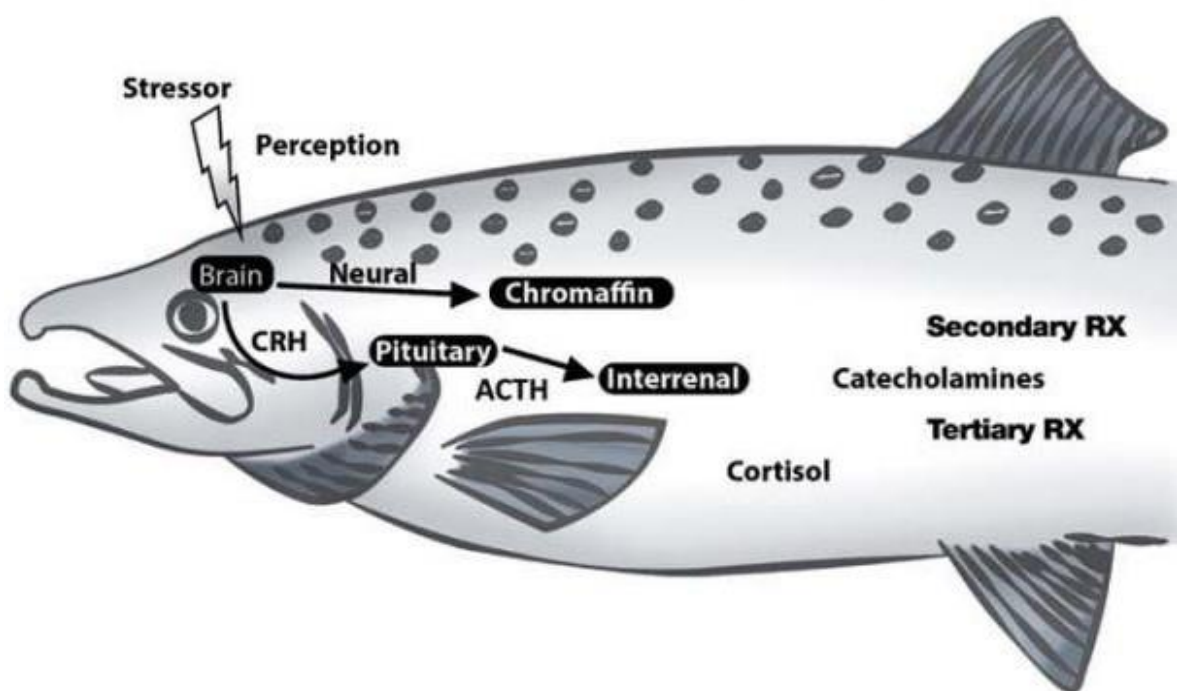


Estrés en acuicultura: una visión actualizada para mejorar el bienestar animal en especies de interés comercial



Trabajo de Fin de Grado en Ciencias del Mar

Septiembre 2020

Cristina Perán Alarcos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero darle las gracias a Juan Antonio Martos Sitcha por haberme brindado la oportunidad de tutorizar mi trabajo. Agradecerle también su continua atención, su esfuerzo y sobre todo su ayuda constante durante todos estos meses. Además, me gustaría resaltar su buen rollo y su forma de hacer todo mucho más fácil.

Por supuesto, agradecer a mi familia, que a pesar de no tener ni idea del tema, me han ayudado en todo lo que han podido y sobre todo, han confiado en mí en todo momento. Al igual que agradecer a mis amigos haberme aguantado todo este período, que no ha sido fácil, y por haber tenido siempre las palabras oportunas para animarme.

Por último, me gustaría dar las gracias a mi prima Paula, que ha invertido días enteros de su verano para ayudarme, aconsejarme y por encima de todo, aguantarme en mis momentos de estrés.

Índice

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Materiales y métodos | 6 |
| 3. | Resultados y discusión | 7 |
| 3.1. | Factores ambientales y biológicos | 7 |
| 3.2. | Diagnóstico del estrés en peces y biomarcadores | 11 |
| 3.2.1. | <i>Métodos de diagnóstico del estrés</i> | 11 |
| 3.2.1.1. | <i>Metodología bioquímica molecular</i> | 12 |
| 3.2.1.2. | <i>Metodología bioquímica hormonal</i> | 13 |
| 3.2.1.3. | <i>Método fisiológico computarizado no invasivo</i> | 14 |
| 3.2.1.4. | <i>Medición de parámetros reproductivos</i> | 15 |
| 3.2.1.5. | <i>Metodología histopatológica</i> | 15 |
| 3.2.2. | Biomarcadores | 15 |
| 3.3. | Atenuación del estrés..... | 16 |
| 3.3.1. | <i>Anestésicos</i> | 16 |
| 3.3.1.1. | <i>Anestésicos comunes</i> | 18 |
| 3.3.1.2. | <i>Aceites esenciales</i> | 21 |
| 3.3.2. | <i>Aditivos a la dieta</i> | 22 |
| 4. | Conclusiones | 24 |
| 5. | Bibliografía | 25 |

Resumen

La producción acuícola se encuentra en pleno proceso de expansión global debido al aumento del consumo generalizado de pescados y mariscos. Aun así, la producción intensiva para poder satisfacer toda esta demanda requiere del control de una gran variedad de parámetros y procesos, tanto físicos como biológicos, que no comprometan su crecimiento, estado de salud, e incluso su supervivencia. Por tanto, una mejora en el bienestar animal, reduciendo cualquier fuente de estrés a lo largo de los ciclos de cultivo, repercutirá en un mayor rendimiento del sector, con productos de mejor calidad y mayor sostenibilidad ambiental. Por tanto, la presente propuesta de TFG pretende realizar una extensa revisión bibliográfica sobre los últimos avances realizados sobre el bienestar animal en acuicultura, y se pretenderá exponer los principales factores bióticos, abióticos o socioeconómicos encaminados hacia una mejora de la producción, así como los efectos fisiológicos producidos, la respuesta al estrés e incluso su monitorización en diferentes especies de interés comercial.

Palabras clave: acuicultura, estrés, bienestar animal, peces.

Abstract

Aquaculture production is in the midst of global expansion due to increased widespread consumption of seafood. Even so, the intensive production to satisfy all this demand requires the control of a wide variety of parameters and processes, both physical and biological, that do not compromise their growth, health status, or even their survival. Therefore, an improvement in animal welfare, by reducing any source of stress throughout the on-growing cycle, will impact on higher yields in the sector, with better quality products and increased environmental sustainability. Therefore, this proposal aims to carry out an extensive bibliographic review on the latest advances on animal welfare in aquaculture, and it will be intended to expose the main biotic, abiotic or socio-economic factors aimed at improving production, as well as the physiological effects produced, stress responses and even the monitoring on different species of commercial interest.

Key Words: aquaculture, stress, animal welfare, fish.

1. Introducción

En los últimos años, la acuicultura ha experimentado adelantos significativos en la producción intensiva de organismos acuáticos. Teniendo en cuenta que los océanos se encuentran sobreexplotados, además de la alta demanda a nivel global, en un futuro próximo la acuicultura será la forma más común de aprovisionamiento de productos acuáticos para la mayor parte de la humanidad (FAO, 2018).

Por esta razón, es necesario el control de una gran variedad de parámetros y procesos, tanto físicos como biológicos, que permitan reducir cualquier fuente de estrés, de manera que no comprometan el crecimiento, la reproducción, el estado de salud e incluso la supervivencia de estos organismos.

Para explicar y analizar los distintos avances actuales realizados sobre el bienestar animal en acuicultura es necesario poner en contexto el término de estrés, así como todos los procesos que este lleva involucrados.

El estrés se puede definir como “una situación en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (estado homeostático) es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo intrínseco o extrínseco al animal, denominado agente estresante” (Mancera y Martín, 2003).

Ante esta situación de amenaza, el animal genera una respuesta fisiológica para poder compensar y/o adaptarse a ese nuevo estado homeostático, activando tanto el eje hipotálamo-simpático-cromafín (HSC) como el eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI).

De esta forma, ante una situación de estrés, la primera respuesta se lleva a cabo en las células cromafines localizadas en el riñón cefálico (eje HSC), generando catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que son liberadas a la sangre. El aumento de estos niveles permite al animal aumentar la frecuencia cardíaca y respiratoria, el transporte de oxígeno y la movilización de los sustratos energéticos necesarios, de tal forma que se produzca tanto un aumento del aporte de metabolitos energéticos como de una mejor orquestación fisiológica para usarlos de una forma más eficiente (Mancera y Martín, 2014).

