



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Grado en BIOLOGÍA**

**MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO**

TÍTULO: RELACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y EL SISTEMA DE ESTRÉS EN ANIMALES MARINOS.

LAURA LOZANO FERNÁNDEZ

MAYO, 2022



D. FRANCISCO CENTENO VELAZQUEZ, profesor del Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR de la Universidad de Extremadura.

Dña. NATALIA SALAMANCA DE LAS NIEVES, investigadora del Instituto de Formación e Investigación Agrario, Pesquera y de la Producción Ecológica de Andalucía.

INFORMAN:

Que Dña. LAURA LOZANO FERNÁNDEZ ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Grado. Consideran que la memoria reúne los requisitos necesarios para su evaluación.

Badajoz, 3 de junio de 2022



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estado de la acuicultura	1
1.2. La dorada	3
1.3. Cultivo de la dorada	5
1.4. Bienestar animal	7
1.5. Atenuación del estrés mediante aditivos	12
1.6. Adición de triptófano en la dieta como atenuante del estrés	13
1.6. Objetivos	15
2. MATERIAL Y MÉTODOS	16
2.1 Animales de experimentación	16
2.2 Diseño experimental	16
2.3 Elaboración del pienso experimental	17
2.4 Procedimiento de muestreo	19
2.5 Parámetros biométricos	20
2.6 Análisis de las muestras	21
2.6.1 Análisis de plasma	21
2.7 Análisis estadístico.	21
3.RESULTADOS	21
3.1 Parámetros biométricos	21
3.2 Metabolitos plasmáticos	25
4. DISCUSIÓN	27
4.1 Efectos de la densidad	27
4.1.1 Parámetros de crecimiento	27
4.2.2 Metabolitos plasmáticos	28
4.2 Efecto de la suplementación con TRP en la dieta.	29
4.2.1 Parámetros de crecimiento.	29
4.2.2 Metabolitos plasmáticos	30
4.3 Efecto de la suplementación con cacao en la dieta.	31

4.3.1 Parámetros de crecimiento.	31
4.3.2 Metabolitos plasmáticos	32
5.CONCLUSIÓN	33
6.BIBLIOGRAFÍA	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2019 (tomado de APROMAR).	1
<b>Figura 2.</b> Distribución de la producción de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea en función de su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2019 (tomado de APROMAR).	2
<b>Figura 3.</b> <i>Sparus aurata</i> (FAO)	3
<b>Figura 4.</b> Distintos estadios de vida entre la fecundación del huevo de dorada y la formación de la larva.	5
<b>Figura 5.</b> Respuestas primarias, secundarias y terciarias generadas por eventos de estrés. (tomado de Schreck & Tort, 2016).	10
<b>Figura 6.</b> Fases del Síndrome de Adaptación General (tomado de Martín de los Santos, 2017).	11
<b>Figura 7.</b> Distribución de los tanques según el tratamiento de densidad y el tipo de pienso.	17
<b>Figura 8.</b> Ingredientes necesarios para producir el pienso control y enriquecido en triptófano: pienso molido, aditivo y agua. Amasadora industrial usada para este experimento.	18
<b>Figura 9.</b> Picadora empleada en el experimento y proceso de formación de pellets mediante el tamizado de las tiras de pienso.	18
<b>Figura 10.</b> Centrifugado de las muestras de sangre y resultado.	19
<b>Figura 11.</b> Parámetros biométricos obtenidos en el primer muestreo en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.	23
<b>Figura 12.</b> Parámetros biométricos obtenidos en el segundo muestreo en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M).	24
<b>Figura 13.</b> Parámetros biométricos obtenidos en el tercer muestreo en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M).	24
<b>Figura 14.</b> Parámetros biométricos obtenidos en último muestreo en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M).	25
<b>Figura 15.</b> Nivel de proteína plasmática obtenido en el muestreo intermedio (A) y muestreo final (B) en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.	26
<b>Figura 16.</b> Nivel de glucosa plasmática obtenida en el segundo muestreo intermedio (A) y cuarto muestreo final (B) en ejemplares de <i>Sparus aurata</i> sometidos a tres condiciones de alimentación	

(control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado. 27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Definiciones de “estrés”.	8
<b>Tabla 2.</b> Parámetros biométricos e índices de crecimiento y nutricionales de los ejemplares de <i>Sparus aurata</i> expuestos a distintos pienso y densidades. Los valores se presentan como la media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M). WG: ganancia en peso, SGR: tasa específica de crecimiento, FCR: factor de conversión y K: factor de condición. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.....	22

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5HT-----	Serotonina
5-HTP-----	5-hidroxitriptófano
AAFCO-----	Association of American Feed Control Officials
ACTH-----	Adrenocorticotropa
AESAN-----	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
APROMAR-----	Asociación Empresarial de Acuicultura de España
CPH-----	Cáscara de la vaina del cacao
CRH-----	Hormona liberadora de la corticotropina
EFSA-----	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EFSA-----	Ciencia de Confianza para la Seguridad Alimentaria
FAWC-----	Farm Animal Welfare Council
FE-----	Eficiencia de alimentación
FRC-----	Factor de Conversión
GH-----	Hormona del crecimiento
GHC-----	Gonadotropina coriónica humana
HD-----	Alta densidad
HHI-----	Eje hipotálamo-hipofisiario-interrenal
HPI-----	Eje hipotálamo-pituitaria-ineterrenal.
HSC-----	Eje hipotálamo-simpático-cromafín
IFAPA-----	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica
IGS-----	Índice gonado-somático
IHS-----	Índice hepático-somático
JACUMAR-----	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos

K-----	Factor de condición
LD-----	Baja densidad
LGR-----	Tasa de ganancia en longitud
OESA-----	Observatorio Español de Acuicultura
OIE-----	Aquatic Animal health code
Pf-----	Peso final
Pi-----	Peso inicial
POMC-----	Precursor de la proopiomelanocortina
SAM-----	Sistema simpático adrenomedular
SGR-----	Tasa específica de crecimiento
SOFÍA-----	Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura
t-----	Tiempo
TRP-----	Triptófano
UE-----	Europa
WG-----	Ganancia en peso
WGR-----	Tasa de ganancia en peso

## RESUMEN

Debido al crecimiento de la población mundial el consumo de pescado se ha visto incrementado desde los últimos años, es por ello que se buscan alternativas a la pesca comercial para evitar que la dinámica de poblaciones marinas se vea afectada. Como consecuencia de ello el sector acuícola ha sufrido un desarrollo exponencial, lo que provoca un aumento en la investigación sobre el bienestar animal mediante el análisis de diversos metabolitos plasmáticos, parámetros biométricos y moléculas como el cortisol. Se ha comprobado que la adición de determinadas sustancias a la dieta puede mejorar la respuesta fisiológica al estrés. En el presente estudio se pretende averiguar el efecto que tienen determinados aditivos sobre la respuesta al estrés de los individuos sometidos a alta densidad y baja densidad, para ello se utilizaron individuos de *Sparus aurata*, una de las especies más comercializadas, alimentados con pienso enriquecido con TRP 1% o Cacao 1% durante 60 días. Se analizaron los niveles de glucosa, lactato, cortisol y proteínas plasmáticas, así como diferentes parámetros biométricos. Los resultados muestran una reducción de las tasas de crecimiento para ambos aditivos con respecto a los grupos controles, una disminución del índice de ganancia en peso (WG) y de la tasa específica de crecimiento (SGR) mientras que el resto de parámetros permanecieron sin diferencia significativa. Los resultados de los metabolitos plasmáticos no revelaron diferencias entre los niveles de glucosa y proteínas para los individuos alimentados con TRP, mientras que en los alimentados con Cacao se observó una disminución de la glucosa.

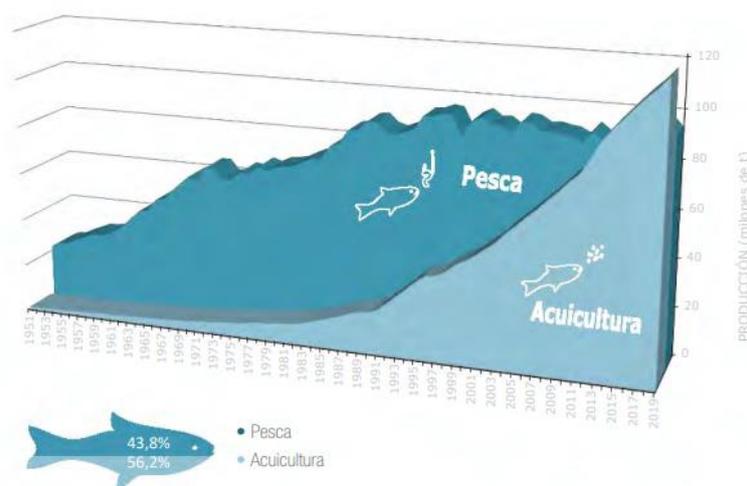
## ABSTRACT

Due to the growth of the world population, the consumption of fish has increased in recent years, which is why alternatives to commercial fishing are being sought to prevent the dynamics of marine populations from being affected. As a consequence, the aquaculture sector has undergone an exponential development, which causes an increase in research on animal welfare through the analysis of various plasmatic metabolites, biometric parameters and molecules such as cortisol. It has been proven that the addition of certain substances to the diet can improve the physiological response to stress. In the present study it is intended to find out the effect that certain additives have on the response to stress of individuals subjected to high density and low density, for this *Sparus aurata* individuals were used, one of the most commercialized species, fed with feed enriched with TRP 1% or Cocoa 1% for 60 days. Glucose, lactate, cortisol and plasma protein levels were analyzed, as well as different biometric parameters. The results show a reduction in the growth rates for both additives with respect to the control groups, a decrease in the weight gain index (WG) and the specific growth rate (SGR) while the rest of the parameters remained without difference. significant. The results of plasma metabolites revealed no differences between glucose and protein levels for individuals fed TRP, while a decrease in glucose was observed in those fed Cocoa.

# 1. INTRODUCCIÓN

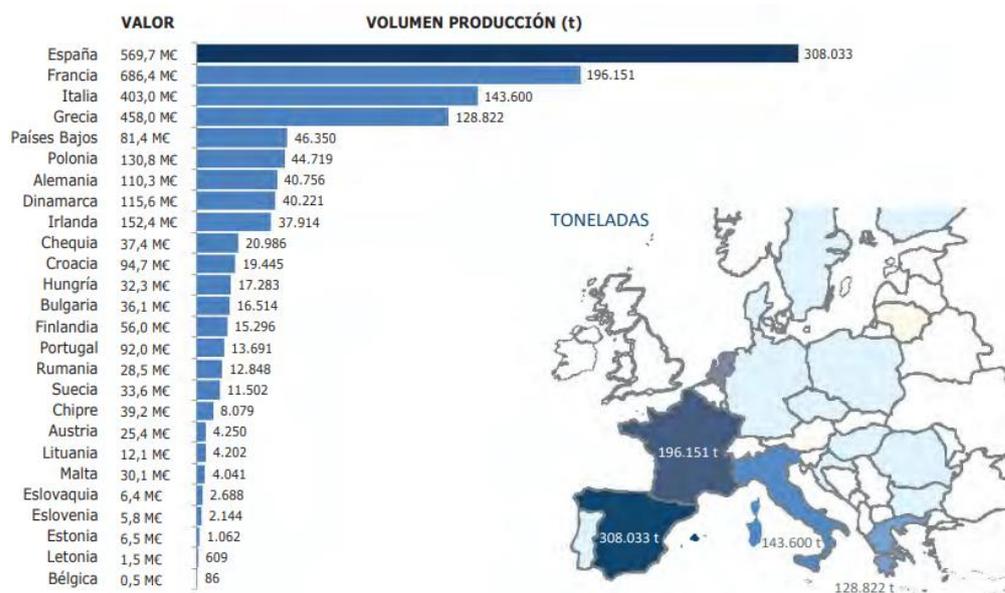
## 1.1 Estado de la acuicultura

Debido al continuo crecimiento de la población mundial, se hace necesario avanzar sobre conocimientos y explotación de diversas vías de alimentación para favorecer el aporte completo de nutrientes. Debido a esto, el consumo de pescado y otras especies marinas incrementan anualmente, según el informe SOFIA sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura, el consumo per cápita de pescado tuvo su record en 2018 situándose en 20,5 kilos, y se estima que alcanzará los 21,5 kilos en 2030. Sin embargo, debido a la dinámica de las poblaciones, no es sostenible incrementar la tasa de extracción mediante la pesca comercial ya que este hecho supondría un desequilibrio ecosistémico, provocando, no solo la posible extinción de las especies afectadas de forma directa, sino también la de sus depredadores. Según las estadísticas de la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR) la producción mundial de acuicultura alcanzó en 2019 los 120,1 millones de toneladas (**figura 1**), siendo un 3,7 % más que el año anterior, y superando así por séptimo año consecutivo a la pesca extractiva en 26,5 millones de toneladas. Además, según el informe SOFIA se estima que en el 2030 la producción total de pescado aumentará en 204 millones de toneladas viéndose incrementada así la aportación de la acuicultura en un 46 % respecto a 2018.



