. doi:10.1007/s10695-004-3321-8.
- Ibarz, A., Blasco, J., Beltrán, M., Gallardo, M. A., Sánchez, J., Sala, R., et al. (2005). Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 477–486. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.056.
- Ibarz, A., Blasco, J., Sala-Rabanal, M., Gallardo, Á., Redondo, A., and Fernández-Borràs, J. (2007a). Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting and their capacity for recovery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 1034–1042. doi:10.1139/f07-079.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., and Blasco, J. (2007b). Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.008.
- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M. Á., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., and Tort, L. (2010a). Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-induced alterations and “Winter Syndrome.” *Rev. Fish Biol. Fish.* 20, 539–556. doi:10.1007/s11160-010-9159-5.
- Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M. Á., and Fernández-Borràs, J. (2010b). Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 155, 319–326. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.012.
- Ibarz, A., Costa, R., Harrison, A. P., and Power, D. M. (2010c). Dietary keto-acid feed-back on pituitary activity in gilthead sea bream: Effects of oral doses of AKG. A proteomic approach. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169, 284–292. doi:10.1016/j.ygcen.2010.09.010.
- Martins, R. S. T., Pinto, P. I. S., Guerreiro, P. M., Zanuy, S., Carrillo, M., and Canário, A. V. M. (2014). Novel galanin receptors in teleost fish: Identification, expression and regulation by sex steroids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 109–120. doi:10.1016/j.ygcen.2014.06.030.
- McGuire, M. A., Beede, D. K., Collier, R. J., Buonomo, F. C., DeLorenzo, M. A., Wilcox, C. J., et al. (1991). Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows². *J. Anim. Sci.* 69, 2050–2056. doi:10.2527/1991.6952050x.
- Millington, G. W. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr. Metab. (Lond)*. 4, 18. doi:10.1186/1743-7075-4-18.
- Mingarro, M., Vega-Rubín De Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M. M., and Pérez-Sánchez, J. (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102–111. doi:10.1016/S0016-6480(02)00042-4.
- Mongile, F., Bonaldo, A., Fontanillas, R., Mariani, L., Badiani, A., Bonvini, E., et al. (2014). Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 30–34. doi:10.4081/ijas.2014.2999.

- Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Garayzar, A. B. S., and Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.* 101, 101–107. doi:10.1016/j.physbeh.2010.04.019.
- Nelson, E. R., and Habibi, H. R. (2009). Thyroid receptor subtypes: Structure and function in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 90–96. doi:10.1016/j.ygcen.2008.09.006.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515. doi:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.
- Pinto, P. I. S., Guerreiro, E. M., and Power, D. M. (2013). Triclosan interferes with the thyroid axis in the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Res. (Camb.)* 2, 60–69. doi:10.1039/c2tx20005h.
- Polakof, S., Arjona, F. J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M. P., Mancera, J. M., and Soengas, J. L. (2006). Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Comp. Physiol. B* 176, 441–452. doi:10.1007/s00360-006-0065-z.
- Power, D. M., Melo, J., and Santos, C. R. A. (2000). The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J. Fish Biol.* 56, 374–387. doi:10.1006/jfbi.1999.1165.
- Rotllant, J., Balm, P. H. M., Ruane, N. M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S. E., and Tort, L. (2000). Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: Differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating . *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 152–163. doi:10.1006/gcen.2000.7508.
- Ryg, M., and Jacobsen, E. (1982). Seasonal changes in growth rate, feed intake, growth hormone, and thyroid hormones in young male reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Can. J. Zool.* 60, 15–23. doi:10.1139/z82-002.
- Sánchez-Nuño, S., Sanahuja, I., Fernández-Alacid, L., Ordóñez-Grande, B., Fontanillas, R., Fernández-Borràs, J., et al. (2018). Redox challenge in a cultured temperate marine species during low temperature and temperature recovery. *Front. Physiol.* 9, 923. doi:10.3389/FPHYS.2018.00923.
- Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., Guzmán, J. M., Martín del Río, M. P., Miguez, J. M., Mancera, J. M., et al. (2003). Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 285, R897–R907. doi:10.1152/ajpregu.00161.2003.
- Sarusic, G. (1999). Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 113.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J. R., Sigholt, T., and Jørgensen, L. (1994). Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: Sxtress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na-K-ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 109, 413–421. doi:10.1016/0300-9629(94)90145-7.
- Suárez, M. D., Trenzado, C. E., García-Gallego, M., Furné, M., García-Mesa, S., Domezain, A., et al. (2015). Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Eng.* 67, 59–66. doi:10.1016/J.AQUAENG.2015.06.001.

Sumpter, J. P., Dye, H. M., and Benfey, T. J. (1986). The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 377–385. doi:10.1016/0016-6480(86)90047-X.

Tort, L., Padrós, F., Rotllant, J., and Crespo, S. (1998b). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 37–47. doi:10.1006/FSIM.1997.0120.

Tort, L., Rotllant, J., and Rovira, L. (1998a). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 120, 175–179. doi:10.1016/S1095-6433(98)10027-2.

Velázquez, M., Zamora, S., and Martínez, F. J. (2006). Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac. Nutr.* 12, 127–133. doi:10.1111/j.1365-2095.2006.00391.x.

DISCUSIÓN

*“Yo quise subir al cielo para ver
Y bajar hasta el infierno para comprender”*

Jesús de la Rosa

El patio (1975)

Durante los meses más fríos del año los peces están expuestos a las bajas temperaturas del agua, siendo la huida fisiológica la respuesta más común en animales en condiciones de libertad (Donaldson, 2008). Las condiciones de cultivo privan a los animales de esta huida, obligando al animal a hacer frente a estas bajas temperaturas, forzando una adaptación. Debido a que los teleósteos son animales poiquilitermos, la exposición a bajas temperaturas disminuye su metabolismo y por lo tanto su crecimiento se estanca durante los meses más fríos, causando grandes pérdidas económicas en el sector. Además, algunos autores relacionan el periodo de bajas temperaturas a un incremento de algunas patologías (revisado en Ibarz et al., 2010a). Es por este motivo que los investigadores han tratado de encontrar posibles indicadores y estrategias que mejoren el desafío que supone periodo invernal. El objetivo de esta tesis es tratar de arrojar algo más de luz y conocimiento en el campo de la producción de dorada durante el periodo de bajas temperaturas, utilizando un modelo de fluctuación térmica “indoor”.

1. CRECIMIENTO DURANTE LA FLUCTUACIÓN TÉRMICA

A lo largo de los capítulos, se analizó el crecimiento de los animales a lo largo del periodo experimental. Por tanto, uno de los propósitos del muestreo previo al frío fue analizar el efecto de la reducción de lípidos en la dieta hasta un 14%, considerando que las dietas comerciales utilizadas actualmente en la industria proporcionan un exceso de energía (Ibarz et al., 2010a). Existen varios estudios donde se estudia el incremento en los niveles de lípidos en la dieta en la dorada, normalmente a temperaturas más elevadas, y todos sugieren que el contenido lipídico del pienso por sí mismo no aportaría ningún beneficio adicional en el crecimiento de los peces (Velázquez et al., 2006; Bonaldo et al., 2010; Mongile et al., 2014). Del mismo modo, nuestros resultados mostraron algo similar, puesto que tras 30 días de alimentación a 22°C, los peces no evidenciaron diferencias en el peso final, en la tasa de crecimiento o SGR o en los niveles de ingesta o FCR, indicando que es posible reducir la energía aportada por la dieta durante los meses previos al invierno sin encontrar diferencias en el crecimiento (Ibarz et al., 2010a). Tal y como se describe en el capítulo I, este hecho se debería probablemente a que metabólicamente los animales compensaron la reducción de lípidos. Por tanto, resulta interesante conocer el destino del exceso de lípidos y energía, y saber si esta compensación puede influir en la acumulación de lípidos oxidados en la dieta D18 al final de los primeros 30 días a 22°C. La elección de 14°C como la temperatura más baja del diseño experimental fue debido a que justo un grado por debajo, a los 13°C, la dorada cesa la ingesta (Tort et al., 1998; Ibarz et al., 2003; Ibarz et al., 2007b), de esta forma se aseguró que los animales disminuyeran su alimentación evitando el ayuno inducido por las bajas temperaturas. Como se esperaba, un descenso de la temperatura del agua provocó un estancamiento del crecimiento (descrito clásicamente como “cold growth arrest”), acompañado de una caída de hasta cuatro veces en el SGR y de un incremento del doble del FCR. Como se vio a lo largo de los capítulos I y II, las bajas temperaturas disminuyeron la actividad enzimática, enlenteciendo o frenando el metabolismo, y por lo tanto reduciendo la energía útil para el crecimiento del animal. A su vez, el hígado aumentó su tamaño y su peso dando lugar a un mayor HSI, demostrando que una condición de ayuno o ayuno parcial a bajas temperaturas no reduce el peso del hígado tal y como sí se describe a temperaturas más altas (Power et al., 2000; Ibarz et al., 2007a, Melis et al., 2017). Por lo que nosotros conocemos, solo dos estudios han propuesto cambios en la alimentación para mejorar el crecimiento de la dorada durante los meses de frío. Tort et al. (2004) probaron

dietas comerciales especiales para invierno en condiciones “indoor”, sin observar diferencias en el crecimiento entre dietas, mientras Silva et al. (2014) propusieron una dieta reforzada para mejorar el crecimiento de los peces durante una fluctuación térmica natural en tanques “outdoor”, describiendo un estancamiento del crecimiento de los peces durante los meses más fríos, independientemente de la dieta. Los resultados del capítulo I (también aparentes en los capítulos II y IV) seguirían la línea de estos trabajos previos, y demostraron que la reducción de lípidos en la dieta no afectó a los parámetros de crecimiento a temperaturas más bajas, y que la dieta menos energética (D14) mostró un rendimiento adecuado y como se discute más adelante sin que se alteren los distintos parámetros metabólicos estudiados.

Por otro lado, la alimentación de los cultivos durante los primeros días de la primavera, inmediatamente después de la estación fría, ha sido poco estudiada en dorada a pesar de ser el período donde los animales se muestran más susceptibles a sufrir diferentes afectaciones y donde se registra una mayor mortalidad (revisado en Ibarz et al., 2010a). Pocos estudios han tratado de comprender la capacidad de recuperación de esta especie después de un período de ayuno en frío (Tort et al., 2004; Ibarz et al., 2007a). Bavcevic et al. (2006) estudiaron los beneficios de un ayuno controlado durante la recuperación de la temperatura y Silva et al. (2014) describieron la importancia de utilizar nutrientes de elevada calidad durante la alimentación en el periodo de aumento de la temperatura. Nuestros datos evidenciaron que una variación del 4% en contenido lipídico de la dieta no modificó los parámetros de crecimiento. No obstante, la aparente dependencia del HSI respecto a la energía aportada a través de la dieta podría sugerir la recomendación de un mayor aporte energético durante este período, de acuerdo con los datos de Silva et al. (2014). Por otro lado, 35 días (final del LR) no fueron suficientes para recuperar los valores previos al frío de SGR y FCR, lo que demostró una adaptación tardía en la salida de las bajas temperaturas, independientemente del nivel de energía de la dieta. En cualquier caso, pese a no evidenciar cambios en el crecimiento, a lo largo de los capítulos I, II y III se evidencia una mejor recuperación metabólica, antioxidante y proteolítica en animales alimentados con un mayor contenido lipídico. En condiciones de cultivo, las bajas temperaturas no se mantienen de forma constante, de modo que los datos de esta tesis podrían complementar lo sugerido por Ibarz et al. (2007a), donde durante el periodo de exposición a 8°C se aprovecharon pequeños picos de subida de temperatura para alimentar adecuadamente los animales, garantizando una mejor recuperación a 18°C.

2. ESTADO DE LOS ANIMALES A 22°C, ANTES DE LA BAJADA DE LA TEMPERATURA

2.1 EFECTO DE LA DIETA SOBRE LOS METABOLITOS PLASMÁTICOS

Recientemente, se han propuesto algunos metabolitos y enzimas plasmáticos para evaluar el estado nutricional de juveniles sanos de dorada (Peres et al., 2013). Así pues, en el capítulo I de esta tesis se analizaron los niveles de glucosa, lactato, proteína y de las diferentes fracciones lipídicas como marcadores del efecto de la fluctuación térmica. Además, en el capítulo II se analizaron marcadores del estado oxido-reductor como las proteínas oxidadas (AOPP), los lípidos oxidados (TBARS) y los grupos tioles (-SH) con función antioxidante. Los datos de PC revelaron que los triacilglicéridos (TAG), los fosfolípidos (PL) y el colesterol total (TC) plasmáticos estaban inversamente relacionados

con el total de lípidos de la dieta, siendo la suma de todas las fracciones lipídicas plasmáticas más altas para D14, en condiciones previas a la ingesta (Polakof et al., 2007). Por lo tanto, las fracciones de lípidos en plasma parecen los indicadores más precisos del estado dietético (Peres et al., 2013) a 22°C. Curiosamente, los resultados del capítulo II mostraron como la reducción del contenido de lípidos en la dieta del 18% al 14% redujo los niveles de lípidos oxidados a la mitad en plasma e hígado. Sin embargo, un mayor contenido de lípidos en la dieta duplicó los niveles totales de lípidos en el plasma.