Por otro lado, el hipotálamo, la hipófisis y la glándula interrenal (eje HHI) se coordinan para sintetizar y secretar corticoides, siendo el cortisol el principal en peces. Su síntesis y liberación se lleva a cabo, principalmente, bajo el control de dos hormonas adeno-hipofisarias: la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona melanotropa (MSH), que son producidas a nivel de la *rostral pars distalis* y la *pars intermedia*, respectivamente.

Dentro de la compleja cascada de mecanismos fisiológicos que comprende el proceso de estrés, se puede hacer una distinción en función de la intensidad y de la duración del agente estresante. Una primera fase, denominada “eustrés”, en la que la situación es ligeramente estresante y la respuesta generada provoca cambios fisiológicos positivos que pueden, por ejemplo, ayudar al funcionamiento del organismo (Martín de los Santos, 2017). Y por otro lado, una segunda fase denominada “diestrés”, en la que dichos cambios fisiológicos pueden inducir respuestas de adaptación, pero también puede producir consecuencias negativas que complican su integridad (Schreck et al., 2016).

Para explicar cómo reacciona el organismo cuando es sometido a las diferentes situaciones de estrés, Seyle (1950) propuso el Síndrome de Adaptación General (SAG), consistiendo en una cascada hormonal en la que intervienen los dos ejes nombrados anteriormente. En función de la duración del agente estresante, la respuesta se puede distribuir en tres fases (Cannon, 1929; Adams, 1990; Schreck, 1990):

- Fase 1: reacción de alarma inicial

En esta primera etapa, se produce el intento de huida por parte del animal. A nivel endocrino, se activa el eje HSC, produciendo un aumento en la liberación de catecolaminas. Estas hormonas originan un incremento en la actividad motora, el ritmo cardíaco y el flujo sanguíneo hacia los órganos fisiológicamente más activos. Aumenta también el flujo sanguíneo hacia las branquias y la tasa metabólica basal, originando un aumento de la glucosa plasmática a partir del glucógeno del hígado y la síntesis de nueva glucosa a partir de ácidos grasos libres en el tejido adiposo.

- **Fase 2: fase de resistencia**

Si el agente estresante continúa actuando, el animal intenta adaptarse disminuyendo los niveles de catecolaminas, pero activando el eje HHI, provocando la liberación de cortisol. Las acciones de este corticoide adrenal son más lentas que las de las catecolaminas, lo que permite mantener esta fase de resistencia, en donde las principales funciones, tal y como se comentó anteriormente, es la de seguir proveyendo al animal de sustratos energéticos para soportar la situación adversa generada.

- **Fase 3: fase de agotamiento**

Por último, la fase agotamiento se produce cuando el agente estresante persiste en el tiempo. El mantenimiento de los altos niveles de cortisol y la activación del metabolismo sostenida en el tiempo pueden provocar la muerte del animal, puesto que interfieren con otros procesos fisiológicos tales como el crecimiento, la pérdida de apetito e inanición, o la reproducción.

En la Figura 1, se puede apreciar la variación del nivel de resistencia en función de cada una de estas tres fases.

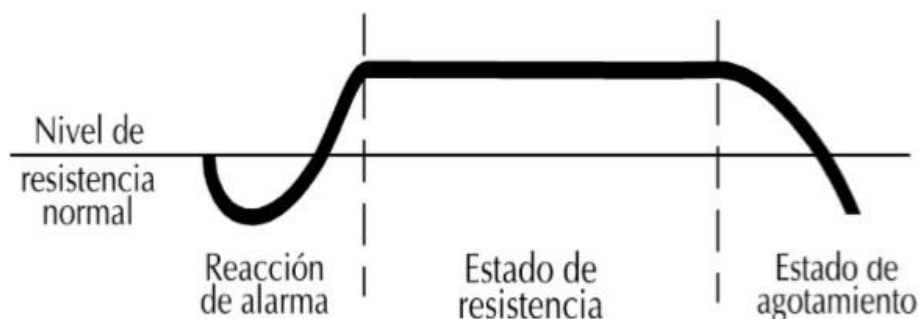


Figura 1. Fases del Síndrome de Adaptación General (Martín de los Santos, 2019).

Otro aspecto interesante sobre este proceso fisiológico es que la forma en la que los peces responden al estrés varía debido a las diferencias genéticas entre los taxones. Aun así, existen ciertos parámetros como la historia ambiental del pez o las condiciones ambientales y fisiológicas en el momento en el que actúa el agente estresante que hacen que la respuesta sea diferente entre organismos de una misma población (Schreck et al., 2016). Estas respuestas se pueden clasificar en:

- **Respuesta primaria.** Formada por la activación de los núcleos cerebrales, las células adenohipofisarias y los tejidos interrenal y cromafín, ocasionando un aumento en los niveles de catecolaminas y corticosteroides adrenales.
- **Respuesta secundaria.** Consistente en los cambios fisiológicos (aumento del consumo de oxígeno, actividad cardíaca, hiperglucemia...) producidos por las catecolaminas y el cortisol.
- **Respuesta terciaria.** Este tipo de respuesta está constituida por: inhibición del crecimiento, modificación del sistema inmune, problemas en la reproducción y pérdida de tolerancia ante nuevas situaciones de estrés.

Todos estos procesos que tienen lugar a nivel endocrino se pueden ver en la Figura 2 de manera más esquemática, formando un complejo sistema de retroalimentación negativa, es decir, produciendo la regulación de la producción o el cese en la liberación de un producto fisiológico u hormonal (en este caso el cortisol o las catecolaminas) dependiendo de las concentraciones o los requerimientos existentes por parte del organismo a niveles superiores de la cascada de producción (en este caso sobre los ejes HPI/HHI o HSC) (Martín, 2006).

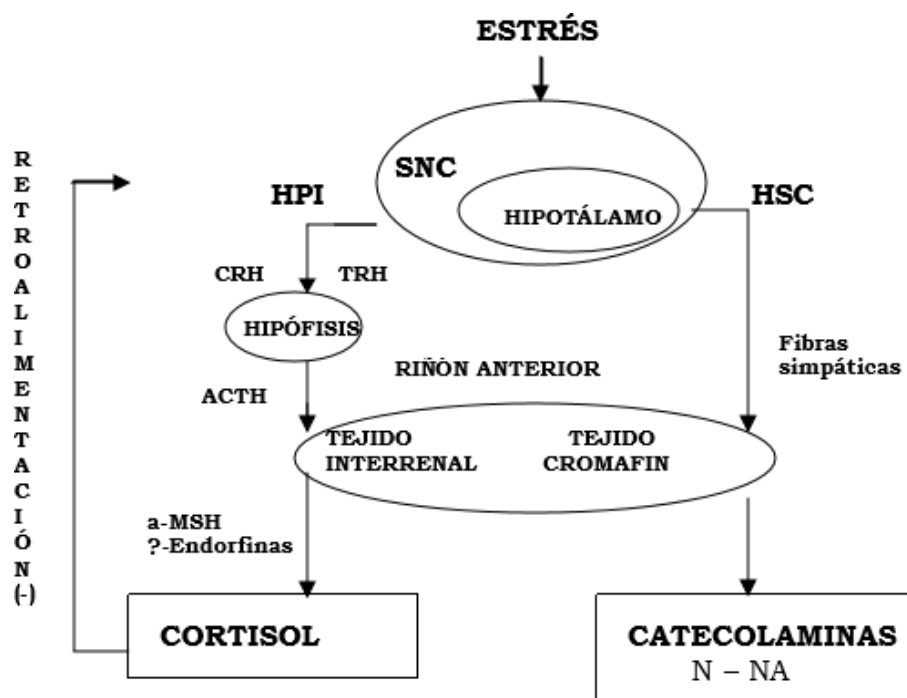


Figura 2. Esquema de la respuesta a un agente estresante (Tort, 1998).

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, se propone como **Objetivo General** del presente Trabajo de Fin de Grado el realizar una extensa revisión bibliográfica, tanto clásica como de los últimos avances realizados sobre el proceso de estrés y el bienestar animal en acuicultura.

Para la consecución del mismo, se abordarán como **Objetivos Específicos** los siguientes:

- Describir el concepto de estrés y de los procesos involucrados.
- Detallar los factores ambientales y biológicos que pueden actuar como agentes estresantes.
- Especificar los distintos métodos de diagnóstico de estrés y biomarcadores.
- Exponer el uso de anestésicos como reductores del estrés, así como el de aditivos en la dieta.
- Reseñar de forma conjunta la intervención de los diferentes órganos como sistema de respuesta al estrés en cada uno de los procesos descritos.