**Figura 1.** Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2019 (tomado de APROMAR).

En la Unión Europea (UE) las tres especies más producidas son la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), siendo España el mayor productor acuícola en 2019 según el informe APROMAR (27 % del total de UE) y el segundo en cuanto al valor de dicha producción (**Figura 2**).



**Figura 2.** Distribución de la producción de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea en función de su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2019 (tomado de APROMAR).

La dorada es la especie más producida de la Unión Europea debido a sus características. Según la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) las doradas son una especie manejable, presentan un alto porcentaje de fecundación (90%) y la mortalidad durante el engorde es aproximadamente del 5-10%, lo cual se considera bajo.

En Europa, según las estadísticas de APROMAR, en 2020 se produjeron un 8.6% menos de juveniles de dorada con respecto al año anterior ya que el total de la acuicultura de la UE ha decrecido desde 2000 una razón de 0.2% anual, mientras que en el resto del mundo se ha visto incrementada una media de 5.6%. En España, la producción de dorada en 2020 fue un 53.3% menor que en 2019, encabezando la producción la Comunidad Valenciana con un 40.5%.

El auge que está tomando de la industria acuícola favorece la formación de nuevos puestos de trabajo que, según el Observatorio Español de Acuicultura (OESA), se han ido incrementando hasta el 2018.

## 1.2. La dorada

La dorada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) es un teleósteo marino perteneciente a la clase actinopterygii (**figura 3**). Se distribuye por todo el Mediterráneo y por zonas del Atlántico Oriental, además consta de una amplia presencia en el Mar Negro y en el Mar Rojo. Es muy común en fondos rocosos y de praderas de algas, aunque también puede ser encontrado en zonas con fondos arenosos. Los individuos jóvenes suelen situarse a 30 m de la superficie mientras que los adultos pueden alcanzar los 150 m de profundidad. A pesar de ser una especie gregaria, se pueden encontrar en solitario o formando pequeños grupos, sin embargo, para realizar las migraciones reproductivas se aglomeran miles de individuos.



**Figura 3.** *Sparus aurata* (FAO)

Se caracteriza por presentar una ancha banda de color dorado entre ambos ojos la cual da nombre a la especie. Su cuerpo es ovalado y comprimido con fuertes mandíbulas.

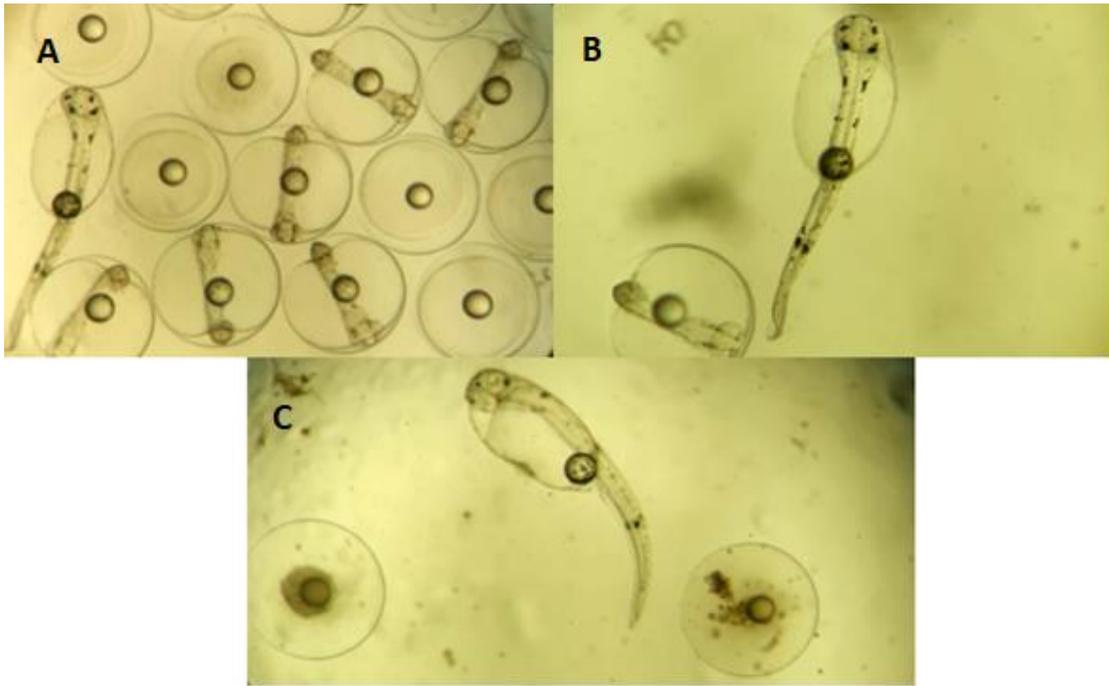
Es un pez euritermo, soportando temperaturas entre 10°C y 33°C aunque presenta especial sensibilidad a las temperaturas bajas, su rango óptimo se sitúa entre 25-26°C. Además, consta de una gran plasticidad salina pudiendo vivir en hábitats con condiciones entre el 3‰ y 70‰ de salinidad.

Esta especie es hermafrodita proterándrica, es decir, desde su nacimiento son organismos machos que adquieren la madurez sexual alrededor de los dos años de vida cuando alcanzan aproximadamente los 250-300 g de peso. Posteriormente parte de la población realiza la inversión sexual en la cual intervienen diversos factores como el

tamaño (aproximadamente 600g), la proporción de sexos y otros factores ambientales. Generalmente son carnívoros, aunque pueden cambiar a una alimentación herbívora bajo ciertas circunstancias (Arias, 1980).

La época natural de la puesta suele prolongarse durante 3 meses y tiene lugar en invierno, aunque presenta variaciones desde noviembre hasta marzo, siendo entre octubre y enero en el Golfo de Cádiz según Arias (1980). Se ha conseguido que esta especie se reproduzca durante todas las épocas del año mediante cambios en el fotoperiodo y temperatura. La fecundidad de los huevos suele estar en torno a 800.000 por cada kg de hembra (90%), estos pueden diferenciarse del resto debido a que presentan una buena flotabilidad. Además, la tasa de eclosión se sitúa entre el 70% y el 80%, por lo tanto, cada hembra aporta entre 250 y 300.000 larvas.

En el momento de la eclosión, las larvas miden aproximadamente 3 mm de largo y no pesan más de 0.15 mg (**figura 4**). Son ciegas y poco activas por lo que se mantienen en la superficie del agua y presentan el tubo digestivo cerrado, debido a esto su sustento está constituido de forma exclusiva por el saco vitelino. Durante el octavo día de vida se da por terminada la fase vitelina, la larva ya presenta los ojos abiertos, pasa a un modo de vida más activa y puede alimentarse por sí sola.



**Figura 4.** Distintos estadios de vida entre la fecundación del huevo de dorada y la formación de la larva. En el panel A se muestran los huevos fecundados con la característica gota lipídica central. En el panel B se muestra una larva de dorada recién eclosionada. En el panel C se aprecia el saco vitelino del cual se alimentará la larva.

### 1.3. Cultivo de la dorada

La cría de doradas comienza en el siglo XIX en lagunas atlánticas, en esta época su captura representaba el 80% de la pesca del Mar Menor, aunque no fue hasta el siglo XX, en España, donde se consiguió cerrar el ciclo de cultivo (Ortega 1973, Odai 1978, Ortega 1983). Los primeros experimentos de engorde fueron realizados por Ortega & Ros, (1973) mediante una alimentación basada en pienso húmedo, y años más tarde se demuestran los beneficios de la presencia de la proteína de harina de calamar en la dieta (Fernández-Palacios et al., 1997), aumentando así la viabilidad de los huevos, el número de larvas producidas por cada kilogramo de hembra y disminuyendo el porcentaje de la presencia de malformaciones en embriones.

En cuanto a la puesta, la hembra la hace de manera natural o artificial mediante masajes abdominales. Se ha estudiado la eficacia de la inyección de gonadotropina coriónica humana (GCH) en ejemplares de ambos sexos, observándose que en un periodo de 2 a 15 días emitían productos sexuales, (Ramos, 1978). También se demostró en el mismo estudio que el índice de supervivencia aumenta cuando se realizaba en un

circuito abierto, ya que si el agua permanece sin recambio se producen ciertas alteraciones en las propiedades químicas.

Para determinar el desarrollo de la reproducción se pueden emplear dos índices, el índice gonado-somático (IGS) relaciona el peso de la gónada con el peso total del individuo y el hepático-somático (IHS) que relaciona el peso del hígado con el total del individuo. El IGS presenta su valor máximo en la época de puesta ya que muestra la variación de la actividad reproductiva respecto al tiempo, mientras que el segundo varía en función del estado del ovario, de hecho, se relaciona el peso del hígado con el diámetro de los ovocitos en el proceso de maduración. Esta relación se establece debida a la participación de las reservas hepáticas en la producción de óvulos ya que el hígado es un órgano de almacenamiento de sustancias como grasas y glucógeno que contribuyen de forma directa a la formación de la vitelogenina exógena (López-Macías et al., 2014), la cual posteriormente es incorporada al ovario.

Con el paso de los años se ha ido perfeccionando distintos aspectos del cultivo de la dorada como la variación del fotoperiodo y la adición de distintos aditivos en la dieta:

- Una disminución de fósforo provoca la reducción del número de huevos, descenso de la tasa de fecundación y de eclosión, así como un incremento de la aparición de anomalías en el embrión (Watanabe et al., 1984a, b).
- El suministro en la dieta de reproductores de Krill, aceite de krill y pigmentos carotenoides presenta una relación con el incremento de huevos fecundados y se observa disminución en larvas anormales debidos a su efecto antioxidante (Watanabe, 1984).
- Se estudió la influencia de la vitamina C en los procesos de resistencia a enfermedades (Soliman et al., 1968) y se observó un efecto antiestrés y antitóxico. Además, un déficit de esta vitamina en los reproductores tiene como consecuencia altos porcentajes de larvas deformes (escoliosis, retraso en el crecimiento y lordosis).
- Se ha observado una transferencia de las vitaminas A y D a los huevos cuando su cantidad se ve incrementada en la dieta (Sugii & Kinumaki, 1968).
- El triptófano es un precursor de neurotransmisores e interviene en la respuesta a estrés (Yao et al., 2011).

En cuanto al fotoperiodo, tiene su acción a través del ojo y de la epífisis (órganos fotorreceptores) y del sistema (eje hipotálamo-hipófisis), traducándose de señal medioambiental en hormonal, por ello se ha conseguido tanto adelantar como retrasar la puesta modulando dicho factor (Izquierdo et al., 1992). Además, se ha comprobado que intensidades elevadas de luz (500-1000 luxes) y fotoperiodos largos al inicio del cultivo larvario son beneficiosas ya que incrementa tanto el número de larvas que se alimentan como la duración (Ortega, 2008).

#### 1.4. Bienestar animal

El concepto de bienestar ha presentado múltiples definiciones desde la década de los 70 puesto que es un término difícil de definir. A menudo es confundido con salud, siendo este un aspecto muy importante a contemplar en las condiciones de bienestar de un organismo, pero no el único. Por ello la definición más compleja es la enunciada por el Farm Animal Welfare Council (FAWC) de Reino Unido en 1992, en la cual habla de las “cinco libertades”. De manera que para considerar que un animal presenta un buen estado de bienestar debe cumplir los siguientes requisitos:

- Debe estar libre de hambre y de sed, así como disponer de acceso al agua y de una dieta específica según sus necesidades.
- Debe estar libre de estrés físico o térmico, además el hábitat debe presentar áreas de refugio y descanso.
- Debe estar libre de dolor gracias a la prevención y al diagnóstico rápido.
- Debe estar libre de restricciones de sus pautas normales de conducta ya que se asegura el espacio suficiente además de las instalaciones adecuadas
- Debe estar libre de estrés, se evita el sufrimiento mental con condiciones adecuadas.

A pesar de que la definición enunciada por la FAWC es la más completa, en ocasiones se considera demasiado genérica y según Broom (2003) el concepto de libertad tiene algunas dificultades lógicas y científicas. Es por ello que se siguen formulando otras nuevas como la propuesta por Welfare Quality (2004-2009), la cual consta de cuatro principios y doce criterios derivados de las “cinco libertades”.