2.2.CONDICIONAMIENTO DE LA DIETA EN EL METABOLISMO HEPÁTICO

Para evaluar el efecto de la reducción de lípidos en la ingesta, los resultados obtenidos en PC (capítulo I) demostraron que los lípidos aportados por la dieta modificaron las actividades hepáticas de acuerdo con la ingesta de energía, tal y como se podría esperar a esta temperatura. Nuestros resultados mostraron para D18 actividades enzimáticas más elevadas en aquellas enzimas relacionadas con la producción de energía (CS, COX, LDH). Por otro lado, las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo proteico (AST, ALT, GDH) fueron menores, posiblemente tratando de preservar el uso de aminoácidos como combustible energético. La actividad de G6PDH también aumentó por una mayor energía (D18). Normalmente, la actividad hepática de G6PDH en peces aumenta con la disponibilidad de alimento para proporcionar poder reductor como NADPH (Bastrop et al., 1992), que es esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y para proteger las células contra agentes oxidantes. A su vez, el evidente aumento del metabolismo hepático en el grupo D18 implicó una mayor producción de radicales libres en las mitocondrias. De modo que una mayor actividad de G6PDH podría estar actuando para contrarrestar el ataque oxidativo. Todos los detalles sobre el estado oxido-reductor están incluidos en los capítulos II y III. Sorprendentemente, la actividad de HOAD no mostró una dependencia de la dieta, a pesar de ser una enzima asociada directamente con el catabolismo lipídico. Por lo general, los peces alimentados con mayor contenido lipídico aumentaron la abundancia de HOAD mitocondrial (Antonopoulou et al., 2014; Librán-Pérez et al., 2015). Los resultados de esta tesis sugieren que el metabolismo lipídico hepático no se vio afectado por una reducción del 4% de los lípidos de la dieta. Sin embargo, utilizando las proporciones enzimáticas (“ratios”) como indicadores de la reorganización metabólica, la dieta D14 presentó un valor de HOAD/CS más alto que D16 y D18, indicando que D14 tiene una mayor capacidad para utilizar los lípidos en el ciclo de Krebs. La preferencia por la oxidación de los combustibles (ácidos grasos frente a carbohidratos) y el índice mitocondrial (relación COX/CS) fueron equivalentes para todas las dietas, lo que demuestra la alta plasticidad del metabolismo hepático a temperaturas cálidas.

La peroxidación lipídica se considera un buen marcador de daño oxidativo en peces (Castro et al., 2012; Lushchak, 2016; Tocher et al., 2002). En mamíferos, niveles más altos de lípidos en la dieta se han asociado con una mayor susceptibilidad al daño inducido por peroxidación, sin embargo, esto no se ha demostrado de manera concluyente en los peces. En *Sciaenops ocellatus*, el aumento del contenido de lípidos en la dieta (0%, 7%, 14% y 21%) aumentó significativamente el estrés oxidativo en el hígado y el plasma (Craig et al., 1999), mientras que en el lenguado (*Solea senegalensis*), los niveles de TBARS aumentaron en los peces alimentados con dietas de elevado contenido lipídico (21% vs 11%) (Rueda-Jasso et al., 2004). Además, en varias especies de salmónidos, se ha observado que los niveles de lípidos oxidados en los tejidos aumentan después de la ingesta de cantidades altas de PUFA (Olsen et al., 1999; Skonberg et al., 1994). Los resultados de los capítulos II y III de esta tesis

mostraron como la reducción del contenido de lípidos en la dieta del 18% al 14% también redujo los niveles de lípidos oxidados a la mitad en el hígado durante el período pre-frío, disminuyendo los efectos putativos de la peroxidación lipídica. En condiciones de cultivo en jaulas marinas, los niveles basales de estrés son más altos debido a las altas densidades, al amontonamiento y/o al manejo (Montero et al., 1999), repercutiendo negativamente en el crecimiento y en el estado oxidativo de los peces (Suárez et al., 2015).

Las proteínas también son objetivos de la oxidación (Berlett y Stadtman, 1997) y aunque son susceptibles a un mayor número de oxidaciones que los lípidos, la eliminación de las proteínas oxidadas está más regulada y su acumulación suele ser menos evidente (Gutteridge y Halliwell, 2000; Valko et al., 2007). Los resultados sobre la eliminación de las proteínas oxidadas y su homeostasis se recogen en el capítulo III. En peces de agua dulce, cantidades mayores de AOPP en hígado y riñón de *Leuciscus cephalus* se han relacionado con la toxicidad de metales pesados ambientales (Hermenean et al., 2015), mientras que la toxicidad AOPP en carpa (*Carassius gibelio*) se ha descrito en estudios de nanopartículas (Stanca et al., 2013). En esta tesis, se utilizó el análisis de AOPP como marcador de estrés oxidativo por primera vez peces marinos. En el capítulo II la reducción del contenido de lípidos en la dieta no afectó significativamente a los niveles de AOPP en el plasma o el hígado a 22°C a pesar de producir diferencias en el nivel de peroxidación lipídica, sin embargo, en el capítulo III la dieta D16 mostró valores de oxidación proteica en hígado ligeramente superiores a las otras dietas.

Para hacer frente al daño oxidativo que resulta del metabolismo, las células utilizan sus defensas antioxidantes. Estas defensas pueden ser no enzimáticas, como los grupos tioles (-SH) y el glutatión, o enzimas con actividad antioxidante (Martínez-Álvarez et al., 2005). En el capítulo II un mayor contenido de lípidos en la dieta no aumentó los niveles de glutatión disponibles (glutatión total) en el hígado. No obstante, los niveles observados de aproximadamente 2,000 nmoles por gramo de peso fresco de hígado se encuentran dentro del rango descrito en la dorada (Pérez-Jiménez et al., 2012; Sitjà-Bobadilla et al., 2005). Mientras que los valores totales de glutatión están asociados con la actividad antioxidante, la relación GSH/GSSG se considera más indicativa del estado oxido-reductor intracelular, que corresponde al estrés oxidativo en los peces (Srikanth et al., 2013). En el capítulo II, la relación GSH/GSSG no se vio afectada por cambios en los lípidos de la dieta a 22°C, lo que sugirió que una diferencia del 4% en el contenido lipídico de la dieta no provoca un desequilibrio en las formas de glutatión hepático. Comparando los niveles de glutatión (GSH y tGSH) de la dieta D16 del capítulo III, con los del capítulo II se observa que son ligeramente inferiores, mostrando la relación GSH/GSSG más baja.

También se evaluaron las actividades enzimáticas antioxidantes en el hígado de dorada. La relación entre los lípidos de la dieta y las enzimas antioxidantes ha sido demostrada previamente por las actividades hepáticas más elevadas de CAT y SOD (un 10%) en dietas con altos niveles de lípidos (Rueda-Jasso et al., 2004) y en esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (un 6%) en dietas con un mayor contenido de lípidos (Babaei et al., 2017). Sin embargo, los resultados mostraron como un cambio del 4% en el contenido de lípidos de la dieta no alteró las actividades hepáticas de SOD, CAT o GR, aunque afectó ligeramente a la actividad hepática GPX. En el capítulo III los valores de D16 evidenciaron niveles más altos de CAT y de GR, lo que explicaría por un lado un mayor gasto de glutatión reducido y, por otro lado, la compensación enzimática de la menor cantidad de glutatión total, tal y

como se ha descrito previamente. Los datos sugirieron que modificar el contenido de lípidos en solo un 4% pudo variar mínimamente tanto las defensas antioxidantes no enzimáticas (principalmente glutatión) como enzimáticas en la dorada. Por lo tanto, el aumento observado en productos lipídicos oxidados en la dieta D18 a 22°C debería tomarse como evidencia de un incipiente estado oxido-reductor desacoplado entre radicales libres y enzimas hepáticas antioxidantes, lo que desfavorecería ligeramente a los peces alimentados con mayores cantidades de lípidos en la dieta. Actualmente, para mejorar el crecimiento en las piscifactorías se utilizan dietas con un elevado contenido de lípidos (más del 18%), y todo parece indicar que a 22°C esta tendencia debería de revisarse.

Los resultados de los capítulos I y II sugieren pequeñas diferencias metabólicas y antioxidantes en relación al contenido lipídico de la dieta, por lo tanto, la homeostasis proteica también se podría ver afectada. Pese a que en el capítulo III no se analizó el efecto de la reducción de lípidos, los primeros resultados obtenidos nos dan indicadores de HSPs, del sistema ubiquitina-proteasoma y del lisosoma en animales alimentados con D16. Estos resultados servirían de punto de partida para ver los efectos de la reducción de lípidos en la dieta, puesto que la fluctuación térmica propuesta sí que afectó a la homeostasis proteica.

2.3. ESTADO DE LOS PARÁMETROS OSMORREGULADORES PREVIOS AL FRÍO

La osmorregulación también está influenciada por las fluctuaciones térmicas, en este sentido, especies eurihalinas muestran dependencia estacional en las condiciones de cultivo (Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Polakof et al., 2006), afectando a la disponibilidad energética. En el capítulo I, los resultados plasmáticos mostraron valores muy altos de osmolaridad ($507 \pm 11,4$ para D14; $512 \pm 10,7$ para D16; $482 \pm 8,1$ para D18), sodio y cloruro en el plasma antes de la bajada de la temperatura, en PC. Estos valores resultaron como mínimo sorprendentes puesto que no pueden explicarse únicamente por la concentración de los iones medidos. Está descrito que muchos factores estresantes afectan el equilibrio hidro-mineral en peces (Wendelaar Bonga, 1997), siendo el cortisol plasmático el principal marcador de estrés, y la liberación de glucosa y lactato en el plasma el resultado primario de una respuesta al estrés (Barton et al., 2002). En el diseño experimental propuesto no se esperaba ningún estrés adicional, de modo que los elevados valores de osmolalidad junto con la glucosa plasmática relativamente más alta antes de la bajada de la temperatura podrían reflejar un estrés inherente (discutido en el capítulo IV). Pese a no estar reflejado en los datos de los capítulos I y IV, se midieron los niveles de cortisol plasmáticos, obteniendo resultados poco fiables, por tanto, serían necesarios más estudios para aclarar estas respuestas osmóticas elevadas en dorada. No obstante, en otro grupo de doradas también se obtuvo una elevada osmolaridad usando un osmómetro por punto de congelación (datos no publicados).

En el capítulo I también se analizaron las actividades de las Na^+/K^+ -ATPasas de branquias e intestinos. Nuestros datos mostraron una baja actividad de las ATPasas branquiales, incluso a 22°C, en comparación con otros estudios en dorada (Laiz-Carrión et al., 2005; Vargas-Chacoff et al., 2009a) pudiendo estar parcialmente relacionado con la alta osmolalidad del plasma y, por lo tanto, con el mantenimiento de un gradiente menor con el agua marina. Contrariamente al tejido branquial, la actividad de las Na^+/K^+ -ATPasas intestinales mostraron diferencias relacionadas con la dieta, y aunque la proporción de lípidos en la composición de la dieta no afectó a la capacidad osmorreguladora general, la dieta D14 mostró valores de actividad ATPasa intestinal 2-3 veces inferiores a D16 y D18

en PC. En dorada, la actividad Na^+/K^+ -ATPasa intestinal sensible a la inhibición por ouabaína tiene una distribución variable según la región intestinal y está relacionada tanto con los procesos iónicos como con los procesos nutricionales (Díaz et al., 1998; Almansa et al., 2001; Gregório et al., 2013). Alrededor de los 15°C este tipo de ATPasa deja de cumplir la ecuación de Arrhenius (Díaz et al., 1998). Esta temperatura, próxima a la temperatura más baja de nuestro estudio, podría explicar la falta de cambios en su actividad entre los períodos térmicos propuestos. Dado que no observamos diferencias significativas en los parámetros osmóticos, esta enzima podría reflejar indirectamente la capacidad de absorción intestinal de los peces ya que algunos nutrientes como los aminoácidos y la glucosa tienen un patrón de absorción asociado con Na^+ a través de la acción de la Na^+/K^+ -ATPasa (Klein et al. 1998, Rhoads et al., 1994). En nuestro estudio, la ausencia de diferencias en los parámetros de crecimiento impediría que las principales contribuciones dietéticas ocurran a través de cambios en la actividad Na^+/K^+ -ATPasa intestinal. Por lo tanto, se requerirían más estudios para abordar la relación entre la energía dietética y actividad Na^+/K^+ -ATPasa. Sin embargo, se sabe que la composición de ácidos grasos lipídicos polares de la mucosa intestinal se correlaciona con el punto de ruptura de la ecuación de Arrhenius, sugiriendo un papel regulador del microambiente lipídico sobre la actividad enzimática (Díaz et al., 1998) y una susceptibilidad de los enterocitos a las alteraciones lipídicas inducidas por la dieta (Díaz et al., 2016).

2.4. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA HIPOFISARIA POR LA DIETA A 22°C

El capítulo IV se centró en el papel regulador de la pituitaria en sí misma, analizando la expresión génica de algunos marcadores de la hipófisis mediante RT-PCR y los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas mediante ELISA. Para evitar las variaciones por los ritmos circadianos, todas las muestras se realizaron antes de la ingesta de alimento por la mañana. Los resultados evidenciaron que la mayor ingesta de lípidos en la dieta modificó la expresión de GH, TSH y ambas hormonas POMC junto con los receptores TR-beta y GR. Por lo tanto, la hipófisis respondió a los cambios en la dieta mostrando una mayor expresión en los animales alimentados con un 18% de lípidos.

