

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Evaluación del estado de bienestar en
el cultivo de la tenca (*Tinca tinca*).
Mejora de su producción intensiva.

Héctor J. Pula Moreno
Tesis Doctoral 2018

Programa de Doctorado en Biología
Fundamental y de Sistemas

Evaluación del estado de bienestar en
el cultivo de la tenca (*Tinca tinca*).
Mejora de su producción intensiva.

Memoria para la obtención del Grado de Doctor
presentada por el Licenciado en Biología

D. Héctor J. Pula Moreno.

DIRECCIÓN

Dra. Ana Sanz Rus y Dra. Cristina E. Trenzado Romero

DOCTORANDO

Fdo. D. Héctor J. Pula Moreno

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Héctor J. Pula Moreno
ISBN: 978-84-9163-959-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52632>

Los trabajos de investigación que recoge esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Zoología y en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada, así como en el Centro de Acuicultura "Vegas del Guadiana" de la Junta de Extremadura, gracias a la financiación obtenida a través del Proyecto "Indicadores de bienestar animal en el cultivo de peces. Test de valoración (AGR-6193) de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y del convenio específico de colaboración entre la Universidad de Granada y la Sociedad de Gestión Pública de Extremadura (GPEX) con referencia C-3805.

De los resultados obtenidos durante el desarrollo de estas Tesis se han podido publicar varios artículos en revistas científicas y comunicaciones en diversos congresos, tanto Nacionales como Internacionales.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Pula, H.J., Trenzado, C.E., García-Mesa, S., Fallola, C., Sanz, A., 2018. Effects of different culture systems on growth, immune status, and other physiological parameters of tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*. 485, 101–110.

Pula, H.J., Trenzado, C.E., García-Mesa, S., Fallola, C., Sanz, A., 2018. Oxidative status and intermediary metabolism in tench (*Tinca tinca*) reared under different culture systems (En proceso).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

H. J. Pula Moreno, C. Trenzado, J.M. Romero, S. García, J.J. Pérez, C. Fallola, A. Sanz. "Influencia de la densidad de cultivo sobre diferentes parámetros fisiológicos en la tenca". XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula Moreno, C. Trenzado, J.C. Ramírez López, S. García, M. Pascual Toca, C. Fallola, A. Sanz. "Influencia de dos piensos comerciales en el crecimiento e índices nutricionales relacionados de tencas de engorde en recirculación". XV Congreso

Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula, C. Trenzado, J.M. Romero, S. García, J.C. Ramírez López, C. Fallola, A. Sanz. “Repercusión de la alimentación con dos piensos comerciales diferentes sobre enzimas del metabolismo intermediario y variables plasmáticas de la tenca”. XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula, P. Navarro-Gómez, R.M. Ferrer Martín, J.F. Díaz Serrano, C.E. Trenzado, A. Sanz, R. Carmona. “Influencia de los niveles lipídicos y proteicos de la dieta en la citoarquitectura hepática de la tenca (*Tinca tinca*)”. XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula, C. Trenzado Romero, J.M. Romero, S. García, P. Moreno, C. Fallola, A. Sanz Rus. “Efectos de los distintos sistemas de cultivo de la Tenca (*Tinca tinca*) sobre enzimas del metabolismo intermediario, variables hemáticas y parámetros inmunológicos”. XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

S. García Mesa, J.M. Romero, H. J. Pula, C.E. Trenzado, M.D. Suárez, M. García Gallego, A. Sanz. “Respuestas fisiológicas al estrés agudo en el esturión, tenca y trucha. Influencia del estrés crónico previo”. XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula, C. Trenzado, P. Moreno, S. García, J.C. Ramírez, C. Fallola, A. Sanz Rus. “Cultivo extensivo, intensivo e hiperintensivo de la tenca: parámetros relacionados con el crecimiento y el estado oxidativo”. XV Congreso Nacional de Acuicultura y I Congreso Ibérico de Acuicultura (CIA). Huelva (España). 13-16 de Octubre de 2015.

H. J. Pula y A. Sanz. “Test de Tolerancia a la glucosa en dos especies dulceacuícolas con distinto régimen alimenticio. Trucha común vs tenca. VIII Jornadas de Acuicultura en el litoral Suratlántico. Cartaya (Huelva, España). 7 y 8 de junio de 2016.

Agradecimientos

Sería una gran insensatez dejar pasar la excelente oportunidad de agradecer a todos aquellos que, de una manera u otra, han participado en la conclusión de este trabajo.

En primer lugar he de agradecer a la Dra. Ana Sanz del Área de Fisiología del Depto. de Zoología de la Universidad de Granada, el haber confiado en un Doctorando del que apenas tenía referencias, sin un currículum académico brillante y con poco más valorable que la falta, quizás algo inconsciente, de vergüenza y pudor para presentarse en su despacho y sugerir estar dispuesto a realizar esta Tesis Doctoral. Desde ese momento, han tenido que ser muchos los esfuerzos realizados por parte de la Dra. Sanz para procurar una continuidad laboral que permitiese el desarrollo y conclusión de esta Tesis, desde formar parte de su equipo de investigación hasta lograr poner en marcha un proyecto que no ha dejado de crecer, que es el Aula del Mar. Gracias a su empeño y al de los Drs. Luís Cruz (Dpto. de Ecología) y Pedro Sánchez (Dpto. de Botánica), hoy puedo estar orgulloso de haber participado en creación de esta entidad que, poco a poco se abre camino como referente de divulgación, investigación y transferencia de la Universidad de Granada hacia su costa y hacia toda la costa andaluza.

Todo esto no hubiese sido posible sin la inestimable intervención de la Dra. Cristina Trenzado, Cris, que desde nuestra llegada a Granada hizo todo lo posible por hacernos, a mí y mi familia, sentir como en casa. En lo personal no podría estar más agradecido por todo lo que hizo y en lo profesional, a buen seguro que esta Tesis Doctoral no hubiera llegado a su fin sin ella, por lo cual solo cabe decir: "gracias por todo jefa".

También habrán tenido parte de culpa el resto de integrantes del Área de Fisiología. Desde el principio han sabido soportar con entereza esos debates retorcidos sobre aspectos, a veces científicos y otras no tanto, a la hora del café. No ha sido mal ejercicio de innovación docente, ya que, al menos por mi parte, considero haber aprendido mucho de estos ratos y estas conversaciones. Gracias por lo tanto a Manuel de la Higuera por sus consejos, a Manuel García Gallego por lo mismo y por haber compartido el sentido del humor, no siempre fácil de entender que me caracteriza. Gracias también a Mari Carmen, a Nani y al resto de contertulios de estos buenos ratos que se han echado de menos en los últimos momentos de esta Tesis.

No puedo dejar atrás la inestimable ayuda de Sergio García como compañero de laboratorio. Gracias a su meticulosa organización, a sus amplios conocimientos de las técnicas, y sobre todo a su inmensa paciencia se han podido solventar los problemas derivados de mi falta de práctica entre matraces y pipetas. Otros compañeros de viaje han dejado también su huella en este trabajo con pequeñas, pero imprescindibles aportaciones y por eso no quiero pasar sin mostrar mi sincero agradecimiento a Rosa,

Paola, Gloria y algunos más que me van a tener que disculpar que no nombre, pero debo recortar para no extenderme demasiado.

Gracias a los miembros del Dpto. de Biología Celular de la UGR, sobre todo al Dr. Ramón Carmona, por sus consejos sobre histología de peces y facilitar, en todo momento, su laboratorio y equipos.

Y en este punto llega uno de los apartados que con mayor ilusión escribo en esta Tesis Doctoral. Es el momento de agradecer a los compañeros de la Piscifactoría Vegas del Guadiana, de la Junta de Extremadura, todo el esfuerzo y apoyo mostrado para la consecución de este largo trabajo. Gracias a César Fallola por haber puesto todo y más de su parte para que este trabajo se pudiera llevar a cabo. En lo profesional ha ejercido como el mejor Director y Jefe que uno quisiera tener y en lo personal ha pasado a ser un ejemplo de humildad, honradez y comprensión. Ramón Velasco también se merece todo mi agradecimiento por haber mantenido siempre ese espíritu en positivo, por haber conseguido transmitir siempre su felicidad hasta en momentos más difíciles. Tener a Ramón por jefe es garantía de una sonrisa diaria, así que gracias Ramón por hacer la vida más fácil.

No merecen menos el resto de compañeros del laboratorio de Vegas del Guadiana, Paloma, Juan Carlos, Marta y Juanse. Han sido momentos, quizás meses, muy intensos de trabajo y siempre habéis estado ahí, aguantando las exigencias que requerían unos ensayos de estas características. Por eso os estaré eternamente agradecido. No puedo olvidar a los chicos de prácticas que, de manera fugaz también participaron en alguno de los muestreos, como Guadalupe, la chica anchoa, o Chema el veterinario y algunos otros que no logro recordar y que espero que me perdonen.

También debo agradecer su participación al personal Laboral del centro, a Emilio y a Genaro especialmente por su implicación en mantener a los animales en las mejores condiciones, y a los compañeros de la Escuela de Pesca de Vegas del Guadiana, que se apuntaban a los muestreos para todo lo que pudieran hacer falta. Gracias a Chema, a Antoñete, a César y a Manolín por vuestro apoyo en los momentos más intensos de trabajo.

Quiero aprovechar para dar las gracias también a los compañeros de la Sección de Pesca de la Junta de Extremadura, Michel y César Esteban, que aunque pudieron aportar menos durante los ensayos, siempre estuvieron ahí para hacer el trabajo más fácil.

Fuera del ámbito profesional, no puedo dejar de mostrar mi eterno agradecimiento a toda mi familia y amigos por haber mantenido siempre su apoyo y confianza.

A mis padres, José Luis e Inmaculada que con dosis extras de paciencia han sabido esperar tanto tiempo a que este momento llegara. Siempre han tenido esas palabras de ánimo y comprensión para los momentos más necesario y ahora solo queda poder celebrarlo con ellos y agradecerles todo lo que se merecen en persona.

A mis hermanos José y Eric, que nunca dudaron en que este era un buen plan, a pesar de haber tenido que posponer por un tiempo algunos de nuestros planes. A mis cuñadas y al pequeño Airam al que no he tenido demasiado tiempo para dedicar hasta ahora.

A mis abuelos, Ángel y Manuela, que siempre tuvieron entre sus mayores ilusiones el ver concluido este trabajo, y aunque él ya no esté con nosotros, seguro que se sentiría muy orgulloso. Él quizás sea en gran parte responsable de que este trabajo se haya culminado ya que, entre otras muchas cosas, me enseñó que el que quiere hacer algo en la vida pone empeño, y el que no quiere pone excusas. Fue todo un ejemplo de bondad, amor incondicional por los suyos y de esfuerzo por hacer las cosas, por difíciles que pareciesen, así que, a él dedico estas palabras y esta Tesis. Todos tenemos un ángel que nos cuida y nos guía y yo tuve la inmensa suerte de conocer al mío.

A la persona a la que más tengo que agradecer por este trabajo, es sin duda a Chary, compañera de laboratorio, asesora científica, esposa y madre de mis hijos. La vela que impulsó este barco desde el principio de la travesía, siempre ajustándose a los vientos más favorables incluso en los momentos de tormenta y tempestad, consiguiendo que hoy, por fin, hayamos llegado a buen puerto. Espero seguir disfrutando como hasta ahora en los próximos viajes que nos esperan. Gracias Chary. Y no me puedo dejar atrás a los dos grumetes que nos han acompañado, Marina e Iván, que han aportado a esta Tesis más de lo que se creen. Me han hecho ver con claridad el horizonte incluso entre las nieblas y comprender que a veces hay que modificar el rumbo para llegar al mismo destino, aunque parezca que el viaje se hace más largo.

A mi otra familia, mis suegros, mis cuñados y mis sobrinas que han tenido que aguantar mis ausencias en los momentos de reunión familiar. Gracias por vuestra paciencia y preparaos porque ya me puedo volver a hacer cargo de la barbacoa.

No quiero pasar sin agradecer a todos los amigos que han compartido muchos ratos de desasosiego y también de alegrías durante esta Tesis, que me han apoyado siempre y me han dado ánimos. Los amigos de Extremadura, que aunque ahora están más lejos no han dejado nunca de interesarse y mostrarse cercanos a pesar de los kilómetros. A mis "odiosos vecinos" que también han tenido que aguantar alguna charla que otra sobre el bienestar de la tenca y otras especies de cultivo. Y por último a los amigos del CUB, que en este último tramo me han dado aliento para llegar hasta la meta.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos esenciales
AANE	Aminoácidos no esenciales
AAAs	Aminoácidos
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poli-insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
APROMAR	Asociación Empresarial de Acuicultura de España
CEC	Coficiente de eficacia en crecimiento
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropinas
CS	Citrato sintasa
DTD	DT-Diaforasa
FAO	Food and Agricultural Organization
FAWC	Farm Animal Welfare Council
FDP	Fructosa Bifosfatasa
FRAP	Ferric reducing ability of plasma. Capacidad antioxidante total
FSBI	Fisheries Society of the British Isles
FSH	Hormona estimulante del folículo
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GAS	Síndrome de Adaptación General
GH	Hormona del crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GOT (o AST)	Trasnsaminasa glutámico-oxalacética (o Aspartato animotrasferasa)
GPT (o ALT)	Trasnsaminasa glutámico pirúvica (o Alanina aminotrasferasa)
GPX	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GST	Glutatioón s-transferasa
GtH-I	Hormona Gonadotropa I (también FSH)
GtH-II	Hormona Gonadotropa II (también LH)
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteinas de alta densidad
HHI	Hipotálamo-Hipofisiario-Interrenal
HK	Hexokinasa
HOAD	β -hidroxiacil CoA deshidrogenasa
HSC	Hipotálamo-Simpático-Cromafin
Ht	Hematocrito
IC	Índice de conversión de alimento
IDef	Índice de deformidades visibles en peces

IDS	Índice digestivosomático
IGS	Índice gonadosomático
IHS	Índice hepatosomático
K	Índice de condición
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LOX	Lipoxigenasa
LPL	Lipoproteína lipasa
LT	Longitud total
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
MELN	Materias extractivas libres de nitrógeno
NAD ⁺ /NADH	Nicotin adenin dinucleótido oxidado/reducido
NADP ⁺ /NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidado/reducido
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PEG	Polietilenglicol
PGI	Fosfogluconato isomerasa
POD	Peroxidasa
ppm	Partes por millón
RCOOH	Ácidos grasos
RE	Retención de energía
REF	Referencia
REGA	Registro general de explotaciones ganaderas
RL	Retención de lípidos
ROS	Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species)
rpm	Revoluciones por minuto
Sat.O ₂	Concentración de oxígeno en % de saturación
SCI	Science citation index. Índice de publicaciones científicas.
SOD	Superoxido dismutasa
T ₀	Tiempo = 0
T3	Hormona triyodotironina
T4	Hormona tiroxina
TAN	Nitrógeno amónico total (Total Amonic Nitrogen)
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TTG	Test de tolerancia a la glucosa
VPP	Valor productivo de la proteína

ÍNDICE

1. Introducción general	1
1.1. LA ACUICULTURA	3
1.1.1. Una visión global.....	3
1.1.2. La acuicultura en España	5
1.2. LA TENCA.....	7
1.3. LA INTENSIFICACIÓN DEL CULTIVO	14
1.4. EL BIENESTAR ANIMAL	16
1.5. EL ESTRÉS COMO MEDIDA DE BIENESTAR	19
1.5.1. Cambios hormonales relacionados con el estrés.....	24
1.5.2. Alteraciones en el equilibrio osmótico debidas al estrés	25
1.5.3. Efecto del estrés a nivel hematológico	26
1.5.4. El metabolismo energético.....	27
1.5.5. Efecto del estrés en el crecimiento e índices biométricos	28
1.5.6. Alteraciones del estado oxidativo debidas al estrés.....	28
1.5.7. Sistema inmune en peces y estrés	30
1.5.8. El efecto del estrés sobre la capacidad reproductiva de los peces	31
1.6. NUTRICIÓN Y ESTADO DE BIENESTAR DE LOS PECES	34
2. Objetivos.....	39
3. Material y métodos	43
3.1. LOS PECES.....	45
3.1.1. Peces empleados para el ensayo de evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	45
3.1.2. Peces empleados para la evaluación del bienestar de la tenca en distintas densidades de cultivo intensivo.....	46
3.1.3. Peces utilizados para la evaluación del bienestar de la tenca en el ensayo de alimentación con distintas dietas	46
3.1.4. Peces utilizados para la realización del Test de Tolerancia a la Glucosa (TTG)	46
3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	47
3.2.1. Evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo	47
3.2.2. Efecto de la densidad de cultivo sobre el bienestar de la tenca	50
3.2.3. Efecto de la dieta sobre el bienestar de la tenca en cultivo intensivo	52
3.2.4. Condiciones experimentales para la realización del Test de Tolerancia a la Glucosa	53
3.3. TOMA DE MUESTRAS.....	54
3.4. PROCESO DE ANÁLISIS.....	58
3.4.1. Parámetros de calidad de agua.	58
3.4.2. Cálculo de índices relacionados con el crecimiento e índices biométricos	58
3.4.3. Análisis hematológicos	59
3.4.4. Análisis bioquímicos en plasma	60
3.4.5. Análisis de enzimas del metabolismo intermediario	65

3.4.6.	Parámetros relacionados con el estado oxidativo.....	67
3.4.7.	Parámetros inmunológicos en plasma	71
3.4.8.	Análisis de composición proximal.....	74
3.4.9.	Cálculo de parámetros relativos al aprovechamiento de los nutrientes y de la energía de las distintas dietas	76
3.4.10.	Procesamiento histológico de las muestras	77
3.4.11.	Test de tolerancia a la glucosa en la tenca.	78
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
4.	Evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	79
4.1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	81
4.2.	<i>RESULTADOS</i>	82
4.2.1.	Crecimiento e índices biométricos de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	82
4.2.2.	Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo	83
4.2.3.	Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario de la tenca en distintos sistemas de cultivo	85
4.2.4.	Estado oxidativo en hígado y en plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo	86
4.2.5.	Parámetros inmunológicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo	87
4.2.6.	Análisis histológico del digestivo de la tenca en distintos sistemas de cultivo	89
4.2.6.1.	<i>Estudio histológico del intestino de la tenca en distintos sistemas de cultivo</i>	89
4.2.6.2.	<i>Estudio histológico del hígado de la tenca en distintos sistemas de cultivo</i>	91
4.3.	<i>DISCUSIÓN</i>	93
4.3.1.	Crecimiento e índices biométricos de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	94
4.3.2.	Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo	98
4.3.3.	Actividad enzimática relacionada con el metabolismo intermediario de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	102
4.3.4.	Estado oxidativo de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	103
4.3.5.	Parámetros inmunológicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo	106
4.3.6.	Análisis histológico del digestivo de la tenca en distintos sistemas de cultivo	111
4.3.6.1.	Estudio histológico del intestino de la tenca en distintos sistemas de cultivo	111
4.3.6.2.	Estudio histológico del hígado de la tenca en distintos sistemas de cultivo.....	112
5.	Efecto de la densidad de cultivo sobre el bienestar de la tenca	113
5.1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	115
5.2.	<i>RESULTADOS</i>	117
5.2.1.	Crecimiento e índices biométricos de la tenca bajo distintas densidades de cultivo.....	117
5.2.2.	Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo	118
5.2.3.	Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado y en plasma de la tenca bajo distintas densidades de cultivo	119
5.2.4.	Estado oxidativo del hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo.....	121
5.2.5.	Parámetros inmunológicos en la tenca en distintas densidades de cultivo	122
5.3.	<i>DISCUSIÓN</i>	123
5.3.1.	Crecimiento e índices biométricos de la tenca bajo distintas densidades de cultivo.....	124
5.3.2.	Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca bajo distintas densidades de cultivo ...	126
5.3.3.	Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo	129