2. Materiales y métodos

Tal y como se ha dicho anteriormente, este Trabajo de Fin de Grado aborda una revisión bibliográfica cuyo desarrollo ha estado comprendido entre el 1 de Junio y el 1 de Septiembre de 2020.

Durante la primera etapa de este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica apropiada. La mayoría de las citas fueron extraídas de trabajos científicos obtenidos en Google académico así como de artículos científicos, trabajos de fin de grado y de máster, y de Tesis Doctorales llevadas a cabo en el Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz.

Una vez elaborado un esquema definido de los puntos que deben estar incluidos en el trabajo, se efectuó una búsqueda más detallada y específica en cuanto a avances actuales en el bienestar animal.

La tercera etapa estaría formada por una lectura crítica de toda la información adecuada recopilada para el presente trabajo.

Además, se han empleado unos criterios de inclusión a la hora de la búsqueda:

- Idioma de publicación, incluyendo publicaciones en cualquier idioma.
- Palabras clave: estrés, acuicultura, bienestar, cortisol, catecolaminas.
- Autores: Juan Miguel Mancera, Juan Antonio Martos Sitcha, Ismael Jerez-Cepa.

Por el contrario, no se empleó ningún criterio de exclusión como tal, aunque se ha intentado usar preferentemente bibliografía actualizada.

Una cuarta y última etapa consistió en el desarrollo y escritura de la memoria del presente trabajo, compaginando y sintetizando de la mejor manera posible toda la información obtenida. En primer lugar, se ha descrito en concepto de estrés así como sus procesos generales. A continuación, se han ido desarrollando los puntos incluidos en el apartado de resultados, desde lo general a lo particular. Finalmente, se ha hecho una breve discusión de los resultados y se han extraído las respectivas conclusiones.

3. Resultados y discusión

Para lograr la mejor adaptación del organismo a las condiciones de cultivo y así conseguir la mejor producción posible (pues repercute directamente en la economía), hay que controlar ciertos factores ambientales y biológicos que pueden llevar a crear situaciones de estrés. Es por eso que existe una amplia investigación detrás de los métodos de diagnóstico del estrés, así como de biomarcadores que permitan reconocer estas circunstancias para poder evitarlas. Actualmente se están llevando a cabo numerosos experimentos en el marco de diferentes Proyectos de Investigación Nacionales e Internacionales para atenuar estas situaciones mediante, como por ejemplo el uso de anestésicos o aditivos en la dieta.

3.1. Factores ambientales y biológicos

La acuicultura intensiva implica el cultivo de grandes poblaciones de organismos en espacios limitados. Por ello es sumamente importante estudiar cómo afectan las altas densidades de cultivo de los peces, pues pueden tener consecuencias en las tasas de crecimiento, en los índices de fertilidad así como en la susceptibilidad a enfermedades, todo ello provocado no solo por las interacciones sociales entre los organismos, sino también por el deterioro de la calidad del agua de cultivo (Auró y Ocampo, 1999).

Así, procesos tales como derrames de sustancias químicas, cambios radicales en la concentración de oxígeno disuelto o variaciones en la temperatura, producen un estado de estrés agudo o letal. Sin embargo, es más común el estrés crónico o subletal, que aparece como resultado a exposiciones continuas o periódicas a bajos niveles de agentes estresantes. Este último tipo de estrés, a su vez, puede dividirse en función de si los efectos adversos son directos o indirectos:

- Se consideran efectos directos aquellos que son generalmente de tipo metabólico en su amplio contexto, y que afectan a los componentes funcionales de las células como es el caso de enzimas y membranas. Además, se incluyen aquellos que alteran funciones tales como la respiración, la circulación, la osmorregulación, la respuesta inmune y la regulación hormonal (Larsson, 1985).
- Por otro lado, se describen como efectos indirectos las modificaciones en actividades conductuales como son la reproducción, la capacidad de competencia o el cese de la alimentación (Reynolds, 1980).

El manejo, los cambios en la calidad del agua y el hacinamiento¹ son algunos de los factores ambientales que producen dichos períodos de estrés ambiental, causantes de lesiones en peces.

Este estrés ambiental puede ser dividido en:

- **Estrés social.** La densidad de cultivo en los tanques es uno de los parámetros más importantes que hay que tener en cuenta a la hora de trabajar, pues si es demasiado alta supone una clara fuente de estrés para los organismos por las interacciones sociales, además de por la dificultad de mantener una calidad de agua óptima, mientras que si es demasiado baja este hecho repercutirá negativamente en el beneficio económico, o incluso la activación del proceso de estrés en especies de un comportamiento más gregario (Millán-Cubillo et al., 2016). Se puede pensar que el estrés por esta sobrepoblación se puede eliminar si se alimenta a los peces artificialmente, recibiendo todos y cada uno de ellos su ración, y evitando así la agresividad. Pero se ha comprobado que esto no es del todo cierto, como ocurre en el caso de la tilapia (*Oreochromis sp.*), que es una especie agresiva de naturaleza, y no por causas de sobrepoblación. Otros investigadores apuntan que las anguilas también desarrollan patrones de comportamiento agresivo (Auró y Ocampo, 1999). En un bioensayo llevado a cabo por Peters et al. (1980), se confinaron durante 10 días a dicha especie, demostrándose que se establece una jerarquía en la que los peces dominantes, en comparación con los peces subordinados, manifiestan menos cambios en la cuenta total de leucocitos, en el tamaño y estructura del tejido interrenal, en la concentración del cortisol plasmático y en la imagen del epitelio lamelar. Cambios degenerativos en los tejidos del tracto gastrointestinal y vejigas natatorias anormalmente grandes son otros de los cambios que se han visto en anguilas y salmones al mantenerlos a altas densidades (Hopley et al., 1993).

- **Estrés físico.** El efecto que tiene la temperatura en los peces cuando ésta se encuentra por encima o por debajo del rango de seguridad también es muy estudiado, puesto que afecta directamente al metabolismo de los peces. Cuando la tasa metabólica aumenta, también lo hace la demanda energética, lo que hace que el animal consuma una mayor cantidad de alimento provocando un aumento también en la tasa de crecimiento. Aun

¹ Aglomeración en un mismo lugar de un número de personas o animales que se considera excesivo. (WordReference)

así, existe un límite superior en el que esta tasa de crecimiento comienza a disminuir debido a que el organismo emplea la energía para satisfacer las necesidades del metabolismo acelerado en lugar de para el crecimiento (Martín de los Santos, 2017). Además, afecta a la solubilidad de los gases en el agua, particularmente a la del oxígeno. Un aumento de la temperatura produce una disminución del oxígeno disuelto en el agua, haciendo que este sea un factor limitante. Este fenómeno ha sido investigado en especies como la tilapia, algunos cyprinodóntidos², la perca (*Perca fluviatilis*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), exponiéndolas a temperaturas entre 30°C y 45°C. Como resultado, se observó el deterioro y disminución de la superficie del epitelio lamelar de las branquias y el colapso de las células pilares. Además, se vio una esteatosis en el hígado y cambios autolíticos en el páncreas, así como cambios degenerativos en las células tubulares renales (Davis y Parker, 1990). En el caso contrario, es decir, las condiciones de bajas temperaturas, se desencadena el estrés por frío, en donde las tasas metabólicas se deprimen hasta tal punto que los organismos cesan su alimentación y entran en un estado de pseudo-hibernación. Este fenómeno ha sido investigado en tilapias, con efectos negativos manifestados en una contracción del epitelio lamelar (Tilney y Hocutt, 1987).

Otra de las causas de este tipo de estrés es la acidificación del agua, bien producida por una disminución del oxígeno, y con ello un aumento del dióxido de carbono, o bien por la presencia de una alta cantidad de materia orgánica (Auró y Ocampo, 1999).

- **Estrés químico.** Este tipo de estrés puede ser producido por contaminantes exógenos o endógenos. Los principales contaminantes exógenos son los xenobióticos, estando también incluidos los metales pesados. Aunque tienden a estar presentes en embalses naturales, el agua que llega a los estanques en la acuicultura intensiva puede contener contaminantes químicos que producen cambios bioquímicos y estructurales, desencadenando importantes patologías y disrupciones endocrinas (Auró y Ocampo, 1999; Gilannejad et al., 2016). Por su parte, entre los contaminantes endógenos más estudiados se encuentra el amonio. Su toxicidad viene determinada por la cantidad de amonio no ionizado (NH_3 , NH_4OH) más que por la forma ionizada (NH_4^+), en donde el grado de disociación está controlado básicamente por la temperatura y el pH del agua.