Se han desarrollado diversas técnicas tanto fisiológicas como comportamentales que solo en su conjunto podrían aportar datos suficientes para conocer el estado de bienestar de un animal (Tort et al., 2011).

Algunos de los parámetros más utilizados en peces son el cambio de color (Kittilsen et al., 2009), cambio de comportamiento (Morton, 1990), anormalidades morfológicas (Boglione et al., 2001), reducción en la ingesta (Upton & Riley, 2013), lesiones (Turnbull et al., 1998) entre otros. En el estado de bienestar del pez no solo influyen sus condiciones durante su cría, engorde o reproducción, sino también las condiciones en las que se da el sacrificio. Según Aquatic Animal health code (OIE) los peces deben aturdirse antes de proceder a la matanza, si el aturdimiento fuera reversible tendría que ser sacrificado antes de que recobrase el conocimiento. Un estudio realizado por la Ciencia de Confianza para la Seguridad Alimentaria (EFSA) establece una relación entre distintas especies de peces y la respuesta frente a procedimientos de sacrificio (Serratos et al., 2007): aturdimiento, muerte o sin efecto.

Sin embargo, el proceso fisiológico más estudiado para valorar el bienestar de los peces es el estrés. Este término es difícil de definir y ha ido sufriendo modificaciones a lo largo de la historia (**tabla 1**). En biología ha sido usado comúnmente para referirse a un conjunto de cambios fisiológicos y de conducta en el organismo debido a un estímulo adverso.

**Tabla 1.** Definiciones de “estrés”.

Definiciones	Año	Autor
Intento del sistema simpático adrenomedular (SAM) de regular la homeostasis cuando el organismo se expone a un estímulo aversivo	1929	Cannon
Situación en la cual el equilibrio dinámico (homeostasis) del individuo se ve alterado por agentes estresantes	1992	Chrousos y Gold
La cascada de eventos fisiológicos que ocurre cuando el organismo intenta resistir a la muerte o restablecer la homeostasis frente a una ofensa	2000	Schreck

A pesar de las modificaciones que aparecen en las distintas definiciones enunciadas a lo largo de la historia, se puede afirmar que el estrés es un estado del organismo encaminado a volver a la homeostasis mientras que un agente estresante es el causante de ese desequilibrio.

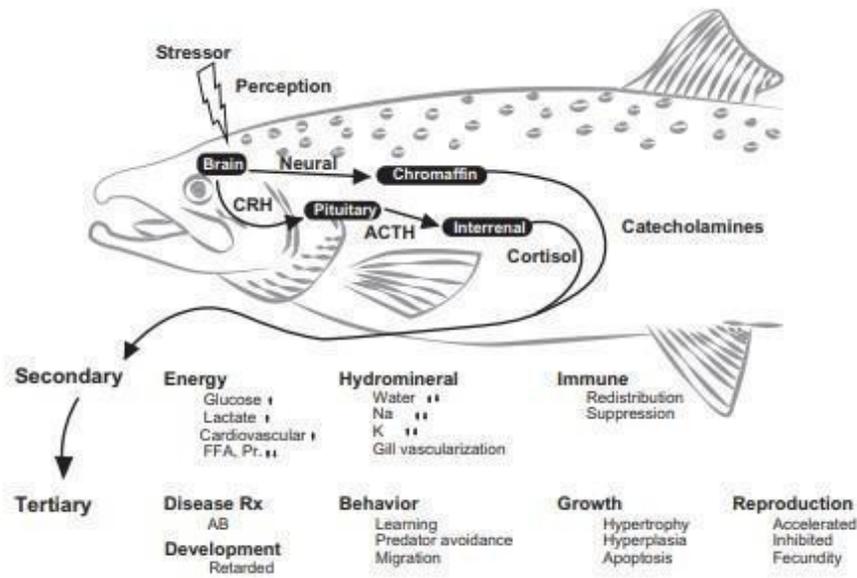
Además, los agentes estresantes pueden ser clasificados según Schreck & Tort (2016) en crónicos y agudos.

- Un agente estresante es agudo cuando dicho estímulo está presente por un corto periodo de tiempo y con una elevada intensidad
- Un agente estresante es crónico cuando dicho estímulo está presente por un periodo prolongado de tiempo y con una intensidad menor.

En peces hay una gran variedad de agentes estresantes y pueden ser tanto físico-químicos como biológicos, entre ellos encontramos: la salinidad (Arjona et al., 2008), el oxígeno disuelto (Herbert y Steffensen, 2005), el pH (Bell et al., 2007), la presencia de patógenos (Ortuño et al., 2002), la alimentación (Menezes et al., 2015) o la reproducción (Koolhaas et al., 2011).

La exposición a dichos factores conlleva en el organismo a la generación del Síndrome de Adaptación General, no es más que una cascada de respuestas fisiológicas formulada por Sayley en 1950. Estas respuestas pueden ser primarias, secundarias y terciarias, y producen alteraciones metabólicas, endocrinas, inmunológicas, neurológicas e incluso comportamentales debido a la acción tanto en genes como en proteínas (**figura 5**).

En este conjunto de respuestas intervienen el eje hipotálamo-simpático-cromafín (HSC) y el eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI), por lo que están controladas por el sistema neuroendocrino.



**Figura 5.** Respuestas primarias, secundarias y terciarias generadas por eventos de estrés. (tomado de Schreck & Tort, 2016).

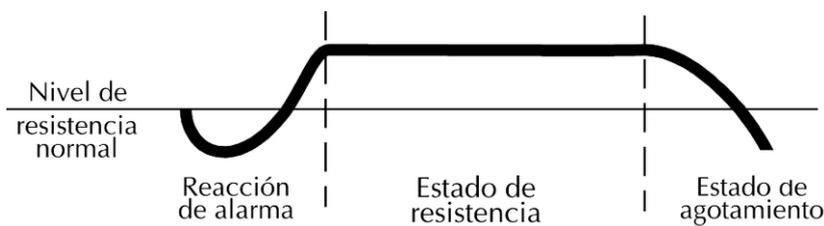
Frente a una situación de estrés la primera respuesta que se da en el organismo es la producción de catecolaminas (eje HSC) mediante la acción de las células cromafines del riñón cefálico, las hormonas catecolaminas posteriormente son liberadas a la sangre lo cual constituye la respuesta primaria (Barton & Iwama 1991; Weber et al., 2011).

Por otro lado, se libera cortisol a través el eje HHI (respuesta primaria). El hipotálamo libera la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), que induce en la adenohipófisis la síntesis del precursor de la proopiomelanocortina (POMC), las células corticotropas adenohipofisiarias producen adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH induce la producción y liberación de cortisol en las células interrenales del riñón cefálico (Wendelaar Bonga, 1997; Flik et al., 2006).

El cortisol y catecolaminas estimulan la respuesta secundaria generando en el individuo un aumento la frecuencia respiratoria y cardíaca, la movilización de sustratos energéticos y el transporte de oxígeno para tener un mayor aporte de metabolitos energéticos (Mancera & Martín, 2003), también influye sobre las funciones inmunes (Wendelaar Bonga, 1997), el incremento de la lipólisis en los tejidos adiposos (Arends et al., 1999; Barton, 2002) así como estimula la ruptura del glucógeno en el hígado y disminuye la proteína albergada en el músculo.

Por último, se da la respuesta terciaria la cual se extiende al nivel de organismo y población, incluye efectos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el comportamiento, resistencia a enfermedades y supervivencia (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

La respuesta generada en el Síndrome de Adaptación General varía en función de la duración del estímulo estresante (**figura 6**), es por ello que se clasifica en tres fases (Cannon, 1929; Adams, 1990; Schreck, 1990).



**Figura 6.** Fases del Síndrome de Adaptación General (tomado de Martín de los Santos, 2017).

- Fase 1: reacción de alarma inicial.

Se activa el eje HSC y se produce una liberación a la sangre de catecolaminas que dan lugar a un incremento de la actividad motora, ritmo cardíaco y flujo sanguíneo hacia los órganos más activos, así como a las branquias, lo cual permite al individuo huir el agente estresante.

- Fase 2: fase de resistencia.

Se produce si el agente estresante persiste. El animal intenta adaptarse a la situación disminuyendo los niveles de catecolaminas y activando el eje HHI, lo cual desencadena la liberación de cortisol. Debido a la acción de esta hormona se sigue suministrando al individuo los sustratos energéticos para soportar la situación.

- Fase 3: fase de agotamiento.

Se produce si el agente estresante se prolonga en el tiempo. Se caracteriza por el agotamiento de los recursos energéticos, estos fueron movilizados para volver al estado de homeostasis. Por lo tanto, procesos como el crecimiento, la reproducción o reparación de lesiones se ven comprometidos debido a la carencia de sustratos energéticos. También se ve afectado el sistema inmune, las defensas bajan y el individuo es más propenso a contraer infecciones, por lo que puede llegar a morir.

## 1.5. Atenuación del estrés mediante aditivos

Debido a las características propias de la actividad acuícola, las diferentes especies están sometidas a diversos agentes estresantes que pueden condicionar tanto el bienestar del animal como el rendimiento económico de las instalaciones (Bermejo-pozza et al., 2015; Conte, 2004; Sneddon et al., 2016; Ashley, 2007). Es por ello que se estudia el uso de aditivos en la dieta para tratar de atenuar dicho estrés (Sneddon et al., 2016).

Los aditivos alimentarios, según la Association of American Feed Control Officials (AAFCO), son sustancias que se añaden a los alimentos y bebidas con el fin de asegurar la seguridad y salubridad de los mismos. Generalmente se usan en pequeñas proporciones y requieren de un manejo cuidadoso (AAFCO, 2008).

Históricamente se han añadido aditivos alimentarios, creándose incluso un código para identificarlos denominado números E. Este código está formado por dígitos alfanuméricos que indican las sustancias añadidas a un ingrediente básico (Ministerio de Consumo- AESAN, 2021). La letra “E” hace referencia a Europa, y va seguida de tres dígitos que indican el tipo de aditivo (colorante, conservante, antioxidante y estabilizante), la familia y la especie. Por lo tanto, según la Conferencia de Consumidores y Usuarios, (2020), todas las sustancias que estén reflejadas en dicho código cuentan con la evaluación de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

A día de hoy se hace necesario el uso de estos productos, ya que sin ellos muchos alimentos no podrían fabricarse o incluso consumirse.

Los aditivos pueden ser clasificados también según su composición (Barrows & Hardy, 2000; Hertrampf & Pascual, 2000; Singh et al., 2008):

- Nutrientes específicos en forma sintética o purificada (aminoácidos, vitaminas, minerales y oligoelementos, colesterol, fosfolípidos, etc)
- Productos químicos, nutrientes o ingredientes que ayudan en el mantenimiento de la calidad del alimento, la estabilidad y/o mejoran la palatabilidad.
- Compuestos o sustancias que mejoran la digestibilidad del alimento, el comportamiento animal, la salud y/o calidad de la carne (enzimas, acidulantes, promotores de crecimiento como hormonas y antibióticos, pigmentos, estimulantes del sistema inmunitario, probióticos, etc.).

Según esta clasificación el triptófano sería una sustancia que mejoraría el comportamiento y la salud animal, al ser añadido a un alimento este pasaría a ser funcional.

Un alimento funcional es aquel que se consume en la dieta en dosis normales pero que aporta algún efecto beneficioso para el consumidor (Gatlin 2002; Nakagawa et al., 2007) más allá de la nutrición básica. El uso de este tipo de alimentos es un modelo seguido en la actualidad para conseguir, a través de la dieta, la mejora de la resistencia al estrés en peces, así como de la salud.

### 1.6. Adición de triptófano en la dieta como atenuante del estrés

El triptófano es un aminoácido esencial y únicamente puede ser obtenido mediante la dieta.

Una vez ingerido por el individuo es metabolizado a través de varias rutas diferentes, destacándose dos especialmente relevantes:

- Ruta de la serotonina: mediante la enzima triptófano hidroxilasa, el triptófano es hidrolizado hasta 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente, gracias a la enzima L-Dopa Decarboxilasa, es transformado hasta la serotonina (5HT). La serotonina se forma principalmente en el sistema nervioso central y sistema gastrointestinal, además, por sí misma no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por ello un aumento de esta en el cerebro se debe a su transporte pasivo, siendo intercambiada por otros aminoácidos neutros, o a la formación de novo a partir del triptófano, el cual sí atraviesa la barrera.
- Ruta de la quirunenina: el 95% del triptófano se metaboliza por esta vía y se da en el hígado. Los sustratos finales originadas son la nicina, el acetyl-CoA, y el piruvato, de los cuales los dos últimos pueden entrar en el ciclo de Krebs para generar energía.