Existen pocos estudios que analicen la expresión génica de marcadores hipofisarios, y no existen datos sobre la respuesta frente a cambios energéticos en la dieta ni sobre cambios en la temperatura. En un estudio previo del proteoma se observó el incremento de la actividad celular de la hipófisis en respuesta a la administración de suplementos aminoacídicos (Ibarz et al., 2010b). En el capítulo IV se observaron más transcritos de GH cuando se alimentó con D18, coincidiendo con los niveles circulantes de GH observados en alevines alimentados con un 17% de lípidos con respecto al 9% (Company et al., 1999). La liberación de TSH corresponde a una respuesta post-prandial en los peces, estimulando de esta forma la liberación de hormonas tiroideas. En nuestros resultados, a pesar de las marcadas diferencias de expresión de TSH entre D18 y D14, los niveles circulantes de T3 y T4 circulantes no cambiaron, posiblemente debido al momento de muestreo cuando ya que la señal alimenticia todavía no estaba presente, tal y como se describió en mamíferos (Ryg y Jacobsen 1982; McGuire et al., 1991). Además, en *Sciaenops ocellatus*, Cohn et al. (2010) sugirieron que la liberación de TSH sigue un ritmo circadiano dinámico de 24 horas y, en dorada, Montoya et al. (2010) describieron la presencia de picos plasmáticos de T3 y T4 influenciados por el momento de la ingesta. De manera similar a los niveles de hormonas tiroideas, en el capítulo I observamos que los metabolitos plasmáticos como la glucosa, el lactato o las proteínas no mostraron diferencias en los peces alimentados con 18% o 14%

de lípidos en la dieta debido a que el momento del muestreo fue previo a su alimentación. Respecto la expresión génica de POMC, Cardoso et al. (2010) describieron en hipófisis de dorada, una distribución diferencial en la expresión de los transcritos, diferenciando entre POMC-alfa (POMCA) y POMC-beta (POMCB). Nuestros resultados, evidenciaron una “up-regulation” de ambos transcritos de POMC como respuesta a una mayor proporción de lípidos en la dieta. Está descrito que a partir de la expresión de POMC derivan varios péptidos, como las hormonas estimuladoras de melanocitos (MSH), la corticotropina (ACTH) y β -endorfina (Millington, 2007), dando lugar a numerosas respuestas. Por tanto, distinguir el papel de cada POMC así como el de sus productos en respuesta a las diferentes dietas propuestas en el capítulo IV es complicado.

La cantidad y la distribución de receptores hormonales específicos tienen una gran relevancia en el control por retroalimentación de la liberación de hormonas (Czeisler y Klerman, 1999; Chiamolera y Wondisford, 2009). En respuesta a un mayor contenido de lípidos en la dieta, las expresiones TR beta y GR aumentaron, mientras que TR alfa fue el único marcador hipofisario en no evidenciar diferencias entre D18 y D14 antes de la bajada de la temperatura. En peces, los TR se relacionan con múltiples procesos fisiológicos presentando varias isoformas (Nelson y Habibi, 2009), mientras que en mamíferos los transcritos de TR beta se expresan más que los de TR alfa en la pituitaria anterior (Bradley et al., 1989). Este hallazgo explicaría la mayor sensibilidad de la modulación TR beta por los lípidos de la dieta en comparación con TR alfa, coincidiendo con la idea en la cual la expresión del gen TR beta podría regular la liberación de TSH por retroalimentación (Bradley et al., 1989). Por otro lado, la expresión génica de GR en dorada es específica de tejido, y se correlaciona con los niveles de cortisol en plasma (Acerete et al., 2007). Este no sería el caso de nuestras condiciones previas al descenso de la temperatura, puesto que en los capítulos I y II se evidenció como las variaciones de lípidos en la dieta no produjeron en ningún caso una condición estresante para el animal. Del mismo modo que se describió una modulación de la actividad hipofisaria mediante la administración de suplementos aminoacídicos (Ibarz et al., 2010b), nuestros resultados también mostraron variaciones de la expresión de hormonas y receptores en la pituitaria como respuesta a un descenso del 4% de lípidos de la dieta. A pesar de estos resultados, la respuesta general de los animales parece compensar la mayor entrada de energía adaptando su metabolismo, lo que no dio lugar a diferencias en el crecimiento tal y como se ha descrito al comienzo de la discusión. En este sentido, nuestros resultados se muestran poco concluyentes y se necesitan más estudios para determinar mejor los efectos de esa modulación hipofisaria y la ausencia de diferencias en el crecimiento entre las dietas D14 y D18.

3. ESTADO DE LOS ANIMALES DESPUÉS DE 50 DÍAS DE EXPOSICIÓN A 14°C

3.1. EFECTO DE LA BAJADA DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS METABOLITOS PLASMÁTICOS

Los primeros estudios desarrollados en el estudio de los efectos del frío en la dorada fueron induciendo un shock agudo por frío (de 18 a 8°C en 7 días), provocando un cuadro de hiperglucemia (Sala-Rabanal et al., 2003) e hiperlipidemia (Ibarz et al., 2007a). Clásicamente, los niveles altos de glucosa se han relacionado con el estrés y correlacionan con la liberación de cortisol (Rotllant et al., 2001), mientras que niveles más altos de lípidos

se deben principalmente a su movilización desde la grasa perivisceral (Ibarz et al., 2007a). A pesar de que nuestros resultados revelaron una hiperlipidemia en las dietas D14 y D16, la glucemia disminuyó a la mitad como consecuencia del frío en todas las dietas por igual. Todos los muestreos de los diferentes capítulos se realizaron a la misma hora en peces ayunados durante la noche para evitar variaciones circadianas y para que los resultados fueran comparables entre periodos térmicos. La disminución de los niveles de glucosa a bajas temperaturas se ha relacionado con una reducción en la capacidad hepática para producir glucosa, mientras que los niveles más altos de lípidos se han relacionado con una reducción de la ingesta y una mayor movilización de los depósitos de lípidos (Vargas-Chacoff et al., 2009b; Ibarz et al., 2010a). La relevancia de la variación de TAG y de glucosa circulantes radica en su afectación transitoria durante la respuesta a bajas temperaturas, mostrándose como buenos indicadores de la afectación por frío. La exposición a baja temperatura también es responsable de un de ayuno asociado, y es bien sabido que el ayuno a largo plazo causa una mayor tasa de peroxidación lipídica en la dorada (Pascual et al., 2003). Sin embargo, la movilización de lípidos en el hígado y la proteinemia se reducen a bajas temperaturas en exposiciones sostenidas (Ibarz et al., 2010c), lo que explicaría la menor presencia de TBARS y AOPP en el plasma.

3.2.EFECTO DE LA BAJADA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO

Algunos trabajos previos estudiaron los cambios metabólicos en la dorada (Ibarz et al., 2003), la composición hepática y las actividades enzimáticas después de una exposición a bajas temperaturas (Ibarz et al., 2007a; 2010b,c), revelando la dificultad de esta especie para aclimatarse a temperaturas por debajo de los 12-13°C. Los resultados de los capítulos I, II y III revelaron que tras 50 días de exposición a 14°C los animales no fueron capaces de compensar la bajada de temperatura, manteniendo su actividad enzimática en el hígado. Esta situación se agravó en la actividad de algunas enzimas como G6PDH, CS, AST y ALT, que se vieron fuertemente deprimidas, coincidiendo con lo descrito a temperaturas inferiores (Ibarz et al., 2010b). Paralelamente, varios estudios evaluaron el cambio anual en el metabolismo intermediario de la glucosa de doradas adultas en jaulas (Gómez-Meilán et al., 2007) y la capacidad osmorreguladora y metabólica de animales juveniles en tanques "indoor" (Vargas-Chacoff et al., 2009a). Estos estudios reportaron la ausencia de cambios estacionales en la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), alanina aminotransferasa (AST) y piruvato quinasa (Gómez-Meilán et al., 2007) o en FPBase y G6PDH (Vargas-Chacoff et al., 2009a). Además, estudios controlados, donde los animales se sometieron a 12°, 19° y 26°C durante 35 días (Vargas-Chacoff et al., 2009b) y a 8°C o 12°C (Ibarz et al., 2007b) corroboraron la falta de aclimatación enzimática a las bajas temperaturas. Esta falta de aclimatación metabólica daría explicación al estancamiento de la producción durante este periodo.

En lo que respecta a los efectos de la reducción de los lípidos de la dieta durante un este periodo, los valores de Q₁₀ demostraron que la depresión enzimática general afectó de forma diferente a todos los grupos, siendo las enzimas G6PDH, CS, AST y ALT de la dieta D14 las que mostraron su actividad reducida a menos de la mitad. Kyprianou et al. (2010) describieron un aumento de las actividades enzimáticas de LDH y HOAD en doradas mantenidas a bajas temperaturas, sugiriendo una estimulación del componente anaeróbico del metabolismo y una mayor utilización de ácidos grasos libres como combustible, contribuyendo a la renovación del ATP. Por tanto, los resultados obtenidos sugirieron una

depresión metabólica generalizada y una reorganización del metabolismo hepático, siendo muy evidente en la dieta D14, a través del aumento de las relaciones LDH/CS y HOAD/CS.

La exposición a un cambio térmico provoca un ataque oxidante, evidenciando niveles elevados de especies reactivas a los ácidos tiobarbitúricos (TBARS) en el hígado y de óxido nítrico, así como un aumento de la oxidación de proteínas después de la exposición aguda a 8°C (Ibarz et al., 2010b). Posiblemente en el capítulo II, el ataque oxidativo por ROS se produjo durante los primeros días de la exposición a 14°C, pasando inadvertido al final de los 50 días. Individuos de trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) sometidos a baja temperatura durante 70 días no mostraron una mayor lipoperoxidación en el hígado (Olsen et al., 1999), lo cual estaría en la línea de nuestros resultados. Nuestros resultados indicaron que los animales alimentados con D16 y D18 presentaron mayores cantidades de AOPP hepático, lo que es particularmente preocupante durante el período frío. El incremento de la oxidación de las proteínas tras un periodo de bajas temperaturas coincidiría con lo observado en trabajos previos en levadura (Isasa et al., 215) y en mamíferos (Selman et al., 2002; Carbonell et al., 2016).

El aumento de las actividades enzimáticas corresponde a una respuesta compensatoria como adaptación a las bajas temperaturas, en lo que se llama adaptación metabólica al frío (White et al., 2012). Sin embargo, los animales que se adaptan a bajas temperaturas pueden aumentar su capacidad oxidativa sin aumentar las actividades enzimáticas antioxidantes (Grim et al., 2010; Speers-Roesch y Ballantyne, 2005). Del mismo modo que sucedió en el capítulo I, nuestro resultados evidenciaron una falta de aclimatación de las enzimas antioxidantes a bajas temperaturas (14°C) en la dorada, de forma que la depresión enzimática global parece evidente al final de este periodo. En el capítulo II, esta especie mostró una disminución del metabolismo oxidativo y antioxidante durante la exposición prolongada al frío, especialmente las actividades de CAT y GR, que disminuyeron en un 40% y 20%, respectivamente. Por otro lado, la expresión de CAT, BHMT y GST está regulados negativamente en el proteoma del hígado de dorada después de una caída aguda de la temperatura (Ibarz et al., 2010b). Además, observamos una caída significativa en los niveles totales de glutatión (50% en formas reducidas y oxidadas) a baja temperatura para D14 y D18 (capítulo II). En el capítulo III se observó una reducción del 20% de los niveles de glutatión en la dieta D16, principalmente debido a una caída en su forma reducida (GSH) coincidiendo con el capítulo II. En todos los casos la bajada en los niveles de glutatión compromete la defensa contra el estrés oxidativo.

3.3. ESTADO DE LA HOMEOSTASIS PROTEICA EN EL HÍGADO TRAS LA EXPOSICIÓN A LAS BAJAS TEMPERATURAS

En el capítulo III, el grupo D16 evidenció, del mismo modo que D18 en el capítulo II, la acumulación de proteínas oxidadas en el hígado al final de 50 días de exposición a 14°C. Tal y como se ha descrito en el bloque anterior, dicha acumulación fue el resultado de una depresión de los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y glutatión). Uno de los primeros mecanismos para hacer frente al daño proteico es la unión de las proteínas de choque térmico (HSP). Existen pocos datos sobre la expresión de HSP hepática en peces, debido a la baja expresión de estas chaperonas en el hígado (principalmente HSP70) en comparación con otros tejidos como músculos y branquias (Feidantsis et al., 2013; Place y Hofmann 2004). Nuestros resultados evidenciaron que la exposición crónica a 14°C no modificó la expresión hepática HSP70 y HSP90 coincidiendo con un estudio estacional realizado en

jaulas marinas por Feidantsis et al. (2013), que incluso describió menor expresión de HSP90. De acuerdo con la depresión hepática inducida por frío (revisada en Ibarz et al., 2010a), la ausencia de cambios en la expresión de chaperonas implicaría una menor capacidad total de repliegamiento de las proteínas o, al menos, este repliegamiento se estaría realizando a una velocidad menor.

De forma simultánea, los daños irreparables en las proteínas escapan a la actuación de las HSPs y deben ser eliminadas a través de las principales vías de degradación: de una forma más regulada en el proteasoma ligado a ubiquitina (UPS), o en el lisosoma. La degradación de una proteína vía UPS implica un marcaje previo mediante la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina y una posterior degradación de la proteína marcada por el proteasoma 26S, compuesto por un núcleo catalítico 20S y dos subunidades reguladoras 19S (Hershko y Ciechanover, 1998). La capacidad de eliminación de proteínas dañadas por el proteasoma puede prevenir el estrés oxidativo y algunos autores lo han incluido como parte de las defensas antioxidantes (Jung et al., 2009). En peces, este complejo enzimático podría desempeñar un papel clave en los sistemas de defensa antioxidante especialmente en aquellas especies que habitan ambientes marinos permanentemente fríos (Gogliettino et al., 2016). En el capítulo III se analizó tanto la poliubiquitinación como la expresión de las subunidades 20S y 19S del proteasoma. La cantidad total de proteínas ubiquitinadas en el hígado no se vio alterada al final del periodo de frío (C). Estos resultados coincidieron con los obtenidos en dorada cultivada durante la temporada de frío (Feidantsis et al., 2018). Sin embargo, en peces que habitan el área polar se ha descrito que exhiben altos niveles de proteínas conjugadas con ubiquitina (Todgham et al., 2007), indicando posiblemente un mayor recambio proteico.