² Familia de peces actinoptergios, denominados comúnmente cachorritos. La etimología del nombre deriva del griego “kyprinos” o carpa y “odontos” o diente, por lo que se podría hablar del grupo como el de las “carpas con dientes”.

Las patologías que se observan al exponer a los peces a este estrés crónico por amonio son: hiperplasia del epitelio branquial, así como cambios degenerativos y hemorragia en el hígado (Córdova, Auró y de Buén, 1996). Además, en un estudio realizado a tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) sometíéndolas a diferentes concentraciones de amonio en acuarios, se demostró que la ganancia de peso está negativamente relacionada con las concentraciones de dicho compuesto. Así pues, se observó que los niveles de la hormona de crecimiento disminuye de forma significativa cuando la concentración de amonio aumenta. Además de las patologías nombradas, las tilapias mostraron otros signos al ser expuestas al amonio tales como desequilibrio, movimientos rápidos, convulsiones, natación en espiral u oscurecimiento de la piel (El-shelby y M.Gad, 2011).

- **Estrés traumático.** La presencia de elementos físicos peligrosos o el canibalismo dentro de los tanques son las principales causas de lesiones traumáticas. Es importante tener un buen control de estos procesos, puesto que estas lesiones constituyen la principal vía de entrada a infecciones bacterianas, víricas o micóticas (Auró y Ocampo, 1999).

- **Estrés nutricional.** El principal problema que se da en los sistemas de cultivo intensivo es la degradación o pérdida de nutrientes o vitaminas en el alimento debido a su mal manejo. Esto deriva en patologías muy específicas: enfermedad nutricional de las branquias, pansteatitis³ de la trucha como consecuencia de la formulación de alimentos con ácidos grasos no saturados, de origen íctico o deficiencia de vitamina E (Peters y Hong, 1985), lesiones hepáticas, en las branquias y miopatía nutricional en el salmón del Atlántico (Auró y Ocampo, 1999) o alteraciones en la visión y degeneraciones de la retina por falta de vitamina A (Martín de los Santos, 2017). Sin embargo, los instrumentos de diagnóstico tales como la hematología clínica o la bioquímica básica, aunque han sido probados experimentalmente, están mal establecidos en la práctica debido a la falta de información fiable sobre valores de referencia de dichos instrumentos. Por ejemplo, hay pruebas de que los electrolitos en circulación, los metabolitos y las hormonas dan información acerca del deterioro del crecimiento, el rendimiento o la condición de estrés, pero hay muchos defectos en lo

³ Inflamación del tejido adiposo

que a biomarcadores clínicos se refiere. Es por eso que se están realizando experimentos donde se intenta reducir al máximo el contenido en las dietas de harina y aceite de pescado, sin comprometer el estado fisiológico de los animales. De igual forma, existen pruebas de signos clínicos para la puntuación histopatológica de tejidos objetivo como los de hígado e intestino, pero no existe un vínculo directo a un nutriente específico. De esta forma, se trabaja en la búsqueda de una referencia fiable que aporte información acerca de las deficiencias nutricionales. En un estudio llevado a cabo por Ballester-Lozano et al. (2015), se formularon siete dietas isoproteicas e isolípídicas semipurificadas con el objetivo de evaluar deficiencias nutricionales en aminoácidos de azufre (SAA), PUFAS de cadena larga (n-3 LC-PUFA), fosfolípidos (PL), P, minerales (Min) y vitaminas (Vit), además de una dieta de control la cual contenía todos estos nutrientes esenciales en cantidades adecuadas. Así, los resultados obtenidos contribuyen para definir el rango normal de variación de marcadores biométricos, bioquímicos, hematológicos e histoquímicos que son de gran utilidad para evaluar el estrés nutricional.

- **Estrés oxidativo.** Este tipo de estrés se genera por un exceso en la producción de radicales libres, dando lugar a un deterioro de las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Estos radicales libres se producen en el organismo debido a fuentes de estrés externas, factores ambientales y exposición a agentes contaminantes como los xenobióticos, produciendo importantes daños celulares (Ochoa y González, 2008).

3.2. Diagnóstico del estrés en peces y biomarcadores

Uno de los grandes problemas presentes en el cultivo intensivo es la dificultad de identificar si los organismos se encuentran sometidos a situaciones de estrés. Para ello, existen diversos métodos de diagnóstico así como biomarcadores. Ambos, constituyen una de las líneas de investigación más actuales.

3.2.1. Métodos de diagnóstico del estrés

Según Adams (1992), “los medios más comunes de identificar o medir los efectos directos del estrés en el pez son los métodos bioquímicos moleculares, los bioquímicos

hormonales, los métodos fisiológicos computarizados no invasivos y los histopatológicos”.

3.2.1.1. Metodología bioquímica molecular

a. Medición de aductores estables de ADN con metabolitos de benzo(a)pireno (BaP) y otros xenobióticos

En los peces, una gran variedad de xenobióticos experimentan una biotransformación. Entre ellos, se encuentra un hidrocarburo aromático policíclico, denominado BaP. Tras una serie de procesos y transformaciones, estos BaP pasan a transdihidrodiolos, algunos de los cuales son carcinógenos (Stegeman et al., 1984). Es por ello que la existencia de pequeñas porciones de estos BaP transdihidrodiolos pueden unirse al ADN y a otras macromoléculas en la célula para formar aductores, y así ejercer presumiblemente su efecto carcinógeno (Auró y Ocampo, 1999). Además, pueden causar rupturas en la cadena simple del ADN, dañándolo. De esta forma, detectar mínimas cantidades de estos aductores de ADN, proporciona gran información sobre el estado homeostático de los animales.

b. Medición de receptores de hormonas esteroideas

Otra de las formas de medir estrés, en este caso de forma indirecta, es a través de estudios de competencia con receptores de estrógenos. Los xenobióticos ya mencionados anteriormente, también pueden unirse a proteínas en lugares tales como receptores de hormonas esteroides, interfiriendo con las acciones moleculares de los estrógenos en los peces teleósteos (Auró y Ocampo, 1999).

c. Medición de metalothioneinas

Las metalothioneinas son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteínas, que se unen a los metales pesados (Auró y Ocampo, 1999). Estas se sintetizan en los tejidos hepático, renal y branquial cuando los peces están expuestos a dichos metales pesados tales como cadmio, cobre, zinc o mercurio. Su detección se realiza mediante cromatografía de gelpermeación a pH de 7.4, que muestra un cromatograma de las fracciones citosólicas del hígado que ha sido expuesto a metales pesados (Auró y Ocampo, 1999). Es por esto, que son un buen indicador biológico específico de la contaminación por dichos metales, la cual es una de las principales causas de estrés, tal

y como ha sido puesto de manifiesto en la detección de Cadmio en ejemplares del carpín dorado (*Carassius auratus*) (Carpené et al., 1992).

d. Medición de la peroxidación lipídica

Se trata de un proceso químico resultante del deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados en membranas biológicas (Auró y Ocampo, 1999). Además, es uno de los principales mecanismos de lesión a la célula por xenobióticos (Recknagel y Glende, 1977). Como índice de peroxidación lipídica se mide colorimétricamente la producción de malondialdehído.

3.2.1.2. Metodología bioquímica hormonal

Esta metodología está basada en la medición de respuestas endocrinas secundarias al estrés, como la hipersecreción de catecolaminas o niveles de cortisol plasmático, propiomelanocortina y concentración de glucosa plasmática (Auró y Ocampo, 1999).

A continuación, se expondrán casos concretos de experimentos llevados a cabo bajo diferentes condiciones para aumentar los conocimientos acerca de dichas respuestas secundarias al estrés de los peces. La gran mayoría de estos estudios se han realizado en la dorada (*Sparus aurata*)

Skrzynska et al. (2018a), estudiaron el impacto que tiene la exposición al aire durante tres minutos de la dorada en los sistemas vasotocinérgicos e isotocinérgicos además de investigar la respuesta transcriptómica de distintos factores endocrinos tales como la hormona liberadora de la corticotropina (Crh), la proteína de unión a dicha hormona (Crhbp), la propiomelanocortina (Pomc) o la hormona liberadora de tirotrópina (Trh), de neuropéptidos tales como la arginina vasotocina (Avt) y la isotocina (It) y sus receptores específicos en cuatro tejidos diana como son el hipotálamo, la hipófisis, el riñón y el hígado. Como resultado, se observa que la exposición a este tipo de estrés agudo, estimula los ejes HPI y HSC, produciendo una activación de la respuesta transcriptómica de los factores endocrinos ya nombrados, además de potenciar la síntesis de catecolaminas y cortisol, estimulando el metabolismo hepático. También se contempló el importante papel que tienen los sistemas vasotocinérgicos e isotocinérgicos en los cambios fisiológicos que se producen.