Debido al papel del triptófano como precursor de neurotransmisores, diferentes estudios han establecido una relación entre la presencia de este aminoácido y la atenuación de la respuesta a estrés en peces, como es el caso de la tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneo, 1758) (Martins et al., 2013), el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Herrera et al., 2019; Salamanca et al., 2020) o la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*

Walbaum, 1792) (Lepage et al., 2002). Por lo que se plantea la hipótesis de que dicha paliación se dé por la interacción de la actividad serotoninérgica y el eje HPI (hipotálamo-pituitaria-ineterrenal), aunque este mecanismo aún no está claro (Le Floch & Seve, 2007). En el estudio de Herrera et al., (2016) con *Gadus morhua*, encontraron atenuación de estrés según los marcadores clásicos.

La presencia de triptófano en la dieta puede dar lugar a efectos más allá de la atenuación del estrés, como los hallados en el estudio realizado en *Solea senegalensis* por Salamanca et al., (2020). En él se detectó una relación entre el aumento de ingesta de triptófano en la dieta y la reducción de los parámetros de crecimiento. De Pedro et al., (1998) sugiere que este efecto es debido al aumento de serotonina proveniente de la metabolización del triptófano, lo cual conlleva, según Lin et al. (2000) y Peng & Peter (1997), a una inhibición de la secreción de la hormona del crecimiento. Estudios anteriores con *Oncorhynchus mykiss* (Johnston et al., 1990) también obtienen resultados similares en cuanto al efecto sobre el peso corporal en individuos alimentados con menor concentración del aditivo. Sin embargo, los resultados hallados por Hseu et al. (2003) no muestran correlación entre parámetros de crecimiento y dieta enriquecida en triptófano.

Son pocos los estudios realizados con cacao puro suplementado en la dieta. Lo que hace a este ingrediente una buena elección a la hora de incluirlo en la alimentación de los peces y crustáceos es el alto porcentaje de triptófano que presenta, así como el efecto antioxidante y antiinflamatorio que posee. Además, presenta polisacáridos denominados modificadores de la respuesta biológica según Kuo et al. (2022). En dicho estudio se observó un aumento significativo de la tasa de supervivencia de los camarones, infectados por un patógeno (*Vibrio alginolyticus*) y sometidos a estrés hipotérmico, que recibían dietas ricas en la pectina derivada del extracto seco de la cascara de la vaina de cacao. Hay varios estudios que emplean la cáscara de cacao como aditivo como es el caso de Martin Penadillo et al., (2018) y Pouomogne et al. (1997). Sin embargo, en este experimento usaremos como aditivo cacao puro en polvo.

## 1.6. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es la determinación de una estrategia de alimentación basada en la concentración de Trp o Cacao que mitigue los efectos adversos de los procesos típicos de la práctica acuícola sobre el sistema de estrés de los individuos cultivados. Aún no han sido ampliamente estudiadas las vías de degradación de estos compuestos en peces ni el efecto de su incorporación a la dieta, por ello es necesario un trabajo metodológico para desarrollar técnicas de detección de estos metabolitos. Ha sido elegida la dorada (*Sparus aurata*) como especie de experimentación debido a su ciclo reproductivo, determinado desde finales del siglo XX, y a su alta producción en España.

Se plantean los siguientes objetivos específicos con el fin de conseguir el objetivo general:

1. Determinar el efecto de la dieta suplementada con Trp o Cacao al 1% sobre la respuesta al estrés crónico en la dorada.
2. Evaluar las diferencias originadas en el crecimiento y parámetros zootécnicos en función de la ausencia o presencia de Trp y Cacao en la dieta, y según el grado de estrés por densidad sometido.
3. Determinar las modificaciones plasmáticas originadas en los individuos suplementados con Trp y Cacao sometidos a situación de estrés.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Animales de experimentación

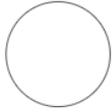
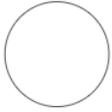
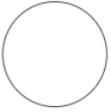
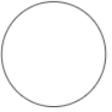
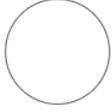
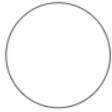
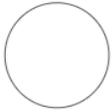
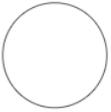
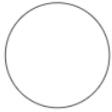
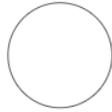
Individuos de *Sparus aurata* con un peso medio de 200g, fueron seleccionados de forma aleatoria de una población del Centro IFAPA “Agua del Pino” (Cartaya, Huelva). Se encontraban en tanques circulares con las siguientes condiciones: fotoperiodo natural, oxígeno disuelto en torno a  $6\text{mgL}^{-1}$ , salinidad media de  $37\text{gL}^{-1} \pm 1\text{gL}^{-1}$  y temperatura media de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Además, eran alimentados dos veces al día con pienso comercial (R- 5 Europa 22%) a una ración de 1-2% de su biomasa corporal por día.

### 2.2 Diseño experimental

Para llevar a cabo el experimento se emplearon 145 individuos repartidos en 10 tanques circulares de  $0.25\text{m}^3$ . Las condiciones de luz, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto fueron similares a los que estaban expuestos con anterioridad, siendo la densidad el parámetro variable.

Los individuos se repartieron de la siguiente forma en los tanques, 5 de los tanques contendrían 20 ejemplares y corresponderían a los tratamientos de alta densidad (HD), y los 5 restantes tan solo contarían con 9 individuos, correspondiente a los tratamientos de baja densidad (LD), de esta manera se somete a estrés por confinamiento a la mitad de los tanques. Para aumentar la situación de estrés se realizó la persecución de los ejemplares sometidos a HD dos veces al día, tratando siempre de variar las horas en las que se someten a dicho estrés agudo para evitar la habituación.

Todos los tanques recibieron pienso enriquecido en triptófano al 1% o en cacao al 1%, salvo los controles. De este modo en cada tratamiento de densidad habría dos tanques alimentados con pienso enriquecido en triptófano, dos con pienso enriquecido en cacao y uno con pienso sin aditivo (tanque control) tal y como se muestra en la **figura 7**.

					LD
					HD
CONTROL	CACAO	CACAO	TRP	TRP	

**Figura 7.** Distribución de los tanques según el tratamiento de densidad y el tipo de pienso.

El experimento se llevó a cabo desde el 14 de febrero hasta el 8 de abril. La cantidad de pienso administrada fue el 2% de la biomasa total, y se suministraba de forma manual dos veces al día. Se realizaron muestreos biométricos cada 15 días para llevar un seguimiento de la talla y peso de los individuos, los cuales fueron el 11 de febrero, 1, 15 y 30 de marzo y el 8 de abril. Así mismo, en el tercer muestreo se obtendría también plasma de los individuos, mientras que en el último se llevaría a cabo el sacrificio del animal y la obtención de plasma, riñón cefálico, hígado, cerebro, músculo e intestino.

### 2.3 Elaboración del pienso experimental

El pienso se realiza simulando los procesos de extrusionado, aumentando la presión y temperatura, que nos permite conseguir unas características concretas del alimento además de añadir los aditivos necesarios. Todos los ingredientes necesarios para la elaboración del pienso se muestran en la **figura 8**.

Para realizar el pienso, en primer lugar, se tritura el pienso comercial (R- 5 Europa 22%) mediante una picadora, para esta experiencia se utilizó el modelo turbo blender electronic de la marca Moulinex. El pienso molido es almacenado en una cámara frigorífica a una temperatura de 7°C. Posteriormente el pienso se amasó (**figura 8**) a baja velocidad durante unos minutos para poder añadir el aditivo en cuestión (L- Tryptophan de Focus Supplements o cacao de Bulk Powders), se añadió un 1% de aditivo del peso seco, salvo en el caso del control, y se aumentó la velocidad de la amasadora. A continuación, se añadió 300g de agua por cada kilogramo de pienso y se amasa hasta tener una textura similar a una masa.



**Figura 8.** Ingredientes necesarios para producir el pienso control y enriquecido en triptófano: pienso molido, aditivo y agua. Amasadora industrial usada para este experimento.

Posteriormente se introduce el pienso en la picadora, peletizadora, hasta en dos ocasiones, lo que nos permitió aumentar la temperatura y presión del pienso simulando el extrusionado (**figura 9**). Para obtener los pellets del tamaño adecuado utilizamos un tamiz con una luz de malla conveniente. El pienso fue secado en una estufa a 30°C durante 48 horas, se removió el pienso para favorecer que todos los pellets se sequen de igual forma. El pienso se almacenó en bolsas herméticas y en la cámara frigorífica para evitar la oxidación y pérdida de propiedades.



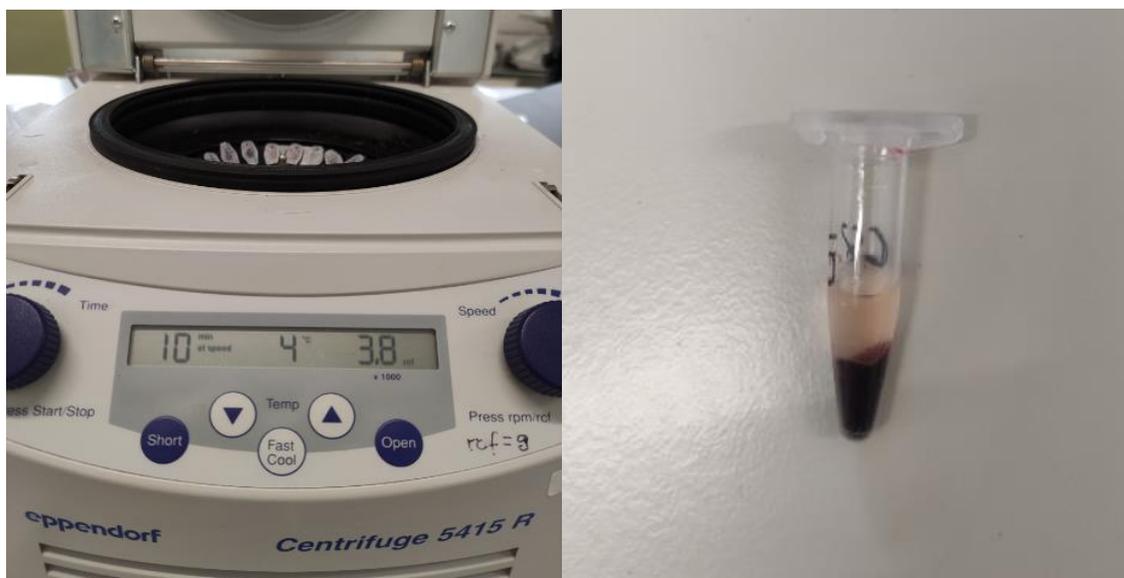
**Figura 9.** Picadora empleada en el experimento y proceso de formación de pellets mediante el tamizado de las tiras de pienso.

La cantidad total de pienso necesario se calcula en base a la ración diaria de cada tanque (2% de la biomasa) multiplicado por el número de días del experimento (60 días). Por lo tanto, se necesitarían alrededor de 26kg de pienso.

## 2.4 Procedimiento de muestreo

Para realizar los muestreos biométricos los peces se anestesiaron previamente en un tanque auxiliar con 2-fenosietanol a razón de  $0.3 \text{ mL}^{-1}$  usando un volumen de 60 L. En el caso de los tratamientos LD, antes de ser introducidos, los peces se anestesiaron añadiendo 40 mL del anestésico en el tanque para evitar desencadenar la cascada de respuestas que provoca una situación de estrés. Los peces fueron medidos y pesados cada 15 días obteniendo datos de talla y peso para cada individuo. Antes de devolverse al tanque de origen los peces fueron recuperados en un tanque auxiliar para evitar posibles agresiones de unos a otros.

La extracción de sangre (0,3 mL aproximadamente) se llevó a cabo en la vena caudal usando jeringas de 1 mL previamente heparinizadas (Sigma H6279). Después de cada muestreo, la sangre era centrifugada (1200 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) para la separación del plasma (**figura 10**) que era conservado en tubos y almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para el posterior análisis de glucosa, lactato y cortisol.



**Figura 10.** Centrifugado de las muestras de sangre y resultado.

Para realizar el muestreo final fue necesario el sacrificio de los animales, el procedimiento se realizó mediante sobredosis de anestésico (1mL/L). En primer lugar,

se extrajo 3mL de sangre mediante punción en la vena caudal, a continuación, se realizó extracción de musculo de la parte dorsal del pez que fue almacenado en tubos eppendorf de 1.5mL a -80°C. Posteriormente se procedió a su disección mediante la realización de un corte longitudinal en la zona ventral, desde la parte de la aleta pectoral, de esta manera accede al paquete visceral. A continuación, se retiró el hígado e intestino tras separar las vísceras, se introducen en respectivos tubos de 1.5mL y se almacena a -80°C.