Para tratar de comprender el alcance real de este proceso, el capítulo III mostró por primera vez en peces el análisis individualizado de las 12 bandas poliubiquitinadas más relevantes en el hígado. Los resultados mostraron un patrón diferente de ubiquitinación hepática dependiente del peso molecular, siendo las proteínas de alto peso molecular (150 kDa) las más marcadas, en comparación con otras proteínas de peso molecular más bajo. En mamíferos existe una controversia sobre la relación entre el peso de la proteína y su tasa de recambio/degradación; clásicamente, se creía que las proteínas de alto peso molecular eran más sensibles a la oxidación y, por tanto, más propensas a reciclarse o degradarse que las proteínas de bajo peso molecular (Dice y Golberg, 1975). Sin embargo, en estudios recientes mediante técnicas de marcaje dinámico, como SILAC, han sugerido que el grado de desorden en una proteína es un claro marcador de la estabilidad de la proteína (Belle et al., 2006; Doherty et al., 2009). Respecto a la degradación específica a través del complejo 26S, los resultados evidenciaron en PC una proporción de 2 entre las subunidades 19S/20S (Peters et al., 1994), que se perdió drásticamente en respuesta al frío debido a la bajada de expresión de la subunidad catalítica 20S. Si tenemos en cuenta la depresión enzimática y metabólica descrita durante los capítulos I y II, la actividad catalítica de la subunidad 20S también podría verse disminuida tras 50 días a 14°C agravando las consecuencias de su menor expresión. Gogliettino et al., (2016) realizaron un análisis comparativo, entre una especie antártica, *Trematomus bernachii*, y otra de aguas más templadas, *Dicentrarchus labrax*, describiendo una mejor eficiencia de la maquinaria de degradación proteica en la especie adaptada al frío. Este no fue el caso de la dorada expuesta a bajas temperaturas, ya que manifestó una menor capacidad antioxidante, un mayor ataque oxidativo a las proteínas hepáticas, una ausencia de aclimatación de las HSP y menor expresión en la subunidad

catalítica 20S del proteasoma. Por otro lado, en este capítulo también se analizó la vía de degradación del lisosoma a través de la expresión de catepsina D. Esta proteasa situada en el interior del lisosoma se considera la endopeptidasa lisosomal más relevante en el hígado de muchas especies, incluidos los peces (Brooks et al., 1997). Los resultados mostraron una drástica reducción en la expresión de catepsina D hepática al final del período frío. En los peces, la gran mayoría de los estudios sobre la vía lisosomal se han centrado en el tejido muscular y, principalmente, en el estudio de las condiciones de ayuno. Salmeron et al. (2015) en dorada o Cassidy et al. (2018) en *Artic charr* describieron una mayor expresión de distintas catepsinas en el músculo tras un periodo de ayuno, incluida la catepsina D. Guderley et al. (2013) demostraron, también en condiciones de ayuno, una mayor expresión de catepsina D en hígado de bacalao. Aunque la exposición de 50 días a 14°C disminuyó la ingesta en dorada, comprometiendo el metabolismo hepático y el crecimiento (capítulo I), los resultados del capítulo III evidenciaron una menor expresión de catepsina D y, en consecuencia, una disminución de vía lisosomal en el hígado, coincidiendo con lo observado en el proteasoma. De manera que la exposición a las bajas temperaturas disminuyó la capacidad proteolítica del hígado, que sumado a la depresión de las defensas antioxidantes dan lugar a la acumulación de proteínas dañadas. Pese a que no se analizó el efecto de la reducción de lípidos en la homeostasis proteica, los resultados de los capítulos anteriores sugerirían un comportamiento muy similar para las otras dietas, dando explicación a la acumulación de proteínas oxidadas al final del periodo de bajas temperaturas en la dieta D18

3.4.EFECTO DE LA BAJADA DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS PARÁMETROS OSMORREGULADORES

Puesto que todas las especies muestran límites en su termotolerancia, existe una franja térmica óptima para su correcto crecimiento y bienestar (Pörtner, 2010). Trabajos previos han demostrado que temperaturas inferiores a las óptimas afectan a la capacidad osmorreguladora de los teleósteos (Staurnes et al., 2001; Imsland et al., 2003; Metz et al., 2003; Sardella et al., 2004, 2008) incluyendo la dorada (Vargas-Chacoff et al., 2009a,b). Por otro lado, la privación de alimentos en peces eurihalinos también influye en la osmorregulación, ya que el equilibrio osmótico se mantiene con la energía disponible (Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Polakof et al., 2006). Ambos factores, las bajas temperaturas y la disminución de la ingesta inducida por el frío están presentes en el desafío invernal de la dorada durante el transcurso del período de cultivo. En la línea de lo anteriormente descrito, nuestros resultados (capítulo I) evidencian una reducción del sodio y del cloruro plasmático tras la exposición de 50 días a 14°C y coinciden con los resultados de trabajos previos donde se realizó un descenso controlado de la temperatura (Sala-Rabanal et al., 2003) o bajo condiciones naturales (Vargas-Chacoff et al., 2009a).

Los cambios en la capacidad de osmorregulación en peces expuestos a bajas temperaturas se ha asociado clásicamente a alteraciones en branquias, riñones e/o intestinos. En general, los peces incrementan la actividad de las Na⁺/K⁺-ATPasas branquiales para hacer frente a las bajas temperaturas (Gabbianelli et al., 1996; Packer and Garvin 1998; Imsland et al., 2003; Metz et al., 2003). Sin embargo, en dorada, Vargas-Chacoff et al. (2009a) e Ibarz et al. (2010a) no pudieron confirmar esta adaptación al frío. Dichos cambios en la actividad vienen acompañados de pequeñas modificaciones morfológicas como la reducción de las microvellosidades de la membrana apical y el número de células de cloruro (Ibarz et al., 2010a) después de los primeros días de exposición al frío. La

exposición prolongada a bajas temperaturas podría invertir parcialmente las alteraciones descritas en las primeras etapas de exposición al frío. Por tanto, la ausencia de cambios en la actividad de las bombas ATPasa branquiales e intestinales al final del periodo de frío podría ser debido su rápida adaptación, lo que no sería de extrañar teniendo en cuenta su vital importancia.

3.5. RESPUESTA HIPOFISARIA A LA EXPOSICIÓN DE BAJA TEMPERATURA

A pesar de la drástica depresión de los tejidos periféricos debido a la exposición de 50 días a 14°C (capítulos I, II y III), los marcadores hipofisarios analizados mostraron una regulación al alza (“up-regulation”) generalizada de su expresión génica, independientemente de la dieta. Como la bajada de la temperatura se produjo al mismo tiempo que la disminución de la ingesta (descrito en el capítulo I), es difícil saber cómo la hipófisis, o incluso el hipotálamo, interpretaron cada una de las señales. Deane y Woo (2006) describieron en *Sparus sarba* una mayor expresión génica y mayor presencia de GH en la pituitaria tras una aclimatación crónica a 12°C en comparación con el grupo mantenido a 25°C. En *Siganus guttatus*, Ayson et al. (2006) publicaron niveles más altos de ARNm de GH en la hipófisis después de 15 días de ayuno. De acuerdo con estos estudios, los resultados del capítulo IV mostraron un incremento del doble en la expresión génica de GH en ambas dietas al final del periodo frío (C). Del mismo modo, la expresión de TSH evidenció una regulación al alza de más de dos veces al final del periodo frío a 14°C, independientemente de la dieta. Aunque no existen datos sobre la expresión génica de TSH en la pituitaria de dorada, Arslan et al. (2016) describieron que tras 45 días de exposición a 6°C se disminuyó la TSH plasmática en la carpa común (*Cyprinus carpio*), sugiriendo que los cambios hormonales en el plasma provocados por un estrés térmico a baja temperatura se manifiestan después de 15 días. Más allá de las alteraciones que provoca la exposición a bajas temperaturas, el ayuno parece condicionar la falta de sensibilidad a TSH en la tiroides, eliminando los patrones diarios de liberación de hormonas tiroideas en plasma y la actividad monodeiodinasa del propio tejido (Power et al., 2000; Gaylord et al., 2001; De Pedro et al., 2003). En el capítulo IV se observó una disminución de T3 circulante debido a las bajas temperaturas, aumentando la relación T4/T3. Esta relación se ha descrito como un buen marcador de la actividad deiodinasa de los tejidos periféricos (De Pedro et al., 2003) transformando T4 en la hormona activa T3 (Blanton y Specket, 2007). Por lo tanto, según la depresión enzimática periférica ampliamente evidenciada en los capítulos I, II y III después de 50 de exposición al frío, parece lógico atribuir el desequilibrio en la relación T4/T3 (patente en ambas dietas) a una depresión de la actividad deiodinasa del tejido periférico. Teniendo en cuenta que, nuevamente, son necesarios más estudios que lo puedan confirmar, la reducción de T3 circulante podría explicar el incremento de ambos receptores tiroideos en la hipófisis a bajas temperaturas, indicando que la hipófisis es capaz de integrar la recepción de señales internas (retroalimentación) así como las externas (temperatura).

Aunque las fluctuaciones de temperatura son naturales para los peces, los cambios abruptos pueden convertirse en un factor estresante, induciendo respuestas de estrés mediadas por la expresión hipofisaria de POMC. Barton y Schreck (1987) describieron un pico de cortisol después de un estrés agudo o crónico en individuos juveniles de *Oncorhynchus tshawytscha* aclimatados a tres temperaturas diferentes. Sumpter et al. (1986) demostraron que los cambios agudos de temperatura amplificaban la respuesta endocrina al manejo y el confinamiento, mientras que Staurnes et al. (1994) estudiaron la aclimatación al agua fría en *Gadus morhua*, observando un marcado aumento del cortisol

plasmático y de la concentración de glucosa. Sin embargo, en nuestros resultados, después de 50 días a 14°C, la dorada no mostró sobreexpresión de POMCs, y no se evidenciaron efectos secundarios por parte del eje HPI. Estos controvertidos resultados podrían estar de acuerdo con los escasos datos sobre el estrés por bajas temperaturas en dorada, donde Rotllant et al. (2000) constataron una liberación transitoria y no sostenida de cortisol y ACTH después de una caída en la temperatura del agua de 18 a 9°C. Por el contrario, la expresión de GR aumentó tras 50 días a 14°C, lo que sugeriría la presencia de una mayor cantidad de cortisol circulante (Acerete et al., 2007). Considerando estos resultados, resulta evidente la necesidad de estudios que relacionen los ejes de estrés con las escasas señales de respuesta al mismo cuando el metabolismo de la dorada se ve inhibido por la exposición crónica a baja temperatura.

4. ESTADO DE LOS ANIMALES TRAS LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA

4.1. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA EN LOS METABOLITOS PLASMÁTICOS

La alteración plasmática de los metabolitos analizados al final del periodo de frío mostró una reversión cuando la temperatura del agua aumentó gradualmente hasta volver a alcanzar los 22°C. Así pues, nuestros resultados coincidieron con la variación inversa de los niveles de glucosa y TAG circulantes descritos por Vargas-Chacoff et al. (2009a) en condiciones controladas, siendo los valores de glucosa los más altos y los valores de TAG los más bajos durante el verano y siendo al contrario en invierno.

Por otro lado, incrementaron los niveles plasmáticos de TBARS, principalmente en la recuperación temprana, revertiendo al final de la recuperación. Estos resultados coincidieron con una menor acumulación de lípidos oxidados en el hígado independientemente de la dieta, sugiriendo una recuperación de la capacidad del tejido hepático para eliminar los lípidos oxidados acumulados durante el período frío. Por tanto, el incremento de TBARS plasmáticos podría sugerir una posible movilización de origen hepático. El estudio de otros tejidos como los músculos, el intestino o el adiposo serían necesarios para confirmar el posible origen de los TBARS circulantes en respuesta al estrés por incremento de la temperatura. En el capítulo II no se apreciaron cambios en los niveles plasmáticos de AOPP durante el período de recuperación.

4.2. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO

Feidantsis et al. (2015) demostraron en dorada respuestas dependientes del tejido y del “timing” en las actividades de LDH, HOAD y CS como consecuencia de un calentamiento agudo del agua. Por ejemplo, en una transición de 18°C a 24°C hubo un aumento en las actividades HOAD y CS, así como una disminución en LDH durante la primera semana, sugiriendo una mayor capacidad aeróbica hepática en respuesta a una mayor demanda energética. Por lo tanto, nuestros resultados evidenciaron que la recuperación de la temperatura tras un largo periodo de frío parece bastante diferente a la de un incremento de la temperatura en animales mantenidos a temperaturas óptimas. Los datos de ER mostraron que 7 días no fueron suficientes para restablecer la depresión enzimática metabólica, sugiriendo una falta de adaptación al incremento de la temperatura.

Únicamente las actividades de LDH de la dieta D18 y CS de la D16 mostraron valores de Q_{10} más altos. Este incremento de LDH para los animales de D18 provocó una relación LDH/CS más alta, sugiriendo un desacoplamiento del proceso anaeróbico durante los primeros días de recuperación para esta dieta. Los datos de LR, mostraron como tras 35 días de haber incrementado la temperatura se revertió la actividad de las principales enzimas metabólicas, llegando a los valores previos al frío y haciendo patente nuevamente la demora en el proceso de recuperación para esta especie. Como punto a añadir, debido a que los valores de las actividades enzimáticas fueron proporcionados por miligramo de peso fresco de hígado y que el grupo D14 mostró un HSI dos veces menor que la dieta D18, la alimentación con D14 estaría agravando la situación y comprometería aún más la correcta funcionalidad del hígado durante la salida del frío. Por lo tanto, aunque el crecimiento de los peces no fue significativamente diferente, la dieta D14 parece ser escasa en energía e insuficiente para las demandas de la recuperación térmica y sería desaconsejable para alimentar los cultivos durante este período.