Por su parte, Cádiz et al. (2015) estudiaron las respuestas de dichos sistemas vasotocinérgico e isotocinérgico tras exponer a la dorada a estrés crónico por la administración de cortisol, observando la existencia de una posible interacción entre ambos al analizar los niveles de Avt e It así como los niveles de ARNm en varios órganos diana asociados a distintos procesos fisiológicos.

Por último, se llevó a cabo otro experimento para ver la influencia que tenía la exposición durante 21 días a estrés crónico producido por la privación de alimentos y la alta densidad de población en las vías vasotocinérgicas e isotocinérgicas. Transcurrido este período de tiempo se tomaron muestras de plasma, hígado, hipotálamo, pituitaria y riñón. Se visualizó un aumento de los niveles de cortisol como consecuencia de esta situación estresante. Además, se observaron cambios en los metabolitos plasmáticos y hepáticos, lo que supone un ajuste metabólico para contrarrestar la demanda de energía ocasionada por dichos factores estresantes (Skrzynska et al., 2018b).

3.2.1.3. Método fisiológico computarizado no invasivo

Este tipo de metodología más clásica suele ser más útil para la medición de los efectos del estrés agudo, y está basado en la detección de las variaciones de los signos eléctricos de un pez, de forma individual, cuando éste se mantiene conectado a sensores en una cámara. Así, los signos eléctricos atribuidos al movimiento ventilatorio, actividad muscular y locomoción, se amplifican y procesan en un ordenador que compara estos resultados con los niveles de glucosa plasmática (Shezifi et al., 1993). Además, recientemente se han realizado avances en este sentido mediante la utilización de acelerómetros similares a los existentes en dispositivos móviles (teléfonos, relojes inteligentes, medidores de constantes y movimiento en deportistas, etc) que son capaces de monitorizar el estado fisiológico de los peces. Un ejemplo de ello es el dispositivo FishBIT desarrollado en los últimos años, el cual va anclado al opérculo del pez para la medición simultánea de la actividad física y la frecuencia respiratoria, tanto en animales sometidos a un esfuerzo físico (cámaras de natación) como en ejemplares mantenidos en tanques bajo condiciones normales de producción (Martos-Sitcha et al., 2019; Ferrer et al., 2020).

3.2.1.4. Medición de parámetros reproductivos

Este tipo de estudios están enfocados a medir los parámetros reproductivos, pues son los reproductores los que pasan más tiempo en cautiverio en el caso de la acuicultura intensiva, y cualquier fuente de estrés puede dar lugar a consecuencias perjudiciales en cuanto a la perpetuación de la especie. Algunos de los parámetros medidos son: número y viabilidad de huevos, alevines y crías y calidad de la progenie.

3.2.1.5. Metodología histopatológica

Los efectos del estrés en los peces se detectan gracias a la existencia de indicadores histopatológicos integrativos. Los cambios histopatológicos permiten identificar los órganos, células y organelos diana que han sido afectados *in vivo* (Auró y Ocampo, 1999). La cuantificación del peso de las glándulas interrenales y la medición de las células corticales de la glándula interrenal y de los núcleos de dichas células son dos de los métodos más utilizados, ya que son variables cuantitativas que permiten diferenciar de forma fácil un organismo que presenta estrés del que no. Existe un tercer método, poco utilizado, en el que se estudia la presencia de células de Rodlet⁴, aunque hay que tener en cuenta que la mayor parte de estas técnicas requieren del sacrificio del animal como método de diagnóstico, siendo no predictivo.

3.2.2. Biomarcadores.

Tal y como apunta Sarasquete (2012), un biomarcador o bioindicador es “un organismo o conjunto de ellos (animal, vegetal...), con capacidad de responder a la variación de los diversos factores bióticos o abióticos de un ecosistema, de tal manera que dicha respuesta queda reflejada en el cambio de valor de una o más variables, y de cualquier nivel de organismo, población, comunidad o ecosistema”. Los parásitos son considerados buenos biomarcadores de estrés ambiental, concretamente de contaminación crónica o accidental, por la gran variedad de respuestas frente a distintas actividades humanas y por tener ciclos vitales complejos, lo que da una idea global de la situación en la que se encuentra el ecosistema.

⁴ Estructuras muy características que se han observado en el epitelio de las branquias, en el epitelio de los túbulos renales, en endotelios vasculares, en el epitelio del tracto gastrointestinal e incluso dentro de los vasos sanguíneos, son ligeramente PAS positivas y se han observado en varias especies de teleosteos asociadas a un efecto de estrés. (Auró y Ocampo, 1999)

Una de las líneas actuales de investigación en la que se está trabajando es en la búsqueda de biomarcadores en especies de pulpo, en concreto en *Eledone moschata*, *Eledone cirrhosa* y *Octopus vulgaris*, puesto que son especies con un gran potencial para la diversificación de la acuicultura mundial. El inconveniente es que existe una falta de conocimientos sobre las respuestas al estrés de estos organismos, lo que frena su desarrollo en todo el mundo (Barragán-Méndez et al., 2019). Otro ejemplo es el caso de *Anadara tuberculosa* (la concha negra), especie emblemática del ecosistema de manglar que se encuentra en estado vulnerable. Por esta razón, es interesante el desarrollo de su acuicultura, y por ello se están buscando biomarcadores asociados al estrés por salinidad a nivel genético, en este caso concreto asociados a péptidos (Mendoza et al., 2017).

En este sentido, la búsqueda de biomarcadores que pongan de manifiesto diversas fuentes de estrés en acuicultura, la detección precoz de estas situaciones adversas durante el proceso completo de cultivo, así como la posibilidad de testar e identificar la validez de nuevos avances en el sistema de cría (a nivel nutricional, ambiental, o social en nuevas especies) de forma temprana en los primeros estadios o instantes de testado (biomarcadores tempranos), son un reto de suma importancia en el escenario global de este sistema de producción.

3.3. Atenuación del estrés

Tal y como se ha ido comentando a lo largo del trabajo, la acuicultura es una técnica en la que la prioridad es la producción de organismos garantizando el bienestar de los mismos para así poder lograr, de forma indirecta, un mayor beneficio económico de los productores. Por esta razón, se han de controlar situaciones tales como el manejo de los ejemplares, una densidad de cultivo inapropiada o el transporte entre instalaciones que, al producirse de manera reiterada o mantenerse en el tiempo, den lugar a un estado de estrés (Jerez-Cepa et al., 2019b)

De esta forma, en la actualidad se trabaja incesantemente en la atenuación del estrés mediante el uso de anestésicos y de aditivos en la dieta.

3.3.1. Anestésicos.

Se ha demostrado que el empleo de anestésicos es de gran utilidad para tener bajo control las situaciones estresantes ya mencionadas, aunque pueden generar respuestas

fisiológicas secundarias alterando el estado homeostático de los organismos, y condicionando la propia respuesta al estrés (Jerez-Cepa et al., 2019b).

El concepto de anestesia involucra distintos sub-conceptos como sedación, pérdida de movilidad, amnesia, inconsciencia y analgesia. Por un lado, la sedación implica una disminución de la sensibilidad haciendo que el organismo se tranquilice. Sin embargo, la anestesia o narcosis provoca inconsciencia, amnesia, inmovilización y analgesia (Zahl et al., 2012). De esta forma, un anestésico se puede definir como “una sustancia o compuesto químico que actúa sobre el sistema nervioso y que induce un estado de analgesia, anestesia o ambos” (Jerez-Cepa et al., 2019b), y el estado alcanzado en este proceso va a depender, entre otros, de la naturaleza y del tiempo de exposición del agente utilizado. Para su aplicación, estos compuestos se pueden inyectar o aplicar de manera tópica en zonas locales, pero el método más usado en acuicultura es la absorción a través de las branquias por medio de baños con anestésicos (Neiffer y Stamper, 2009).