Para poder obtener el riñón cefálico se realizó un corte en la base de la espina dorsal, este se sitúa en la posición retroperitoneal. Por último, para extraer el cerebro se realizó un corte longitudinal en la parte superior de la cabeza. Ambos órganos fueron almacenados mediante el procedimiento ya mencionado.

## 2.5 Parámetros biométricos

Se realizó un seguimiento de la evolución del crecimiento en peso (g) y longitud total (cm) de la media de individuos de cada tanque gracias a los datos registrados durante los muestreos biométricos.

- Ganancia en peso (WG)=  $[(\text{Peso húmedo final (g)} - \text{Peso húmedo inicial (g)}) / \text{Peso húmedo inicial (g)}] * 100$
- Factor de Conversión (FCR)=  $\text{Alimento suministrado (g)} / \text{Ganancia en peso (g)}$ 
  - Es la cantidad de alimento (g) que necesita para el animal para engordar un gramo de peso.
- Tasa específica de Crecimiento (SGR)=  $[(\ln Pf - \ln Pi) * 100] / t$ 
  - Pf: peso final (g)
  - Pi: peso inicial (g)
  - t = tiempo (días)
  - Muestra la variación del peso corporal a lo largo del tiempo (%).
- Factor de condición (k)=  $[\text{peso (g)} * 100] / \text{longitud total}^3 \text{ (cm)}$ 
  - Expresa la relación volumétrica en función del peso.

## 2.6 Análisis de las muestras

### 2.6.1 Análisis de plasma

A partir de la muestra de plasma obtenidas se obtuvieron valores de glucosa y proteínas.

Para medir los niveles de glucosa y proteínas se utilizaron kits comerciales de Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida Ref. 998225, QCA Proteínas totales Ref. 997180, Tarragona, España) adaptados a microplacas de 96 pocillos.

Fue usado el lector de microplacas Varioskan Lux, utilizando el software v.6.0 Skantt para Windows (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), para todas las medidas espectrofotométricas.

## 2.7 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). Se comprobó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En aquellos parámetros cuya normalidad era aceptada se realizaba un análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA), tomando como factor el tipo de dieta suministrada (TRP, cacao y control) y la densidad (LD y HD), se utilizó un test de Tukey para la comparación entre grupos que fueron considerados significativamente diferentes para  $P < 0,05$ . En el caso de que los parámetros no fueran normales se usa la prueba de la U de Mann-Whitney, considerándose significativamente diferentes para  $P < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el uso del programa informático SPSS<sup>®</sup>.

## 3.RESULTADOS

### 3.1 Parámetros biométricos

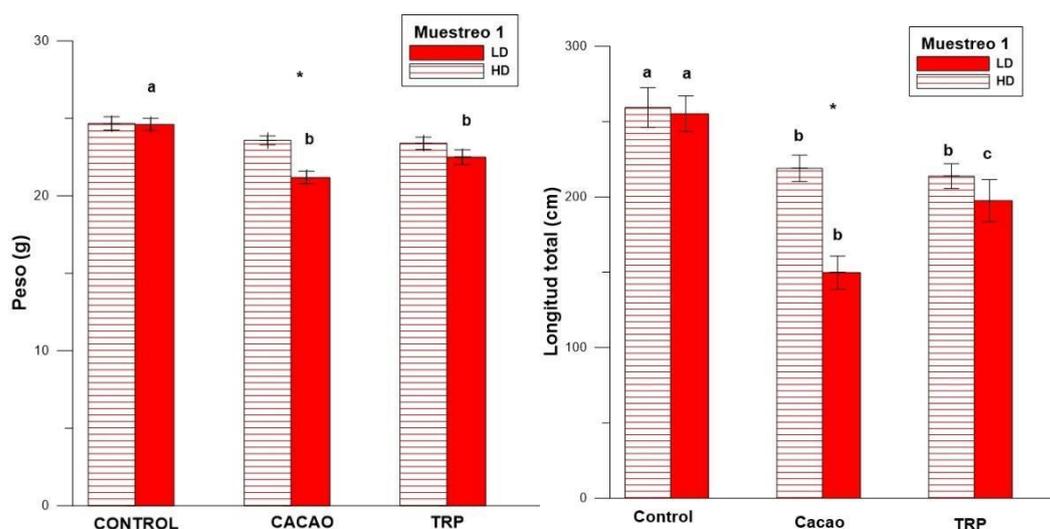
En la **tabla 2** se presentan los diferentes parámetros zootécnicos obtenidos a partir de los datos de peso, talla y cantidad de alimento suministrado al final del experimento. Se observan diferencias significativas en los parámetros WG y SGR entre los individuos alimentados con cacao y sometidos a las diferentes densidades de cultivo. También se apreciaron diferencias entre los individuos sometidos a HD y LD y alimentados con la dieta control para el FCR. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en el factor de condición en ninguno de los casos.

En los ejemplares sometidos a HD se apreciaron diferencias significativas tanto en la ganancia en peso como en la tasa específica de crecimiento entre el control y los ejemplares alimentados con los aditivos. También hubo diferencias en la ganancia en peso y la tasa específica de crecimiento para los ejemplares LD.

**Tabla 2.** Parámetros biométricos e índices de crecimiento y nutricionales de los ejemplares de *Sparus aurata* expuestos a distintos pienso y densidades. Los valores se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). WG: ganancia en peso, SGR: tasa específica de crecimiento, FCR: factor de conversión y K: factor de condición. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.

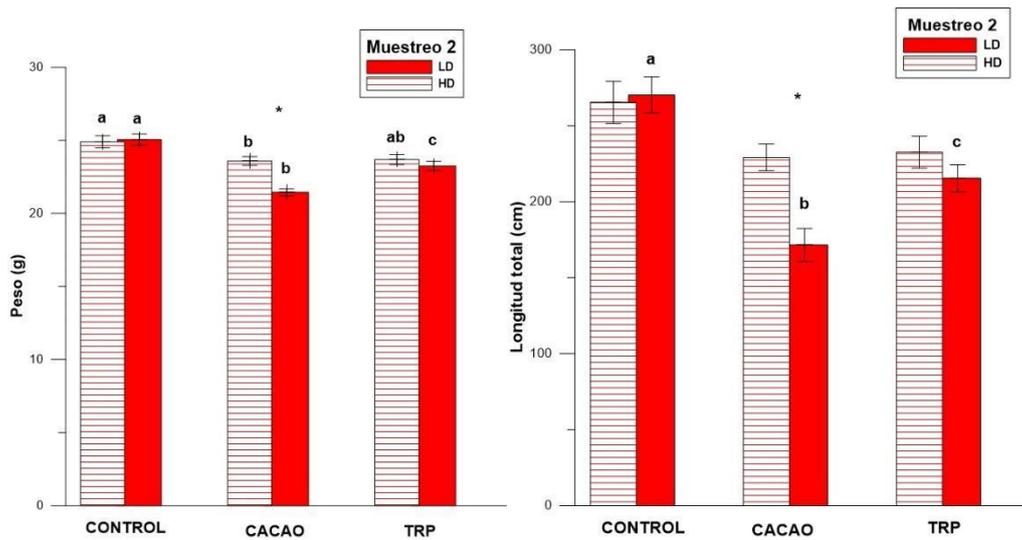
Parámetros	HD control	LD Control	HD Cacao	LD Cacao	HD TRP	LD TRP
WG (%)	71,67 $\pm$ 8,02 <sup>a</sup>	72,65 $\pm$ 7,14 <sup>a</sup>	48,10 $\pm$ 5,41 <sup>b,*</sup>	9,18 $\pm$ 6,67 <sup>b,*</sup>	42,67 $\pm$ 6,42 <sup>ab</sup>	35,87 $\pm$ 5,22 <sup>c</sup>
SGR (% day <sup>-1</sup> )	0,87 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,61 $\pm$ 0,06 <sup>b,*</sup>	0,88 $\pm$ 0,11 <sup>b,*</sup>	0,65 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	0,49 $\pm$ 0,66 <sup>c</sup>
FCR	7,95 $\pm$ 1,25*	2,85 $\pm$ 0,33*	12,98 $\pm$ 4,30	11,61 $\pm$ 21,97	5,01 $\pm$ 2,30	10,44 $\pm$ 4,46
K	1,70 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,19	1,71 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,03	1,72 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,03

En la **figura 11** se muestra el peso y la longitud media, obtenido en el primer muestreo. Se observan diferencias significativas en ambos parámetros entre los tratamientos HD y LD cacao. No se encontraron diferencias significativas en el peso de los grupos sometidos a alta densidad mientras que sí lo hubo en los ejemplares sometidos a baja densidad, observándose una disminución en el peso de los ejemplares alimentados con ambos aditivos con respecto al control. En cuanto a la longitud se hallaron diferencias significativas en todos los tratamientos LD, mientras que en los HD se observó una disminución de los individuos pertenecientes a los tratamientos con pienso enriquecido aditivo con respecto al control.



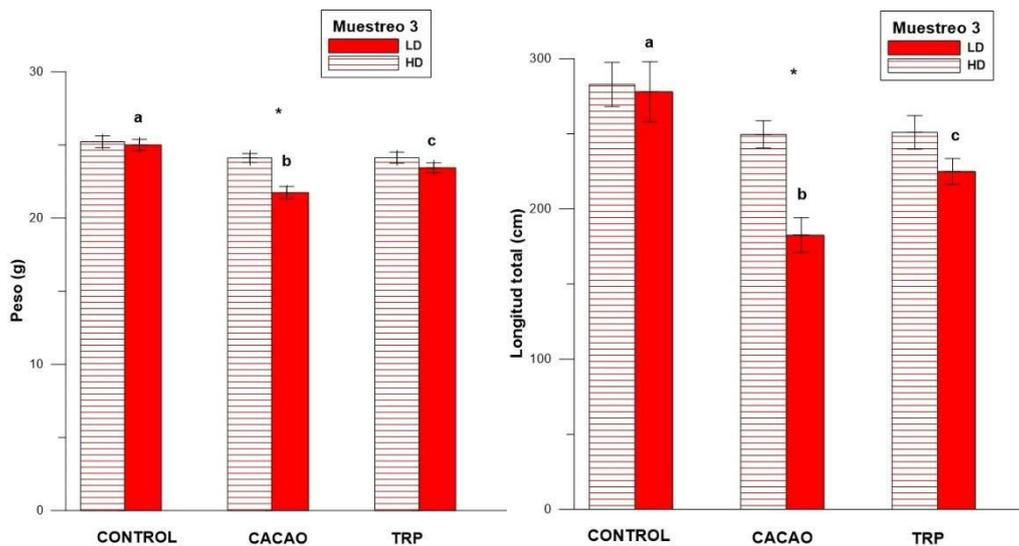
**Figura 11.** Parámetros biométricos obtenidos en el primer muestreo en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.

En los datos pertenecientes al segundo muestreo se observaron diferencias significativas en ambos parámetros entre los tratamientos HD y LD cacao. Se encontraron diferencias significativas en el peso entre todos los tratamientos LD, mientras que en el grupo HD solo se detectaron diferencias entre el tratamiento control y el enriquecido en cacao. No se hallaron diferencias significativas en la longitud de los grupos HD, mientras que en los LD se detectó entre los tres tratamientos, siendo inferior en los ejemplares alimentados con los aditivos, sobre todo en los alimentados con la dieta suplementada con cacao (**figura 12**).