En la línea de lo observado en el capítulo I, en dorada, la recuperación de la temperatura coincide con una restauración progresiva de la tasa metabólica previa al frío (Ibarz et al., 2007a) y como consecuencia, la activación de la maquinaria mitocondrial productora de energía y generadora de ROS (Gutteridge y Halliwell, 2010). En peces marinos, el calentamiento del agua (18°C-28°C) a menudo provoca estrés oxidativo debido a un desequilibrio entre la generación y la eliminación de ROS (Feidantsis et al., 2015). A nivel hepático, los datos reflejan una mayor acumulación de proteínas oxidadas en las dietas con un menor porcentaje de lípidos (D14 y D16). Este incremento se produjo en la primera semana de la recuperación, recuperando valores iniciales al final del LR. Pese a que en el capítulo III no se evaluaron los parámetros proteolíticos en D14 y D18, la recuperación tardía de la maquinaria enzimática se evidenció para todas las dietas (capítulos I y II), por tanto, es probable que también se produzca una recuperación tardía de las principales vías catabólicas para las dietas, especialmente para D14. En mamíferos, la acumulación de AOPP en hígado puede utilizarse como un buen marcador de estrés oxidativo en la detección de insuficiencia hepática aguda crónica (Garnacho-Castaño et al., 2016; Liu et al., 2012). Así pues, la acumulación de AOPP en hígado durante el periodo de recuperación temprana en los peces alimentados con las dietas D14 (capítulo II) y D16 (capítulo III), sumado a la mayor acumulación de TBARS al final del periodo de recuperación, podría sugerir los beneficios de la alimentación con piensos más energéticos durante la de recuperación de la temperatura.

Con respecto a las defensas antioxidantes del hígado durante la recuperación, los niveles totales de glutatión y la relación GSH/GSSG no se restablecieron al final del período de recuperación, debido a la caída de GSH reducido y al incremento de la forma oxidada. En peces, la recuperación de una condición perjudicial o nociva, como el ayuno, presenta dinámicas variables según los tejidos o las funciones estudiadas (Ali et al., 2003; Metcalfe et al., 2002; Nicieza y Metcalfe, 1997). El desequilibrio entre las formas reducidas y oxidadas de glutatión (la relación GSH/GSSG) durante la recuperación de la temperatura coincidió con el aumento de la actividad GPX, que genera la forma oxidada de glutatión. El ciclo oxido-reductor del glutatión se mostró como una pieza clave para entender el estado hepático durante los períodos de frío y recuperación, pero todavía quedan incógnitas por resolver. Por tanto, serían necesarios estudios centrados en conocer la afectación de las vías de degradación a péptidos más pequeños, y principalmente, las vías enzimáticas de biosíntesis durante una fluctuación térmica. Respecto a la afectación de los mecanismos enzimáticos

durante la recuperación de la temperatura, la actividad de SOD se mantuvo sin cambios, las actividades de CAT y GPX aumentaron, y la actividad de GR mantuvo su actividad igual que al final del período frío. A excepción de GR, los resultados concordaron con la mayor expresión génica de las enzimas antioxidantes a altas temperaturas en dorada, tal y como describieron Feidantsis et al. (2015). Del mismo modo que en el capítulo I, los niveles de actividad enzimática se mostraron por miligramo de peso de hígado fresco y dado que la alimentación con las dietas D14 (capítulo II) y D16 (capítulo III) presentaron un HSI menor que en la dieta D18, las capacidades antioxidantes hepáticas totales de esas dietas se redujeron marcadamente durante el período de recuperación. Así pues, haciendo una visión de conjunto, parece evidente que nuestros resultados mostraron como el período de recuperación de 35 días propuesto, aparentemente no fue suficiente para revertir el estado oxidoreductor hasta valores previos al frío. Si esta recuperación incompleta es atribuible al corto período de nuestra recuperación o a la insuficiencia de la dieta durante este período de recuperación, como parece ser el caso de D14, no se puede concluir a partir de nuestros resultados. Por lo tanto, prestando especial atención a las condiciones productivas de esta especie, se necesitan más experimentos para conocer mejor el período de recuperación de las bajas temperaturas.

4.3. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LA HOMEOSTASIS PROTEICA EN EL HÍGADO

En el capítulo I, se evidenció la recuperación del metabolismo intermediario después de la estación fría, y en los capítulos II y III se describió la recuperación incompleta de los mecanismos antioxidantes después de 30 días a 22°C, causando un incremento en la acumulación de proteínas oxidadas en las primeras etapas de la recuperación para las dietas menos energéticas.

En lo referente a los mecanismos específicos relacionados con la homeostasis de proteínas, los resultados del capítulo III mostraron evidencias de una reversión por parte de todos los mecanismos al final del período de recuperación. Como las expresiones HSP70 y HSP90 no se modificaron al final del período de frío (C), se consideró que su actividad solo dependía de la temperatura durante el aumento de la temperatura. Curiosamente, la familia de HSP fue descrita inicialmente en la protección frente a un choque térmico por temperatura caliente. En el capítulo III, el calentamiento de 14°C a 22°C no aumentó la expresión de HSPs en el hígado. Por el contrario, en músculo rojo, en músculo blanco y en corazón de dorada, se describieron en estudios “indoor” mayores expresiones de HSP70 y HSP90 frente a temperaturas más altas (Feidantsis et al., 2009). Además, en un experimento estacional en condiciones de cultivo se describieron niveles más altos de HSPs a principios de la primavera, alcanzando su máximo a principios de mayo (Feidantsis et al., 2013). No obstante, la reducción de proteínas oxidadas en el hígado parece depender del tiempo de recuperación, siendo siete días insuficientes para revertir el ataque oxidativo registrado al final del período de frío. En consonancia, las proteínas marcadas con ubiquitina durante la recuperación temprana (ER) no se modificaron con respecto a lo observado tras la exposición a 50 días a 14°C frío. Al final del período de recuperación (LR), el marcaje con ubiquitina en las proteínas de alto peso molecular revertió, mientras que en las proteínas de bajo peso molecular aún se mostraba bajo. Feidantsis et al. (2018) en un ensayo estacional en jaulas, describió un aumento gradual de los conjugados totales de ubiquitina de abril a junio en corazón e hígado de dorada debido a una mayor actividad metabólica. Una vez más, nuestros resultados sugieren la necesidad de más estudios, en este caso para

comprender mejor la respuesta específica del marcaje de ubiquitina con respecto al peso molecular de las proteínas. Del mismo modo que sucede con la gran mayoría del resto de actividades enzimáticas descritas en los capítulos I y II, la expresión de la subunidad 20S del proteasoma, disminuida a bajas temperaturas, se recuperó después de 30 días de aumentar la temperatura a 22°C, restaurando la capacidad de reciclaje proteico del hígado a través de la ruta del proteasoma. Dorts et al. (2012) describieron en *Cottus gobio* el aumento de la actividad proteasomal en el hígado y las branquias después de la exposición a temperaturas elevadas y Lamarre et al. (2010) observaron un aumento de la actividad en el hígado de *Anarhichas minor* aclimatados a altas temperaturas. Del mismo modo, la actividad lisosomal también revertió al final de la recuperación, incrementando la expresión de catepsina D hasta los niveles de PC. Nuestros resultados coincidieron con los de Feidantsis et al. (2018), los cuales describieron una dinámica estacional para la actividad lisosomal autofágica en hígado mostrando los valores más altos en junio, después de la recuperación de la temperatura. Los resultados la recuperación del capítulo III sugirieron que la homeostasis proteica alterada durante las temperaturas inducidas por el frío fue una condición transitoria para la dorada, puesto que las vías catalíticas se recuperaron por completo al final del periodo de recuperación, reduciendo la acumulación de AOPP hasta valores PC.

Los resultados correspondientes a las principales vías de degradación y reciclado de las proteínas mostraron una respuesta coordinada frente a las variaciones térmicas. En este sentido, algunos autores sugirieron respuestas simultáneas y entrecruzadas entre HSP, UPS y el lisosoma: HSP70 se ha relacionado con la formación y la disociación del proteosoma 26S durante la adaptación al estrés oxidativo (Grune et al., 2011) y, en mamíferos, algunos autores coinciden con la acción conjunta de UPS y lisosoma (Ciechanover et al., 2012; Chondriogranni et al., 2014). En peces, estas relaciones todavía no están descritas.

4.4. EFECTO DE LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS PARÁMETROS OSMORREGULADORES

Según los resultados del capítulo I, los niveles más altos de potasio (un 70%) y fósforo en plasma se encontraron al final del periodo de recuperación, curiosamente estos iones se obtienen principalmente a través de la dieta. Estos datos evidenciaron una situación diferente con respecto al período anterior al frío (PC), a la misma temperatura. En peces, está descrito que los niveles de potasio en plasma aumentan o se mantienen constantes al aumentar la temperatura (Burton, 1986) así que los resultados obtenidos podrían corresponder a una respuesta de adaptación. Por otro lado, está descrito un incremento de los niveles plasmáticos de potasio en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) justo antes de realizar un ejercicio máximo, especialmente a temperaturas elevadas, ya que el ejercicio de alta intensidad produce la pérdida de potasio en el tejido muscular (Jain & Farrell, 2003). Por último, otra posible causa responsable de un incremento de los niveles plasmáticos de potasio podría ser la contaminación por hemólisis (Mirghaed et al., 2017), hecho que no se produjo en condiciones de muestreo ni de análisis. En cualquier caso, y con una visión de conjunto, la causa más posible respecto al incremento del potasio plasmático durante la recuperación podría ser la falta de un estado nutricional adecuado sumado al aumento del metabolismo y de la actividad general inducida por el incremento de la temperatura.

4.5. RESPUESTA HIPOFISARIA FRENTE A LA RECUPERACIÓN DE LA TEMPERATURA A 22°C

Como ocurrió durante la exposición a bajas temperaturas, la pituitaria fue capaz de reconocer la restauración de la temperatura y la recuperación de la ingesta. Sorprendentemente, a diferencia de los períodos anteriores, el restablecimiento gradual de la temperatura hasta los 22°C moduló de manera diferente cada uno de los marcadores hipofisarios analizados: mientras que la expresión de TSH recuperó los niveles de expresión en 7 días (ER); la expresión de GH, de ambos TR y de GR se recuperó al final de los 35 días de recuperación (LR); y POMC mostró una respuesta diferente entre D14 y D18. La recuperación de la expresión génica de TSH se logró en una semana a 22°C, indicando la gran relevancia de la recuperación temprana de la liberación de TSH, sin embargo, las consecuencias de este mecanismo todavía no están descritas en peces (revisado por Blanton y Specker, 2007). Por otro lado, la bajada en la expresión de GH se produjo más lentamente que la de TSH. El aumento de la temperatura hasta los 22°C también incrementó la ingesta de los animales y la recuperación de la actividad enzimática (capítulos I, II y III), hecho que podría estar íntimamente relacionado con la mayor expresión de TSH y GH en las primeras etapas de periodo de recuperación. Los niveles plasmáticos de T3 mostraron una sobrecompensación al final de este periodo (LR), lo que evidenció la relevancia de las hormonas tiroideas en este momento térmico, pudiendo ser una señal de crecimiento compensatorio (Blanton y Specker, 2007). Por otro lado, la expresión de los TRs sugirió la inherencia del efecto de la dieta. En D14, ambos TRs se sobreexpresaron en ER, volviendo a los valores iniciales al final de la recuperación.

Con respecto a la expresión de los POMC, el proceso de recuperación mostró diferentes patrones en la “down-regulation” de POMCA y POMCB y fueron dependientes de la dieta. Debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos reguladores de la expresión de los transcritos de POMC, nuevamente es difícil justificar su comportamiento. El aumento de la temperatura provocó un incremento de POMC en D14 sugiriendo un posible efecto estresante para los animales de esta dieta. Este hecho respaldaría los datos mostrados en los capítulos I y II donde se apreció una menor capacidad de los animales alimentados con D14 para hacer frente a la recuperación de la temperatura. Por otra parte, la expresión hipofisaria de GR para D14 se recuperó más tarde que D18, lo que justificaría una señal de retroalimentación y, por tanto, una situación estresante para esa dieta.