El paso entre sedación y anestesia se produce de manera secuencial como se puede apreciar en la Tabla 1:

Tabla 1. Descripción de los diferentes estados de inducción a la sedación y anestesia frente a la exposición a un anestésico (Jerez-Cepa et al., 2019b).

| Estado de Inducción | Descripción |
|-----------------------------|---|
| Sedación ligera | Pérdida parcial de la movilidad, respuesta activa ante estímulos |
| Sedación profunda | Movimientos erráticos, ventilación disminuida, respuesta a estímulos reducida |
| Anestesia ligera | Pérdida parcial de equilibrio, analgesia |
| Anestesia profunda | Pérdida total del equilibrio, no reacciona a estímulos contundentes (presión de la zona caudal), ventilación casi cesada por completo |
| Anestesia quirúrgica | Pérdida total de reacción a estímulos, incluidos los de máxima severidad |
| Colapso medular | Cese de la ventilación, paro cardíaco, posible muerte por sobredosis |

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la normativa que rige el uso de anestésicos, pues es bastante restrictiva cuando las especies cultivadas son para el consumo humano. También lo es cuando se aplican para el transporte entre instalaciones. En la Unión Europea, su utilización está limitada a la prescripción

veterinaria en casos de necesidad, tal como indica el Reglamento No. 1/2005 del Consejo Europeo, del 22 de diciembre de 2004. “Los estándares establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el transporte de animales acuáticos se centran en las características del manejo y la calidad del agua, pero la sedación no está considerada una opción para mejorar el bienestar de los peces”. En cambio, este aspecto está siendo revisado en varios trabajos, y se considera que durante el transporte una sedación ligera puede aportar beneficios como la reducción de la tasa metabólica, disminuyendo así el consumo de oxígeno y la excreción de desechos metabólicos, por lo que la calidad del agua se conserva (Sneddon et al., 2016).

3.3.1.1. Anestésicos comunes.

Los compuestos más usados y testados en condiciones de laboratorio para un gran número de especies de cultivo son los siguientes: triclaína metanosulfonato (MS-222), aceite de clavo, AQUI-S, isoeugenol, 2-fenoxietanol, etomidato, metomidato, benzocaína, quinaldina y ketamida (Zahl et al., 2012).

Como ya se ha enunciado antes, la aplicación de estos anestésicos está bastante regulada. Además, es necesario considerar el período legal de espera, es decir, el tiempo que tiene que transcurrir desde que se administra el anestésico al organismo hasta que éste puede ser comercializado para asegurar que los productos suministrados han sido correctamente metabolizados y excretados.

En la Tabla 2, se ha hecho una breve clasificación de algunos anestésicos en función del país en el que se permite su uso para especies de consumo humano, así como del período legal de espera. El resto de anestésicos anteriormente nombrados (aceite de clavo, 2-fenoxietanol, metomidato, quinaldina y ketamida) no están permitidos para uso de consumo humano, solamente para investigación.

Tabla 2. Clasificación de anestésicos según la localización y el período legal de espera. Para los casos en los que aparece un guión (-), no se ha encontrado información.

| <u>Anestésico</u> | <u>Localización</u> | <u>Período legal de espera</u> |
|------------------------------|--|---------------------------------------|
| MS-222 | Estados Unidos, Unión Europea | 21 días |
| Benzocaína | Unión Europea | - |
| Isoeugenol | Unión Europea | 24 horas |
| AQUÍ-S | Australia, Chile, Corea, Costa Rica, Honduras, Noruega y Nueva Zelanda | - |
| Etomidato (Propiscín) | En desarrollo, pero carente de aprobación para su uso | |

A la hora de elegir un anestésico no sólo hay que tener en cuenta ciertos parámetros como la disponibilidad, el costo, la facilidad de uso o la seguridad del usuario. Es fundamental determinar la eficiencia y el nivel de toxicidad; es decir, la adecuación para cada especie, ya que cada uno de los compuestos puede presentar variaciones especie-específicas.

A continuación, se exponen cuatro ejemplos en los que se ha estudiado el efecto de varios anestésicos en distintas especies.

Un primer estudio, evalúa la eficacia del 2-fenoxietanol y su potencial capacidad antiestrés en juveniles de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Para ello, se administró una dosis de 500 y 600 mg/l (siendo la dosis efectiva de este agente de 200 a 666 mg/l) para determinar las características de los distintos estadios de inducción y recuperación de la anestesia. Se comprobó que con estas dosis, los individuos fueron capaces de inducir el estadio II de anestesia (correspondiente a la anestesia profunda mencionada en la Tabla 1) en menos de 5 minutos y de recuperarse en un período menor a 8 minutos. Así, se concluyó que el 2-fenoxietanol es efectivo para atenuar un estrés causado por la manipulación (Weber et al., 2007).

Como segundo ejemplo se encuentra el estudio de la eficiencia anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y MS-222 en alevines y juveniles de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Al igual que en el estudio anterior, se evaluó la duración de la inducción y recuperación, añadiendo la frecuencia opercular y la supervivencia post-anestesia tras ser expuestos a estos anestésicos. Se detectaron

diferencias en el tiempo de inducción entre alevines y juveniles en función del anestésico y de la concentración. Sin embargo, no se observaron variaciones de la frecuencia opercular ni mortalidad durante o después de ser expuestos a dichos anestésicos. Así, se concluyó que para procedimientos cortos el 2-fenoxietanol es el que mejor funciona para los alevines, mientras que el MS-222 es el más eficaz en los juveniles, aunque para situaciones en las que la exposición a la anestesia sea prolongada se debería recurrir a altas concentraciones de benzocaína (Velasco et al., 2008).

Un tercer ejemplo es el experimento realizado con ejemplares de dorada (*S. aurata*), exponiéndolas a dosis de sedación óptimas de cuatro anestésicos diferentes: MS-222, aceite de clavo, AQUÍ-S y etomidato. Así, se obtuvieron los tiempos de inducción y recuperación con el objetivo de estudiar las respuestas al estrés de estos organismos como consecuencia del transporte. Los resultados no fueron favorables puesto que el uso de estas sustancias no mejoró las respuestas al estrés generado por el transporte. Además, las dosis empleadas dieron lugar a respuestas fisiológicas secundarias en los juveniles, afectando a la regulación del sistema HHI, al metabolismo intermediario y a la capacidad osmorreguladora de los peces. Lo que sí se determinó fue el orden de efectividad de estos cuatro anestésicos en la dorada, siendo el más efectivo el etomidato, seguido del MS-222. Sin embargo, en lo referente al tiempo de inducción, el MS-222 y el AQUÍ-S serían los mejores cuando los procesos de manejo requieran anestesia profunda, siendo completamente desaconsejable el uso de etomidato en estos casos (Jerez-Cepa et al., 2019b).

En cuarto y último lugar, se expone un estudio realizado también con doradas, para investigar los efectos que tienen el aceite de clavo y el MS-222 en diversos aspectos en relación con el estrés oxidativo. Tras ser expuestos a baños con estos anestésicos, se evaluaron las variaciones en los niveles de expresión de varios genes diana relacionados con la respuesta antioxidante y la reparación del tejido celular de las branquias, el hígado y el cerebro (Teles et al., 2019). Finalmente, se determinó que el empleo de estos anestésicos reduce los efectos del estrés producidos por el transporte, pero a largo plazo puede originar efectos en el estado inmunitario de los peces. Aun así, este estudio representa un importante avance para la acuicultura, ya que el estrés oxidativo puede aumentar la susceptibilidad a diferentes situaciones de estrés ambiental y frente a distintas patologías (Teles et al., 2019).

3.3.1.2. Aceites esenciales

Una de las corrientes de trabajo actuales es la búsqueda de aceites esenciales (EO) a partir de extractos naturales de plantas aromáticas, puesto que presentan varias propiedades como anestésicas, antioxidantes y antimicrobianas que han manifestado reducir las alteraciones bioquímicas y endocrinas y, por tanto, incrementar el bienestar animal de ejemplares cultivados. Recientes estudios demuestran que estos EO presentan compuestos biogénicos aislados que tienen increíbles actividades biológicas. Además, su forma nanoencapsulada puede reforzar sus efectos (Souza et al., 2019).

Los EO se definen como “compuestos naturales multicomponentes de sustancias volátiles, lipofílicas, odoríferas y líquidas, obtenidos a partir de materias primas vegetales” (Edris, 2007). Están formados por entre 20 y 200 componentes que en función de su concentración, se denominan i) componentes principales, ii) componentes secundarios y iii) componentes traza. Otros autores, como Morais (2009), describe los EO como “mezclas complejas de sustancias de bajo peso molecular”. Así, los EO son sustancias lipofílicas y liposolubles, lo que favorece la dispersión a través de las membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central (Zahl et al., 2012), facilitando su entrada en las células para ejercer la función fisiológica necesaria. Su principal modo de acción es la regulación del complejo de receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABA), siendo este el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central.

Como se ha dicho anteriormente, uno de los inconvenientes de los compuestos sintéticos como los anestésicos comunes ya nombrados, es que pueden originar efectos secundarios no deseados. Por el contrario, se ha visto que estos aceites esenciales producen menos efectos adicionales, pero para que sean eficaces en la reducción de estrés se ha de controlar la composición química, la concentración y el quimiotipo utilizado. Por tanto, es importante determinar cómo actúa cada uno de los aceites esenciales en cada una de las especies para encontrar el rango de concentración ideal, así como la forma en que han de ser administrados para obtener la actividad biológica que se desea (Souza et al., 2019).