5.3.4.	Estado oxidativo del hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo	131
5.3.5.	Parámetros inmunológicos en la tenca en distintas densidades de cultivo	132
6.	Efecto de la dieta sobre el bienestar de la tenca en cultivo intensivo	135
6.1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	137
6.2.	<i>RESULTADOS</i>	140
6.2.1.	Efectos de la dieta sobre el crecimiento e índices biométricos de la tenca en cultivo intensivo.....	141
6.2.2.	Evaluación de la composición corporal y de la utilización de la energía y los nutrientes de la dieta en la tenca	143
6.2.3.	Efectos de la dieta sobre el perfil de aminoácidos de la tenca en cultivo intensivo	144
6.2.4.	Efectos de la dieta sobre el perfil lipídico de la tenca en cultivo intensivo	146
6.2.5.	Efectos de la dieta sobre parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en cultivo intensivo.....	148
6.2.6.	Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el metabolismo intermediario de la tenca en cultivo intensivo	149
6.2.7.	Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el estado oxidativo de la tenca en cultivo intensivo	151
6.2.8.	Efecto de la dieta sobre parámetros inmunológicos de la tenca en cultivo intensivo	152
6.2.9.	Test de tolerancia a la glucosa en la tenca	153
6.2.10.	Análisis histológico en tencas alimentadas con dos dietas distintas	155
6.2.10.1.	Análisis histológico en el intestino.....	155
6.2.10.2.	Análisis histológico en el hígado	156
6.3.	<i>DISCUSIÓN</i>	157
6.3.1.	Efectos de la dieta sobre el crecimiento e índices biométricos de la tenca en cultivo intensivo.....	158
6.3.2.	Evaluación de la composición corporal y de la utilización de la energía y los nutrientes de la dieta en la tenca	160
6.3.3.	Efectos de la dieta sobre el perfil de aminoácidos de la tenca en cultivo intensivo	162
6.3.4.	Efectos de la dieta sobre el perfil lipídico de la tenca en cultivo intensivo	164
6.3.5.	Efectos de la dieta sobre parámetros bioquímicos del plasma de la tenca en cultivo intensivo.....	168
6.3.6.	Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el metabolismo intermediario de la tenca en cultivo intensivo	170
6.3.7.	Efectos de la dieta sobre el estado oxidativo de la tenca en cultivo intensivo	171
6.3.8.	Efectos de la dieta sobre el estado inmunológico de la tenca en cultivo intensivo	172
6.3.9.	Test de tolerancia a la glucosa en tenca	174
6.3.10.	Análisis histológico en tencas alimentadas con dos dietas distintas	175
6.3.10.1.	Análisis histológico en el intestino.....	175
6.3.10.2.	Análisis histológico en el hígado	175
7.	Discusión general	177
8.	Conclusiones	187
9.	Bibliografía	191

1. Introducción general

1.1. LA ACUICULTURA

1.1.1. Una visión global

Se podría entender el concepto de acuicultura como el conjunto de técnicas que hacen posible la producción de organismos acuáticos de forma controlada en mayor o menor medida, aumentando el rendimiento frente a técnicas puramente extractivas, como en el caso de la pesca o el marisqueo. En base a esta definición, la acuicultura ha sido practicada por el hombre desde hace más de 4.000 años, pero ha sido en el último medio siglo cuando se ha podido evidenciar un verdadero y notable desarrollo de esta actividad. Se ha pasado del uso de técnicas artesanales a procesos altamente tecnificados e industrializados que dan empleo a más de 12 millones de personas en todo el mundo (FAO, Food and Agricultural Organization, 2015). Se podría considerar una industria homóloga a lo que en el medio terrestre representan la agricultura y la ganadería, pero englobando en un único término tanto la producción de animales como de vegetales acuáticos, siendo un representante de estos últimos, el alga comestible *Eucheuma sp.*, el principal producto obtenido a nivel mundial, con casi 12 millones de toneladas, producidas principalmente en países asiáticos (FAO, 2015).

En la última década se han conseguido producir más alimentos de origen acuícola de gran calidad a través de la acuicultura que provenientes de la industria pesquera y extractiva. De las 199,7 millones de toneladas de productos de origen acuático obtenidos a nivel mundial en 2015, el 53,1% procedían de la acuicultura. Estos resultados (Fig. 1) se deben a un crecimiento medio continuado de un 3,2 % durante las cinco últimas décadas (FAO, 2015; APROMAR, Asociación Empresarial de Acuicultura de España, 2017). Indudablemente la industria pesquera también ha aumentado sus rendimientos gracias, ente otros motivos, a los avances tecnológicos y también al desarrollo de nuevos canales de distribución, pero en cambio ha visto mermado su crecimiento a consecuencia del agotamiento de los recursos naturales que, en algunos casos están llegando al colapso.

De cualquier modo, sería un error considerar la pesca y la acuicultura como dos sectores independientes y quizás fuera más acertado ver la acuicultura como la sucesión natural de la pesca, al igual que consideramos a la ganadería como una evolución de la caza o a la agricultura como el exitoso avance conseguido por el hombre en el pasado.

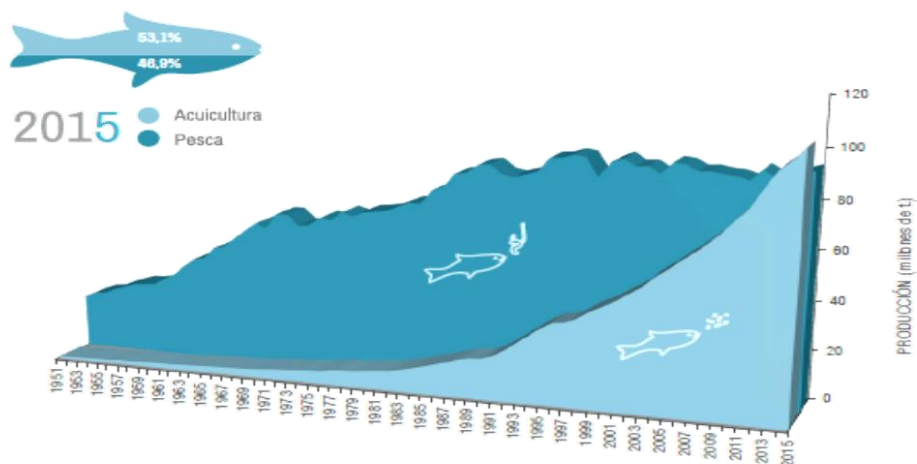


Figura 1. Evolución de la producción en acuicultura y pesca a nivel mundial en el periodo de 1950-2015 (FAO, 2015).

Es ya una realidad, sobre todo en los países más desarrollados, que el consumidor haya dejado de plantearse si el origen de ciertos productos sea la pesca o quizás la acuicultura y se plantee entonces si las condiciones de cultivo en las que se han obtenido esos productos han sido las adecuadas. Nadie pensaría que ciertas especies habituales en las pescaderías como la trucha o el mejillón pudieran proceder de la pesca o del marisqueo, al igual que nadie plantea si la ternera o el pollo son productos de granja o han sido cazados en su medio natural. En un futuro, esto mismo ocurrirá con muchos otros productos de origen acuático y los consumidores tendrán entonces que elegir en base a criterios como las condiciones de cultivo, el grado de procesamiento, el país de procedencia u otras características que aportarán distintas cualidades y calidades al producto. Dejará definitivamente de ser un criterio de elección si su procedencia es salvaje o de cultivo.

En otro orden de cosas, un incremento constante en la demanda mundial de productos acuícolas, una previsión del aumento de la población a más de 9.500 millones de habitantes para 2050 (FAO, 2015) y un necesario e inevitable cambio de las políticas productivas hacia estrategias más sostenibles con el medio ambiente, tanto en los sectores ganadero como agrícola, abren las puertas a un mayor desarrollo de la acuicultura desde todos los puntos de vista. Será necesario implementar las tecnologías aplicadas a este sector y conseguir una mayor diversificación de los productos, tanto en número de especies como en formatos de presentación y procesamiento. Esto conllevará necesariamente un aumento del conocimiento tanto de la biología de las propias

especies como en su adaptación a las condiciones de cultivo. En el caso de los animales será imprescindible, además, incrementar los estudios sobre su comportamiento y su bienestar en condiciones de cautividad. Hay que destacar que existen más de veinte mil especies solo del grupo de peces teleósteos y que están representados en casi todos los ecosistemas acuáticos, con una amplia gama de adaptaciones fisiológicas y comportamentales, pero hasta el momento un número reducido de estas especies se han estudiado con suficiente detalle científico. Por tanto, las evidencias científicas y generalidades en este grupo tan amplio no deben ser empleadas sin la cautela adecuada.

No obstante, ya se producen a través de la acuicultura, en unos volúmenes considerables (más de 100 toneladas anuales) unas 305 especies, entre vegetales, moluscos, crustáceos, peces y otros organismos. Esta riqueza en diversidad de productos acuícolas se debe principalmente a la variabilidad de entornos donde es posible cultivarlos, a la adaptabilidad de estas especies a las condiciones de cultivo y al ingenio de las personas (APROMAR, 2017).

1.1.2. La acuicultura en España

La historia de la acuicultura moderna en España tiene su punto de partida a mediados del siglo XIX, durante el reinado de Dña. Isabel II y Don Francisco de Asís que apoyaron la creación en 1866 del primer laboratorio español destinado a la producción de alevines de trucha común (*Salmo trutta*), y que fue el Laboratorio Ictiogénico de la Granja del Real Sitio de San Ildefonso (Segovia). Este permaneció en activo relativamente poco tiempo, debido a la instauración de la Primera República y la retirada de la financiación para su mantenimiento, pero simultáneamente se creó en Aragón la primera piscifactoría con capital privado de España (Jiménez Sánchez, 1997). Esta instalación situada en el Monasterio de Piedra (Zaragoza) tuvo que ser cedida al Estado Español unos años después y desde entonces se destinó a la producción de truchas con fines de repoblación de los ríos españoles. Aún hoy sigue cumpliendo una inestimable función, habiéndose transformado en un Centro de Interpretación y de Educación Ambiental sin perder su condición de centro de producción acuícola original.

Desde entonces a esta parte la acuicultura española ha evolucionado de forma notable, a un ritmo incluso mayor que en otros en países europeos, situándose en 2015 a

la cabeza del sector en volumen de producción (MAPAMA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2015) y dando trabajo a unas 18.000 personas en nuestro país (APROMAR, 2017). No hay que olvidar que el principal producto acuícola español es el mejillón, con más 225.000 toneladas, y que en cuanto a piscicultura, son otros países como Reino Unido o Grecia los más productivos tanto en volumen como en valor económico. La dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*) son las principales especies de peces cultivadas en España y la diversificación del sector está centrada en algunas especies como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), el lenguado (*Solea senegalensis*) o el atún rojo (*Thunnus thynnus*). En el caso de la tenca (*Tinca tinca*) en España, su producción actual es casi testimonial, con 23 toneladas en 2015 (MAPAMA, 2015), producidas principalmente en explotaciones de Extremadura (Fig. 2).



Figura 2. Número de explotaciones de acuicultura de tenca en España en 2016. (<http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/visor-de-instalaciones/>)

Esta cifra queda lejos de los máximos alcanzados a finales de la década de los ochenta, que rondaba las 460 toneladas. No obstante, la tenca sigue siendo de especial

interés para las zonas rurales llegando a ser incluso protagonista de una fiesta popular catalogada de Interés Turístico Gastronómico de Extremadura que lleva su nombre.

1.2. LA TENCA

La tenca (*Tinca tinca*, Linnaeus, 1758) es la única especie del género *Tinca* de la familia *Cyprinidae* (Fig. 3). Es originaria de grandes sistemas lacustres de Europa Central y cultivada tradicionalmente en muchos países europeos (Billard y Flajshans, 1995).

Situación Taxonómica

Reino Animal

Subreino Bilateria

Infrareino Deuterostomia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Infrafilum Gnathostomata

Superclase Osteichthyes

Clase Actinopterygii

Subclase Neopterygii

Infraclase Teleostei

Superorden Ostariophysi

Orden Cypriniformes

Superfamilia Cyprinoidea

Familia Cyprinidae

Género *Tinca*

Especie *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758).

Figura 3. Situación taxonómica de la tenca según ITIS (Integrated Taxonomic Information System, 2018)

Algunos autores consideran que la tenca es autóctona en España (Elvira, 1995) y existen referencias de hallazgos de esta especie en yacimientos arqueológicos de la Edad de Bronce (Doadrio, 2001). Sin embargo existe cierta controversia ya que Kohlmann *et al.* (2007) encontraron evidencias genéticas que asocian las poblaciones actuales españolas con poblaciones de origen asiático y que se distancian genéticamente de las centroeuropeas. Más recientemente, a través de análisis genético espacial se han

revelado datos sobre la posible dispersión de esta especie a manos del hombre, incluyendo su introducción en la Peninsular Ibérica en el siglo XVI (Lajbner *et al.*, 2011; Presti *et al.*, 2012).

La distribución mundial actual de la tenca (Fig. 4) incluye América del Norte y del Sur, África, Australia y Asia (Rosa, 1958; Bircan *et al.*, 1989; Kottelat, 1997; Alas *et al.*, 2009; Cudmore y Mandrak, 2011; Freyhof y Kottelat, 2008). La razón fundamental de su introducción en distintos países ha sido su consumo, siendo una de las especies de mayor interés para el cultivo en estanques (Pérez-Regadera, 1997).

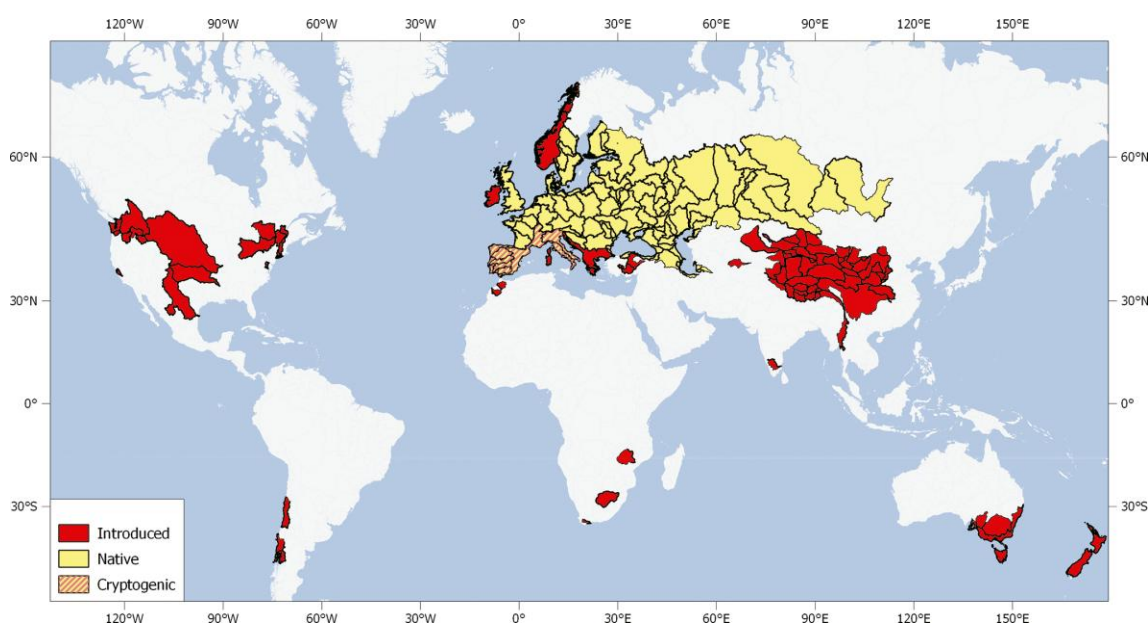


Figura 4. Distribución mundial de la tenca (Avlijaš *et al.*, 2017).

La tenca es un pez de talla media que puede alcanzar los 85 cm de longitud total y un peso máximo de 7,5 kg. Su cuerpo es corto, grueso y algo comprimido dorsoventralmente, con un pedúnculo caudal también corto y robusto. Presenta un par de barbillas cortas en el maxilar inferior (Fig. 5). Las escamas son pequeñas y presenta de 90 a 120 en la línea lateral. La aleta dorsal se compone de entre 8 y 9 radios, y la anal de 7 a 8, ambas con sus bordes redondeados. Existe un marcado dimorfismo sexual, siendo los machos fácilmente distinguibles de las hembras por poseer el primer radio de las aletas pelvianas engrosado, mientras que las hembras tienen todos los radios similares (Lozano, 1990). Su coloración es principalmente verde, sobre todo en el

dorso, mientras que el resto del cuerpo presenta color verde amarillento con tonos dorados, con cierta variabilidad dependiendo del medio donde se encuentre (De La Rosa, 1996).



Figura 5. Macho adulto de tenca.

También se pueden encontrar variedades de tenca que van desde los colores azulados hasta el amarillo intenso, y que han sido objeto de selección artificial con fines ornamentales (Kvasnička *et al.*, 1998).

Respecto a su aparato digestivo, la tenca carece de estómago, al igual que ocurre en el resto de ciprínidos. Presenta un esófago corto seguido por el intestino, cuyo comienzo coincide con el conducto del colédoco (Fig. 6).

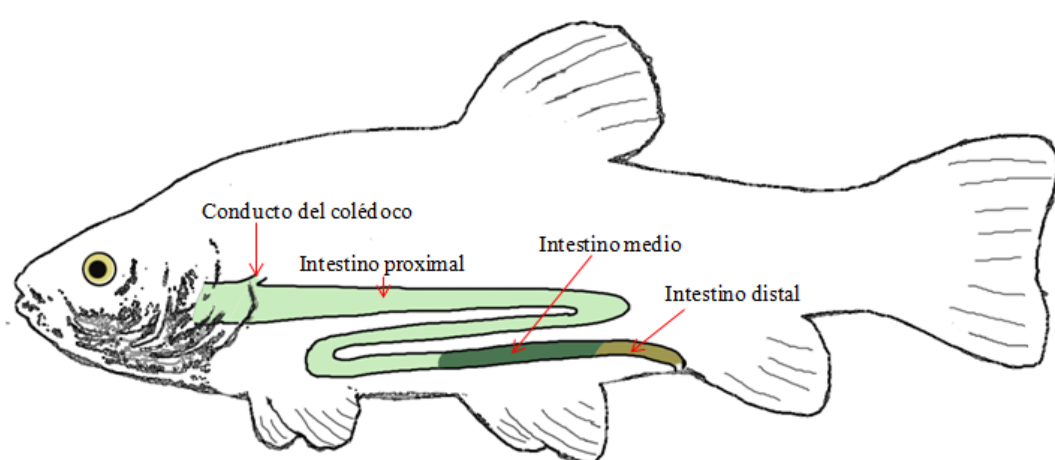


Figura 6. Diagrama del intestino de la tenca.

El resto del intestino es largo y en forma de tubo sin aparente diferenciación anatómica, pero dividido en tres partes diferenciables morfológica y funcionalmente, como digestivo proximal, medio y distal. Es más amplio en el extremo anterior y se vuelve progresivamente más delgado hacia la parte distal (Noaillac-Depeyre y Gas 1976).

Desde un punto de vista histológico (Fig. 7), la pared del intestino de la tenca consiste en una capa mucosa, formada por un epitelio cilíndrico simple con chapa estriada y células caliciformes y un corion de tejido conjuntivo laxo, que presenta evaginaciones formando las vellosidades intestinales, una submucosa casi inapreciable, una capa muscular formada por 2 capas internas de músculo liso y dos externas de músculo estriado esquelético y una serosa.

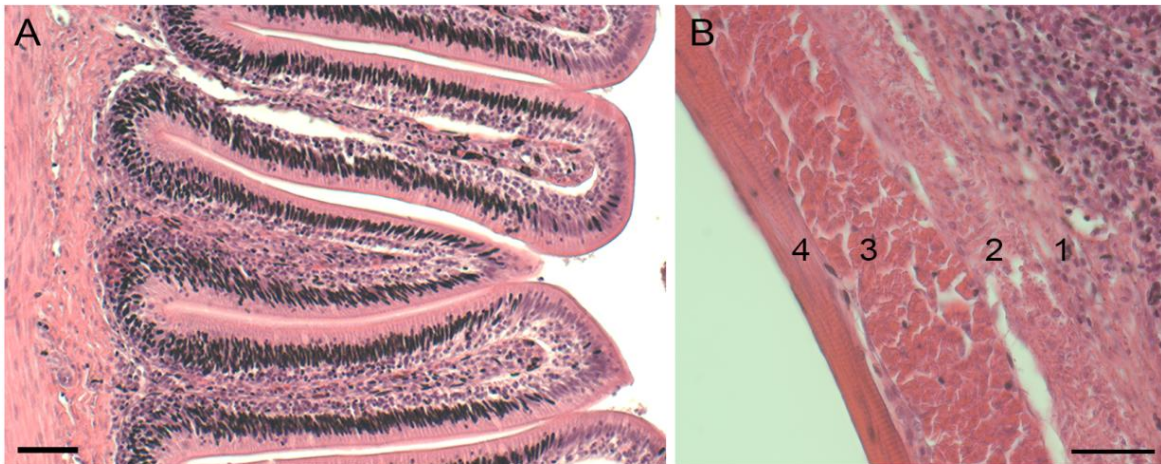


Figura 7. Micrografía del intestino de la tenca (*Tinca tinca*). Tinción de hematoxilina-eosina del intestino de la tenca donde se muestra (A) vellosidades intestinales y (B) las dos capas de músculo liso (1 y 2) y las dos capas de músculo estriado (3 y 4). Barra de escala: A, 100 μ m; B, 25 μ m.