5. SUMARIO

Todos los resultados obtenidos sugieren que la estrategia alimentaria debe adecuarse a la temperatura. La reducción de los lípidos en la dieta no altera el crecimiento de los animales ya que parecen adaptarse metabólicamente a la disponibilidad energética (capítulo I) y mejora el estado oxido-reductor del animal en PC y C (capítulo II). Todo ello sin que la respuesta hipofisaria se vea deprimida por el frío (a diferencia de los tejidos periféricos), y siendo más activa en D18 durante todos los periodos térmicos (capítulo IV). Por tanto, durante los periodos PC y C se recomendaría la alimentación con piensos bajos en lípidos. Durante la recuperación de la temperatura, los resultados indican que sería necesaria la alimentación con dietas más energéticas y reforzadas. La reducción de los lípidos de la dieta parece dificultar la salida de las bajas temperaturas debido a la reorganización del metabolismo intermediario apreciada durante C (capítulo I), y a la acumulación de

proteínas oxidadas en el hígado de D14 y D16 como consecuencia de la depresión antioxidante y de la caída del glutatión (capítulos II y III). Además, los primeros resultados de homeostasis proteica en D16 (capítulo III) sugieren una recuperación tardía de los sistemas proteolíticos, agravando el desbalance oxido-reductor de este periodo

CONCLUSIONES

De la presente tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La reducción de los lípidos en la dieta (del 18% al 14%) no afecta al crecimiento ni al factor de condición de la dorada durante un periodo de fluctuaciones térmicas en condiciones controladas, sugiriendo que los animales compensan la reducción de la ingesta lipídica y la menor energía asociada, manteniendo su balance energético.
2. La eficiencia de los sistemas antioxidantes es independiente de los niveles de lípidos en la dieta, en los rangos analizados. Las tres dietas tienen en el hígado valores similares de antioxidantes endógenos no enzimáticos (glutati6n) y de antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GR y GPX) a 22°C.
3. La alimentaci6n con dietas de menor contenido lipídico a 22°C muestran mayores niveles de lípidos circulantes y una menor acumulaci6n de lípidos oxidados en el hígado y en el plasma, sugiriendo un mayor ataque oxidativo en los animales con mayor aporte lipídico. Sin embargo, la mayor actividad metabólica de D18 tambi6n se observa en la actividad G6PD, sugiriendo su posible implicaci6n en la creaci6n de poder reductor como mecanismo compensatorio a la mayor producci6n de ROS. En condiciones de cultivo los factores estresantes son m6s numerosos, por lo tanto, esta situaci6n podría verse agravada en jaulas. Por lo tanto, recomendamos dietas con contenido reducido de lípidos durante los periodos de cultivo previos al frío.
4. La actividad hipofisaria responde a cambios en la dieta. La alimentaci6n con una mayor cantidad de lípidos en la dieta incrementa la actividad hipofisaria de manera global, incrementando la expresi6n génica de hormonas y de receptores.
5. Un periodo de exposici6n de 50 días a 14°C bajo condiciones controladas detiene el crecimiento, disminuye el SGR e incrementa el HSI independientemente de la dieta. La dorada es incapaz de compensar su actividad metabólica pese a que los animales siguen comiendo. En este sentido, pese a que la depresi6n metabólica afecta de forma diferente a las dietas, la exposici6n a bajas temperaturas implica una reorganizaci6n metabólica, m6s evidente en la dieta D14 al mostrar una mayor relaci6n de LDH/CS y HOAD/CS.
6. La depresi6n enzimática descrita en el metabolismo durante la exposici6n de 50 días a 14°C tambi6n se refleja en falta de adaptaci6n de las enzimas antioxidantes, especialmente en CAT y GR. La caída de la temperatura disminuye los niveles de glutati6n hepático, posiblemente por una depresi6n de las vías de síntesis, y tambi6n altera su ciclo oxido-reductor debido a la descompensaci6n entre GR y GPX. Como consecuencia, D16 y D18 muestran una acumulaci6n de proteínas oxidadas en el hígado al final del periodo de frío.
7. Los mecanismos de reparaci6n proteico y los sistemas proteolíticos tampoco se adaptan a la bajada de temperatura en condiciones controladas. La menor expresi6n de la subunidad catalítica del proteasoma y de la expresi6n de catepsinas lisosomales, implica una bajada de ambas actividades. Este hecho sumado a la depresi6n de los mecanismos antioxidantes, corroboran la etiología de la acumulaci6n de proteínas oxidadas en el hígado al final de 50 días de exposici6n a 14 °C. A su vez, el marcaje de las proteínas dañadas con ubiquitina no varía durante la fluctuaci6n térmica, sin

embargo, los cambios térmicos alteran el patrón de marcaje en relación al peso molecular. Esto podría indicar el reciclado selectivo de grupos proteicos o proteínas concretas en función de las necesidades de cada periodo térmico.

8. A diferencia de lo observado en metabolismo, sistemas antioxidantes y homeostasis proteica, la hipófisis responde a las bajas temperaturas en condiciones controladas. El descenso de la temperatura incrementa la expresión génica de la mayoría de los marcadores (hormonas y receptores), indicando que posiblemente la hipófisis es capaz de detectar la depresión global del animal. En este punto son necesarios más estudios para dar más a estos resultados. Por otro lado, la exposición al frío disminuye la T₃ plasmática y altera la relación T₄/T₃, presumiblemente como consecuencia de la bajada de la actividad deionidasa de los tejidos periféricos.
9. En el periodo de recuperación de la temperatura hasta los 22°C, la dorada muestra una recuperación tardía del metabolismo y de los sistemas antioxidantes, además de un aumento de los niveles de potasio. La suma de estas condiciones podría reflejar un desbalance entre los requerimientos energéticos de la salida del frío y la demanda exigida por el incremento de la actividad global del animal durante los primeros días de la recuperación de la temperatura. Este hecho podría generar un mayor estrés en los animales, especialmente en los alimentados con un menor porcentaje lipídico.
10. Durante la recuperación de la temperatura, debido a que los resultados se expresan por unidades de actividad en gramos de tejido fresco, el menor HSI de los animales de D14 evidencian una peor recuperación de la actividad enzimática global. Por este motivo dietas con menor contenido lipídico y energía podrían ser menos adecuadas durante la salida del frío.
11. Paralelamente a la depresión enzimática antioxidante, el glutatión no recupera valores iniciales. El incremento de la actividad de la GPX sugiere la utilización del glutatión para reducir el ataque oxidativo, acumulando GSSG y desequilibrando su capacidad antioxidante durante el periodo de recuperación térmica. Además, los sistemas de reparación proteica también muestran una recuperación tardía. Por lo tanto, la depresión de los sistemas antioxidantes y proteolíticos, sumado a la poca disponibilidad energética podría explicar la acumulación de proteínas oxidadas en el hígado tras la primera semana de la recuperación en D14 y en D16, apoyando la necesidad de dietas más energéticas y correctamente formuladas durante la recuperación térmica.
12. Durante la recuperación se producen la reversión de la sobreexpresión hormonal en la hipófisis. Nuevamente, la hipófisis reconoce (vía hipotálamo) los cambios de temperatura. El incremento de la temperatura mostró, por otro lado, una sobrecompensación de T₃ al final del periodo de recuperación, lo que demuestra la relevancia de las hormonas tiroideas en el proceso de recuperación, seguramente ligadas con el proceso de realimentación. Por otro lado, POMCs elevan su expresión durante la primera semana de la recuperación en D14, demostrando nuevamente el desafío y el estrés que supone la recuperación de las temperaturas, especialmente en esta dieta con menor contenido lipídico y energético.

BIBLIOGRAFÍA

- Acerete, L., Balasch, J. C., Castellana, B., Redruello, B., Roher, N., Canario, A. V., et al. (2007). Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 148, 32–43. doi:10.1016/j.cbpb.2007.04.015.
- Adham, K., Khairalla, A., Abu-Shabana, M., Abdel-Maguid, N., and Moneim, A. A. (1997). Environmental stress in lake Maryut and physiological response of *Tilapia zilli* Gerv., *J. Environ. Sci. Heal. . Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.* 32, 2585–2598. doi:10.1080/10934529709376705.
- Ahmad, S. (1995). “Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins,” in *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology* (Boston, MA: Springer US), 238–272. doi:10.1007/978-1-4615-9689-9_7.
- Ali, M., Nieceza, A., and Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish Fish.* 4, 147–190. doi:10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x.
- Almansa, E., Sanchez, J., Cozzi, S., Casariego, M., Cejas, J., and Díaz, M. (2001). Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na⁺-K⁺-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 171, 557–567. doi:10.1007/s003600100206.
- Antonopoulou, E., Kousidou, E., Tserga, E., Feidantsis, K., and Chatzifotis, S. (2014). Dietary lipid levels in meagre (*Argyrosomus regius*): Effects on biochemical and molecular indicators of liver. *Aquaculture* 428–429, 265–271. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2014.03.024.
- APROMAR (2018). La Acuicultura en España.
- Aras, N. M., Bayir, A., Sirkecioglu, A. N., Bayir, M., Aksakal, E., and Haliloglu, H. I. (2009). Seasonal changes in antioxidant defence system of liver and gills of *Salmo trutta caspius*, *Salmo trutta labrax* and *Salmo trutta macrostigma*. *J. Fish Biol.* 74, 842–856. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02164.x.
- Arslan, G., Sahin, T., Hisar, O., and Hisar, S. A. (2016). Effects of low temperature and starvation on plasma cortisol, triiodothyronine, thyroxine, thyroid-stimulating hormone and prolactin levels of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). 4, 5–9.
- Ayson, F. G., de Jesus-Ayson, E. G. T., and Takemura, A. (2007). mRNA expression patterns for GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II during altered feeding status in rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 196–204. doi:10.1016/j.ygcen.2006.08.001.
- Babaei, S., Abedian-Kenari, A., Hedayati, M., and Yazdani-Sadati, M. A. (2017). Growth response, body composition, plasma metabolites, digestive and antioxidant enzymes activities of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) fed different dietary protein and carbohydrate: lipid ratio. *Aquac. Res.* 48, 2642–2654. doi:10.1111/are.13096.
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I., and Lushchak, V. I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325–331. doi:10.1016/j.aquatox.2006.04.005.

- Baldisserotto, B., Mancera Romero, J. M., and Kapoor, B. G. (2007). *Fish osmoregulation*. Science Publishers.
- Barnabé, G. (1990). Rearing bass and gilthead sea bream. *Aquaculture* 2, 647–686.
- Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517.
- Barton, B. A., and Schreck, C. B. (1987). Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 62, 299–310. doi:10.1016/0044-8486(87)90172-4.
- Bastrop, R., Jürss, K., and Wacke, R. (1992). Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 102, 151–161. doi:10.1016/0300-9629(92)90028-0.
- Bavcevic, L., Petrovic, S., Crnica, M., and Corazzin, E. (2006). Effects of feeding strategy on growth of sea bream (*Sparus aurata* L.) during winter-spring and possible implications for »winter disease« syndrome. *Ribarstvo* 64, 1–17.
- Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581. doi:10.1152/physrev.1998.78.2.547.
- Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R., and O’Shea, E. K. (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13004–9. doi:10.1073/pnas.0605420103.
- Benarroch, E. E. (2011). Heat shock proteins: Multiple neuroprotective functions and implications for neurologic disease. *Neurology* 76, 660–667. doi:10.1212/WNL.0b013e31820c3119.
- Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313.
- Blanton, M. L., and Specker, J. L. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 97–115. doi:10.1080/10408440601123529.
- Bonaldo, A., Isani, G., Fontanillas, R., Parma, L., Grilli, E., and Gatta, P. P. (2010). Growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed to satiation and restrictively at increasing dietary energy levels. *Aquac. Int.* 18, 909–919. doi:10.1007/s10499-009-9312-0.
- Bovo G, Borghesan F, Comuzzi M, Ceschias G, G. G. (1995). No Title. *Boll Soc Ital Patol Ittica* 17, 2–11.
- Bradley, D. J., Young, W. S., and Weinberger, C. (1989). Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7250–4.
- Brett, J. (1995). “Energetics,” in *Physiological ecology of Pacific Salmon*, 3–68.

- Brooks, S., Tyler, C. R., Carnevali, O., Coward, K., and Sumpter, J. P. (1997). Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* 201, 45–54. doi:10.1016/S0378-1119(97)00426-5.
- Burton, R. F. (1986). Ionic regulation in fish: the influence of acclimation temperature on plasma composition and apparent set points. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* 85, 23–8. doi:10.1016/0300-9629(86)90456-1.
- Cadenas, S., Rojas, C., Pérez-Campo, R., López-Torres, M., and Barja, G. (1995). Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 1175–1181. doi:10.1016/1357-2725(95)00077-3.
- Carbonell, T., Alva, N., Sanchez-Nuño, S., Dewey, S., and Gomes, A. V. (2016). Subnormothermic Perfusion in the Isolated Rat Liver Preserves the Antioxidant Glutathione and Enhances the Function of the Ubiquitin Proteasome System. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–12. doi:10.1155/2016/9324692.
- Cardoso, J. C. R., Laiz-Carrion, R., Louro, B., Silva, N., Canario, A. V. M., Mancera, J. M., et al. (2011). Divergence of duplicate POMC genes in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 396–404. doi:10.1016/j.ygcen.2010.12.001.
- Cassidy, A. A., Blier, P. U., Le François, N. R., Dionne, P., Morin, P. J., and Lamarre, S. G. (2018). Effects of fasting and refeeding on protein and glucose metabolism in *Arctic charr*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 226, 66–74. doi:10.1016/J.CBPA.2018.08.010.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Coutinho, F., Díaz-Rosales, P., Serra, C. A. D. R., Panserat, S., et al. (2015). Dietary carbohydrate and lipid sources affect differently the oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Br. J. Nutr.* 114, 1584–1593. doi:10.1017/S0007114515003360.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., and Oliva-Teles, A. (2012). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 163, 372–378. doi:10.1016/j.cbpa.2012.07.003.
- Chiamolera, M. I., and Wondisford, F. E. (2009). Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. *Endocrinology* 150, 1091–1096. doi:10.1210/en.2008-1795.
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguier, B., et al. (2014). Molecular Aspects of Medicine Protein damage , repair and proteolysis. *Mol. Aspects Med.* 35, 1–71. doi:10.1016/j.mam.2012.09.001.
- Ciechanover, A. (2012). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin–proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 3–13. doi:10.1016/J.BBAPAP.2011.03.007.
- Cohn, W. B., Jones, R. A., Valverde, R. A., Leiner, K. A., and MacKenzie, D. S. (2010). Molecular cloning and regulation of mRNA expression of the thyrotropin β and glycoprotein hormone α subunits in red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 1277–1290. doi:10.1007/s10695-010-9408-5.