Algunos de los efectos estudiados de los EO son: actuar como anestésicos y/o sedantes, disminuir los niveles de cortisol en el plasma, atenuar las respuestas al estrés, o prevenir el estrés oxidativo, entre otros.

A continuación, se exponen un par de ejemplos concretos de estudios que se han realizado con EO:

- En ejemplares de bagre negro (*Rhamdia quelen*) anestesiados con el EO de *Lippia alba*⁵ se observó la represión del incremento de cortisol en el plasma cuando estos organismos se expusieron al aire por manejo (Cunha et al., 2010).
- Este mismo compuesto, fue empleado en juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*) con la finalidad de obtener los tiempos de inducción y recuperación de sedación y anestesia, así como para ver las variaciones fisiológicas que experimentan los animales al ser sometidos a un transporte simulado durante 3 y 6 horas. A la vista de los resultados, se concluyó que este EO disminuía los tiempos de inducción y recuperación, pero en lo que al transporte respecta, la concentración de dicho aceite solamente atenuó el estrés por transporte durante las primeras 3 horas. Sin embargo, tras 6 horas se pierde su efectividad, pudiendo ocasionar un estrés adicional (Maestro et al., 2015).

3.3.2. Aditivos a la dieta.

El empleo de aditivos en la alimentación es una de las estrategias terapéuticas que se están llevando a cabo para atenuar las respuestas del estrés, ya que la entrada de compuestos beneficiosos añadidos a través de la comida, además de los propios de las materias primas con los que se elaboran, permiten aumentar diferentes capacidades fisiológicas, como la resistencia frente a enfermedades.

Los aditivos “son elementos, nutritivos o no nutritivos, que se incluyen solos o combinados, en pequeñas cantidades en la dieta de los peces con diferentes propósitos” (Bai et al., 2015). Algunos investigadores trabajan en la introducción en la dieta de compuestos sintéticos como vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos y lípidos, nucleótidos, minerales y prebióticos, aumentando así la ingesta de muchos de ellos que son muy importantes para las funciones celulares pero que en las materias primas se encuentran a niveles traza (Herrera et al., 2019). Por su parte, otros buscan la inclusión

⁵ Especie perteneciente a la familia de las verbenáceas

de extractos naturales de organismos vegetales de origen marino y terrestre como por ejemplo hidrolizados de microalgas (Jerez-Cepa et al., 2019b). Se ha demostrado que estos últimos, al igual que diferentes extractos de macroalgas, son efectivos para favorecer el crecimiento, optimizar la absorción de nutrientes, la morfología de las microvellosidades intestinales o el aguante a la hipoxia aguda (Magnoni et al., 2017). Otra forma de atenuar el estrés provocado por altas densidades es la utilización de aceites esenciales de plantas aromáticas terrestres incluidas en la formulación de piensos, pues tienen propiedades sedantes (Souza et al., 2019). Por último, actualmente también se está trabajando en la comercialización de preparados de extractos naturales para su inclusión en los piensos, lo que sin duda dará un valor añadido a los productos de la acuicultura tanto desde una perspectiva de bienestar animal durante el cultivo, como a nivel del consumo de ejemplares con un valor nutritivo añadido (Jerez-Cepa et al., 2019b).

Como caso concreto, podemos nombrar el experimento llevado a cabo con ejemplares de lenguado senegalés (*S. senegalensis*) alimentados con dietas suplementadas con una concentración final de triptófano de dos o cuatro veces el nivel de exigencia, así como una dieta de control sin suplementación durante 38 días bajo condiciones de altas y bajas densidades de cultivo (Azeredo et al., 2019). A la vista de los resultados obtenidos, los autores observaron que la producción de cortisol inducida por el estrés podría estar contrarrestada por los altos niveles de triptófano, lo que permitió disminuir la susceptibilidad de los lenguados frente a enfermedades inducidas por el estrés. Además, este mismo modelo experimental ha mostrado resultados similares en la trucha arco iris (Lepage et al., 2002), demostrando así la importancia y efectividad de este aminoácido en la dieta de las especies de cultivo.

También se ha realizado otro estudio en el que se emplean este y otros tipos de aminoácidos para mejorar la resistencia al estrés. En esta ocasión, la investigación estaba enfocada en la adición de triptófano en el cultivo la corvina (*Argyrosomus regius*), una nueva especie en acuicultura muy importante en el sur de Europa, para evaluar los efectos que tenían dos tipos de factores estresantes de la manipulación, tales como la exposición al aire y el confinamiento. Así, los ejemplares se alimentaron durante 7 días mediante dos dietas, i) una dieta comercial con un suplemento de 1% de triptófano, y ii) la misma dieta pero sin ese suplemento. Los resultados apuntan a que

esta adición del 1% de triptófano en la dieta puede ayudar a optimizar la tolerancia y/o aliviar la respuesta aguda al manejo, por lo que se considera una buena estrategia nutricional (Asencio-Alcudia et al., 2019).

En último lugar, en un estudio reciente se han analizado los efectos que tiene un preparado natural comercial en juveniles de dorada (*S. aurata*) mantenidos en altas densidades de cultivo durante tres meses. Este compuesto actúa como ansiolítico, reduciendo la agresividad que lleva consigo la jerarquización, previniendo así las posibles situaciones adversas ante un estrés agudo o crónico (Jerez-Cepa, 2019a). Según afirman los autores, los principios activos de este compuesto bloquean las señales nerviosas del estrés, y con ello la síntesis de cortisol. Como resultado, se observó una mejora en el crecimiento y el gasto energético de los ejemplares, y por tanto se concluyó que este aditivo presenta efectividad en la dorada para la atenuación de las respuestas del estrés originadas por una alta densidad (Jerez-Cepa et al., 2019b).

4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en la extensa revisión bibliográfica realizada, se puede concluir lo siguiente:

- Tal y como se ha descrito en la introducción, ha sido necesario conocer el concepto de estrés y los procesos que este lleva involucrados para el desarrollo del presente trabajo.
- De la misma forma, se ha observado cómo los diferentes factores ambientales y biológicos desencadenan múltiples y diversos tipos de estrés.
- Asimismo, se ha comprobado que una de las trabas del cultivo intensivo es la detección del estrés. Por esta razón, existen diversos métodos de diagnóstico ya mencionados anteriormente que junto con la búsqueda de biomarcadores constituyen líneas actuales de investigación que se encuentran en continuo desarrollo.
- Se ha comprobado que existe una gran variedad de anestésicos como reductores de estrés, aunque no todos están permitidos para el consumo humano. Es por eso que se están buscando alternativas como los aceites esenciales. Además, se ha visto que en los estudios realizados hasta el momento, uno de los suplementos más utilizados en las dietas es el triptófano.

5. Bibliografía

- Adams, S. M. (1990). Biological indicators of stress in fish. In *American fisheries symposium* (No. 597.0334 A4/8).
- Adams, S. M. (1992). Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Proceedings of the American Fisheries Symposium 8; 1990 February 23-24; Bethesda, (Ma). Bethesda (Ma): *American Fisheries Society*, 1992: 1-8.
- Asencio-Alcudia, G., Andree, K. B., Giraldez, I., Tovar-Ramirez, D., Alvarez-González, A., Herrera, M. y Gisbert, E. (2019). Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (*Argyrosomus regius*): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan. *Frontiers in Physiology*, 10: 547.
- Auró de Ocampo, A. y Ocampo Camberos, L. (1999). Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*, 30(4): 337-344.
- Azeredo, R., Machado, M., Martos-Sitcha, J. A., Martínez-Rodríguez, G., Moura, J., Peres, H., Oliva-Teles, A., Afonso, A., Mancera, J. M. y 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.
- Barandica, C. L. M., y Tort, L. (2008). Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 32(123): 267-284.
- Barragán-Méndez, C., Sobrino, I., Marín-Rincón, A., Fernández-Boo, S., Costas, B., Mancera, J. M. y Ruiz-Jarabo, I. (2019). Acute-Stress Biomarkers in Three Octopodidae Species After Bottom Trawling. *Frontiers in Physiology*, 10: 784.
- Bai, S. C., Katya, K. y Yun, H. (2015). Additives in Aquafeed, Feed and Feeding Practices in Aquaculture, *Elsevier*.
- Cádiz, L., Román-Padilla, J., Gozdowska, M., Kulczykowska, E., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., & Martos-Sitcha, J. A. (2015). Cortisol modulates