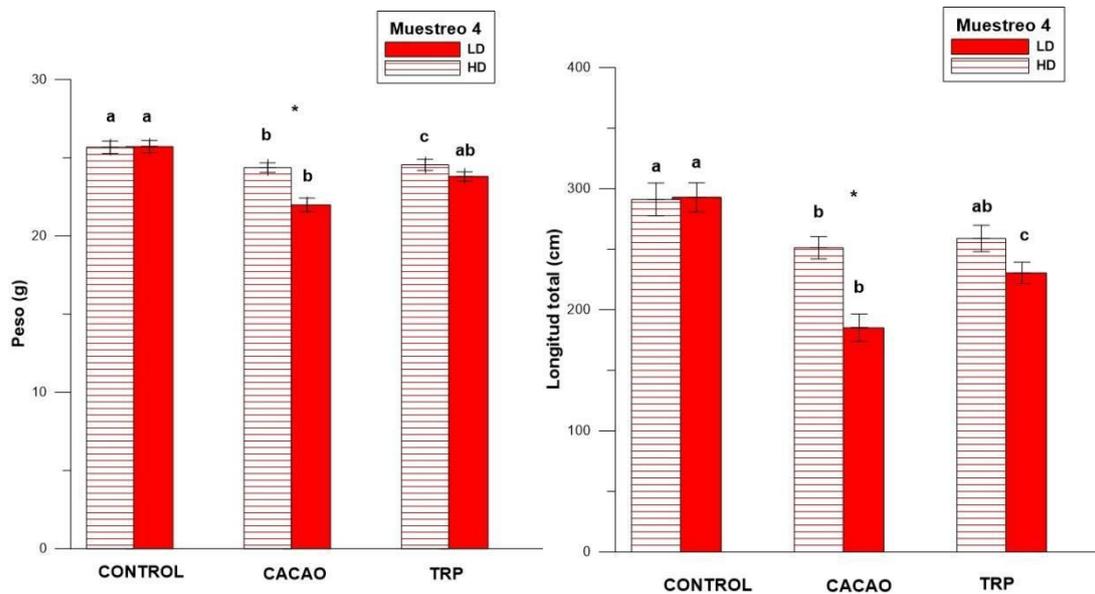
**Figura 12.** Parámetros biométricos obtenidos en el segundo muestreo en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M).

En el tercer muestreo se observaron diferencias significativas en ambos parámetros entre los tratamientos HD y LD cacao. No se encontraron diferencias significativas ni en el peso ni en la longitud entre los grupos HD mientras que sí existían entre los tratamientos del grupo LD donde los ejemplares alimentados con la dieta suplementada por el aditivo fueron inferiores al control (**figura 13**).



**Figura 13.** Parámetros biométricos obtenidos en el tercer muestreo en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M).

En el último muestreo se observaron diferencias significativas en ambos parámetros entre los tratamientos HD y LD cacao. En cuanto al peso se observan diferencias significativas entre los tratamientos del grupo HD, mientras que en el grupo LD solo se observan entre los tratamientos control y los enriquecido en cacao siendo en ambos casos el peso inferior el obtenido en la dieta suplementada con cacao. Se observaron diferencias significativas en la longitud entre todos los tratamientos pertenecientes al grupo LD, mientras que en el HD solo se encontró en los tratamientos control y enriquecido en cacao, de igual forma que en el peso, los ejemplares que fueron alimentados con la dieta suplementada con cacao obtuvieron una longitud inferior (figura 14).



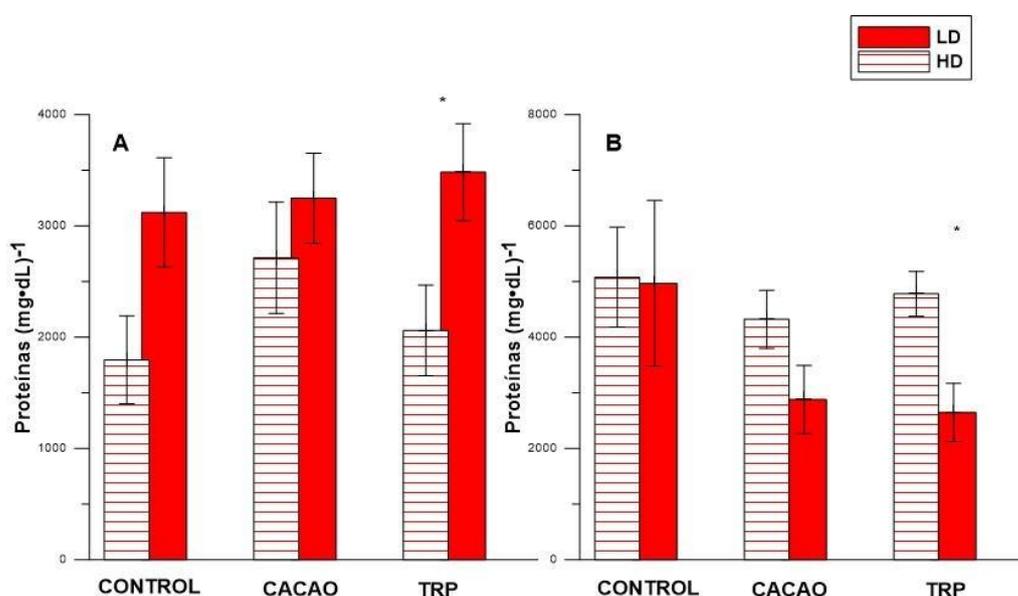
**Figura 14.** Parámetros biométricos obtenidos en último muestreo en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M).

### 3.2 Metabolitos plasmáticos

En la **figura 15 y 16** se muestran los valores de proteína y glucosa, respectivamente, obtenidos en el muestreo intermedio y final. Se apreciaron diferencias significativas en el nivel de glucosa en sangre entre los individuos alimentados con cacao y sometidos a las diferentes densidades de cultivo (**figura 16**), de igual manera también se encontraron diferencias significativas tanto en el segundo como en el cuarto muestreo, entre los

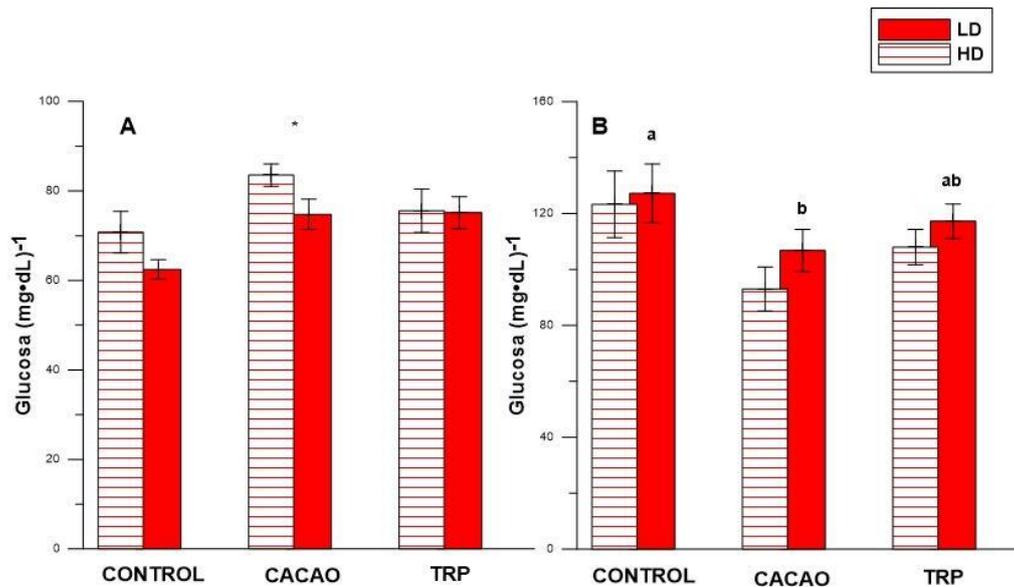
individuos sometidos a HD y LD y alimentados con la dieta Trp para el nivel de proteínas (figura 15).

Se aprecian diferencias significativas en el nivel de glucosa en sangre entre los individuos sometidos a LD alimentados con cacao y control (figura 16). Se observa un claro aumento de los valores de proteína plasmática en aquellos sometidos a LD en el muestreo intermedio (figura 15A), mientras que en el muestreo final existe una disminución de los valores de dicho metabolito en aquellos ejemplares sometidos a LD la tendencia se invierte (figura 15B).



**Figura 15.** Nivel de proteína plasmática obtenido en el muestreo intermedio (A) y muestreo final (B) en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.

En el muestreo intermedio se detectaron diferencias significativas en los niveles de glucosa plasmática entre los individuos alimentados con cacao, aumentando en los ejemplares sometidos a HD (figura 16A). En el muestreo final no se observaron diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso, pero sí se apreciaron entre los individuos alimentados con cacao y control (figura 16B).



**Figura 16.** Nivel de glucosa plasmática obtenida en el segundo muestreo intermedio (A) y cuarto muestreo final (B) en ejemplares de *Sparus aurata* sometidos a tres condiciones de alimentación (control, triptófano y cacao) y a dos condiciones de densidad (LD y HD). Los parámetros se representan con la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre individuos alimentados con un mismo pienso. Las letras indican diferencias significativas entre diferentes alimentos para un mismo estado.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Efectos de la densidad

En este apartado se evaluará el efecto causado en la tasa de crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*) debido al estrés por hacinamiento durante 60 días.

#### 4.1.1 Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento y alimentación son uno de los parámetros más estudiados para evaluar la respuesta al estrés ya que constituyen la respuesta terciaria tras situaciones de estrés en peces (Barton, 2002). Existen multitud de respuestas a situaciones de estrés dependiendo de la duración e intensidad del agente estresante, si la situación de estrés se prolonga a lo largo del tiempo se desarrollaría la respuesta terciaria (Iwama et al., 2006). Frente a un mismo agente estresante puede haber diferencias en las respuestas generadas por el individuo dependiendo de la especie a la que pertenezca (Small, 2004). Es por ello que no en todos los estudios se observan los mismos resultados, según Montero et al. (1999) se detectó una disminución del crecimiento en doradas (*Sparus aurata*) tras estar expuestas a altas densidades mientras

que Herrera et al. (2015) no detectó dicha disminución en la acedia (*Dicologlossa cuneata*).

A menudo las situaciones de estrés crónico se denominan, según Iwama et al. (2006), respuestas de todo el organismo, en dichas respuestas no se ven afectados determinados órganos diana sino todo el organismo y es por ello que se desencadena una reducción en los parámetros de crecimiento y de supervivencia. Varios autores sugieren que no se produce una disminución de los parámetros de crecimiento debido a una habituación del eje HPI a situaciones de estrés prolongado aunque su base neurológica aún no ha sido lo suficientemente estudiada (Montero et al., 1999a, 1999b; Procarione et al., 1999; Haukenes y Barton, 2004; Barton et al., 2005).

Los resultados del presente estudio no revelan efectos negativos ni positivos en ninguno de los parámetros de crecimiento analizados, observándose un continuo crecimiento durante toda la duración del experimento (60 días). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por Johnston et al. (1990), lo cual puede sugerir que existe una variación de los efectos producidos por el estrés sobre el crecimiento según la especie que se trate. Sin embargo, si comparamos los resultados de este estudio con los del realizado por Montero et al. (1999) vemos que son contradictorios tratándose de la misma especie, es por ello que dicha diferencia podría residir también en la intensidad y duración del estrés, siendo menor la llevada a cabo en nuestro estudio.

#### **4.2.2 Metabolitos plasmáticos**

Los metabolitos plasmáticos son analizados para determinar el estado metabólico del animal cuando este está sometido a una fuente de estrés (Salamanca et al., 2020).

En el presente estudio no se observaron diferencias en la concentración de glucosa entre los grupos sometidos a alta y baja densidad, resultados similares fueron observados en *Solea senegalensis* y en *Argyrosomus regius* (Azerezo et al., 2019; Herrera et al., 2020) donde no se detectaron diferencias significativas en los valores de glucosa plasmática para los peces sometidos a un evento de estrés crónico. Además, los peces no pueden mantener los niveles normales de glucosa debido la movilización de los recursos bajo situaciones de estrés (Conde-Sieira et al., 2018), es por ello que la ausencia de diferencias significativas con respecto al control indicaría que los niveles de glucosa

no se ven afectados por el aditivo. Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos en los individuos LD pero no para los HD, ya que en los sometidos a alta densidad encontramos diferencias significativas entre los alimentados con pienso control y enriquecido en cacao, observándose un menor nivel de glucosa con respecto al control, esto puede deberse a una aclimatación del eje HPI que estabiliza los valores de glucosa en situaciones de estrés crónico (Salamanca et al., 2019).

Los niveles de proteína plasmática también son analizados para determinar el estado metabólico del animal, y a diferencia de la glucosa, este metabolito no presenta diferencia en su concentración salvo entre los individuos sometidos a alta y baja densidad alimentados con triptófano, lo que parece indicar que el Trp influye en los valores de proteínas (Herrera et al., 2019).