- Company, R., Caldach-Giner, J. ., Kaushik, S., and Pérez-Sánchez, J. (1999). Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279–292. doi:10.1016/S0044-8486(98)00495-5.
- Costa, P. M., Neuparth, T. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., et al. (2011). Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environ. Res.* 111, 25–36. doi:10.1016/j.envres.2010.09.011.
- Coutteau, P., Robles, R., De Nigris, G., Cirillo, A., Verstraete, P., and Tort, L. (2001). Nutritional solutions to winter syndrome in gilthead seabream, *Sparus aurata*: Verification at a land-based farm. *Aquafeed Int*, 2:30–33.
- Cunha Bastos, V. L. F., Salles, J. B., Valente, R. H., León, I. R., Perales, J., Dantas, R. F., et al. (2007). Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. *Biochimie* 89, 1332–1342. doi:10.1016/j.biochi.2007.04.003.
- Czeisler, C. A., and Klerman, E. B. (1999). Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Prog. Horm. Res.* 54, 97-130; discussion 130–2.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11, 1–12.
- De Pedro, N., Delgado, M. J., Gancedo, B., and Alonso-Bedate, M. (2003). Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 173, 475–481. doi:10.1007/s00360-003-0355-7.
- Deane, E. E., and Woo, N. Y. S. (2006). Molecular cloning of growth hormone from silver sea bream: Effects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1077–1082. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.069.
- Díaz, M., Cozzi, S., Almansa, E., Casariego, M., Bolaños, A., Cejas, J., et al. (1998). Characterization of intestinal Na⁺-K⁺-ATPase in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a tissue-specific heterogeneity. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 121, 65–76. doi:10.1016/S0305-0491(98)10052-4.
- Díaz, M., Dópido, R., Gómez, T., and Rodríguez, C. (2016). Membrane lipid microenvironment modulates thermodynamic properties of the Na⁺-K⁺-ATPase in branchial and intestinal epithelia in euryhaline fish in vivo. *Front. Physiol.* 7, 589. doi:10.3389/fphys.2016.00589.
- Dice, J. F., and Goldberg, A. L. (1975). A statistical analysis of the relationship between degradative rates and molecular weights of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 213–219. doi:10.1016/0003-9861(75)90112-5.
- Doherty, M. K., Hammond, D. E., Clague, M. J., Gaskell, S. J., and Beynon, R. J. (2009). Turnover of the Human Proteome: Determination of Protein Intracellular Stability by Dynamic SILAC. *J. Proteome Res.* 8, 104–112. doi:10.1021/pr800641v.
- Donaldson, M. R., Cooke, S. J., Patterson, D. A., and Macdonald, J. S. (2008). Cold shock and fish. *J. Fish Biol.* 73, 1491–1530. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x.

- Dorts, J., Bauwin, A., Kestemont, P., Jolly, S., Sanchez, W., and Silvestre, F. (2012). Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 318–324. doi:10.1016/j.cbpc.2011.10.003.
- Du Preez, HH., Strydom, W., and Winter, P. (1986). Oxygen consumption of two marine teleosts *Lithognathus mormyrus* (Linnaeus, 1758) and *Lithognathus lithognathus* (Cuvier 1830). *Comp Biochem Physiol* 85A, 313–381.
- Elliot, JM. (1991). Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Freshw Biol* 25, 61–70.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., and Oliva-Teles, A. (2006). Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 143, 89–96. doi:10.1016/J.CBPA.2005.10.027.
- FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all.
- Feder, M. E., and Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Lazou, A., Kostoglou, B., and Michaelidis, B. (2009). Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) during long-term exposure to increasing temperatures. *Mar. Biol.* 156, 797–809. doi:10.1007/s00227-009-1135-z.
- Feidantsis, K., Antonopoulou, E., Lazou, A., Pörtner, H. O., and Michaelidis, B. (2013). Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 183, 625–639. doi:10.1007/s00360-012-0735-y.
- Feidantsis, K., Pörtner, H.-O., Antonopoulou, E., and Michaelidis, B. (2015). Synergistic effects of acute warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Comp. Physiol. B* 185, 185–205. doi:10.1007/s00360-014-0875-3.
- Feidantsis, K., Pörtner, H. O., Vlachonikola, E., Antonopoulou, E., and Michaelidis, B. (2018). Seasonal Changes in Metabolism and Cellular Stress Phenomena in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Physiol. Biochem. Zool.* 91(3), 878–895. doi:10.1086/697170.
- Fry, J.F.E. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. *Fish Physiol.*, 1–98.
- Gabbianelli, R., Falcioni, G., Mazzanti, L., Bertoli, E., and Zolese, G. (1996). Seasonal variations of physical and biochemical membrane properties in trout erythrocytes (*Salmo irideus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 114, 275–279. doi:10.1016/0305-0491(96)00032-6.

- Gallardo, M. Á., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padrós, F., Blasco, J., Fernández-Borràs, J., et al. (2003). Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223, 15–27. doi:10.1016/S0044-8486(03)00164-9.
- Garnacho-Castaño, M. V., Alva, N., Sánchez-Nuño, S., Bardallo, R. G., Palomeque, J., and Carbonell, T. (2016). Hypothermia can reverse hepatic oxidative stress damage induced by hypoxia in rats. *J. Physiol. Biochem.* 72, 615–623. doi:10.1007/s13105-016-0500-x.
- Gaylord, T. G., MacKenzie, D. S., and Gatlin III, D. M. (2001). Growth performance, body composition and plasma thyroid hormone status of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to short-term feed deprivation and refeeding. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 73–79. doi:10.1023/A:1011199518135.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., and Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259. doi:10.1079/NRR200479.
- Gogliettino, M., Balestrieri, M., Riccio, A., Facchiano, A., Fusco, C., Palazzo, V. C., et al. (2016). Uncommon functional properties of the first piscine 26S proteasome from the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. *Biosci. Rep.* 36, BSR20160022. doi:10.1042/BSR20160022.
- Gomes, A. V., Zong, C., and Ping, P. (2006). Protein degradation by the 26S proteasome system in the normal and stressed myocardium. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1677–1691. doi:10.1089/ars.2006.8.1677.
- Gómez-Milán, E., Cardenete, G., and Sánchez-Muros, M. J. (2007). Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 147, 49–55. doi:10.1016/J.CBPB.2006.12.013.
- Gregório, S. F., Carvalho, E. S. M., Encarnação, S., Wilson, J. M., Power, D. M., Canário, A. V. M., et al. (2013). Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). *J. Exp. Biol.* 216, 470–9. doi:10.1242/jeb.073742.
- Grim, J. M., Miles, D. R. B., and Crockett, E. L. (2010). Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *J. Exp. Biol.* 213, 445–52. doi:10.1242/jeb.036939.
- Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A. M., Ngo, J. K., et al. (2011). HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1355–1364. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.06.015.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., and Dutil, J. D. (2003). Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 135, 347–356. doi:10.1016/S1095-6433(03)00089-8.

- Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B. (2000). Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
- Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–564. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071.
- Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., and Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin. Chim. Acta* 413, 901–906. doi:10.1016/j.cca.2012.01.038.
- Hazel, J. R. (1984). Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am. J. Physiol.* 246, R460-70. doi:10.1152/ajpregu.1984.246.4.R460.
- Hermenean, A., Damache, G., Albu, P., Ardelean, A., Ardelean, G., Puiu Ardelean, D., et al. (2015). Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 198–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.05.029.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Cuesta, A., and Sun, Y.-Z. (2015). Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 23, 315–328. doi:10.1080/23308249.2015.1052365.
- Hung, S. S. O., Fynn-Aikins, F. K., Lutes, P. B., and Xu, R. (1989). Ability of Juvenile White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to Utilize Different Carbohydrate Sources. *J. Nutr.* 119, 727–733. doi:10.1093/jn/119.5.727.
- Hung, S. S. O., and Storebakken, T. (1994). Carbohydrate Utilization by Rainbow Trout Is Affected by Feeding Strategy. *J. Nutr.* 124, 223–230. doi:10.1093/jn/124.2.223.
- Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., and Sánchez, J. (2003). Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 313–321. doi:10.1007/s10695-004-3321-8.
- Ibarz, A., Blasco, J., Beltrán, M., Gallardo, M. A., Sánchez, J., Sala, R., et al. (2005). Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 477–486. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.056.
- Ibarz, A., Blasco, J., Sala-Rabanal, M., Gallardo, Á., Redondo, A., and Fernández-Borràs, J. (2007a). Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting and their capacity for recovery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 1034–1042. doi:10.1139/f07-079.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., and Blasco, J. (2007b). Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.008.

- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M. Á., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., and Tort, L. (2010a). Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-induced alterations and "Winter Syndrome." *Rev. Fish Biol. Fish.* 20, 539–556. doi:10.1007/s11160-010-9159-5.
- Ibarz, A., Martín-Pérez, M., Blasco, J., Bellido, D., de Oliveira, E., and Fernández-Borràs, J. (2010b). Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. *Proteomics* 10, NA-NA. doi:10.1002/pmic.200900528.
- Ibarz, A., Costa, R., Harrison, A. P., and Power, D. M. (2010c). Dietary keto-acid feed-back on pituitary activity in gilthead sea bream: Effects of oral doses of AKG. A proteomic approach. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169, 284–292. doi:10.1016/j.ygcen.2010.09.010.
- Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M. Á., and Fernández-Borràs, J. (2010d). Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 155, 319–326. doi:10.1016/j.cbpa.2009.11.012.
- Imsland, A. K., Gunnarsson, S., Foss, A., and Stefansson, S. O. (2003). Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture* 218, 671–683. doi:10.1016/S0044-8486(02)00423-4.
- Isasa, M., Rose, C. M., Elsasser, S., Navarrete-Perea, J., Paulo, J. A., Finley, D. J., et al. (2015). Multiplexed, Proteome-Wide Protein Expression Profiling: Yeast Deubiquitylating Enzyme Knockout Strains. *J. Proteome Res.* 14, 5306–5317. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00802.
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., and Nakano, K. (2004). Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *J. Exp. Biol.* 207, 15–9. doi:10.1242/JEB.00707.
- Jain, K. E., and Farrell, A. P. (2003). Influence of seasonal temperature on the repeat swimming performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 206, 3569–79. doi:10.1242/JEB.00588.
- Klein S, Cohn SM, Alpers DH (1998). The alimentary tract in nutrition. In: Shils, M.E., Olson, A.J., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, pp. 605–630.
- Jung, T., Catalgol, B., and Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* 30, 191–296. doi:10.1016/j.mam.2009.04.001.
- Jurado, J., Fuentes-Almagro, C. A., Guardiola, F. A., Cuesta, A., Esteban, M. Á., and Prieto-Álamo, M.-J. (2015). Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Proteomics* 120, 21–34. doi:10.1016/J.JPROT.2015.02.019.
- Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417. doi:10.1016/J.TCB.2012.05.006.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., and Finley, D. (2001). The Axial Channel of the Proteasome Core Particle Is Gated by the Rpt2 ATPase and Controls Both Substrate Entry and Product Release. *Mol. Cell* 7, 1143–1152. doi:10.1016/S1097-2765(01)00274-X.
- Kyprianou, T. D., Pörtner, H. O., Anestis, A., Kostoglou, B., Feidantsis, K., and Michaelidis, B. (2010). Metabolic and molecular stress responses of gilthead seam bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: An analysis of mechanisms underlying the

winter syndrome. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 180, 1005–1018. doi:10.1007/s00360-010-0481-y.

Laiz-Carrión, R., Guerreiro, P. M., Fuentes, J., Canario, A. V. M., Martín Del Río, M. P., and Mancera, J. M. (2005). Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 303A, 563–576. doi:10.1002/jez.a.183.

Lamarre, S. G., Blier, P. U., Driedzic, W. R., and Le François, N. R. (2010). White muscle 20S proteasome activity is negatively correlated to growth rate at low temperature in the spotted wolffish *Anarhichas minor*. *J. Fish Biol.* 76, 1565–1575. doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02581.x.

Laplante, A.F., Moulin, V., Auger, F.A., Landry, J., Li, H., Morrow, G., Tanguai, R.M., Germain, L. (1998). Expression of Heat Shock Proteins in Mouse Skin During Wound Healing. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1291–1301. doi:10.1177/002215549804601109.

Librán-Pérez, M., Geurden, I., Dias, K., Corraze, G., Panserat, S., and Soengas, J. L. (2015). Feeding rainbow trout with a lipid-enriched diet: effects on fatty acid sensing, regulation of food intake and cellular signaling pathways. *J. Exp. Biol.* 218, 2610–9. doi:10.1242/jeb.123802.

Liu, C.W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T., Tang, Z., et al. (2006). ATP Binding and ATP Hydrolysis Play Distinct Roles in the Function of 26S Proteasome. *Mol. Cell* 24, 39–50. doi:10.1016/J.MOLCEL.2006.08.025.

Liu, H., Han, T., Tian, J., Zhu, Z.-Y., Liu, Y., Li, Y., Xiao, S.X., Feng, Y.Y. (2012). Monitoring oxidative stress in acute-on-chronic liver failure by advanced oxidation protein products. *Hepatol. Res.* 42, 171–180. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00911.x.

Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. doi:10.1007/s10695-015-0171-5.

Maffia, M., Acierno, R., Rollo, M., and Storelli, C. (1998). Ion and Metabolite Transport Through the Intestinal Luminal Membranes of the Antarctic Fish *Trematomus bernacchii*, in *Fishes of Antarctica* (Milano: Springer Milan), 237–246. doi:10.1007/978-88-470-2157-0_21.

Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., and Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88. doi:10.1007/s11160-005-7846-4.

Mathews, W. R., Guido, D. M., Fisher, M. A., and Jaesche, H. (1994). Lipid-Peroxidation as Molecular Mechanism of Liver-Cell Injury during Reperfusion After Ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 763–770. doi:10.1016/0891-5849(94)90191-0.

Matz, J. M., Blake, M. J., Tatelman, H. M., Lavoie, K. P., and Holbrook, N. J. (1995). Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am. J. Physiol.* 269, R38–47. doi:10.1152/ajpregu.1995.269.1.R38.

McGuire, M. A., Beede, D. K., Collier, R. J., Buonomo, F. C., DeLorenzo, M. A., Wilcox, C. J., et al. (1991). Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of

somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows². *J. Anim. Sci.* 69, 2050–2056. doi:10.2527/1991.6952050x.

Melis, R., Sanna, R., Braca, A., Bonaglini, E., Cappuccinelli, R., Slawski, H., Roggio, T., Uzzau, S., Anedda, R. (2017). Molecular details on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sensitivity to low water temperatures from (1)H NMR metabolomics. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 204, 129–136. doi:10.1016/j.cbpa.2016.11.010.