La tenca presenta un hígado (Fig. 8) con un parénquima constituido por cordones de hepatocitos de forma poligonal, núcleo centrado y citoplasma que puede almacenar gránulos de glucógeno y/o vacuolas lipídicas. Entre los cordones de hepatocitos aparecen unas zonas poco teñidas que constituyen los sinusoides sanguíneos y que en algunos casos muestran la presencia de eritrocitos nucleados y células con

función defensiva (células de Kupffer). La presencia de conductillos biliares refleja su capacidad exocrina.

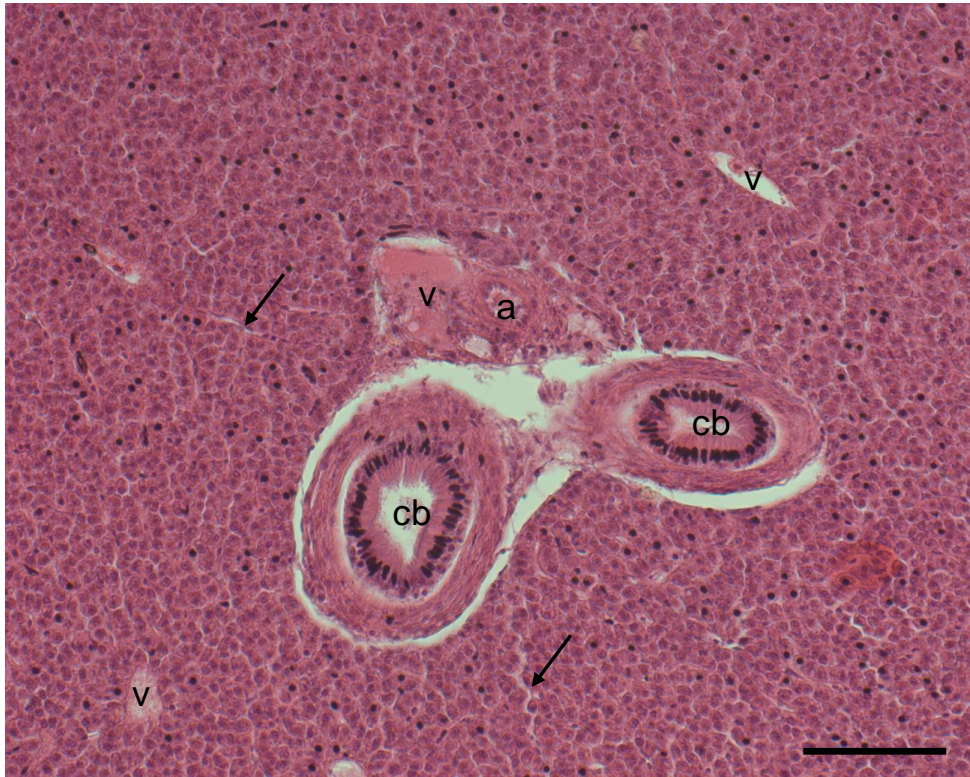


Figura 8. Micrografía del hígado de la tenca (*Tinca tinca*). Tinción de Hematoxilina-Eosina. Se observan sinusoides entre cordones de hepatocitos y un doble corte transversal de un conductillo biliar. Junto a este conductillo se observa una arteriola y una vena de diámetro mayor. En el resto del parénquima se observan varias venas donde confluyen los sinusoides. Barra de escala: 100 µm.

Además, la tenca presenta hepatopáncreas (Fig. 9), de forma que entre los hepatocitos existen algunas zonas más oscuras en tinciones de hematoxilina-eosina constituidas por acinos pancreáticos, correspondientes a la porción exocrina del páncreas. Dichas células presentan forma piramidal y gránulos de zimógeno en la porción apical, y se disponen rodeando los vasos derivados de la vena porta. Entre estos acinos encontramos de forma dispersa los islotes de Langherans con función endocrina.

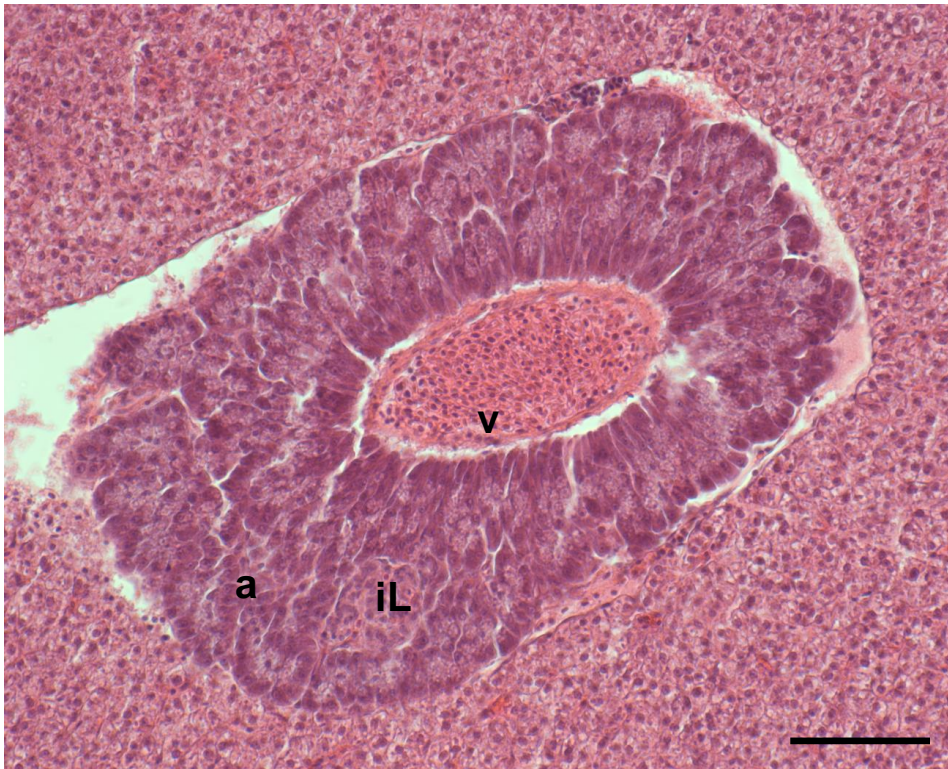


Figura 9. Micrografía del hepato-páncreas de la tenca (*Tinca tinca*). Tinción de hematoxilina-eosina. Se observa una sección donde se ponen de manifiesto abundantes hepatocitos (h) y la porción exocrina pancreática, de carácter acinar (ac) más teñida, rodeando un vaso portal (v) en cuya luz aparecen numerosos eritrocitos. Barra de escala: 100 μ m.

Desde un punto de vista comportamental, la tenca es una especie de carácter huidizo y gregario, sobre todo en aguas claras, sin refugio o sin la protección de vegetación acuática. No presenta comportamiento territorial o agresividad por el alimento o por el espacio y rara vez depreda sobre sus alevines o sobre los alevines de otros peces.

Habita principalmente en zonas poco profundas de lagos y charcas con preferencia por sustratos fangosos o arenosos (Rendón *et al.*, 2003) donde se puede encontrar vegetación sumergida que favorece su reproducción (Nordstrom, 2011). Esta tiene lugar en los meses finales de primavera y principio de verano, cuando la temperatura del agua supera los 20 °C (Podhorec *et al.*, 2012). Se requiere un mínimo de 10 °C de temperatura para el inicio de su desarrollo gonadal (Pimpicka, 1990). Realizan varias puestas a lo largo de estos meses y depositan sus huevos sobre la vegetación sumergida

a la que se adhieren rápidamente evitando así que caigan al sustrato donde serían enterrados fácilmente por los sedimentos.

Según Benzer *et al.* (2009, 2010), la tenca se podría considerar una especie omnívora habiendo hallado mayoritariamente en su tracto digestivo componentes del zooplancton, algunos organismos bentónicos como gusanos y caracoles, restos vegetales y detritus. Algunos autores consideran que la presencia de material vegetal en el intestino de las tencas es accidental y que estaría asociado a los invertebrados de los que sí que se alimenta de manera activa (Kennedy y Fitzmaurice, 1970). Michael y Oberdorff, (1995) afirman que la alimentación de los adultos se basa exclusivamente en macroinvertebrados acuáticos. Otros autores consideran que existe un componente vegetal en la dieta de la tenca, hallando una notable presencia de estos materiales en los tubos digestivos estudiados (Alas *et al.* 2009, Pérez-Bote, 1998). Su comportamiento alimenticio es nocturno (Perrow *et al.* 1996) aunque según Herrero *et al.*, (2003, 2005) se puede adaptar a un régimen de alimentación artificial diurno aun manteniendo su predisposición de locomoción y alimentación nocturnas.

La tenca presenta gran resistencia a bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el agua y cierto grado de eutrofización y se adapta bien a amplios rangos de temperatura y pH (Lukowicz y Proske, 1979; Rowe, 2004; San Juan, 1995; Steffens, 1995).

Comparada con otras especies piscícolas, la tenca presenta una baja incidencia de enfermedades siendo la prevalencia e intensidad de éstas también bajas (Svobodova y Kolarova, 2004).

Todo este conjunto de características hacen de la tenca una especie muy adecuada para la acuicultura existiendo actualmente un gran interés por parte de esta industria en todo el mundo como especie de consumo, como objeto de la pesca deportiva (García *et al.*, 2015; Gela *et al.*, 2006; Grosch *et al.*, 2000; Perdikaris *et al.*, 2010) y en menor medida, como especie ornamental (Kvasnička *et al.*, 1998). Esta demanda creciente por la tenca y otras especies de interés trae consigo la necesidad de una intensificación de los cultivos y la sustitución de las técnicas tradicionales menos productivas.

1.3. LA INTENSIFICACIÓN DEL CULTIVO

Cada vez resulta más complejo hacer una clasificación de los sistemas de cultivo de peces en base a su intensificación y sería aconsejable definirlos para cada especie de manera independiente. Además, los avances tecnológicos son tan rápidos que podríamos incluir grados de intensificación intermedios según los nuevos elementos de control y manejo que se incorporan en los sistemas.

No obstante, hay características generales a casi todos los sistemas de cultivo empleados hoy día en piscicultura. En la tabla I se han agrupado los niveles de intensificación que se podrían establecer y sus características más destacables.

La tenca se ha cultivado en Europa desde la Edad Media (Steffens, 1995) y su cultivo se ha desarrollado escasamente, manteniendo sistemas extensivos o semi-intensivos y, en la mayoría de ocasiones, en policultivo junto con especies de mayor valor comercial como la carpa (*Cyprinus carpio*). Varios autores han descrito experiencias en sistemas más intensificados, aunque no siempre con buenos resultados (Celada *et al.*, 2007b; Kamler *et al.*, 2006; Pantazis y Apokotou, 2009; Sierra *et al.*, 1995; Wolnicki y Myszkowski, 1998; Wolnicki *et al.*, 2006).

En España, al igual que en el resto de Europa, el cultivo industrial de la tenca también ha sido escaso y se ha mantenido de forma tradicional en Extremadura y otras Comunidades como las dos Castillas, Aragón y Cataluña, estando frecuentemente asociado a otros aprovechamientos del agua, como fines agrícolas o ganaderos (Claver y Díaz de la Lastra, 1983, Pérez-Bote *et al.* 1998).

Existen claros ejemplos de cultivo extensivo (Fig. 10), que ponen de manifiesto un aprovechamiento sostenible basado en la capacidad de carga del medio, consiguiéndose producciones modestas pero con el mínimo impacto ambiental (Pérez-Bote *et al.*, 1998).

Tabla I. Clasificación de los sistemas de cultivo de peces según su grado de intensificación.

Sistemas de cultivo	Extensivo	Semi-Intensivo	Intensivo	Hiper-intensivo
Reproducción	Natural en la propia instalación o siembra con ejemplares de otra instalación pero también obtenidos de forma natural. También alevines capturados en el medio ambiente.	Siembra con ejemplares procedentes de otra instalación. En algunos casos alevines capturados en el medio natural.	Generalmente reproducción controlada. En ocasiones modificación de ciclos reproductivos.	Reproducción controlada. Alevines con controles de calidad, en ocasiones procedentes de centros de cría garantizados.
Alimentación	Natural. En ocasiones tratamiento previo del sistema o fertilización para aumentar la capacidad de producción natural.	Alimento natural más aportación con grano, semillas o piensos artificiales.	Alimentación principalmente artificial, con piensos adaptados a la especie cultivada.	Estrictamente artificial. Específico para cada etapa de desarrollo. También alimento para reproductores. Adición de pre/probióticos.
Densidad	Muy baja, aunque depende de los requerimientos de calidad del agua de la especie cultivada y de la disponibilidad de alimento.	Baja, aunque dependiente de los requerimientos de la especie y de la disponibilidad de alimento.	Media o media/alta, dependiente de los requerimientos de la especie sobre todo respecto a la calidad del agua.	Alta/muy alta según requerimiento de la especie. Muy dependiente del control de calidad del agua.
VARIABLES ambientales	Ningún control. En ocasiones aportación de agua a demanda y/o sistemas de aireación.	Control de depredadores. Control de algunos parámetros como niveles de oxígeno disuelto.	Posible control técnico, de fotoperíodo, de parámetros como el oxígeno. Uso de equipos de oxigenación y sondas de medida.	Monitorización de calidad de agua. Aporte de oxígeno, corrección de pH y otras variables. Control de temperatura y fotoperíodo.
Selección de peces	Selección de especies adaptadas a la climatología del lugar. En algún caso selección por tamaños con vistas a la reproducción.	Separación de reproductores y engorde En algunos casos clasificación por lotes o por tamaño.	Selección de reproductores. Clasificación por lotes de tamaño/edad/sexo Diversificación de instalaciones según estado de desarrollo.	Selección genética de reproductores. Obtención de monosexos o incluso triploides. Clasificación por tamaños y fases de desarrollo.
Control de patologías	Escaso o nulo control.	Poco control. Eliminación de ejemplares enfermos sintomáticos. Adición de medicamentos a través del pienso en caso de enfermedad.	Controles rutinarios preventivos. Establecimiento de zonas de cuarentena. Eliminación de ejemplares afectados. Uso de piensos medicamentosos en caso de enfermedad.	Controles exhaustivos. Selección de peces resistentes. Campañas de vacunación. Aportación de inmunostimulantes en alimentos.



Figura 10. Charca de producción extensiva de tenca en Extremadura.

Es indudable que la intensificación de los cultivos puede suponer un alejamiento de las condiciones naturales en las que se desarrolla una especie y en consecuencia podemos pensar que se produce una pérdida o alteración de su bienestar. Pero antes de plantearnos cómo, en qué medida y por qué se puede ver afectado este bienestar debemos aclarar el alcance de este concepto.

1.4. EL BIENESTAR ANIMAL

Chandroo *et al.* (2004) opinaban que el concepto de bienestar puede llevar asociado connotaciones antropológicas (los sentimientos) que quizás no tengan cabida en el resto del mundo animal. Otros autores aplicaron el término de bienestar animal a aquellos grupos animales considerados con un nivel cognitivo mayor que el aceptado para los peces (Wood-Gushetal, 1981; Duncan, 1996). Estas conjeturas se basaban en algunas revisiones científicas que argumentaban que los peces carecen de la complejidad estructural del cerebro de vertebrados superiores, por lo que sería improbable que pudieran experimentar sensaciones de dolor, miedo o sufrimiento (Rose, 2002).

Según otros autores, no se trataría únicamente del estado de salud o del nivel de estrés que tiene un animal lo que indicaría su grado de bienestar, sino la posesión de una serie de capacidades cognitivas que forman la base de la sensibilidad (Duncan y Petherick, 1991; Curtis y Stricklin, 1991; Duncan, 1996). Por lo tanto, la sensibilidad sería un prerrequisito que deberían cumplir los animales para tener lo que hemos considerado estado de bienestar (Wood-Gush *et al.*, 1981; Duncan, 1996).

Debido a que los sentimientos son subjetivos, no pueden ser investigados directamente. Pero existen métodos indirectos para evaluar qué sienten los animales bajo las condiciones en que se mantienen y los procedimientos a los que están sometidos. Los numerosos estudios realizados sobre la fisiología y comportamiento de los peces, tanto en las distintas etapas de su ciclo de vida como en su relación con distintas situaciones medioambientales y las medidas de disfunción biológica, de disminución de la salud y del aumento del estrés fisiológico, pueden proporcionar una buena evidencia de la pérdida de bienestar en los animales (Duncan, 2005).

Los cambios en la fisiología de los animales o su respuesta conductual frente a distintos estímulos, al igual que sucede en humanos, pueden dar a una idea de lo que supondría la falta de bienestar animal (Flik, *et al.* 2006; Overli, *et al.*, 2001) y en base a este argumento se podría asumir la capacidad de experimentar dolor, miedo o sufrimiento, también por parte de los peces. No obstante, y aunque una amplia gama de estas características fisiológicas, bioquímicas o conductuales se utilizan, de hecho para evaluar el bienestar, ninguno de estos parámetros se considera fiable de forma aislada (Broom, 1997).

Poco a poco la comunidad científica y la sociedad en general ha asumido que los peces también pueden experimentar estas sensaciones que asociamos con el bienestar y el momento en que se ha tomado mayor conciencia sobre este aspecto ha coincidido con el mayor desarrollo en el sector de la acuicultura (Poli, 2009).

Organizaciones como FAWC (Farm Animal Welfare) basaron su definición de bienestar en los animales incluyendo a los peces en cinco pilares o "libertades" postuladas por el informe del Comité Brambell de 1965 que serían:

- El animal no sufre sed, hambre ni malnutrición, porque tiene acceso a agua de bebida y se le suministra una dieta adecuada a sus necesidades.

- El animal no sufre estrés físico ni térmico, porque se le proporciona un ambiente adecuado, incluyendo refugio frente a las inclemencias climáticas y un área de descanso cómoda.
- El animal no sufre dolor, lesiones ni enfermedades, gracias a una prevención adecuada y/o a un diagnóstico y tratamiento rápidos.
- El animal es capaz de mostrar la mayoría de sus patrones normales de conducta, porque se le proporciona el espacio necesario y las instalaciones adecuadas, y se aloja en compañía de otros individuos de su especie.
- El animal no experimenta miedo ni distrés, porque se garantizan las condiciones necesarias para evitar el sufrimiento mental.

Otros autores como Fraser *et al.* (1997) opinaban que el bienestar de los animales se podría sustentar en tres pilares básicos que serían:

- La posibilidad de expresar algunas conductas naturales y desarrollar sus capacidades y adaptaciones al medio.
- Un estado emocional del animal saludable (evitando emociones negativas tales como el dolor y el miedo).
- Un adecuado funcionamiento del organismo (en aspectos relativos a su salud física, su nutrición, y crecimiento).

Y estas mismas premisas fueron adoptadas por algunos organismos oficiales tales como la OIE (Organización Internacional de Epizootias - Organización Mundial de Sanidad Animal) considerando que un animal se encuentra en un estado satisfactorio de bienestar cuando está sano, confortable y bien alimentado, puede expresar su comportamiento innato, y no sufre dolor, miedo o distrés (OIE, 2008).

Siendo la OIE la Organización Internacional de referencia para la sanidad animal, los Países Miembros de la Unión Europea encargaron a esta entidad que asumiera el liderazgo en este área y elaborase recomendaciones y directrices que recogieran las prácticas en el bienestar animal.

En 1998, la Unión Europea estableció, mediante la Directiva del Consejo 98/58/EC, la Ley de estándares mínimos para la protección de animales criados en granjas, incluidos los peces.

El Tratado de Ámsterdam, que entró en vigor en mayo de 1999, reflejó la preocupación de la sociedad sobre este tema y a partir de entonces la evaluación del bienestar de los animales se convirtió en un objetivo de investigación principal para la comunidad científica.