## 4.2 Efecto de la suplementación con TRP en la dieta.

### 4.2.1 Parámetros de crecimiento.

La influencia de los suplementos dietéticos de Trp en el crecimiento ha sido estudiado en varias especies de osteíctios, demostrando que un aumento de este suplemento en la dieta conduce a la reducción de los parámetros de crecimiento en especies como *Epinephelus coioides* (Hseu et al., 2003), *Scylla serrata* (Laranja et al., 2010), *Cyprinus carpio* (Tang et al., 2013), *Cirrhinus mrigala* (Tejpal et al., 2009) y *Solea senegalensis* (Salamanca et al., 2020). De Pedro et al. (1998) sugiere que este efecto encontrado se deba a un aumento de la serotonina (5-HT) procedente de la degradación del Trp, lo cual produce una reducción en la ingesta de alimento. Además, Peng & Peter (1997) observaron en su estudio de *Carassius auratus* que la serotonina actúa sobre las células somatotropas de la glándula pituitaria inhibiendo de esta manera la secreción de la hormona del crecimiento. Por ende, la serotonina reduce el crecimiento en peces ya que se ha demostrado que la hormona del crecimiento (GH) influye en la reducción de la ingesta de comida (Peng & Peter, 1997; Lin et al., 2000). Por otra parte, Hoseini et al. (2019) sugieren que el Trp dietético modula la liberación de cortisol en peces, y este presenta una influencia inhibitoria sobre el eje somatotrópico y el proceso de crecimiento (Sadoul & Vijayan, 2016).

Para algunas especies ya ha sido determinado el nivel de triptófano necesario para reducir las respuestas de estrés como es el caso de *Labeo rohita*, expuesta a contaminación del agua. Se ha demostrado que si son alimentadas con dietas que contengan 3.05-5.17% de triptófano mejora el rendimiento de crecimiento en comparación con otros piensos con menor porcentaje (Akhtar et al., 2013a & Ciji et al., 2015). De igual manera en el caso de *Cyprinus carpio* ha sido determinado el porcentaje de proteína dietética entre un 0.3 y 1.1 (Dabrowski 1981; Tang et al., 2013), y en *Oncirhynchus mykiss* se ha determinado valores entre el 0.40-0.71% (Walton et al., 1984, 1986, Kim et al., 1987, Jonhston et al., 1990).

En el presente estudio los valores de los parámetros de crecimiento de los individuos alimentados con el pienso suplementado con Trp (1%) disminuyen respecto a los controles, destacando una menor reducción en el caso de los grupos HD. Por ello se podría inducir que los parámetros de crecimiento de los grupos expuestos a estrés por hacinamiento se ven menos influenciados debido a la dieta enriquecida en Trp. En este estudio no se detectaron diferencias en la ingesta de alimento al igual que el estudio realizado por Hseu et al. (2003) con *Epinephelus coioides*, en el cual afirmaron que no se puede excluir que el Trp o la 5-HT disminuyan o no el consumo de alimento ya que los mecanismos fisiológicos mediante los cuales actúan sobre el crecimiento no están lo suficientemente descritos. De igual modo ocurre en estudios previos en lenguado donde los parámetros de crecimiento se ven reducidos cuando los ejemplares son alimentados con 1% de Trp y sometidos a condiciones de estrés (Salamanca et al., 2020).

#### **4.2.2 Metabolitos plasmáticos**

En el presente estudio no se aprecian diferencias significativas en los niveles de glucosa para los individuos alimentados con triptófano con respecto al grupo control y cacao. Según Conde-Sieira et al. (2018) estos resultados no concuerdan con la situación de estrés a la que están sometidos ya que, como se ha referido anteriormente, este efecto hallado podría deberse a la adaptación metabólica de los individuos a las dietas experimentales, lo cual provoca que la glucosa plasmática vuelva a valores normales (Herrera et al., 2019). Es por ello que podríamos atribuir este efecto a la presencia de triptófano en la dieta, además el triptófano presenta efectos inhibitorios sobre la gluconeogénesis (Smith et al., 1978; Tejpal et al., 2009), es por ello que los niveles no

superan a los encontrados en el grupo control. En otros estudios como el realizado con trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se detectaron tendencias distintas, una disminución de los niveles de glucosa de los individuos sometidos a condiciones LD con respecto a los HD (Hoseini et al., 2019). Sin embargo, Jerez-Cepa et al. (2020) en su estudio con doradas (*Sparus aurata*) observó un aumento en la glucosa plasmática de aquellos pertenecientes a la condición LD.

En el análisis de las proteínas plasmáticas se aprecian diferencias significativas entre los individuos HD y LD, pero no hay diferencias con respecto al grupo control. A lo largo de la experiencia los valores de proteínas fueron variando entre los ejemplares LD y HD. En estudios previos con diferentes especies no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Álvarez et al., 2020; Jerez-Cepa et al., 2020).

Por ello podríamos inducir que la variación de los niveles de metabolitos plasmáticos influenciados por la suplementación con TRP tiene un marcado carácter especie dependiente.

### 4.3 Efecto de la suplementación con cacao en la dieta.

#### 4.3.1 Parámetros de crecimiento.

Son escasos los estudios realizados con cacao como suplemento dietético, es por ello que se sabe poco acerca del modo en el que actúa en el organismo. En estudios previos se ha empleado cáscara de la vaina del cacao (CPH) en sobre *Litopenaeus vannamei*, observando un aumento en la tasa de ganancia en peso (WGR), tasa de ganancia en longitud (LGR), la eficiencia de alimentación (FE), así como en el de supervivencia de aquellos expuestos a un patógeno y estrés por hipotermia (Ya Kuo, 2021). Otros estudios realizados en peces como el de Martin Penadillo et al., (2018) establecieron que, a mayor proporción de harina de cáscara de cacao en las dietas, mayor velocidad de crecimiento en peso, tasa de crecimiento específico en peso, y conversión alimenticia aparente.

En el presente estudio los valores de los parámetros de crecimiento de los individuos alimentados con el pienso suplementado con cacao (1%) disminuyen respecto a los controles, destacando una menor reducción en el caso de los grupos HD. Se observa una diferencia significativa en los parámetros de peso y longitud entre los grupos LD y HD, así como en el parámetro WG, observándose una mayor ganancia en peso en aquellos

pertenecientes al segundo grupo, por lo que la presencia de este aditivo en la dieta aumenta la tasa de ganancia en peso como se ha mencionado en los dos anteriores estudios, reduciendo así las consecuencias de la exposición a determinadas situaciones de estrés. Aun así, se hace necesario un estudio integrado del efecto del cacao en la dieta y de su mecanismo de acción en el organismo, para así poder implementarlo de una forma más eficaz en el futuro.

#### **4.3.2 Metabolitos plasmáticos**

Se encontraron diferencias significativas entre los niveles de glucosa con respecto al grupo control, estas diferencias surgen a medida que avanza el experimento ya que en el segundo muestreo aún no estaban presentes. Esto no concuerda con la situación de estrés a la que estuvieron sometidos los individuos ya que no pueden mantener los niveles de glucosa debido a su movilización (Conde-Sieira et al., 2018). Estas diferencias solo son encontradas en los organismos LD, lo que podría sugerir que en estos individuos se esté dando una adaptación metabólica al estrés a largo plazo (Herrera et al., 2019), o que el aditivo incorporado a la dieta esté paliando los efectos del estrés tal y como se observó en el estudio realizado por Kuo et al. (2022) en el cual se sometía a estrés por hipotermia a los camarones. En caso de que el efecto encontrado se debiera a la presencia de cacao en la dieta, podríamos afirmar que este aditivo tiene mayor eficacia que el triptófano a la concentración proporcionada (1%) cuando se trata de devolver los valores de glucosa plasmática a la normalidad, debido a la escasez de estudios realizados con este aditivo sería necesario realizar diferentes ensayos con otras especies para conocer los posibles efectos.

En el análisis de proteínas plasmáticas no se hallan diferencias significativas con respecto al control, debido a la reducida bibliografía se hace difícil la comparación con otros resultados. Todo parece indicar que el cacao suplementado en la dieta no afecta de ningún modo a las proteínas.

## 5.CONCLUSIÓN

- i. Las dietas suplementadas reducen los parámetros de crecimiento tras los 60 días que duro el experimento, sobre todo en aquellos ejemplares sometidos a baja densidad.
- ii. La glucosa plasmática no se ve afectada por la suplementación de Trp en la dieta, esto puede deberse al efecto inhibitor que presenta este aminoácido sobre la gluconeogénesis.
- iii. Los valores de glucosa presentaron diferencias en el cacao, reduciéndose en aquellos ejemplares sometidos a estrés. Esto puede deberse a las propiedades del cacao como relajante natural.
- iv. Los valores de proteínas plasmáticas no se vieron afectadas por ninguno de los aditivos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

AAFCO (Asociation of American Feed Control Officials). 2008. Official feed terms. Official Publication of the Association of American Feed Control Officials. Inc, Oxford, IN USA 239-252. Dirección URL: <<https://www.btsa.com/aafco-nutricion-animal/>>

ADAMS, S. M. 1990. *Biological indicators of stress in fish. In American fisheries symposium*. American Fisheries Society. Bethesda, USA. 191pp

AESAN-Ministerio de Consumo. 2021. Guía para saber más sobre seguridad alimentaria. Ministerio de Consumo, Madrid, España. Dirección URL: <[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm)>

AKHTAR M, P. A., SAHU, N., CIJI, A., MEENA, D. & DAS, P. 2013. Physiological responses of dietary tryptophan fed *Labeo rohita* to temperature and salinity stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 1075–1083.

ALCÁZAR, A. G. 1998. *Influencia de la alimentación de los reproductores en la calidad de la puesta y el cultivo larvario de la dorada (Sparus aurata L.)*. (Murcia, España). Tesis. Universidad de Murcia. 155pp.

ÁLVAREZ, C. A., JEREZ-CEPA, I., CÁRCAMO, C. B., TOLEDO, P., FLORES, H. & BROKORDT, K. 2020. Growth performance, physiological responses to hypoxia and flesh quality of Chilean croaker (*Cilus gilberti*) stocked at different densities. *Aquaculture*, 525, 735316.

ARENDS, R. J., MANCERA, J. M., MUNOZ, J. L., BONGA, S. W. & FLIK, G. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of endocrinology*, 163: 149.

ARIAS, A. 1980. Crecimiento, regimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Investigación pesquera*, 44: 921–926.

ARJONA, F. J., VARGAS-CHACOFF, L., DEL RIO, M. M., FLIK, G., MANCERA, J. M. & KLAREN, P. H. M. 2008. The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic acclimation of *Solea senegalensis*. *General and comparative endocrinology*, 155: 796-803.

ASHLEY, P. J. 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104:199-235.

AZEREDO, R., MACHADO, M., MARTOS-SITCHA, J. A., MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, G., MOURA, J., PERES, H. & COSTAS, B. 2019. Dietary tryptophan induces opposite health-related responses in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reared at low or high stocking densities with implications in disease resistance. *Frontiers in Physiology*, 10: 508.

BARROWS, F. T. HARDY, R. W. 2000. Encyclopedia of aquaculture.

BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42: 517-525.

BARTON, B. A. & IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish diseases*, 1: 3-26.

BARTON, B.A., RIBAS, L., ACERETE, L. & TORT, L., 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research*, 36: 172–179.

BARTON, BRUCE A. 2002. Stress in fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.

BELL, T. G., JOHNSON, M. T., JICKELLS, T. D. & LISS, P. S. 2007. Ammonia/ammonium dissociation coefficient in seawater: a significant numerical correction. *Environmental Chemistry*, 4: 183-186.

BERMEJO-POZA, R., DE LA FUENTE, J., PÉREZ, C., LAUZURICA, S., GONZÁLEZ, E., DIAZ, M. T. & VILLARROEL, M. 2015. The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout. *Aquaculture*, 443: 24-30.

BOGLIONE, C., GAGLIARDI, F., SCARDI, M. & CATAUDELLA, S. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192: 1-22.

BROOM, D. M. 2003. The evolution of morality and religion. Cambridge University Press, Cambridge, p259.

CANNON, W. B. 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 9: 399-431.

CHROUSOS, G. P., & GOLD, P. W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267: 1244-1252.

CJI, A., SAHU, N. P., PAL, A.K. & AKHTAR, M.S. 2015. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. *Aquaculture Research* 46: 2013–2024.

CONDE-SIEIRA, M., VALENTE, L.M.P., HERNÁNDEZ-PÉREZ, J., SOENGAS, J.L., MÍGUEZ, J.M. & GESTO, M. 2018. Short-term exposure to repeated chasing stress does not induce habituation in Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture* 487: 32–40.

Conferencia de Consumidores & Usuarios- CECU (2020). Aditivos, alimentarios: los números E de las etiquetas. Madrid, España. 9 pp.

CONTE, F. S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86: 205-223.

DABROWSKI, K. R. 1981. Tryptophan requirement of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 46: 64-71.

DE PEDRO, N., PINILLOS, M. L., VALENCIANO, A. I., ALONSO-BEDATE, M. & Delgado, M. J. 1998. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides*, 19: 505-511.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M., ROBAINA, L., VALENCIA, A., SALHI, M. & MONTERO, D. 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 148: 233-246.