Metcalfe, N. B., Bull, C. D., and Mangel, M. (2002). Seasonal variation in catch-up growth reveals state-dependent somatic allocations in salmon. *Evol. Ecol. Res.*, 4:871–881.

Metz, J. R., van den Burg, E. H., Bonga, S. E. W., and Flik, G. (2003). Regulation of branchial Na(+)/K(+)-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *J. Exp. Biol.* 206, 2273–80. doi:10.1242/JEB.00421.

Millington, G. W. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr. Metab. (Lond)*. 4, 18. doi:10.1186/1743-7075-4-18.

Mingarro, M., Vega-Rubín De Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M. M., and Pérez-Sánchez, J. (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102–111. doi:10.1016/S0016-6480(02)00042-4.

Mirghaed, A. T., Ghelichpour, M., Hoseini, S. M., and Amini, K. (2017). Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. *Fish Physiol. Biochem.* 43, 1143–1151. doi:10.1007/s10695-017-0359-y.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–73. doi:10.1101/gad.1599207.

Mongile, F., Bonaldo, A., Fontanillas, R., Mariani, L., Badiani, A., Bonvini, E., Parma, L. (2014). Effects of dietary lipid level on growth and feed utilisation of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) reared at Mediterranean summer temperature. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 30–34. doi:10.4081/ijas.2014.2999.

Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L., and Vergara, J. M. (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53–60. doi:10.1023/A:1007719928905.

Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Garayzar, A. B. S., and Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.* 101, 101–107. doi:10.1016/j.physbeh.2010.04.019.

Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J. G., and Tocher, D. R. (2002). Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: Attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343–361. doi:10.1016/S0044-8486(02)00064-9.

Nelson, E. R., and Habibi, H. R. (2009). Thyroid receptor subtypes: Structure and function in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 90–96. doi:10.1016/j.ygcen.2008.09.006.

- Nicieza, A. G., and Metcalfe, N. B. (1997). Growth compensation in juvenile atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* 78, 2385–2400. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[2385:GCIJAS]2.0.CO;2.
- Olsen, R. E., Løvaas, E., and Lie, Ø. (1999). The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Fish Physiol. Biochem.* 20, 13–29. doi:10.1023/A:1007767827996.
- Packer, R. K., and Garvin, J. L. (1998). Seasonal differences in activity of perch (*Perca flavescens*) gill Na⁺/K⁺ ATPase. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 120, 777–783. doi:10.1016/S0305-0491(98)10078-0.
- Palti Y, Tinman S, Cnaani A, Avidar Y, Ron M, H. G. (1999). Comparative study of biochemical and non-specific immunological parameters in two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. mossambicus*). *Isr J Aquacult* 51, 148–156.
- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., and Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biol. Interact.* 145, 191–199. doi:10.1016/S0009-2797(03)00002-4.
- Peres, H., Santos, S., and Oliva-Teles, A. (2013). Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 630–636. doi:10.1111/j.1439-0426.2012.02049.x.
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V. C., and Oliva-Teles, A. (2012). The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 155, 506–16. doi:10.1016/j.cbpc.2011.12.005.
- Pérez-Sánchez (2000). The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol. Biochem.*, 135–144. doi:10.1023/A:1007816015345.
- Peters, J. M., Frankie, W. W., and Kleinschmidt, J. A. (1994). Distinct 19-S and 20-S Subcomplexes of the 26-S Proteasome and their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269, 7709–7718.
- Pickering, A. D., and Pottinger, T. G. (1985). Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.* 27, 611–619. doi:10.1111/j.1095-8649.1985.tb03206.x.
- Place, S. P., and Hofmann, G. E. (2005). Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish. *Polar Biol.* 28, 261–267. doi:10.1007/s00300-004-0697-y.
- Polakof, S., Arjona, F. J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M. P., Mancera, J. M., and Soengas, J. L. (2006). Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Comp. Physiol. B* 176, 441–452. doi:10.1007/s00360-006-0065-z.

- Polakof, S., Míguez, J. M., and Soengas, J. L. (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 147, 363–374. doi:10.1016/J.CBPA.2007.01.009.
- Pörtner, H. O., and Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315, 95–7. doi:10.1126/science.1135471.
- Pörtner, H.-O. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–93. doi:10.1242/jeb.037523.
- Powell, S. R., and Divald, A. (2010). The ubiquitin-proteasome system in myocardial ischaemia and preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 85, 303–311. doi:10.1093/cvr/cvp321.
- Power, D. M., and Canario, A. V. M. (1992). Immunocytochemistry of somatotrophs, gonadotrophs, prolactin and adrenocorticotropin cells in larval sea bream (*Sparus auratus*) pituitaries. *Cell Tissue Res.* 269, 341–346. doi:10.1007/BF00319626.
- Power, D. M., Melo, J., and Santos, C. R. A. (2000). The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J. Fish Biol.* 56, 374–387. doi:10.1111/j.1095-8649.2000.tb02112.x.
- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Björnsson, B. T., Einarsdottir, I. E., et al. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 130, 447–459. doi:10.1016/S1532-0456(01)00271-X.
- Ravagnan, G. (1978). “Elementi di vallicoltura moderna; proposte operative per la ristrutturazione e lo sviluppo della itticoltura salmastra italiana,” in (Bologna (Italy) Edagricole), 283.
- Reindl, K. M., and Sheridan, M. A. (2012). Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 163, 231–245. doi:10.1016/J.CBPA.2012.08.003.
- Requena, A., Fernandez-Borras, J., and Planas, J. (1997). The effects of a temperature rise on oxygen consumption and energy budget in gilthead sea bream. *Aquac. Int.* 5, 415–426. doi:10.1023/A:1018332727888.
- Rescan, P.-Y., Montfort, J., Rallièrre, C., Le Cam, A., Esquerré, D., and Hugot, K. (2007). Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule. *BMC Genomics* 8, 438. doi:10.1186/1471-2164-8-438.
- Rhoads J, Chen W, Chu P, Berschneider H, Argenzio R, Paradiso A (1994) L-glutamine and L-asparagine stimulate $Na^+ -H^+$ exchange in porcine jejunal enterocytes. *Am. J. Phys.* 266, G828–838.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J., and Lauzon, H. L. (2014). Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Rev. Fish Biol. Fish.* 24, 1005–1032. doi:10.1007/s11160-014-9361-y.
- Rotllant, J., Balm, P. H. M., Wendelaar-Bonga, S. E., Pérez-Sánchez, J., and Tort, L. (2000). A drop in ambient temperature results in a transient reduction of interrenal ACTH

responsiveness in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 265–273. doi:10.1023/A:1007873811975.

Rotllant, J., Balm, P. H. M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S. E., and Tort, L. (2001). Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333–342. doi:10.1006/GCEN.2001.7604.

Rudneva, I. I. (1997). Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 255–260. doi:10.1016/S0742-8413(97)00111-4.

Rueda-Jasso, R., Conceição, L. E. C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J. F., et al. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231, 417–433. doi:10.1016/S0044-8486(03)00537-4.

Ryg, M., and Jacobsen, E. (1982). Seasonal changes in growth rate, feed intake, growth hormone, and thyroid hormones in young male reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Can. J. Zool.* 60, 15–23. doi:10.1139/z82-002.

Saera-Vila, A., Benedito-Palos, L., Sitjà-Bobadilla, A., Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. (2009). Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants. *Aquaculture* 296, 87–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.07.028.

Sagstad, A., Sanden, M., Haugland, Ø., Hansen, A.-C., Olsvik, P. A., and Hemre, G.I. (2007). Evaluation of stress- and immune-response biomarkers in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different levels of genetically modified maize (*Bt maize*), compared with its near-isogenic parental line and a commercial suprex maize. *J. Fish Dis.* 30, 201–212. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00808.x.

Sala-Rabanal, M., Sanchez, J., Ibarz, A., Fernandez-Borras, J., Blasco, J., and Gallardo, M. A. (2003). Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 105–115. doi:10.1023/B:FISH.0000035904.16686.b6.

Salmerón, C., Navarro, I., Johnston, I. A., Gutiérrez, J., and Capilla, E. (2015). Characterisation and expression analysis of cathepsins and ubiquitin-proteasome genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) skeletal muscle. *BMC Res. Notes* 8. doi:10.1186/s13104-015-1121-0.

Sanahuja, I., and Ibarz, A. (2015). Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 426–435. doi:10.1016/J.FSI.2015.05.056.

Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., Guzmán, J. M., Martín del Río, M. P., Miguez, J. M., Mancera, J. M., Soengas, J. L. (2003). Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 285, R897–R907. doi:10.1152/ajpregu.00161.2003.

- Sanz, A., Furné, M., Trenzado, C. E., De Haro, C., and Sánchez-Muros, M. J. (2012). Study of the Oxidative State, as a Marker of Welfare, on Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*, Subjected to Handling Stress. *J. World Aquac. Soc.* 43, 707–715. doi:10.1111/j.1749-7345.2012.00602.x.
- Sardella, B. A., Matey, V., Cooper, J., Gonzalez, R. J., and Brauner, C. J. (2004). Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in “California” Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *J. Exp. Biol.* 207, 1399–413. doi:10.1242/JEB.00895.
- Sardella, B. A., Sanmarti, E., and Kültz, D. (2008). The acute temperature tolerance of green sturgeon (*Acipenser medirostris*) and the effect of environmental salinity. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 309A, 477–483. doi:10.1002/jez.477.
- Selman, C., Grune, T., Stolzing, A., Jakstadt, M., McLaren, J. S., and Speakman, J. R. (2002). The consequences of acute cold exposure on protein oxidation and proteasome activity in short-tailed field voles, *Microtus agrestis*. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 259–265. doi:10.1016/S0891-5849(02)00874-2.
- Sheridan, M. A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 90, 679–690. doi:10.1016/0305-0491(88)90322-7.
- Shikata, T., Iwanaga, S., and Shimeno, S. (1994). Effects of Dietary Glucose, Fructose, and Galactose on Hepatopancreatic Enzyme Activities and Body Composition in Carp. *Fish. Sci.* 60, 613–617. doi:10.2331/fishsci.60.613.
- Silva, T. S., da Costa, A. M. R., Conceição, L. E. C., Dias, J. P., Rodrigues, P. M. L., and Richard, N. (2014). Metabolic fingerprinting of gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver to track interactions between dietary factors and seasonal temperature variations. *PeerJ* 2, e527. doi:10.7717/peerj.527.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., and Pérez-Sánchez, J. (2005). Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.031.
- Skonberg, D. I., Rasco, B. A., and Dong, F. M. (1994). Fatty acid composition of salmonid muscle changes in response to a high oleic acid diet. *J. Nutr.* 124, 1628–1638. doi:10.1093/jn/124.9.1628.
- Solé, M., Rodríguez, S., Papiol, V., Maynou, F., and Cartes, J. E. (2009). Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 83–89. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.008.
- Speers-Roesch, B., and Ballantyne, J. S. (2005). Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 140, 487–494. doi:10.1016/J.CBPA.2005.02.014.
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., and Tomasi, V. (1998). Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *J. Fish Dis.* 21, 177–184. doi:10.1046/j.1365-2761.1998.00089.x.

- Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, A. C., and Ahmad, I. (2013). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2133–2149. doi:10.1007/s11356-012-1459-y.
- Stanca, L., Petrache, S., Serban, A., Staicu, A., Sima, C., Munteanu, M., et al. (2013). Interaction of silicon-based quantum dots with gibel carp liver: oxidative and structural modifications. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 254. doi:10.1186/1556-276X-8-254.
- Staurnes, M., Rainuzzo, J. R., Sigholt, T., and Jørgensen, L. (1994). Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: Sxtress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na-K-ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 109, 413–421. doi:10.1016/0300-9629(94)90145-7.
- Staurnes, M., Sigholt, T., Åsgård, T., and Baeverfjord, G. (2001). Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture* 201, 153–159. doi:10.1016/S0044-8486(01)00654-8.
- Suárez, M. D., Trenzado, C. E., García-Gallego, M., Furné, M., García-Mesa, S., Domezain, A., Alba, I., Sanz, A. (2015). Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Eng.* 67, 59–66. doi:10.1016/J.AQUAENG.2015.06.001.
- Sumpter, J. P., Dye, H. M., and Benfey, T. J. (1986). The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62, 377–385. doi:10.1016/0016-6480(86)90047-X.
- Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Nutr.* 8, 195–207. doi:10.1046/j.1365-2095.2002.00205.x.
- Todgham, A. E., Hoaglund, E. A., and Hofmann, G. E. (2007). Is cold the new hot? Elevated ubiquitin-conjugated protein levels in tissues of Antarctic fish as evidence for cold-denaturation of proteins in vivo. *J. Comp. Physiol. B* 177, 857–866. doi:10.1007/s00360-007-0183-2.
- Tort, L., Rotllant, J., and Rovira, L. (1998). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 120, 175–179. doi:10.1016/S1095-6433(98)10027-2.
- Tort, L., Balasch, J. C., and Mackenzie, S. (2004). Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contrib. to Sci.* 2, 443–454.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 68–88. doi:10.1016/j.bbapap.2011.10.002.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

- 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. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02226.x.
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F. J., Polakof, S., del Río, M. P. M., Soengas, J. L., and Mancera, J. M. (2009b). Interactive effects of environmental salinity and temperature on metabolic responses of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 154, 417–424. doi:10.1016/J.CBPA.2009.07.015.
- Velázquez, M., Zamora, S., and Martínez, F. J. (2006). Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. *Aquac. Nutr.* 12, 127–133. doi:10.1111/j.1365-2095.2006.00391.x.
- Waterlow, J. C., Garlick, P. J., and Millward, D. J. (1978). Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. *Protein turnover Mamm. tissues whole body*.
- Wendelaar-Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., et al. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313. doi:10.1038/ki.1996.186.