En febrero de 2004, la OIE organizó la primera Conferencia Mundial sobre bienestar animal. Poco después publicó las “Recomendaciones sobre Bienestar de Peces Cultivados” que fueron adoptadas por el Comisión Europea en 2005 (Código Sanitario para Animales Acuáticos, OIE, 2017). Este documento es revisado cada poco tiempo y en él se van incorporando los nuevos avances científicos, aunque mantiene año tras año algunas de sus recomendaciones como la que sigue:

“La evaluación científica del bienestar de los peces de cultivo abarca una serie de elementos científicos y de juicios de valor que deben tomarse en consideración conjuntamente y el proceso de esta evaluación debe ser lo más explícito posible”. (Apartado 2b de Principios Básicos. Artículo 7.1.1 del Capítulo 7.1 del Código Sanitario para Animales Acuáticos. 2017 ©OIE - Código Sanitario para los Animales Acuáticos).

Aún así, los avances científicos en este campo a día de hoy siguen siendo escasos, como podemos comprobar por el número de publicaciones SCI realizadas en los últimos años. Se han llegado a generar un total de 160 publicaciones en 2016, siendo este número inferior a la media de publicaciones en otros campos científicos (ISI Web of Science®, enero de 2018).

Como factor más común entre los estudios científicos relacionados con el bienestar en los peces encontramos el estrés, aunque no siempre supone una pérdida del bienestar.

1.5. EL ESTRÉS COMO MEDIDA DE BIENESTAR

El concepto de estrés, para algunos autores supone la pérdida del equilibrio homeostático de un organismo a consecuencia de la acción individual o combinada de estímulos extrínsecos e intrínsecos denominados agentes estresantes (Barton e Iwama, 1991a; Iwama *et al.*, 2006; Chrousos, 2009). Asimismo, la respuesta a una situación

comprometida lleva asociada una serie de reacciones comportamentales y fisiológicas en pro de recuperar el equilibrio homeostático perdido. Los agentes estresantes afectan directa e indirectamente a los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario del animal, interconectados gracias a neuropéptidos, hormonas y moléculas como las citocinas respectivamente. El resultado es una compleja red de señales químicas sometidas a la modulación por factores externos (Tort *et al.*, 1998).

El término "homeostasis" ya fue empleado por algunos filósofos griegos para definir el principio de equilibrio de la vida. Sinónimo de armonía para Pitágoras o de isonomía para Alcmeón de Crotona (siglo VI a. C.), fue introducido por Cannon (1929) en los estudios sobre fisiología del estrés para describir los mecanismos que intervienen en el mantenimiento de un equilibrio físico-químico esencial.

Poco después, el endocrinólogo Hans Selye, (1936) introdujo el término estrés y estresante dentro de la investigación biomédica. Selye opinaba que ante cualquier agente agresor, el organismo reacciona de forma simultánea con dos tipos de respuestas, unas atípicas independientemente del tipo de estímulo y que son siempre las mismas y otras dependientes del estímulo estresor. En 1946, Selye definió el **Síndrome de Adaptación General** (GAS), que se podría dividir en 3 fases:

- **Fase 1.** Reacción de alarma inicial, con una rápida activación del eje hipotálamo-simpático-cromafín, que supondría un incremento en la concentración de catecolaminas (adrenalina/noradrenalina) en el tejido cromafín de la médula adrenal, por estimulación de terminaciones nerviosas preganglionares simpáticas. También se produce una activación de la secreción de noradrenalina en los terminales nerviosos simpáticos. Las catecolaminas actúan sobre un amplio rango de funciones fisiológicas como son, la activación de la capacidad motora, aumento del ritmo cardíaco y del flujo sanguíneo hacia los órganos fisiológicamente más activos, estimulación de la captación y transporte de oxígeno, alteraciones en el metabolismo intermediario con un aumento de la glucosa plasmática a partir del glucógeno del hígado (glucogenolisis) y la síntesis de nueva glucosa a partir de ácidos grasos libres en tejido adiposo (gluconeogénesis).
- **Fase 2.** Fase de resistencia. En el caso de que la situación de estrés sea prolongada, el organismo debe adaptarse y los niveles de catecolaminas deberían volver poco a poco a valores similares a los de la situación de partida. Durante esta fase se activa el eje

hipotálamo-hipófisis-adrenal y como consecuencia, se produce la liberación de corticoides en la corteza adrenal. Estos actúan más lentamente que las catecolaminas manteniendo esta fase de manera más prolongada. Entre otras actividades, los corticoides también estimulan la síntesis de las propias catecolaminas a nivel del tejido cromafín, ayudando a mantener sus niveles altos durante más de tiempo.

- **Fase 3.** Fase de agotamiento. Si la situación de estrés se prolonga aún más, los efectos de altos niveles de cortisol y de la activación del metabolismo para superar la situación de estrés terminarán afectando a otros procesos fisiológicos que podrían llegar a ser negativos e incluso letales para el organismo.

Según esta definición, el estrés es una respuesta adaptativa frente a una amenaza y tienen por finalidad preservar la integridad del individuo. Pero cuando el estrés se convierte en crónico o prolongado, se producen otros efectos que pueden llevar asociados una pérdida o alejamiento del estado de bienestar. El mismo Selye (1985) planteó la diferencia entre “eustrés” o estrés beneficioso y “diestrés” o estrés perjudicial.

Otros autores posteriormente comprobaron la existencia de una relación directa entre la duración e intensidad del estímulo estresante y el paso de una respuesta adaptativa a otro tipo de respuesta maladaptativa (Pickering, 1989; Pickering y Pottinger, 1989). En este sentido podemos establecer una diferencia entre estrés agudo, cuando el agente estresante afecta durante poco tiempo (apenas minutos o pocas horas) y la recuperación de este episodio también es breve, y por otro lado, hablaremos de estrés crónico cuando el estímulo es continuado en el tiempo (Pickering *et al.*, 1982).

Según McCormick *et al.* (1998) si los episodios de estrés agudo se repitiesen en espacios cortos de tiempo pueden tener efectos similares a los considerados en los casos de estrés crónico, como por ejemplo el retraso en el crecimiento.

Wedemeyer (1996) consideró que la respuesta al estrés en peces se podría dividir en tres fases o niveles de actuación (Fig. 11):

- **Respuesta primaria:** En la que se liberan catecolaminas, corticoides y hormonas que producen tanto la activación de los ejes hipotálamo-simpático-cromafín como el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal.

El tejido interrenal es equivalente, en peces, a la glándula adrenal antes mencionada, que presentan los mamíferos. Este tejido, que se localizan en capas, cordones o grupos aislados a lo largo de la vena cardinal y riñón cefálico, produce y secreta adrenalina y también hormonas esteroideas bajo el control de dos hormonas adenohipofisarias, la ACTH y la hormona melanotropa, y otras tantas sustancias que actuarían como moduladores (Wendelaar Bonga, 1997).

- **Respuesta secundaria:** Como resultado de esta liberación, se producirán cambios a nivel fisiológico, metabólico y tisular, que incluyen un aumento del ritmo cardiaco, movilización de los substratos energéticos y desequilibrio hidromineral.
- **Respuesta terciaria:** Cuando el estrés es prolongado se pueden llegar a producir ciertos efectos negativos, como retraso en el crecimiento, mayor sensibilidad a enfermedades, disminución de la capacidad reproductora, etc. Otros autores consideraban además, dentro de esta respuesta terciaria, la pérdida de capacidad para afrontar nuevas situaciones estresantes (Wendelaar-Bonga, 1997; Schreck, 2000).
- Por último, cuando las consecuencias de la respuesta terciaria sobrepasan un nivel individual y comienzan a afectar a poblaciones enteras e incluso al nivel de ecosistemas podríamos estar hablando de un tipo de **Respuesta cuaternaria** aunque determinados autores las consideran dentro de las respuestas terciarias.

Ciertos autores defienden además que la capacidad de respuesta al estrés, en sus diferentes niveles, depende de múltiples factores y puede variar entre distintas especies o incluso para cada individuo dentro de una misma especie (Pankhurst y Van Der Kraak, 2000; Trenzado *et al.*, 2003). No podemos olvidar que existen más de veinte mil especies de teleósteos que habitan el planeta, con una amplia gama de rasgos fisiológicos y comportamentales y que pueden mostrar un amplio abanico de respuestas ante situaciones de estrés. En este sentido, en la figura 9 se muestra de forma general la influencia de la duración de un estímulo estresante sobre las diferentes fases de la respuesta de estrés. La mayoría de las especies de peces cultivados son teleósteos (Evans *et al.*, 2005) y comparativamente sólo en un pequeño número de ellos la respuesta de estrés ha sido estudiada con profundidad. Por lo tanto, es aconsejable que las generalidades a este respecto sean utilizadas con la cautela adecuada.

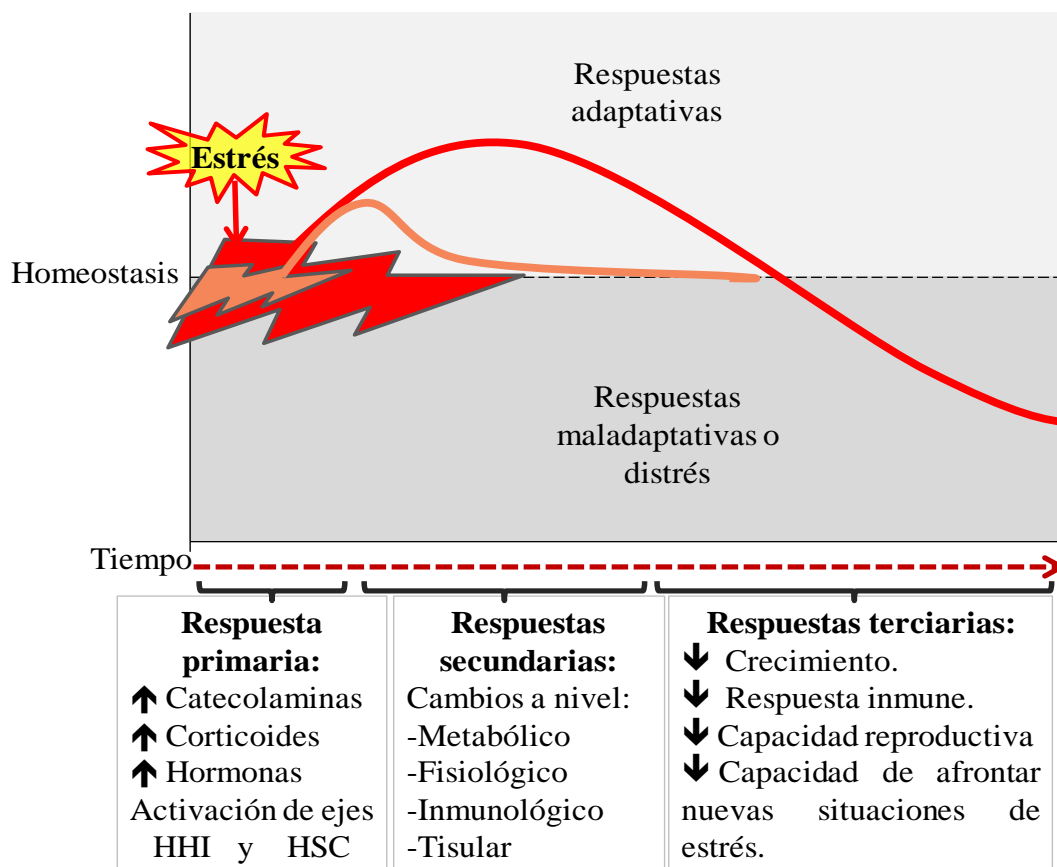


Figura 11. Efecto de los distintos estímulos estresantes en relación a su duración y tipo de respuestas: En naranja respuestas primaria y secundaria ante estrés agudo, en rojo respuestas primaria, secundaria y terciaria ante un estrés prolongado o crónico. HHI (Hipotálamo-Hipófisis-Interrenal), HSC (Hipotálamo-Simpático-Cromafín).

No obstante podemos comprobar que a día de hoy existe una extensa literatura sobre la biología del estrés en los peces y las distintas respuestas fisiológicas y comportamentales de éstos ante una amplia variedad de factores de estrés, ya sean físicos, químicos o biológicos, muchos de ellos presentes de manera frecuente en la práctica de la producción acuícola (Wendelaar-Bonga, 1997; Iwama *et al.*, 1997; Barton, 2002; FSBI, 2002; Conte, 2004).

El principal objetivo en la acuicultura es la correcta adaptación del animal a las condiciones de cultivo. Esta adaptación debe permitir el mantenimiento en cautividad, el crecimiento adecuado y la reproducción de la especie (Van Weerd y Komen, 1998; Weyts *et al.*, 1999).

Algunos autores han planteado más recientemente que el término de estrés debería ser empleado exclusivamente para las condiciones en las que la demanda de respuesta excede la capacidad natural de un organismo para hacer frente a situaciones impredecibles e incontrolables (Koolhaas *et al.*, 2011). Estos autores observaron que ciertas respuestas fisiológicas ante estímulos que se entenderían como gratificantes o placenteros no se consideran estrés, pero pueden tener la misma dimensión que otras respuestas ante estímulos inesperados con efectos negativos. En este sentido, las medidas de valoración del bienestar animal en la acuicultura estarían generalmente relacionadas con la respuesta terciaria al estrés y generalmente asociadas con situaciones de estrés de tipo crónico (Barton, 2002; Conte, 2004).

1.5.1. Cambios hormonales relacionados con el estrés

Los procesos fisiológicos básicos en todos los vertebrados están regulados por señales endocrinas, principalmente promovidas por las hormonas tiroideas y los corticosteroides.

En peces teleósteos las hormonas tiroideas regulan muchas funciones importantes tales como el crecimiento, el consumo de oxígeno, el metabolismo de nutrientes y la metamorfosis en peces (Eales, 2006; Blanton y Specker, 2007). Las hormonas tiroideas T3 (3,5,3'-triyodotironina) y T4 (tiroxina, 3,5,3'5'-tetrayodotironina) son los productos finales del eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo (HPT) en el cual, la hormona liberadora de tirotrina (TRH) hipotalámica provoca la liberación de hormona estimulante del tiroides (TSH) hipofisaria, que a su vez desencadena la liberación de hormonas tiroideas (Bernier *et al.*, 2009). En condiciones normales, la glándula tiroides secreta la pro hormona T4 que debe convertirse en la hormona biológicamente activa T3 mediante la eliminación de un átomo de yodo (Eales y Brown 1993).

El eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (HPI) por otra parte, controla la liberación del cortisol procedente de las células interrenales del riñón cefálico, gracias a la reacción de liberación en cadena de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) hipotalámica y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de la hipófisis.

Las hormonas tiroideas y el cortisol, están implicadas en la osmorregulación en los teleósteos y una comunicación bidireccional entre estos sistemas endocrinos es una necesidad para la integración y el funcionamiento adecuado de ambos sistemas (Geven *et al.*, 2009).

Varios factores bióticos y abióticos pueden afectar también a la liberación de hormonas tiroideas (Grau, 1988; Peter, 2011). En este sentido, se han encontrado resultados contradictorios con respecto a los efectos del cortisol sobre los niveles de las hormonas tiroideas. Así, diferentes tipos de estrés o tratamiento con cortisol disminuyen los niveles plasmáticos de T4 y/o T3 en diversas especies de peces (Pickering, *et al.*, 1982; Redding, *et al.*, 1984; Vijayan, *et al.*, 1990; Brown, *et al.*, 1991; Coimbra and Reis-Henriques, 2007; Arjona, *et al.*, 2011). En cambio, el cortisol estimuló la conversión de T4 a T3 en el hígado de la trucha de arroyo, *Salvelinus fontinalis*, *in vitro* (Vijayan *et al.*, 1988) y en el hígado del fúndulo, *Fundulus heteroclitus* (Orozco *et al.*, 1998). Según Walpita *et al.* (2007) El cortisol disminuyó la capacidad hepática de transformar la T4 en T3 pero no se vio afectada esta capacidad en otros órganos como las branquias, el riñón o el cerebro de tilapia.

1.5.2. Alteraciones en el equilibrio osmótico debidas al estrés

Variaciones en los niveles de iones y en la actividad de las enzimas asociadas a procesos osmorreguladores en sangre, pueden ser también indicadoras de la salud general de los peces (McDonald y Milligan, 1997; Vijayan, *et al.*, 1997) y consideradas como parte de la respuesta primaria a episodios de estrés.

Aunque en los vertebrados terrestres el estrés tiene muchos efectos perturbadores sobre el balance hidromineral, en los animales acuáticos primarios, como los peces, el impacto sobre la homeostasis iónica es mucho mayor y, de hecho, éste es uno de los aspectos más característicos del estrés en los peces, debido a la relación tan estrecha existente entre los fluidos internos y el medio acuático a través de las branquias (Wendelaar Bonga, 1997). Según en el medio que nos encontremos podemos observar un incremento en la osmolaridad del plasma en medios marinos o hipertónicos o decremento en medios hipotónicos o dulceacuícolas como respuesta al estrés (Robertson, 1988).

Los peces de agua dulce regulan la osmolaridad de la sangre y de los tejidos excretando el exceso de agua vía renal e incorporando sales gracias al transporte activo de Na^+ , K^+ y Cl^- hacia la sangre mediante las células cloruro-branquiales. Este proceso conlleva la activación de la enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ que está íntimamente involucrada en el equilibrio electrolítico y consecuentemente en la osmorregulación. Pueden ser muchos los factores estresantes que afectan al equilibrio iónico de los peces (Bonga, 1997; Postlethwaite y McDonald, 1995) y la ausencia de mineralocorticoides específicos en los peces sitúa al cortisol en un papel crucial en la regulación del equilibrio iónico (Mommsen *et al.*, 1999).

1.5.3. Efecto del estrés a nivel hematológico

Según algunos autores, a través de determinados parámetros hematológicos resulta relativamente sencillo establecer el estado fisiológico de un organismo. Se podría decir que son buenos indicadores del bienestar y la salud de los peces e, indirectamente, de las condiciones ambientales (Ivanc *et al.*, 2005; Rey Vázquez, 2007; Fazio *et al.*, 2015).

En respuesta a problemas ecológicos y fisiológicos de los peces, situaciones de estrés en definitiva, se producen cambios importantes en la composición de su sangre, como fluctuaciones en los niveles de glóbulos rojos, glóbulos blancos, hormonas, hematocrito (Ht), concentración de hemoglobina (Hb), y otros parámetros sanguíneos (Satheeshkumar, 2010). Se ha puesto de manifiesto que la adrenalina genera desequilibrios iónicos también en las células sanguíneas, produciendo absorción de agua y aumento de su tamaño con lo que su número disminuye (Nikinmaa *et al.*, 1981; Nikinmaa *et al.*, 1982) y con ello el valor del hematocrito.

Es imprescindible, por ello, conocer el estado de estos parámetros en condiciones normales y las posibles variaciones naturales en cada especie para poder determinar en qué momento se puede considerar que una alteración en sus niveles está asociada con una pérdida de bienestar o de salud en los peces (Roche *et al.*, 2003).

Además de las diferencias interespecíficas, es posible encontrar también variaciones debidas, por ejemplo, a la metodología de muestreo empleada, al tamaño de

los peces, a las variaciones entre cepas de una misma especie, a la estación del año o estado del ciclo biológico, la condición fisiológica, etc., y por tanto es difícil encontrar parámetros sanguíneos que de manera individual sean realmente útiles en estudios de bienestar (Manera y Britti, 2006).

1.5.4. El metabolismo energético

Durante la respuesta primaria al estrés, la adrenalina y el cortisol hacen aumentar el nivel de glucosa en sangre gracias principalmente a la activación de la glucogenolisis en el hígado y aunque la adrenalina desaparece poco tiempo después, los niveles de glucosa se mantienen elevados, previsiblemente por efecto de cortisol, que permanece durante más tiempo (Iwama, *et al.*, 2006). También se produce la inhibición de la síntesis de proteínas con un aumento de la disponibilidad de aminoácidos y una activación de las vías catabólicas promovidas por las enzimas aminotransferasas (Davis *et al.*, 1985; Van der Boon *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1989, Mommsen *et al.*, 1999), con el fin de proveer de energía suficiente al organismo para superar la situación estresante.

Algunos metabolitos como el lactato y la glucosa en el plasma son útiles indicadores metabólicos y energéticos del estrés (Tort *et al.*, 1994), aunque en el caso de estrés crónico parece no haber alteraciones en el caso del lactato (Barandica, 2010).