FLIK, G., KLAREN, P. H., VAN DEN BURG, E. H., METZ, J. R. & HUIZING, M. O. 2006. CRF and stress in fish. *General and comparative Endocrinology*, 146: 36-44.

GATLIN III, D. M. 2002. Nutrition and fish health. In *Fish Nutrition* (eds J. E. Halver and R. W. Hardy). Academic Press, San Diego, CA, USA, 671-702.

HAUKENES, A. H. & BARTON, B.A. 2004. Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in the yellow perch and the influence of rearing density. *Journal of Fish Biology*, 64: 851–862.

HERBERT, N. A. & STEFFENSEN, J. F. 2005. The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Marine Biology*, 147: 1403-1412.

HERRERA, M., FERNÁNDEZ-ALACID, L., SANAHUJA, I., IBARZ, A., SALAMANCA, N., MORALES, E. & GIRÁLDEZ, I. 2020. Physiological and metabolic effects of a tryptophan-enriched diet to face up chronic stress in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 522: 735102.

HERRERA, M., HERVES, M. A., GIRÁLDEZ, I., SKAR, K., MOGREN, H., MORTENSEN, A. & PUVANENDRAN, V. 2016. Effects of amino acid supplementations on metabolic and physiological parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) under stress. *Fish physiology and biochemistry*, 43: 591-602.

HERRERA, M., MIRÓ, J. M., GIRÁLDEZ, I., SALAMANCA, N., MARTOS-SITCHA, J. A., MANCERA, J. M. & LÓPEZ, J. R. 2019. Metabolic and stress responses in Senegalese soles (*Solea senegalensis Kaup*) fed tryptophan supplements: effects of concentration and feeding period. *Animals*, 9: 320.

HERRERA, M., RUIZ-JARABO, I., VARGAS-CHACOFF, L., DE LA ROCA, E. & MANCERA, J.M. 2015. Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture Research* 46: 2808-2818.

HERTRAMPF, J.W. & PASCUAL, F.P. 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Boston, USA, Kluwer Academic Publishers.

OSEINI, S.M., PEREZ-JIMENEZ, A., COSTAS, B., AZEREDO, R. & GESTO, M., 2019. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. *Aquaculture*, 11: 3–24.

HSEU, J. R., Lu, F. I., SU, H. M., WANG, L. S., TSAI, C. L. & HWANG, P. P. 2003. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218: 251-263.

ARECHAVALA-LOPEZ, P., NAZZARO-ALVAREZ, J., JARDÍ-PONS, A., REIG, L., CARELLA, F., CARRASSÓN, M. & ROQUE, A. 2020. Linking stocking densities and feeding strategies with social and individual stress responses on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Physiology & behavior*, 213: 112723.

IZQUIERDO-LÓPEZ, M. S. 1992. *Control de la reproducción de Teleósteos en Acuicultura*. 9-12 abril, 1992. Las Palmas de Gran Canaria, España. 153-165pp

JEREZ-CEPA, I., MARÍN-RINCÓN, A., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., RUIZ-JARABO, I. & MANCERA, J. M. 2020. A natural additive in the diet to improve growth and reduce energy expenditure of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Attenuation of high stocking density stress responses. *Aquaculture*, 524: 735263.

JOHNSTON, W.L, ATKINSON, J.L., HILTON, J.W. & WERE, K.E. 1990. Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain serotonin, and brain 5-hydroxyindoleacetic acid in rainbow trout. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1: 49-54.

KIM K. I., KAYES, T.B. & AMUNDSON, C.H. 1987. Effects of dietary tryptophan levels on growth, feed/gain, carcass composition and liver glutamate dehydrogenase activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Comparative Biochemistry* 88: 737–741.

KITTILSEN, S., SCHJOLDENS, J., BEITNES-JOHANSEN, I., SHAW, J. C., POTTINGER, T. G., SORENSEN, C. & OVERLI, O. 2009. Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Hormones and behavior*, 56: 292-298.

KOOLHAAS, J. M., BARTOLOMUCCI, A., BUWALDA, B., DE BOER, S. F., FLÜGGE, G., KORTE, S. M. & FUCHS, E. 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35: 1291-1301.

KUO, H. W., CHANG, C. C. & CHENG, W. 2021. Pectin from dry cacao pod husk mediates growth performance, immune resistance responses and carbohydrate metabolism of *Litopenaeus vannamei* through dietary administration. *Aquaculture*, 548: 737613.

LARANJA Jr, J. L. Q., QUINTIO, E. T., CATACUTAN, M. R. & COLOSO, R. M. 2010. Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*, 310: 84-90.

LE FLOCH, N. & SEVE, B. 2007. Biological roles of tryptophan and its metabolism: potential implications for pig feeding. *Livestock Science*, 122: 23-32.

LEPAGE, O., TOTTMAR, O. & WINBERG, S. (2002). Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 205: 3679-3687.

LIN, X., VOLKOFF, H., NARNAWARE, Y., BERNIER, N. J., PEYON, P. & PETER, R. E. 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126: 415-434.

LÓPEZ-MACÍAS, J. 2014. *Nutrición y Alimentación Piscícola*. Editorial Universidad de Nariño, 1a edición. Pasto. Colombia. 348 pp.

MANCERA, J. & MARTÍN, M. (2003). El sistema de estrés en peces teleósteos.

De los Santos, E. 2017. Respuestas fisiológicas de peces sometidos a estrés. TFG. Universidad de La Laguna. 33pp.

MARTIN-PENADILLO, D. 2018. *Desempeño bioeconómico de cuatro niveles de inclusión de harina de cáscara de theobroma cacao I (cacao) en dietas de Oreochromis niloticus (tilapia) en fase de engorde. (Huánuco, Perú)*. Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 87pp.

MARTINS, C. I. M., SILVA, P. I. M., COSTAS, B., LARSEN, B. K., SANTOS, G. a., CONCEIÇÃO, L. E. C., DIAS, J., OVERLI O., HÖGLUND, E. & SCHRAMA, J. W. 2013. The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 400: 129-134.

MENEZES, C., RUIZ-JARABO, I., MARTOS-SITCHA, J. A., TONI, C., SALBEGO, J., BECKER, A. & BALDISSEROTTO, B. 2015. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): a metabolic and endocrine approach. *Aquaculture*, 435: 257-264.

MONTERO, D., IZQUIERDO, M.S., TORT, L., ROBIANA, L. & VERGARA, J.M. 1999a. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 53–60.

MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M. & TORT, L., 1999b. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269–278.

MORTON, D. B. 1990. Guidelines on the recognition on pain, distress and discomfort in experimental animals. *European Journal of Pharmacology*, 183(4): 1583.

NAKAGAWA, H., SATO, M. & GATLIN, D.M. III (eds). 2007. *Dietary Supplements for the Health and Quality of cultured Fish*. Cabi Publishing. Oxford. UK. 256.

ODAI, M. 1978. Experiencias sobre cultivos de larvas *Sparus aurata* realizadas en el laboratorio del Mar Menor del Instituto Español de Oceanografía (Tomo IV. n.º 239): 1-54.

OESA - Fundación Biodiversidad (2019). Indicadores de Seguimiento y Sostenibilidad en Acuicultura 2019. Fundación Biodiversidad. Madrid. España. 64 pp.  
Dirección URL: <<https://www.observatorio-acuicultura.es/recursos/publicaciones/indicadores-de-seguimiento-y-sostenibilidad-en-acuicultura-2019>>

ORTEGA, A. 1983. Cultivo de Dorada, *Sparus aurata* L. Editor Dr. Juan Espinosa de los Monteros. Centro Costero del mar Menor. España. 45pp.

ORTEGA, A. & ROS, J. 1973. Primeras experiencias sobre cultivos de peces en el Mar Menor. Instituto Español de Oceanografía, 163: 1-20.

ORTEGA, A. 2008. Cultivo de Dorada. *Sparus aurata* L. Editor Dr. Juan Espinosa de los Monteros. Centro Costero del mar Menor. España. 45pp.

ORTUÑO, J., ESTEBAN, M. A. & MESEGUER, J. 2002. Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 12: 49-59.

PENG, C. & PETER, R.E. 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 173-197.

POUOMOGNE, V., TAKAM, G. & POUEMEGNE, J. B. 1997. A preliminary evaluation of cacao husks in practical diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 156: 211-219.

PROCARIONE, L.S., BARRY, T.P. & MALISON, J.A. 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 61: 91-96.

RAMOS, J. 1978. Experiencias de cultivo de dorada (*Sparus aurata*) en tanques (Informes Técnicos). Instituto de Investigaciones Pesqueras. 45pp.

SADOUL, B. & VIJAYAN, M.M. 2016. Stress and growth. In: SCHRECK, B., TORT, L., FARRELL, A.P. & BRAUNER, C.J. (Eds.), *Biology of Stress in Fish*. Academic Press, The Netherlands. 35-75pp.

SALAMANCA, N., MORALES, E., RUIZ-AZCONA, P. & HERRERA, M. 2020. Endocrine and metabolic effects of Trp-enriched diets for attenuation of chronic stress in the Senegal soles (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 523: 735-743.

SCHRECK, C. B. 1990. Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 29-37.

SCHRECK, C. B. & TORT, L. 2016. The concept of stress in fish. In *Fish physiology*. Academic Press, 23:1-34.

SCHRECK, C. B., MOBERG, G. P. & MENCH, J. A. 2000. *The Biology of Animal Stress: basic principles and implications for animal welfare*.

SELYE, H. 1950. *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress*, Acta Inc. Medical Publishers, Montreal, Canada. Pp 822..

SERRATOSA, J., RIBO, O., CORREIA, S. & PITTMAN, M. 2007. EFSA scientific risk assessment on animal health and welfare aspects of avian influenza (EFSA-Q-2004-075). *Avian diseases*, 51: 501-503.

SINGH, S. D., NAYAK, S. K., SEKAR, M. & BEHERA, B. K. 2008. Applications of nutritional biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 17-23.

SMALL, B.C. 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucosa, and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture* 238: 469-481.

SMITH, S. A., ELLIOTT, K. R. & POGSON, C. I. 1978. Differential effects of tryptophan on glucose synthesis in rats and guinea pigs. *Biochemical Journal*, 176: 817-825.

SNEDDON, L. U., WOLFENDEN, D. C. & THOMSON, J. S. 2016. Stress management and welfare. In *Fish physiology*. Academic Press. London. UK. 539pp.

SOLIMAN, A.K., JAUNCEY, K. & ROBERTS, R.J. 1986. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus*, Peters. *Aquaculture*, 59: 197-208.

SUGII, K., & KINUMAKI, T. 1968. Distribution of vitamin E in a few species of fish. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 34: 420.

TANG, L., FENG, L., SUN, C. Y., CHEN, G. F., JIANG, W. D., HU, K., LIU, Y., JIANG, J., LI, S. H., KUANG, S. Y. & ZHOU, X. Q. 2013. Effect of tryptophan on growth, intestinal

enzyme activities and TOR gene expression in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Studies in vivo and in vitro. *Aquaculture*, 412: 23-33.

TEJPAL, C. S., PAL, A. K., SAHU, N. P., ASHISH KUMAR, J., MUTHAPPA, N. A., VIDYA, S. & RAJAN, M. G. 2009. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*, 293(3-4): 272-277.

TORT, L., PAVLIDIS, M. A. & WOO, N. Y. S. 2011. Stress and welfare in sparid fishes. *Sparidae*, 75-94.

TURNBULL, J. F., ADAMS, C. E., RICHARDS, R. H. & ROBERTSON, D. A. 1998. Attack site and resultant damage during aggressive encounters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Aquaculture*, 159: 345-353.

UPTON, K. R. & RILEY, L. G. 2013. Acute stress inhibits food intake and alters ghrelin signaling in the brain of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 44: 157-164.

WALTON, M., COLOSO, R.M., COWEY, C., ADRON, J. & KNOX, D. 1984. The effects of dietary tryptophan levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 51: 279–287.

WALTON, M., COWEY, C., COLOSO, R.M. & ADRON, J. 1986. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2: 161–169.

WATANABE, T. 1984. Importance of broodstock nutrition study for further development of aquaculture. *Abstr. Cong. on Fish Nutrition*. p 27. Aberdeen.

WEBER, R. A., PÉREZ-MACEIRA, J. J., PELETEIRO, J. B., GARCÍA-MARTÍN, L. & ALDEGUNDE, M. 2011. Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, 321: 108-112.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77: 591-625.

YAO, K., FANG, J., YIN, Y. L., FENG, Z. M., TANG, Z. R. & WU, G. 2011. Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3: 286-97.