- vasotocinergic and isotocinergic pathways in the gilthead sea bream. *Journal of Experimental Biology*, 218(2): 316-325.
- Cannon, W. B. (1929). *Physiological Reviews*, 399-431.
- Carpené, E., Camatti, A., Isani, G., Cattani, O. y Cortesi P. (1992). Cd• metallothionein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*): effects of temperature and salinity. *Italian Journal of Biochemistry*, 41: 273• 282.
- Córdova, M. S., Auró, O. A. y de Buén, A. N. (1996). Lesiones histopatológicas producidas en la tilapia (*Oreochromis sp*) por el confinamiento experimental en acuario. *Veterinaria México*, 27: 143-148.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., García, L. O., Veeck, A. P. D., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., et al. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306: 403-406.
- Davis, K. B. and Parker, N. C. (1990). Physiological stress in striped bass: effect of the acclimation temperature. *Aquaculture*, 91: 349-358.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21: 308-323.
- El-Shebly, A. A. y M. Gad, H. A. (2011). Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4): 183-197.
- FAO. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.
- Ferrer, M. A., Calduch-Giner, J. A., Díaz, M., Sosa, J., Rosell-Moll, E., Abril, J. S., ... y Pérez-Sánchez, J. (2020). From operculum and body tail movements to different coupling of physical activity and respiratory frequency in farmed gilthead sea bream and European sea bass. Insights on aquaculture biosensing. *Computers and Electronics in Agriculture*, 175.

- Gilannejad, N., Dorafshan, S., Heyrati, F. P., Soofiani, N. M., Asadollah, S., Martos-Sitcha, J. A., y Martínez-Rodríguez, G. (2016). Vitellogenin expression in wild cyprinid *Petroleuciscus esfahani* as a biomarker of endocrine disruption along the Zayandeh Roud River, Iran. *Chemosphere*, 144: 1342-1350.
- Hopley, C. W., Mathews, S. B., Appleby, A. E., Rankis, A. y Halliday, K. L. (1993). Effects of river fish hatcheries. *The Progressive Fish-Culturist*, 55:16-28.
- Jerez-Cepa, I. (2019a). Bienestar Animal En El Cultivo de Dorada (*Sparus aurata*): Mecanismos de Atenuación Del Estrés. Departamento de Biología, Universidad de Cádiz.
- Jerez-Cepa, I., Ruiz-Jarabo, I., y Mancera, J. M. (2019b). Bienestar Animal en la Acuicultura de Peces: Atenuación del Estrés a través de la Dieta y mediante el Empleo de Anestésicos durante el Transporte, 10(4): 85-92.
- Larsson, A., Haux, C. y Sjobeck, M. (1985). Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9: 250-281.
- Lepage, O., Vilchez, I. M., Pottinger, T. G. y Winberg, S. (2003). Evolución temporal del efecto del L-triptófano en la dieta sobre los niveles de cortisol plasmático en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 206: 3589–3599.
- López Olmeda, J. F., Vera, L. M., y Sánchez-Vázquez, F. J. (2015). Cronobiología de peces y sus aplicaciones en acuicultura.
- Maestro, M., Simões, L. N., Jerez, I., Martos-Sitcha, J. A., y Mancera, J. M. (2015). Efecto del anestésico aceite de lipia (*Lippia alba*) sobre juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*).
- Magnoni, L. et al., (2017). Dietary Supplementation of Heat-Treated *Gracilaria* and *Ulva* Seaweeds Enhanced Acute Hypoxia Tolerance in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Biology Open*, 6(6): 897–908.
- Mancera, J., y Martín, M. (2003). El sistema de estrés en peces teleósteos.

- Martín Cuenca, E. (2006). Fundamentos de fisiología.
- Martín de los Santos Rodríguez de Vera, E. (2017). Respuestas fisiológicas de peces sometidos a estrés.
- Martos-Sitcha, J. A., Sosa, J., Ramos-Valido, D., Bravo, F. J., Carmona-Duarte, C., Gomes, H. L., y Lozano, M. (2019). Ultra-low power sensor devices for monitoring physical activity and respiratory frequency in farmed fish. *Frontiers in physiology*, 10:667.
- Mendoza, O., Pretell, K., Diringier, B., Avellan, R., Zapata, K., Marchan, A. y Mialhe, E. (2017). Respuesta fisiológica y molecular de *Anadara tuberculosa* (Arcoidea: Arcidae) al estrés de salinidad. *Revista de Biología Tropical*, 65(3): 1142-1151.
- Millán-Cubillo, A. F., Martos-Sitcha, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Cárdenas, S., y Mancera, J. M. (2016). Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 451: 87-92.
- Morais, L. A. S. (2009). Influence of abiotic factor son the chemical composition of essential oils. *Horticultura Brasileira*, 27: 4050-4063.
- Neiffer, D. L. y Stamper, M. A. (2009). Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs, *ILAR Journal*, 50(4): 343–60.
- Ochoa, D. M., y González, J. F. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(2): 115-126.
- Peters, G., Delventhal, H. y Klinger, H. (1980). Physiological and morphological effects of social stress in the eel, (*Anguilla anguilla* L.). *Arch Fischereiwiss.*
- Peters, G. y Hong, L.Q. (1985). Fish and shellfish Pathology. London (UK).
- Reynolds, W. W. y Casterlin, M. E. (1980). The role of behavior in biomonitoring of fishes: laboratory studies. *Biological monitoring of fish.*

- Robertson, L., Thomas, P. y Arnold, C. R. (1988). Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, 68: 117-129.
- Sarasquete, C. (2012). Biomarcadores y Bioindicadores en Acuicultura y Medio Ambiente.
- Schreck, C. B. (1990). Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium*, 8: 29-37.
- Shezifi, Y., Kimmel, E. y Diamant, A. (1993). Computerized noninvasive monitoring of stress in fish. *Program and abstracts of the International Symposium on Aquatic Animal Health*.
- Skrzynska, A. K., Maiorano, E., Bastaroli, M., Naderi, F., Míguez, J. M., Martínez-Rodríguez, G. y Martos-Sitcha, J. A. (2018a). Impact of air exposure on vasotocinergic and isotocinergic systems in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): new insights on fish stress response. *Frontiers in Physiology*, 9: 96.
- Skrzynska, A. K., Martos-Sitcha, J. A., Martínez-Rodríguez, G., y Mancera, J. M. (2018b). Unraveling vasotocinergic, isotocinergic and stress pathways after food deprivation and high stocking density in the gilthead sea bream. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 215: 35-44.
- Sneddon, L. U., Wolfenden, D. C. C. y Thomson, J. S., (2016). Stress Management and Welfare, en *Fish Physiology: Biology of Stress in Fish*. Elsevier.
- Souza CdF., Baldissera M. D., Baldisserotto B., Heinzmann B. M., Martos-Sitcha J. A. y Mancera J. M. (2019). Essential Oils as Stress-Reducing Agents for Fish Aquaculture: A Review. *Frontiers in Physiology*, 10: 785.
- Stegeman, J. J., Woodin, B. R. y Binder, R. L. (1984). Patterns of benzo (a) pyrene metabolism by varied species, organs and developmental stages of fish. *National Cancer Institute Monograph Series*, 65: 371-377.

- Teles, M., Oliveira, M., Jerez-Cepa, I., Franco-Martínez, L., Tvarijonaviciute, A., Tort, L. y Mancera, J. M. (2019). Transport and Recovery of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Sedated With Clove Oil and MS222: Effects on Oxidative Stress Status. *Frontiers in Physiology*, 10:523.
- Tilney, R. L. y Hocutt, C. H. (1987). Changes in gill epithelia of *Oreochromis mossambicus* subjected to cold shock. *Environmental Biology of Fishes*. 19: 35-44.
- Tort, L. (1998). Stress and immunosuppression in fish. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 5: 17-29.
- Velasco, Y., Palacios, C. y Cruz, P. (2008). Eficiencia anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y metasulfonato de tricaína en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista MVZ Córdoba*.
- Weber, R. A., Peleteiro-Alonso, J. B., Chereguini-Fernández-Maqueira, M. O., García-Martín, Ó. y Aldegunde, M. (1858). Evaluación de la eficacia del 2-fenoxietanol como anestésico en el lenguado (*Solea senegalensis*).
- Wedemeyer, G. A. y McLeay, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fish to environmental stresses. *Stress and fish*.
- Zahl, I. H., Samuelsen, O. y Kiessling, A. (2012). Anaesthesia of Farmed Fish: Implications for Welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38 (1): 201–18.