El contenido en el plasma de otros compuestos como colesterol (HDL y LDL), lipoproteínas, triglicéridos y proteínas totales puede también ser indicativo de la alteración de diversas funciones fisiológicas en los peces como consecuencia de exposición a situaciones estresantes. (Ajani, 2015; Cileček, 2011; Mareš *et al.*, 2007; Wagner y Congleton, 2004).

En peces cultivados sometidos a condiciones de alta densidad puede aparecer competencia por el espacio, por el refugio o por los alimentos de manera continuada, lo que podría suponer un mayor gasto de energía que también podría desencadenar la activación de algunas vías metabólicas como la gluconeogénesis y la glucólisis (Vijayan *et al.*, 1990).

1.5.5. Efecto del estrés en el crecimiento e índices biométricos

De todos los aspectos que podrían verse afectados por situaciones de estrés crónico y por lo tanto que afectarían directamente al bienestar de los animales, quizás el más relevante desde un punto de vista práctico, sería el crecimiento (Barton *et al.*, 1987, Pickering *et al.*, 1991; Pankhurst y Van der Kraak, 1997; McCormick *et al.*, 1998).

Con frecuencia se emplean diversos índices biométricos para conocer el estado de salud/bienestar de los peces ya que se presupone que una desviación en estos índices puede indicar un desequilibrio o una adaptación a unas condiciones externas distintas. Ante una situación de estrés, se producirá una movilización de las reservas energéticas, puede haber un cese de la correcta alimentación y esto se verá reflejado, en poco tiempo, en una reducción del índice de condición u otros índices similares que relacionen medidas de peso y longitud. Otros índices organosomáticos muy utilizados serían el índice hepatosomático (IHS), el índice gonadosomático (IGS), el rendimiento de la carcasa u otros tantos. Una variación en los valores normales en estos índices indicaría una desviación de energía y una modificación de la actividad en determinados órganos o tejidos para combatir una situación de estrés.

1.5.6. Alteraciones del estado oxidativo debidas al estrés

Como ya se ha mencionado, las respuestas secundarias a situaciones de estrés suponen, entre otras, una notable alteración metabólica general. El oxígeno, imprescindible para llevar a cabo gran parte de las reacciones metabólicas en organismos aerobios, termina siendo transformado en una serie de moléculas conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS), capaces de ocasionar daños a nivel molecular y celular. Los organismos aerobios han conseguido mitigar estos posibles daños gracias a mecanismos de defensa representados por pequeñas moléculas antioxidantes y un amplio repertorio de enzimas antioxidantes como pueden ser la superóxido dismutasa (SOD), que acelera la transformación del oxígeno reactivo (O_2^-) en agua oxigenada (H_2O_2), o la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), que se encargan de convertir esta H_2O_2 en H_2O . Además del oxígeno reactivo procedente de

metabolismo aerobio existen otras especies químicamente independientes (moléculas o átomos) denominadas radicales libres, caracterizadas por poseer uno o más electrones desapareados en su último orbital (Halliwell *et al.*, 1989) y por tener un efecto muy similar al que causan los ROS.

Cuando el mecanismo defensivo del organismo se ve superado por el efecto de las especies reactivas del oxígeno procedentes del metabolismo aerobio y del resto de radicales libres se produce lo que conocemos como daño o estrés oxidativo (Sies, 1986) (Fig. 12).

Las células dañadas pueden detener su crecimiento, pueden morir por apoptosis sin efecto para las células y tejidos circundantes o pueden llegar a ocasionar necrosis a niveles muy altos de estrés oxidativo, con pérdida de la integridad de las membranas acompañada de una respuesta inmunitaria inflamatoria que también puede dañar las células y tejidos adyacentes (Davies, 2000).



Figura 12. Representación esquemática del balance entre la generación de radicales libres y los sistemas de defensa y reparación antioxidantes.

Las situaciones de estrés, además de incrementar la producción de especies reactivas del oxígeno, como ya se ha comentado, disminuyen la capacidad reparadora lo que se sumaría a los efectos negativos sobre el bienestar de los animales.

1.5.7. Sistema inmune en peces y estrés

El sistema inmune en los animales tiene por objetivo primordial mantener al margen a otros organismos que pueden llegar a ser patógenos. Estos sistemas son más complejos cuanto mayor es el grado evolutivo. Así los invertebrados poseen únicamente un Sistema Inmune Innato, representado por componentes celulares con capacidad fagocítica, y otros componentes humorales (Janeway, *et al.*, 2005). En cambio los vertebrados tienen además un nivel mayor de complejidad denominado Sistema Inmune Adquirido y Adaptativo, representado principalmente por los linfocitos T, linfocitos B y los anticuerpos que tienen la capacidad de reconocer de forma específica un antígeno y de recordar la exposición a este antígeno en posteriores exposiciones .

Los peces presentan una respuesta inmune tanto innata como adquirida muy similar a la que encontramos en mamíferos, aunque su condición de animales poiquilotermos hace que su respuesta adaptativa sea mucho más lenta, y por lo tanto, que su respuesta innata inespecífica deba estar bien desarrollada (Ellis, 1988).

En la acuicultura, las patologías son uno de los factores limitantes más importantes y se cree que la inmunidad innata de los peces juega un papel primordial en la resistencia a las enfermedades. Varios parámetros de la respuesta inmunitaria innata, como la actividad de "explosión respiratoria" (burst activity), la actividad hemolítica, la actividad lisozima, la activación del sistema de complemento o la concentración de inmunoglobulina M (IgM) total, están asociados con la resistencia a enfermedades (Ellis 1999, 2001).

De nuevo observamos que el estrés en peces puede causar una gran diversidad de respuestas, también en cuanto al efecto sobre su sistema inmune se refiere.

Otro aspecto importante a remarcar en cuanto a la relación del estrés con las respuestas a nivel neuroendocrino e inmunológico es que existen moléculas como citoquinas y los neuropéptidos que participan como mensajeros en ambos sistema con

las interacciones que esto conlleva. Otro elemento importante a considerar es que el riñón cefálico desempeña un papel fundamental en la organización de la respuesta al estrés también en ambos sistemas.

Se pueden encontrar ejemplos de efectos supresores del sistema inmune ante situaciones de estrés (Costas *et al.*, 2011), pero también encontramos efectos de activación de este sistema inmune innato bajo estrés agudo (Demers y Bayne, 1997, Marlowe *et al.*, 2009) y ello dependerá de múltiples factores como la duración del estímulo, la intensidad del mismo, la situación previa respecto del estado sanitario, etc. Eslamloo *et al.* (2014), por ejemplo, encontraron una activación del sistema inmune innato durante los primeros momentos tras estrés agudo pero una depleción general del sistema inmune innato trascurridos varios días bajo la situación de estrés agudo repetitivo. Ante situaciones de estrés crónico se ha demostrado una disminución generalizada de la respuesta inmune (Einarsdottir *et al.*, 2000) con una consecuente reducción de la resistencia a enfermedades (Pickering, 1992; Bálsamo, 1997).

Algunos autores han llegado a mostrar resultados con activación o supresión del sistema inmune como respuesta a un mismo agente estresante (Dhabhar, 2002, 2008) dependiente de otros condicionantes.

Según Tort, (2011) podemos encontrar algunos rasgos que son característicos de la respuesta al estrés, y que incluyen, por ejemplo, reducción en tamaño del timo, el bazo u otras estructuras linfáticas, variación en el número y la distribución de glóbulos blancos en el cuerpo, o la aparición de sangrado o úlceras en el sistema digestivo.

Por último, hay autores que consideran que las situaciones de estrés en los peces alteran gran número de parámetros inmunes difíciles de identificar debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos involucrados, si comparamos con lo que se conoce en vertebrados superiores (Barandica, 2010).

1.5.8. El efecto del estrés sobre la capacidad reproductiva de los peces

Los sistemas nervioso y endocrino integrados en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal coordinan el proceso reproductivo en los peces. Las señales que recibe el

cerebro son procesadas para provocar la liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo. Esta GnRH llega a la hipófisis (o glándula pituitaria) donde activa la liberación de Gonadotropinas, la GtH-I y la GtH-II, estructuralmente similares a la hormona estimulante del folículo (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) de mamíferos, respectivamente (Quérat, 1994). Estas hormonas gonadotropas llegan a través del torrente sanguíneo a las gónadas y en las células de la teca actúan regulando la producción de los esteroides Testosterona y 17β -Estradiol en los testículos y ovarios respectivamente. Las células de la teca sintetizan testosterona que, en respuesta a la estimulación por las gonadotropinas, es aromatizada a estradiol en las células de la capa granulosa (Adachi *et al.*, 1990). En el caso de las hembras, el 17β -Estradiol llega al hígado para activar la secreción de vitelogenina, fundamental en el proceso de vitelogénesis (Nagahama, 1994).

Hemos visto como el estrés afecta al estado fisiológico general de los peces y que también juega un papel clave en su capacidad reproductiva (Haddy y Pankhurst, 1999; Schreck, 1981, 2010). La mayoría de los estudios relacionados con la endocrinología reproductiva se centran en los componentes endocrinos clásicos como son la Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), las gonadotropinas o los esteroides sexuales gonadales. Sin embargo, cada vez es más evidente la importancia de las moléculas implicadas en la respuesta al estrés sobre la reproducción y viceversa. Aunque los informes sobre los efectos inhibitorios y estimulantes de los corticosteroides y el estrés sobre la reproducción son a veces controvertidos (Milla *et al.*, 2009).

Los niveles plasmáticos de corticosteroides varían mucho a lo largo del ciclo reproductivo de los peces. En concreto, algunas especies de peces muestran aumento considerable en los niveles plasmáticos de cortisol durante el período previo al desove o durante el desove (Wingfield, 1977; Noaksson *et al.*, 2005). Además se han podido observar niveles mayores en peces maduros que en inmaduros lo que haría pensar que el cortisol juega un importante papel en la maduración gonadal (Milla *et al.*, 2009), proceso que además se ve acompañado por otros cambios metabólicos, también promovidos por el cortisol, como el catabolismo de los aminoácidos en el hígado y la gluconeogénesis con la finalidad de conseguir el sustrato energético necesario para hacer frente al estrés de la migración, de la defensa de los nidos o de otros comportamientos reproductivos.

Otros autores han comprobado cómo durante la maduración sexual en machos, el estrés puede suponer una alteración en los niveles de los andrógenos testosterona y 11-ketotestosterona. Se observó que tratamientos con cortisol sobre peces no estresados producen un efecto similar (Foo y Lam, 1993), lo que vendría a corroborar la implicación del eje HHI en este mecanismo de control. En el caso de las hembras ocurre de forma similar, y el cortisol provoca una reducción de los esteroides circulantes, estradiol y testosterona y también de la vitelogenina (Gerriero y Ciacia, 2006). Pottinger *et al.* (1991) comprobaron que la administración de cortisol a peces maduros suponía una reducción de los niveles de Estradiol (E2) y de Vitelogenina, en cambio, en peces inmaduros solo causaba la reducción de vitelogenina y no de E2. Sugerían que el cortisol afectaría a la unión del receptor específico de E2 en el citoplasma de células hepáticas, inhibiendo la síntesis en estas de la Vitelogenina.

Flores Quintana (2002) proponía que el estrés puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la liberación de GnRH que puede estar condicionado por el aumento de la Hormona Liberadora de Corticotropinas (CRH), La Hormona Adrenocorticotropa (ACTH), vasopresina y determinados opioides. La disminución de GnRH y de todas las funciones del eje gonadotrópico durante el estrés crónico genera importantes respuestas adaptativas que favorecen las funciones de mantenimiento de la homeostasis en detrimento de las funciones reproductivas. Los glucocorticoides elevados pueden modificar la sensibilidad a FSH y LH por parte de sus respectivos órganos blancos y suprimir los procesos endócrinos que actúan sobre la maduración sexual, disminuyendo los niveles de testosterona (Pickering, *et al.*, 1987; Kubokawa *et al.*, 1999), el tamaño de gónadas y por lo tanto, afectando al índice gonadosomático (Pickering, 1989). Además se registra una reducción de los receptores para estrógenos en el hígado, lo que afecta indirectamente la síntesis de vitelogenina (Pottinger y Pickering, 1990).

Algunos autores concluyen que es difícil separar los efectos del cortisol en la regulación del proceso reproductivo de los que son propios de respuesta a situaciones estresantes de otra índole (Small *et al.*, 2008). Como se puede ver en el siguiente esquema (Fig. 13) existe una importante interconexión entre los sistemas de control de los ejes Hipotalámico-hipofisario-interrenal e Hipotalámico-hipofisario-gonadal.

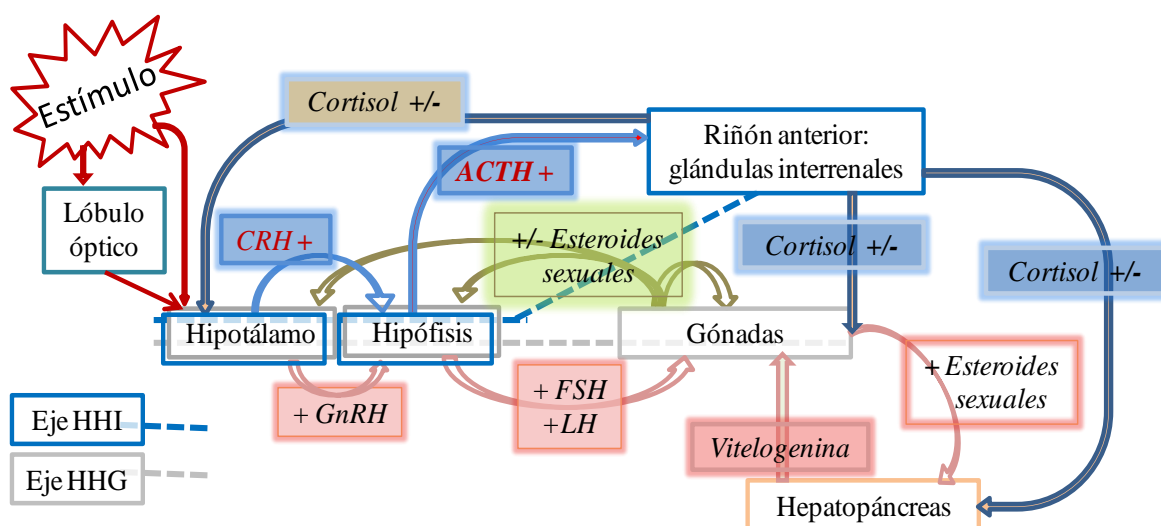
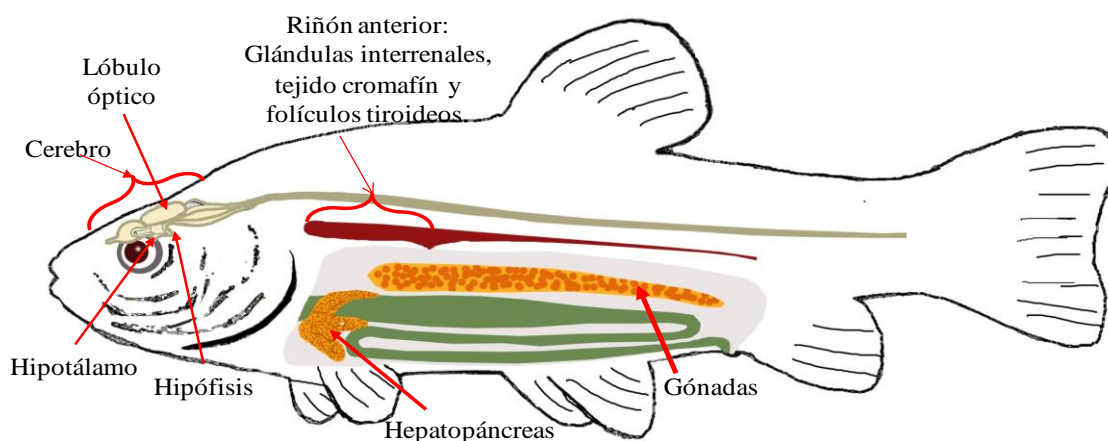


Figura 13. Interrelación de los sistemas nervioso y endocrino frente al estrés y la capacidad reproductora de los peces.

1.6. NUTRICIÓN Y ESTADO DE BIENESTAR DE LOS PECES

Los peces en cultivo se enfrentan en ocasiones al desafío de una alimentación inapropiada, en ocasiones porque los requisitos nutricionales precisos para una especie concreta no se han determinado adecuadamente, porque estos requisitos son excesivamente costosos o difíciles de adquirir o por causa de la degradación de los nutrientes que se produce durante el procesado y almacenamiento del alimento (Harper

et al., 2009). Para la mayoría de especies en cultivo se conocen los requerimientos básicos a la hora de formular sus dietas específicas, pero los datos sobre bio-disponibilidad de los nutrientes no están tan claros en todos los casos y se limitan a unas pocas especies (Oliva-Teles, 2012).

La dieta y el estado nutricional se consideran de los factores más importantes para los cultivos acuícolas, tanto por los costes directos que supone para la producción como por su repercusión sobre estado fisiológico de los animales.

Aspectos como el aporte insuficiente de algunos nutrientes, un desequilibrio de estos en la dieta, una estrategia alimentaria inadecuada, o alimentos mal conservados pueden provocar directamente periodos de anorexia o pueden llegar a tener un gran impacto sobre la función digestiva. Igualmente, situaciones de estrés ambiental pueden provocar el cese de la alimentación y la movilización de sustratos energéticos para suplir las necesidades del organismo para recuperar el equilibrio homeostático.

La digestión y la utilización metabólica de los nutrientes en diferentes alimentos o las interacciones entre estos nutrientes pueden ser distintos entre especies y están relacionadas con los propios hábitos alimenticios naturales de éstas. Por ejemplo, los peces carnívoros y herbívoros difieren en su capacidad para usar carbohidratos complejos o piensos vegetales (Oliva-Teles, 2012).

El estado nutricional puede influir directamente sobre el estado energético y además puede condicionar la resistencia al estrés y a enfermedades (Barandica, 2010). En muchos casos las enfermedades en peces están promovidas por una situación de estrés acompañada de una deficiente alimentación (Lall, 2000). Por ejemplo, ante una situación de inanición se puede hacer evidente histológicamente un descenso en las reservas de glucógeno hepático, no solo como resultado del aumento del gasto energético en relación con la ingesta, sino también debido al estrés provocado por esta situación, que induce la glucogenolisis mediada por corticosteroides (Barton y Schreck, 1987; Vijayan *et al.*, 1997).

Es también necesario comprender mejor los mecanismos mediante los cuales la nutrición influye en el sistema inmune para apreciar las numerosas interacciones complejas entre la dieta y la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. Las dietas, entre otros factores, tienen efectos relevantes sobre la tolerancia al estrés y la salud y,

por lo tanto, para un crecimiento adecuado y resistencia al estrés y a enfermedades, los peces deben alimentarse con cantidades adecuadas y con dietas que cumplan con todos sus requerimientos nutricionales (Trichet, 2010).

A los efectos directos provocados por un mal estado nutricional hay que sumar los propios efectos negativos del estrés sobre el sistema inmune. El cortisol puede interferir en los centros neurales de la saciedad haciendo que disminuya la absorción de nutrientes por el intestino. Además se reduce el número de receptores celulares para la hormona del crecimiento (Mommsen *et al.*, 1999)

La consecuencia final es un deterioro de la salud y bienestar de los animales en cultivo (Fig. 14).

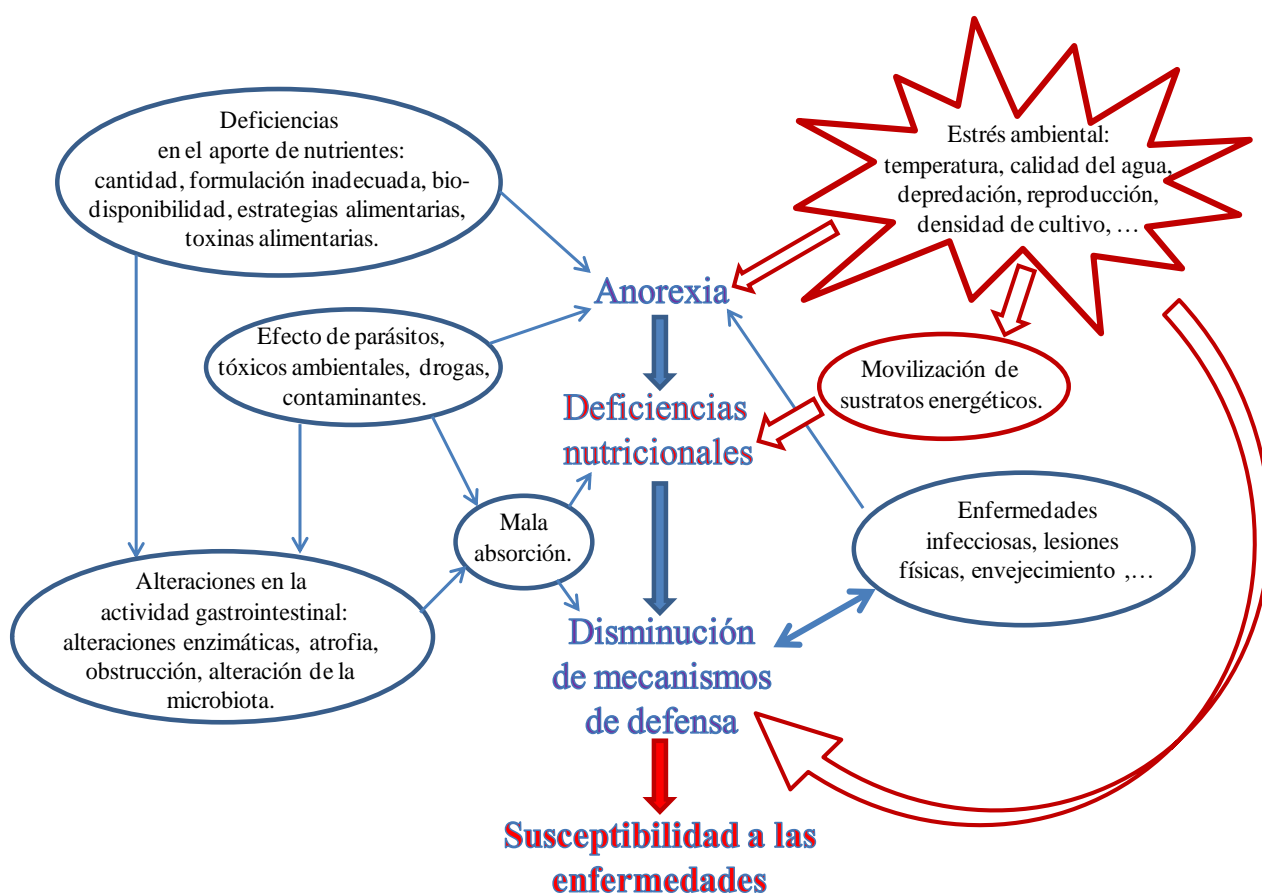


Figura 14. Influencia de la nutrición y del estrés sobre la salud de los peces cultivados (Modificado de Lall, 2000).

Una de las estrategias actualmente empleadas con mayor potencial para aumentar la resistencia a enfermedades es el enriquecimiento de las dietas con productos inmunoestimulantes o inmuno moduladores, tales como los probióticos, prebióticos, levaduras de diversos hongos, etc. (Barandica, 2008).

Como se puede apreciar la evaluación del bienestar de los peces requiere un enfoque multidisciplinario además del estudio de su comportamiento con respecto a las condiciones estresantes y tomando en cuenta los diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados (Poli *et al.*, 2005). Más aún cuando se trata de animales mantenidos en cautividad con la finalidad principal de la alimentación humana.

Es necesario resaltar que el bienestar de estos animales tiene una repercusión directa tanto a nivel económico como de calidad de los productos que llegan a los mercados, sin olvidar los condicionantes éticos y morales que deben regir en todo momento respecto al trato humanitario con el que se deben mantener a los animales.

2. Objetivos

El cultivo de la tenca en modo de acuicultura intensiva aún no está suficientemente definido y quedarían varios problemas por resolver. Es una especie con una notable falta de domesticación, por lo que su mantenimiento en condiciones de confinamiento y a densidades no adecuadas puede generar un estrés elevado que repercute sobre su bienestar y, por ende, sobre la productividad del cultivo. Además, no existen piensos específicamente formulados para su alimentación en cultivo intensivo. La valoración de estos piensos podría explicar la aparición de ciertos problemas relacionados principalmente con deformidades y poco crecimiento en el cultivo.

La importancia de esta especie para algunas zonas rurales como parte de su economía productiva, su atractivo como especie objetivo para pescadores deportivos y su calidad como producto de consumo hacen necesarios estudios para la optimización de su cultivo a nivel industrial.

Por otro lado, la creciente conciencia social sobre el trato humanitario hacia los animales en producción con fines de consumo humano, hace plantear que los avances en la tecnología y los procedimientos deban ir en paralelo y acorde a los conocimientos científicos sobre el bienestar animal.

Por todo ello, en esta Tesis Doctoral se ha planteado como objetivo principal un estudio exhaustivo sobre el bienestar de la tenca sometida a diversas variables que, de forma general, puede afectar a su producción intensiva en acuicultura y encontrar así, las condiciones óptimas para su cultivo.

Para conseguir este objetivo se han establecido tres bloques u objetivos parciales que abarcarían amplios ámbitos en la industrialización de esta especie. Los tres bloques de estudio serían:

- **Objetivo 1:** Efecto de distintos sistemas de cultivo sobre diversas variables indicadoras de bienestar en la tenca.

- **Objetivo 2:** Efecto de la densidad de cultivo sobre diversas variables indicadoras de bienestar en la tenca.

- **Objetivo 3:** Estudio nutricional de dos piensos comerciales suministrados a la tenca y su efecto sobre diversas variables indicadoras de bienestar.

Objetivos

Para el desarrollo de estos tres objetivos se analizarán principalmente los siguientes grupos de variables: crecimiento e índices biométricos, parámetros hematológicos, metabolitos plasmáticos, enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario, parámetros representativos del estado oxidativo y parámetros relacionados con el sistema inmune inespecífico. Además se realizarán análisis histológicos en intestino e hígado.

Por último, en el análisis de los efectos de dos piensos comerciales sobre el bienestar de la tenca, además de evaluar aspectos relacionados con su utilización nutritiva, se realizará el Test de Tolerancia a la Glucosa (TTG).

3. Material y métodos

3.1. LOS PECES

La especie elegida para la realización de este trabajo fue la tenca, por ser una especie de gran interés en la Comunidad Autónoma de Extremadura y por ser además el principal objeto de cultivo en el Centro de Acuicultura Vegas del Guadiana de Villafranco del Guadiana (Badajoz) donde se realizaron los ensayos.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las directrices de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos, con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Granada (España). Los procedimientos se realizaron en el Centro de Acuicultura de Vegas del Guadiana de la Junta de Extremadura, con Código REGA ES060150001651, ubicado en la localidad de Villafranca del Guadiana, en la provincia de Badajoz, (España). La realización del proyecto fuera de un Centro Usuario de Animales de Experimentación se justificó por el objetivo principalmente zootécnico del mismo.

3.1.1. Peces empleados para el ensayo de evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Se utilizaron peces nacidos en 2012, de aproximadamente ocho meses de edad, con peso corporal inicial de $7,19 \pm 0,34$ g, una longitud total inicial (LT) de $79,85 \pm 1,06$ mm y un factor de condición (K) de $1,31 \pm 0,02$ g / mm³. Estos peces procedían de reproducción controlada para garantizar una cohorte de edad homogénea y habían sido mantenidos en un estanque de 1.500 m² durante los seis meses previos al inicio de los experimentos. Fueron capturados y clasificados para eliminar los tamaños extremos y se seleccionaron únicamente los peces del tamaño intermedio. Una vez realizada esta clasificación se tomó una muestra representativa de 100 individuos (n = 100) para obtener los datos iniciales de peso y longitud y el correspondiente índice de condición inicial (K). Durante este muestreo se observó además que no hubiera signos evidentes de enfermedad, de desnutrición o cualquier aspecto que hubiera desaconsejado su uso.

3.1.2. Peces empleados para la evaluación del bienestar de la tenca en distintas densidades de cultivo intensivo

En este caso los peces procedían del mismo stock inicial que los peces descritos en el apartado anterior y pasaron por el mismo tratamiento de clasificación y análisis.

3.1.3. Peces utilizados para la evaluación del bienestar de la tenca en el ensayo de alimentación con distintas dietas

En este caso los peces habían permanecido desde su nacimiento y destete en 2013 hasta el comienzo del experimento, en febrero de 2014, en un estanque de alevinaje de 1.500 m², alimentándose principalmente de piensos de arranque y alimento natural (crustáceos de los géneros *Cladocera*, *Copepoda* y *Ostracoda* e insectos de los géneros *Diptera*, *Ephemeroptera*, *Odonata*, *Coleoptera* y *Hemiptera*). De igual modo que se procediera en los ensayos anteriormente descritos, los peces fueron clasificados para seleccionar los tamaños intermedios. Al inicio del experimento mostraban un peso medio de $5,98 \pm 0,18$ g, una longitud total media de $79,26 \pm 0,61$ mm y un índice de condición $(K) = 1,17 \pm 0,01$ g / mm³ (n = 100).

3.1.4. Peces utilizados para la realización del Test de Tolerancia a la Glucosa (TTG)

Se emplearon un total de 72 tencas de 1,5 años de edad que se habían mantenido en estanques de pre-engorde en el Centro de Acuicultura de Vegas del Guadiana. De las 72 se pesaron 36, obteniendo un peso medio de $20,77 \pm 1,34$ g. Como modelo de referencia, se utilizaron 72 truchas comunes (*Salmo trutta*) procedentes del Centro de Salmónidos de Jerte (Cáceres). Igualmente se pesaron 36 individuos obteniéndose $60,0 \pm 0,9$ g de peso medio. Se tomó la trucha común como modelo, ya que existe una amplia bibliografía sobre esta especie y está contrastada su respuesta ante este tipo de test (Blasco *et al.*, 1996).

3.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.2.1. Evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Este ensayo se desarrolló durante 15 semanas (desde mediados de abril hasta mediados de julio de 2013).

Se establecieron tres grupos experimentales de peces (ensayados por triplicado) en diferentes condiciones de cultivo que a continuación se describen:

- **Cultivo extensivo (E):** un total de 840 tencas se mantuvieron en tres estanques (tres replicas con 280 peces cada réplica) de 30 m^3 ($10 \times 3 \times 1 \text{ m}$) y una densidad inicial de carga de $0,07 \text{ kg} / \text{m}^3$. El fondo de los estanques tenía vegetación natural simulando las condiciones de una charca o laguna natural (Fig. 15).



Figura 15. Estanques de cultivo extensivo.

El régimen de alimentación fue natural y consistió principalmente en invertebrados acuáticos, mayoritariamente crustáceos (*Cladocera*, *Copepoda* y

Ostracoda) e insectos (*Diptera*, *Ephemeroptera*, *Odonata*, *Coleoptera* y *Hemiptera*). El fotoperiodo y la temperatura ($20,5 \pm 3,4$ °C) también fueron naturales. Se mantenía un flujo agua constante de 5 L / min para controlar las variables de calidad dentro de los márgenes adecuados para esta especie.

Los estanques estaban cubiertos por una malla para evitar la depredación y por una lona de sombreado parcial para evitar el exceso de insolación.

- **Cultivo semi-intensivo (S-I):** en este caso las tencas se mantuvieron en tres estanques de 36 m^3 (6 x 6 x 1 m) en el interior de un invernadero (Fig. 16).



Figura 16. Estanque de cultivo semi-intensivo.

Se emplearon un total de 2.100 tencas por cada estanque (6.300 peces en toda la situación experimental), lo que suponía una densidad inicial de $0,42 \text{ kg} / \text{m}^3$. La alimentación fue diaria y constante, con una aportación del 2,5% de la biomasa total, y se basó en pienso comercial de ciprínidos (42% de proteína y 8% de lípidos). En este caso también hubo alimento natural disponible compuesto principalmente por insectos (*Géneros Diptera*, *Ephemeroptera* y *Odonata*) que no se pudo cuantificar.

El fotoperiodo fue natural y la temperatura se controló parcialmente ($19,3 \pm 2,4$ °C) gracias a la estructura del invernadero con sistemas de ventilación (cenital y

lateral), calefacción y sombreado móvil (malla aluminizada de 35% de reducción de transmisión de radiación) gestionada por un controlador climático. El agua se mantuvo bajo recirculación con una tasa de renovación diaria del 10%.

- **Cultivo intensivo (I):** las tencas se mantuvieron en tres tanques circulares de poliéster (1740 tencas en cada uno) de 5 m³ (radio = 1,3 y altura = 1 m) ubicados en una nave industrial climatizada y con sistema de recirculación de agua (Fig. 17).



Figura 17. Instalación de sistema intensivo con sistema de recirculación.

La densidad inicial fue de 2,5 kg / m³ coincidiendo con la densidad expresada por otros autores en ensayos similares con peces de este tamaño inicial (Pantazis, 2012). La alimentación fue también diaria y constante, con una tasa del 2,5% de biomasa total. Esta alimentación se basó exclusivamente en el mismo pienso comercial de ciprínidos detallado en el apartado anterior (42% de proteína y 8% de lípidos).

La temperatura ($22,4 \pm 1,4$ °C) se mantuvo constante mediante una caldera y un sistema automático de intercambiadores de calor. El fotoperiodo (14:10 y $41 \pm$

6,5 lux) se mantuvo constante con un controlador de encendido y apagado automático. El agua se mantuvo con una calidad suficiente gracias a un sistema de recirculación con una tasa de renovación diaria del 10%.

Los distintos estanques y tanques se controlaron diariamente para observar posibles bajas o imprevistos y las propiedades fisicoquímicas del agua se controlaron dos veces por semana durante todo el periodo experimental (Tabla II).

Tabla II. Propiedades físico-químicas del agua en los diferentes grupos experimentales.

	T ^a (°C)	O ₂ (mg/l)	Sal. (mg/l)	pH	TAN (mg/l)	Amonio (mg/l)	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)	Fosfatos (mg/l)
E	20.54±3.38	10.75±2,70	555.87±26.71	8.42±0.29	0.27±0.16	0.03±0.02	0.36±0.17	46.92±7.48	1.29±0.84
S-I	19.33±2.45	8.39±1,02	671.25±57.03	8.65±1.00	0.26±0.11	0.05±0.02	0.17±0.09	73.46±15.58	1.90±0.85
I	22.39±1.39	5.24±1.31	690.88±54.31	8.25±0.25	0.97±0.74	0.07±0.05	1.43±0.57	126.40±30.31	2.40±0.66

Los valores son media ± SEM (n=30), T^a (Temperatura), O₂ (Oxígeno disuelto), Sal. (Salinidad), TAN (Nitrógeno amónical total). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

3.2.2. Efecto de la densidad de cultivo sobre el bienestar de la tenca

En este caso las tencas se mantuvieron en nueve tanques circulares de poliéster de 5 m³ (radio = 1,3 y altura = 1 m) como los definidos para el ensayo anterior para el grupo experimental intensivo (Fig. 17). La ubicación de estos tanques también fue en la nave industrial climatizada con recirculación de agua y tasa de renovación del 10%. Se mantuvo un fotoperiodo constante (14:10) y una intensidad lumínica de 41 ± 6,5 lux gracias a un controlador automático de encendido y apagado. La temperatura también se mantuvo constante (22,4 ± 1,4 °C) mediante una caldera y un sistema automático de intercambiadores de calor.

Se establecieron 3 grupos experimentales (ensayo por triplicado) que se diferenciaron únicamente en la densidad de cultivo y que se describen a continuación.

- **Alta densidad (AD):** las tencas se mantuvieron en tres tanques a una densidad inicial de 5 kg / m³ (25 kg en cada depósito de 5 m³). Se estimó una cantidad total de 3.475 peces en cada depósito. La alimentación se basó exclusivamente en pienso artificial de ciprínidos (42% de proteína y 8% de lípidos) a un porcentaje del 2,5% diario. Como en el ensayo anterior, cada mes se tomaba una muestra para pasar y medir los peces y poder corregir las dosis y posibles establecer modificaciones que fueran necesarias.
- **Control de densidad (CD):** en este caso la densidad inicial fue de la mitad que la anterior, 2,5 kg / m³, lo que supuso un total de 12,5 kg por depósito y 1.740 tencas en cada uno. El resto de condiciones experimentales fueron similares a las descritas para el grupo anterior.
- **Baja densidad (BD):** la densidad inicial en este grupo fue de 1,6 kg / m³, es decir 8 kg en cada depósito y aproximadamente 1.110 tencas en cada uno. Las restantes condiciones de cultivo fueron similares a las de los grupos anteriormente descritos.

La calidad del agua durante el experimento se mantuvo dentro de los rangos adecuados para esta especie como se puede comprobar en la siguiente tabla (Tabla III). Las muestras de agua para su análisis se tomaron dos veces por semana.

Tabla III. Propiedades físico-químicas del agua en los diferentes grupos experimentales en distintas densidad de cultivo.

	T ^a (°C)	O ₂ (mg/l)	pH	Sal. (mg/l)	TAN (mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	Nitrito (mg/l)	Nitrato (mg/l)	Fosfato (mg/l)
AD	22.39±0.16	4.89±0.17	8.81±0.67	694.83±3.99	0.88±0.06	0.06±0.01	1.42±0.07	124.69±4.23	2.38±0.07
CD	22.41±0.16	5.31±0.17	8.90±0.73	691.82±4.22	0.82±0.06	0.06±0.01	1.39±0.07	121.71±4.25	2.46±0.08
BD	22.44±0.16	5.56±0.16	8.94±0.77	694.68±4.01	0.80±0.06	0.06±0.00	1.41±0.07	118.93±4.22	2.42±0.08

Los valores son media ± SEM (n = 30), T^a (Temperatura), O₂ (Oxígeno disuelto), Sal. (Salinidad), TAN (Nitrógeno amoniacal total). AD (Alta densidad), CD (Control de densidad) y BD (Baja densidad).

3.2.3. Efecto de la dieta sobre el bienestar de la tenca en cultivo intensivo

Para este ensayo, las condiciones experimentales fueron similares en su inicio a las expresadas para el grupo del anterior ensayo al que se denominó Control de Densidad, y que presentaba una densidad inicial de 2,5 kg / m³, lo que suponía un total de 12,5 kg por depósito. En este caso los peces iniciales (IN) fueron de menor tamaño que en el ensayo anterior, con lo que su número total por depósito fue de aproximadamente 2.007 peces. De estos peces iniciales se tomaron muestras para poder calcular posteriormente algunas de las variables analizadas en este ensayo.

Se establecieron dos grupos experimentales por triplicado (3 lotes) que ocuparon 6 depósitos como los descritos de la figura 17. El ensayo se llevó a cabo desde el 20 de febrero hasta el 20 de junio de 2014 (16 semanas).

- **El grupo experimental A** se compuso de tres lotes que fueron alimentados con pienso de Dorada (Inicio Plus 868), con mayor contenido energético, alto contenido en proteína y lípidos y menor proporción de carbohidratos, concebido para alimentación de una especie carnívora. La base principal de esta dieta fue harina de trigo, gluten de trigo, harina de kril, harina de pescado, aceite de pescado, proteínas de pescado hidrolizadas, vitaminas, minerales, probióticos y extracto de levaduras.
- **El grupo experimental B** estaba compuesto por tres lotes alimentados con pienso de Tilapia (50 % de Efico Alpha 845 y 50% de Efico Alpha 830), con las cualidades adecuadas para alimentación de una especie herbívora. La base principal de estos piensos fue harina de soja, harina de girasol, gluten de maíz, salvado de trigo, harina de colza, harina de pescado, harina de krill, aceite vegetal, aceite de pescado, vitaminas y minerales.

Ambos piensos eran procedentes de la casa comercial BioMar Iberia, S.A. Los datos de composición de estas dietas según la información aportada por el fabricante se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Composición proximal (en %) de dietas experimentales según fabricantes.

	INICIO PLUS 868 n°1,9	EFICO ALPHA 845F N° 1,9	EFICO ALPHA 830F N° 3
Humedad	5	5	5
Proteína	51	38	30
Materia Grasa	17	6	8
Fibra bruta	1,5	5,9	6,9
Ceniza bruta	7,8	5,1	6,4
Fósforo	1,1	1,07	0,95
Calcio	1,9	0,96	1,01
Sodio	0,6	0,14	0,12
Energía (MJ/kg s/sf)	21,8642	12,3528	11,4268

El alimento se suministraba de forma continua mediante comederos de reloj de 12 horas de duración y comenzaba a las 12:00 h durante 6 días a la semana.

Las condiciones de calidad del agua se controlaron también dos veces por semana y los valores se mantuvieron dentro de los rangos adecuados para la especie, obteniendo datos similares a los expresados para el ensayo anterior.

3.2.4. Condiciones experimentales para la realización del Test de Tolerancia a la Glucosa

Se separaron en 12 tanques de poliéster por cada especie, lotes de 6 peces ($n = 6$) en cada uno, estableciendo para cada una de las especies un grupo control en 6 de los tanques y un grupo experimental en los otros 6. Estos tanques estaban localizados en el interior de la nave industrial climatizada descrita con anterioridad. Las condiciones de temperatura fueron de $18 \pm 0,5$ °C y fotoperiodo natural simulado (10:14; invierno) mediante un programador automático. Los peces se mantuvieron en estas condiciones una semana previa a la realización del TTG como periodo de adaptación.

Se establecieron, según pruebas realizadas con anterioridad y de acuerdo con la bibliografía consultada, 2 ensayos (realizados en 2 días diferentes) con distintas dosis de glucosa (200 mg/kg y 1.000 mg/kg de pez) aplicadas mediante inyección intraperitoneal. Para ellos, los peces eran anestesiados mediante baños con dilución de aceite de clavo a una dosis de 33 ppm antes de cualquier manejo. Para cada una de las

especies se estableció un grupo control (36 peces) al que se les inyectó suero fisiológico (NaCl al 0,9 %), exceptuando a 6 peces que conformarían el lote inicial de Tiempo 0 ($T_0 = 0$). Al grupo experimental (36 peces de cada especie) se les inyectó la dosis correspondiente de glucosa, exceptuando igualmente, al grupo de peces que conformarían el lote inicial de $T_0 = 0$.

3.3. TOMA DE MUESTRAS

Se capturaron una vez al mes 100 peces de cada lote, es decir, 300 tencas por situación experimental, para determinar parámetros biométricos como el peso corporal y la longitud total (LT). Con estos datos se calculó también el factor de condición (K) para comprobar el correcto desarrollo del experimento, la ausencia de patologías y para ajustar las dosis de alimentación en caso necesario.

Al final del proceso experimental se sacaron todos los peces de sus correspondientes lotes y se pesaron para obtener así los datos de peso final de los lotes y densidad final. Este proceso de pesado se realizó con una balanza de gran capacidad marca Metter Toledo IND231 de 1 a 150 kg \pm 50 g (Fig. 18).



Figura 18. Pesado total de los lotes mediante balanza de gran capacidad.

Además de cada lote se tomaron nuevamente muestras de 100 peces de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. El resto de los peces de cada lote fue reutilizado en la propia instalación para los fines propuestos por los gestores del Centro (reproducción, engorde etc.)

Las medidas individuales se realizaban empleando una balanza Mettler Toledo modelo Monobloc con 0,1 g de precisión (Fig. 19).



Figura 19. Balanza de precisión 0,1g para medidas individuales.

Este proceso se realizó bajo sedación de los peces mediante baños con una disolución de aceite de clavo en una dosis de 33 ppm (Hamackova *et al.* 2004). Los peces posteriormente eran devueltos a su lote respectivo una vez recuperados de la sedación.

De estos 100 animales previamente seleccionados de cada lote, se sacrificaron 12 (36 por condición experimental) mediante sobredosis del mismo anestésico y exsanguinación, extrayendo la sangre mediante punción con jeringuillas heparinizadas en la vena caudal. La sangre extraída de estos 12 peces se agrupó en tubos heparinizados formando 4 pules por cada estanque o depósito (n = 12 por situación experimental).

Con esta sangre se realizaron los análisis correspondientes a hematocrito (Ht), hemoglobina total (Hb) y actividad de "explosión respiratoria" (burst activity). Además se realizaron frotis sanguíneos para el recuento leucocitario.

Con el resto de la sangre, se obtuvo el plasma mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. De cada muestra se generaron varios viales de plasma que se almacenaron a -80 °C hasta su correspondiente análisis.

Los 12 peces sacrificados por lote se diseccionaron y se pesaron distintos órganos y tejidos como vísceras totales, hígado, gónadas y la grasa perivisceral, para estimar varios índices biométricos. Además, se tomaron fragmentos de intestino e hígado para su análisis histológico.

En el siguiente esquema se puede ver a modo de resumen el proceso de toma de muestras realizado por cada lote dentro de cada situación experimental (Fig. 20).

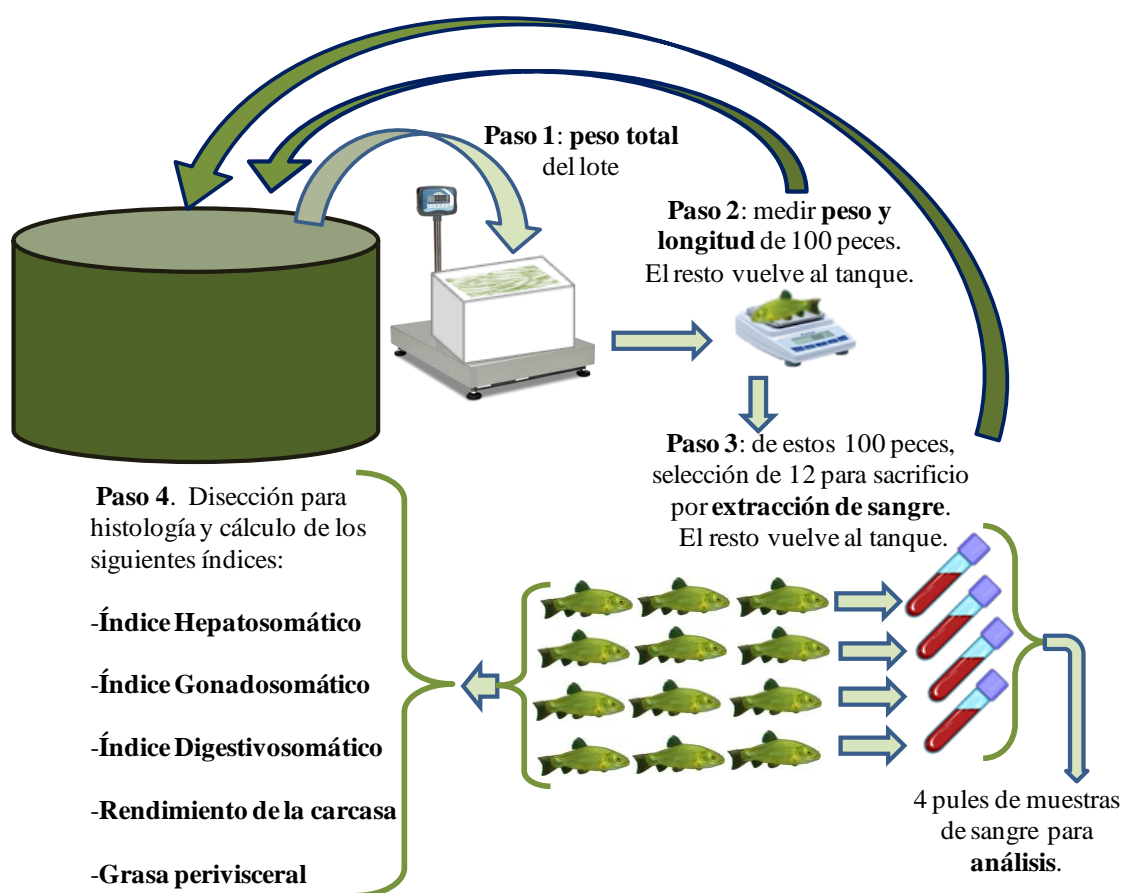


Figura 20. Proceso de toma de muestra final en cada uno de los lotes (por triplicado) dentro de cada situación experimental, excepto para el Test de Tolerancia a la Glucosa (TTG).

Este proceso de toma de muestras fue común en todos los ensayos, exceptuando el ensayo de test de tolerancia a la glucosa (TTG). Para el ensayo de alimentación con dos dietas diferentes, además se tomó una muestra de 12 peces enteros de cada grupo experimental para la determinación de su composición proximal. Estas muestras fueron conservadas enteras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Para el ensayo de TTG, se establecieron 6 muestreos ($T=0, 2, 4, 6, 8, 10\text{h}$). La toma de muestras se realizó bajo sedación en todos los peces utilizados en el ensayo (72 truchas y 72 tencas). Para ello se practicó una punción en la vena caudal para extracción de una gota de sangre, cantidad suficiente para la realización del test. El protocolo de toma de muestras siguió el desarrollo mostrado en la figura 21.

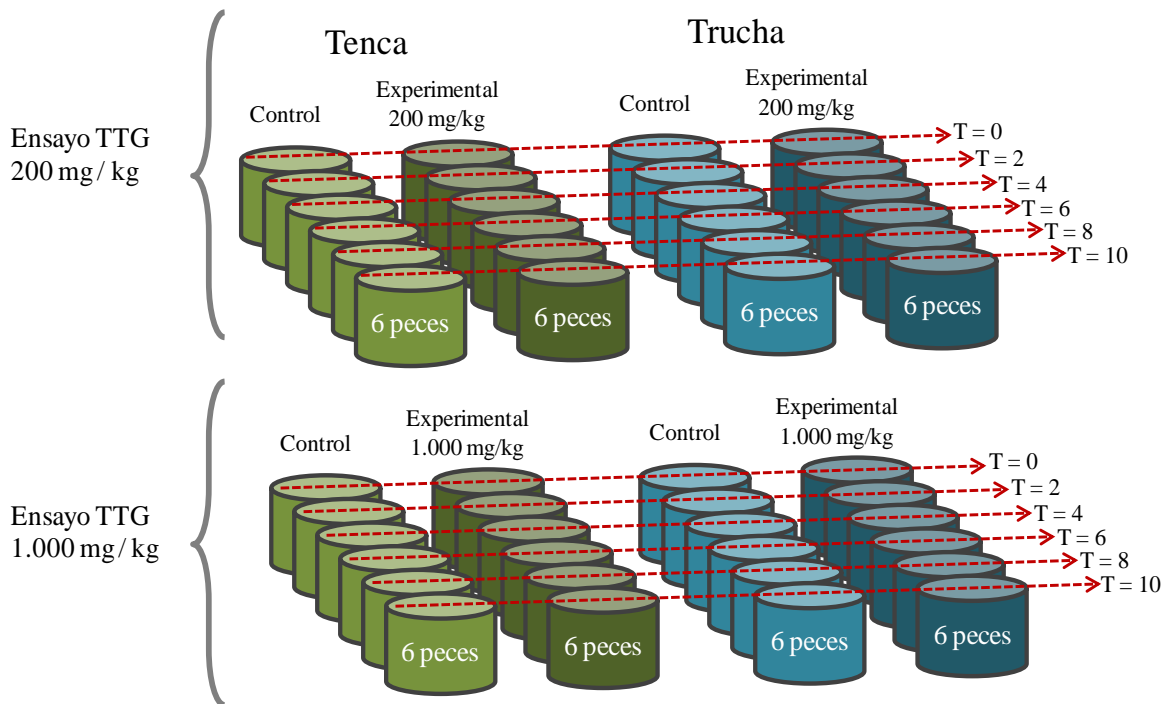


Figura 21. Distribución de grupos experimentales y lotes en los ensayos de TTG de la tenca en comparación con la trucha.

3.4. PROCESO DE ANÁLISIS

3.4.1. Parámetros de calidad de agua.

Los datos de calidad de agua fueron obtenidos mediante el uso de kits comerciales de la casa Macherey-Nagel™ y modelo Visocolor™ ECO. Los kits concretos que se utilizaron fueron:

- MACH.931008RM. Visocolor ECO test Amonio 3. Rango: 0,2 - 3 mg/l NH_4^+
- MACH.931041RM. Visocolor ECO test Nitrato. Rango: 1 - 120 mg/l NO_3^-
- MACH.931044RM. Visocolor ECO test Nitrito. Rango: 0,02 - 0,5 mg/l NO_2^-
- MACH.931084RM. Visocolor ECO test Fosfato. Rango: 0,2 - 5 mg/l $\text{PO}_4\text{-P}$
- MACH.931029RM. Visocolor ECO test Dureza total. Rango: 1 - 20 d y superior.
- MACH.931014RM. Visocolor ECO test Dureza de carbonatos. Rango: 1 - 20 d y superior.

Las valoraciones se realizaron con ayuda de un Fotómetro portátil PF-11 de la misma marca Macherey-Nagel.

La concentración de oxígeno, disolución porcentual de oxígeno y la temperatura, fueron medidos mediante una sonda electromagnética Handy Polaris II.

Los datos de pH y conductividad-salinidad fueron medidos con una sonda multiparamétrica marca XS-Instruments modelo G-RPCT5.

3.4.2. Cálculo de índices relacionados con el crecimiento e índices biométricos

Diferentes parámetros de crecimiento y producción se obtuvieron de los 100 peces seleccionados de cada lote de la siguiente manera:

- **Factor de condición** (K , g/cm^3) = $100 \times [\text{Peso (g)} / \text{Longitud Total}^3 \text{ (cm)}]$.
- **Tasa de crecimiento instantáneo** (TCI, % / día) = $100 \times [\ln \text{Peso final (g)} - \ln \text{Peso inicial (g)}] / \text{tiempo (días)}$.

- **Incremento de densidad (%)** = $100 \times (\text{densidad final del lote} - \text{densidad inicial del lote}) / \text{densidad inicial del lote}$.
- **Índice de conversión de alimento (IC)** = $\text{alimento total suministrado (g)} / [\text{biomasa final de peces (g)} - \text{biomasa inicial de peces (g)}]$.
- **Índice de deformidades visibles en peces (IDef, %)** = $100 \times (\text{n}^\circ \text{ de peces con deformidades visibles}) / \text{n}^\circ \text{ total de peces cultivados}$.
- **Tasa de supervivencia (%)** = $100 \times (\text{n}^\circ \text{ de peces después del período experimental}) / (\text{n}^\circ \text{ total de peces iniciales})$.

De los 12 peces sacrificados por lote además se obtuvieron los siguientes índices biométricos:

- **Índice hepatosomático (IHS; %)** = $100 \times \text{Peso del hígado (g)} / \text{Peso total (g)}$.
- **Índice gonadosomático (IGS; %)** = $100 \times \text{Peso de la gónada (g)} / \text{Peso total (g)}$.
- **Índice digestivosomático (IDS; %)** = $100 \times \text{Peso del digestivo (g)} / \text{Peso total (g)}$.
- **Rendimiento de la carcasa (%)** = $100 \times \text{Peso del pez eviscerado (g)} / \text{Peso total (g)}$.
- **Grasa perivisceral (%)** = $100 \times \text{Grasa perivisceral (g)} / \text{Peso total (g)}$.

3.4.3. Análisis hematológicos

- **Hemoglobina total (Hb):** la concentración de hemoglobina se estimó mediante el método de cianometahemoglobina (Larsen, 1964) usando un kit comercial (Sigma Chemical Co.). Se tomó una muestra de sangre de 20 μL en un tubo heparinizado y se mezcló en 5 mL de reactivo Drabkin. El proceso se realizó de la misma manera con la

muestra patrón. Tras reposar 5 min. se determinó la absorbancia a 540 nm y se calculó la concentración según la curva patrón obtenida.

- **Hematocrito (Ht):** se determinó el volumen porcentual de glóbulos rojos mediante centrifugación de las muestras de sangre por duplicado siguiendo el método de microhematocrito estándar. Para ello, se cargaron las muestras de sangre recién extraída en tubos capilares heparinizados y se centrifugaron a 650 x g durante 10 min (Modificado de Larsen y Snieszko, 1961).

3.4.4. Análisis bioquímicos en plasma

El análisis de los siguientes parámetros bioquímicos plasmáticos, glucosa, cortisol, colesterol total, colesterol HDL (High density lipoprotein), colesterol LDL (Low density lipoprotein), triglicéridos, las transaminasas aspartato aminotransferasa (GOT o AST) y alanina aminotransferasa (GPT o ALT), las hormonas tiroideas T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina), así como los electrolitos Cl^- , K^+ , Na^+ se realizó según los métodos que a continuación se detallan:

- **Cortisol:** la concentración de cortisol en plasma se analizó mediante una prueba inmunológica *in vitro* (Ref.1.875.116, Roche), con los siguientes pasos:

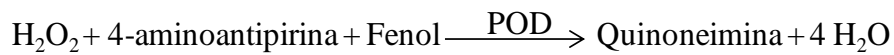
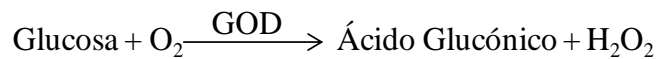
1ª incubación: la muestra se incuba con un anticuerpo biotinilado específico anti-cortisol y un derivado de cortisol marcado con quelato de rutenio. Los puntos de fijación del anticuerpo marcado son ocupados, según sea la concentración de analito en la muestra, en parte por el analito de la muestra y en parte por el hapteno marcado con rutenio provocando la formación del inmunocomplejo respectivo.

2ª incubación: después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimio-luminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

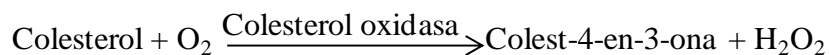
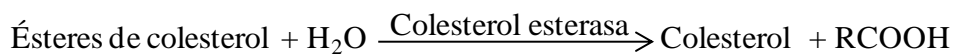
Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

- Método GOD-POD para **Glucosa** (modificado de Trinder, 1969): determinación de la glucosa tras la oxidación enzimática por la glucosa oxidasa (GOD). El indicador colorimétrico es la quinoneimina, la cual se genera a través de la 4-aminoantipirina, el fenol y el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (POD).



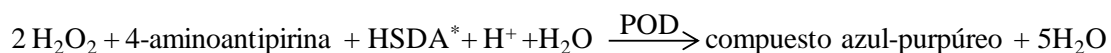
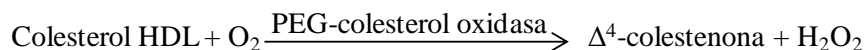
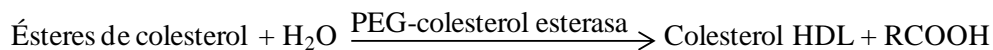
Se determinó por absorbancia a 505 nm.

- Método CHOL₂ para **Colesterol total**: los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol esterasa a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa cataliza entonces la oxidación de colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado produce la unión oxidativa del fenol y la 4-aminofenazona para formar un colorante rojo de quinoneimina.



La intensidad cromática del colorante formado es directamente proporcional a la concentración de colesterol. Se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 500 nm.

- Método HDLC_3 para **Colesterol HDL**: en presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos hidrosolubles, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas con PEG. La concentración del colesterol HDL se determina enzimáticamente mediante la colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas con PEG a los grupos amínicos (aprox. 40 %). La colesterol esterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de O₂, el colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ⁴-colestenona y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y HSDA para formar un compuesto purpúreo azul.

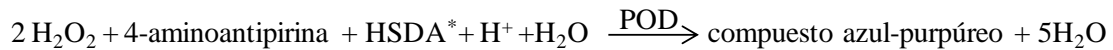
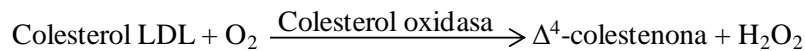


*HSDA = N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica

La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide espectrofotométricamente a 600-700 nm.

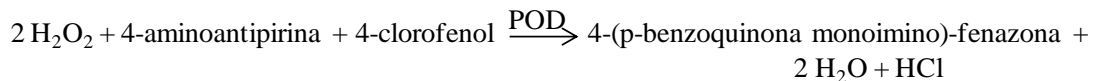
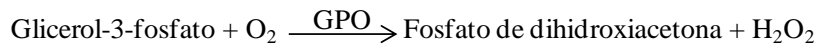
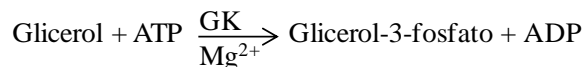
- Método LDL_C para **Colesterol LDL**: este método para la determinación directa del colesterol LDL emplea la solubilización micelar selectiva del colesterol LDL por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto de azúcar y lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). Al añadir un detergente en el método enzimático de determinación del colesterol (reacción de acoplamiento de colesterol esterasa y colesterol oxidasa), la actividad relativa del colesterol en las fracciones de lipoproteínas aumentan en el siguiente orden: HDL < quilomicrones < VLDL < LDL. En presencia de Mg²⁺, un compuesto de azúcar reduce pronunciadamente la reacción enzimática de medición del colesterol en VLDL y quilomicrones. La combinación de un compuesto de azúcar y un detergente permite la determinación selectiva de colesterol LDL en el suero. La colesterol esterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el

colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ^4 -colestenoa y peróxido de hidrógeno. En presencia de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y HSDA para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide espectrofotométricamente a 600-700 nm.



*HSDA = N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica

- Método TRIGL para **Triglicéridos** (TRIGL: ACN 781): este método se basa en el protocolo de Wahlefeld *et al.*, (1974) utilizando una lipoproteína lipasa (LPL) de microorganismos para la hidrólisis rápida y completa de triglicéridos a glicerol, seguida de la oxidación a fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido reacciona con 4-aminofenazona y 4-clorofenol bajo la acción catalítica de la peroxidasa para formar un compuesto rojo (reacción del punto final de Trinder).



La intensidad del color obtenido es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos y se determinó por absorbancia a 546 nm.

- Método inmunológico para la determinación de **T3 (triyodotironina)** (Roche, REF. 06437206). La concentración de T3 en plasma se analizó como se detalla a continuación:

1^a incubación: 15 µL de muestra y un anticuerpo anti-T3 específico biotinilado marcado con un complejo de rutenio.

2^a incubación: Después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre la biotina y la estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimio-luminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

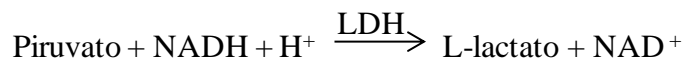
- Método inmunológico para la determinación de **T4 (tiroxina)** (Roche, REF. 06437281): el proceso es similar al descrito en el método para T3 cambiando únicamente el anticuerpo anti-T3 específico por otro anti-T4 específico.

- Medición de iones **Cl⁻, K⁺, Na⁺**: el sistema Roche / Hitachi cobas C System está preparado para la determinación cuantitativa de sodio, potasio y cloruro en plasma mediante el uso de electrodos selectivos de iones.

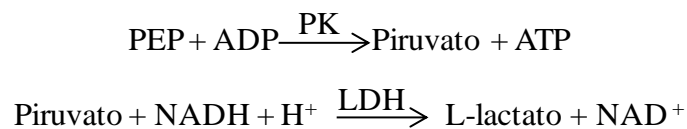
- La **proteína total** se determinó usando el kit Bio-Rad Protein Assay (Kit II) basado en el método de descrito por Bradford (1976).

3.4.5. Análisis de enzimas del metabolismo intermediario

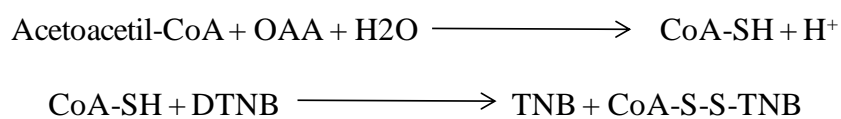
- **Lactato deshidrogenasa** (LDH; EC 1.1.1.27): la actividad de esta enzima se determinó según Singer *et al.*, (1990). El cóctel contenía tampón imidazol-HCl 50 mM (pH 7,4), NADH 0,16 mM y piruvato 1 mM. El proceso se basó en la variación de D.O. que se obtuvo de la oxidación de NADH a NAD⁺ tomando el piruvato como sustrato que era transformado en L-lactato. Se midió espectrofotométricamente a 340 nm.



- **Piruvato quinasa** (PK; EC 2.7.1.40): se midió espectrofotométricamente a 340 nm la reacción de extinción de NADH en un medio que contenía 100 mM de imidazol-HCl, pH 7,4 (a 15 ° C), KCl 70 mM, MgCl₂ 4 mM, fosfoenol piruvato 2 mM, ADP 2 mM 0.16 mM NADH y exceso de lactato deshidrogenasa. (Johnston *et al.*, 1982).



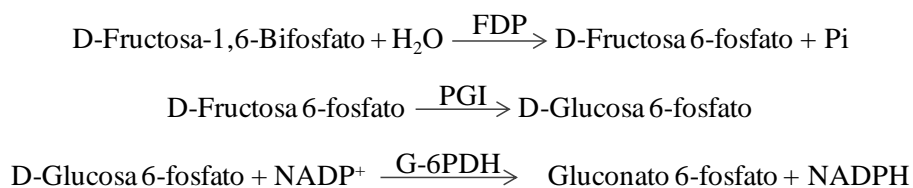
- La actividad de **citrato sintasa** (CS, EC 4.1.3.7): se midió de acuerdo con Thibault *et al.*, (1997) al observar la reducción de DTNB a 412 nm. La mezcla de ensayo consistió en tampón imidazol-HCl 50 mM (pH 8), DTNB 0,1 mM, acetoacetyl-CoA 0,2 mM y ácido oxaloacético 0,2 mM.



- La **Hidroxiacil CoA deshidrogenasa** (HOAD; EC 1.1.1.35): se ensayó de acuerdo con Singer et al. (1990) midiendo la oxidación de NADH a 340 nm. La mezcla de ensayo consistió en tampón de imidazol-HCl 50 mM (pH 8), NADH 0,1 mM y acetoacetilo CoA 0,1 mM.

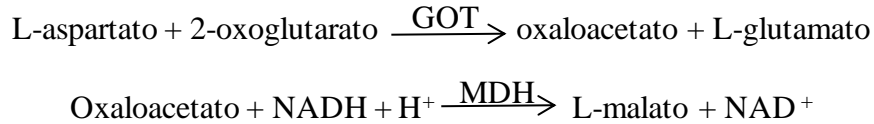


- La **Fructosa Bifosfatasa** (FBPasa; EC 3.1.3.11): se determinó según el método propuesto por Latzko y Gibbs (1970) midiendo la reducción de NADP⁺ después de tres reacciones consecutivas.



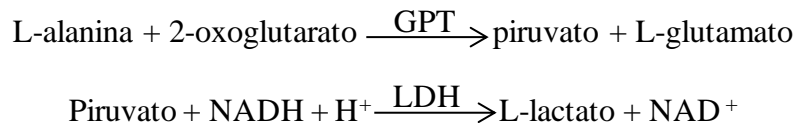
Se midió el incremento de absorbancia a 340 nm durante 4 min a 25 °C. Los reactivos utilizados fueron: tampón imidazol-HCl 71.4 mM pH 7,4, MgCl₂ 100 mM, 2mercaptoetanol 240 mM, NADP 10 mM, G6PDH, PGI, Fructosa 1,6-difosfato 0,5 mM.

- Método para análisis de **glutámico-oxalacético transaminasa** o **aspartato animotrasferasa (GOT o AST)**: la GOT existente en la muestra cataliza la transferencia de un grupo amino entre el L-aspartato y el 2-oxoglutarato para formar oxaloacetato y L-glutamato. El oxaloacetato posteriormente reacciona con NADH, en presencia de la Malato Deshidrogenasa (MDH), para formar NAD⁺. El piridoxal-fosfato sirve como coenzima y asegura la activación enzimática completa.



La tasa de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la enzima GOT. Por último se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

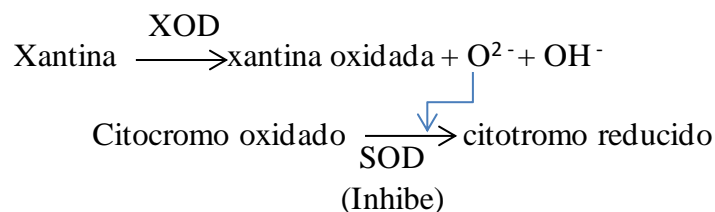
- Método para análisis de **glutámico pirúvico transaminasa** o **alanina aminotrasferasa (GPT o ALT)**: la GPT cataliza la reacción entre L-alanina y 2-oxoglutarato. El piruvato formado se reduce por NADH en una reacción catalizada por Lactato Deshidrogenasa (LDH) para formar L-lactato y NAD⁺.



La velocidad de oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad ALT catalítica y se determina midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm.

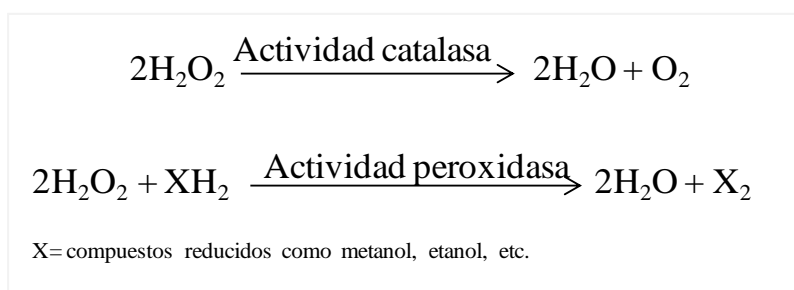
3.4.6. Parámetros relacionados con el estado oxidativo

- Actividad de la **superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)**: se midió mediante el método del ferricitocromo C utilizando xantina / xantina oxidasa como fuente de radicales superóxido. La mezcla de reacción consistió en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, xantina 0,1 mM, citocromo C 0,013 mM y xantina oxidasa 0,024 UI / ml.

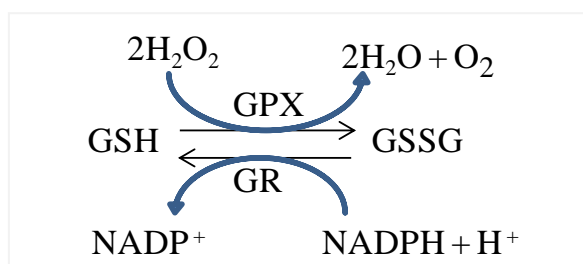


Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% de la velocidad de reducción del ferricitocromo C medida a 550 nm (McCord y Fridovich, 1969).

- La actividad de la **catalasa** (CAT; EC 1.11.1.6): se determinó según el método de Aebi (1984), midiendo la disminución de la concentración de H₂O₂ debido a la actividad catalasa y peroxidasa de esta enzima. La medición se realizó a 240 nm. La mezcla de reacción contenía tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0) y H₂O₂ 10,6 mM recién preparada.

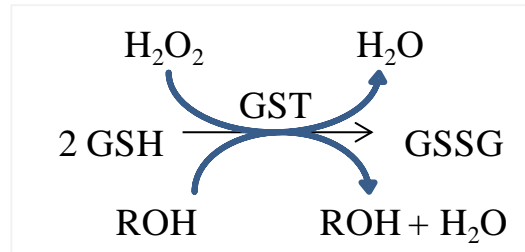


- Actividad de la **glutación peroxidasa** (GPX; EC 1.11.1.9): se midió según lo descrito por Flohé y Günzler (1984). El glutación oxidado (GSSG) generado por GPX se redujo por la Glutación reductasa (GR), y la oxidación de NADPH se midió a 340 nm. La mezcla de reacción consistió en 50 mM de tampón fosfato potásico (pH 7,1), Glutación reducido (GSH) 3,6 mM, azida sódica 3,6 mM, glutación reductasa 1 IU / ml, NADPH 0,2 mM y H₂O₂ 1,2 mM.

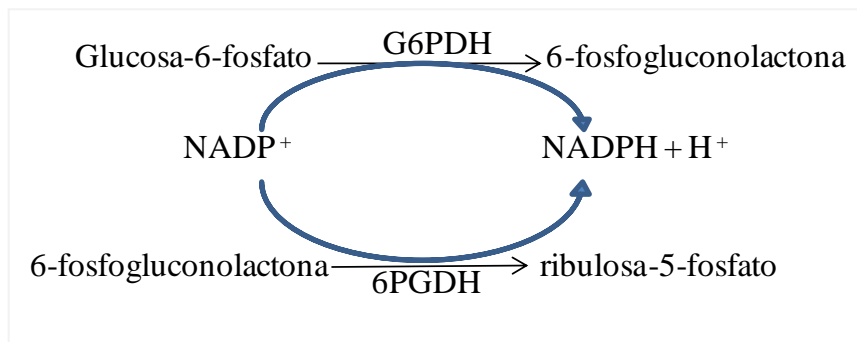


- Actividad de **glutación reductasa** (GR, EC 1.6.4.2): se ensayó como describen Calberg y Mannervik (1975), con algunas modificaciones, midiendo la oxidación de NADPH a 340 nm. La mezcla de reacción consistió en tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, NADPH 0,63 mM y GSSG 0,15 mM.

- Actividad **glutación-S-transferasa** (GST; EC 2.5.1.18): se determinó por el método propuesto por Habig et al. (1974) adaptado a una microplaca. La mezcla de reacción contenía tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,5), GSH 1,2 mM y solución 1,23 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobeneno en etanol, que se preparó justo antes del ensayo. La actividad de la GST se midió espectrofotométricamente a 340 nm mediante la formación de glutati3n-CDNB-conjugado.



- Actividad **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa** (G6PDH; 1.1.1.49): se determinó midiendo la reducción de NADP^+ a 340 nm como describieron previamente Löhr y Waller (1960) con algunas modificaciones. La mezcla del ensayo consistió en tampón de imidazol-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl_2 5 mM, NADP^+ 2 mM y Glucosa-6-fosfato 1 mM. La glucosa-6-fosfato se transforma, por acción de la G6PDH, en 6-fosfogluconolactona que a su vez es transformada por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa en ribulosa-5-fosfato.



- Actividad **DT-diaforasa** (DTD; EC 1.6.99.2): se midió de acuerdo con el método descrito por Lind et al. (1990) adaptado para placas multipocillo. La mezcla de reacción, en un volumen final de 210 μL , consistió en 165 μL de cóctel (35 μL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,3) más 5 μL de NADH 5 mM), 25 μL de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) 400 μM , 10 μL de albumina y 10 μL de muestra. Se

registró una disminución de la absorbancia a 600 nm durante 3 minutos a 30°C. La actividad DT-diaforasa se calculó usando el coeficiente de extinción para DCPIP ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) después de corregir el blanco.

- Niveles de **peroxidación lipídica**: se determinaron en función de los niveles de malondialdehído (MDA) generados por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. En presencia de ácido tiobarbitúrico, MDA reacciona produciendo sustancias de reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARS) que se midieron a 535 nm según Buege y Aust (1978).
- **Capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC)**: se midió de acuerdo con los descrito por Erel (2004). La solución ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se generó a partir de los siguientes reactivos: 2,5 mM ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro) y solución madre ABTS-2 20 mM en solución tampón de fosfato 100 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. Esta solución es capaz de oxidarse con peróxido de hidrógeno en medio ácido, volviéndose de un color verde esmeralda. La reducción de este compuesto en presencia de antioxidantes produce una pérdida de color que se puede medir a 595 nm, siendo esta reducción proporcional a la capacidad antioxidante total del extracto. Como estándar se empleó un análogo soluble en agua de vitamina E (Trolox). Los resultados se expresan en términos de μmol de capacidad antioxidante equivalente a Trolox por litro de extracto de tejido (μM).
- Parámetro **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power): se midió siguiendo el protocolo descrito por Benzie y Strain (1999) con modificaciones. Esta medida indica la capacidad antioxidante de una muestra en relación con su capacidad para reducir el ión férrico (Fe^{3+}) presente en un complejo con 2,4,6-tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a ión ferroso (Fe^{2+}). Se utilizó para ello tampón ácido acético-acetato sódico (pH de 3,4) que contenía TPTZ y FeCl_3 . Tras 60 minutos de reacción se determinó la absorbancia a 593 nm. La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón. Las actividades de las muestras se expresaron como capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico (AEAC: mg de ácido ascórbico / 100 g de extracto).

3.4.7. Parámetros inmunológicos en plasma

- **Globulina sérica total:** se añadieron gota a gota 50 μ l de solución saturada de sulfato de amonio a 50 μ L de plasma. Después se agitó en el vórtex y a continuación la mezcla se centrifugó durante 5 min a 10.000 x g. Se disolvieron 20 μ L del sobrenadante de esta muestra con 80 μ L de tampón de bicarbonato a pH 9,3 (Swain, *et al.*, 2007b) y se determinó la proteína total resultante mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

- **Inmunoglobulina total (IgM):** se determinó según Anderson y Siwicki (1995). Las inmunoglobulinas se separaron de las proteínas totales por precipitación con polietilenglicol. Brevemente, se incubaron 0,1 mL de cada muestra y 0,1 mL de polietilenglicol al 12 % a temperatura ambiente durante 2 h bajo agitación constante. La mezcla se centrifugó a 7.000 x g durante 10 min. La proteína total del sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford (1976). El contenido total de inmunoglobulina se determinó restando el contenido de proteína resultante del contenido de proteína total en el plasma no tratado.

- **Actividad hemolítica** de glóbulos rojos: se realizó en placas de microtitulación con fondo en U. Se prepararon por duplicado diluciones seriadas de cada muestra de plasma en 25 μ l de EDTA-GVB (EDTA 10 mM en tampón Gelatine Verona1). Se añadieron a cada pocillo 25 μ l de una suspensión que contenían 1% de glóbulos rojos de conejo lavados. Los resultados se expresaron como el valor del Ln de la dilución de suero final en la que se apreció una hemólisis visible.

- Ensayo de **hemaglutinación:** se siguió el mismo procedimiento expresado en el apartado anterior pero con las muestras de plasma inactivadas mediante aplicación de temperatura (45 °C durante 30 min.). Las microplacas se dejaron reposar durante 2 h a temperatura ambiente y se determinó el valor más alto que dio como resultado la hemólisis completa de la muestra o la aglutinación completa de los glóbulos rojos. Los resultados se expresaron como ln (Swain, *et al.*, 2007b).

- Actividad de estallido respiratorio (**Burst Activity**) de los fagocitos: se midió mediante la reducción de una solución de Nitroblue tetrazolium al 0,2% (NBT, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a formazan como medida de la producción de anión superóxido (O_2^-) (Kumar *et al.*, 2007). Se incubó un volumen de 50 μ L de sangre heparinizada en placas de microtitulación con fondo en U durante 60 min a 37 °C para facilitar la adhesión de las células. Luego se retiró el sobrenadante y los pocillos se lavaron tres veces en PBS. Se añadió un volumen de 50 μ L de NBT al 0,2% y se incubó durante 1 hora más. Las células se fijaron con 200 μ L de metanol al 100% y se dejaron en reposo durante 2-3 min. Después se realizaron 2-3 lavados con metanol al 30 %. La placa se dejó secar completamente y se añadieron 60 μ L de KOH 2N + 70 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente, el volumen total del pocillo se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se leyó a 540 nm.

- **Actividad de peroxidasa** (EC 1.11.1.7): se analizó de acuerdo con Mohanty y Sahoo (2010). Se diluyeron 10 μ L de plasma con 90 μ L de tampón de Hank's (HBSS) en placas de 96 pocillos de fondo plano. Como sustratos, se añadieron 35 μ L de una solución 20 mM de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) con 5 mM de H_2O_2 . La reacción de cambio de color se detuvo después de 2 min. añadiendo 35 μ L de ácido sulfúrico 2 M. La lectura se realizó a 450 nm. Como controles se realizó todo el proceso sin la adición de plasma. La actividad se expresó en D.O. (Densidad Óptica) Una unidad de actividad peroxidasa se definió como la cantidad necesaria para producir un cambio de absorbancia de 1 D.O.

- **Actividad de la lisozima** (EC 3.2.1.17): se ensayó de acuerdo con Swain *et al.* (2007a), utilizando un método turbidimétrico con *Micrococcus lysodeikticus*. Se mezcló un volumen de 180 μ L de células de *M. lysodeikticus* liofilizadas (Sigma) a 0,2 mg / ml en tampón de fosfato de sodio 0,04 M (pH 6,2) con 20 μ L de muestra de plasma en cada pocillo. Para la curva estándar se usó lisozima de clara de huevo de gallina. Se consideró un blanco con 20 μ L de plasma más 180 μ L de tampón de fosfato de sodio. La reacción se desarrolló durante 20 min a 35 °C y se midió a 450 nm. Los valores se expresaron como μ g / ml de actividad HEWL equivalente (lisozima blanca de huevo de gallina).

- **Actividad de la lipoxigenasa** (EC 1.13.11.12): se analizó espectrofotométricamente de acuerdo con Surrey (1964) con modificaciones. La mezcla de reacción consistió en tampón de fosfato de potasio 0,1 mM (pH 7,0) y ácido araquidónico 0,4 mM. La reacción se desarrolló a 20 °C y se midió a 234 nm. La actividad se expresó en mU / mg de proteína.
- **Recuento leucocitario:** Para los ensayos realizados en 2013, es decir los correspondientes a la evaluación de los distintos sistemas de cultivo y el ensayo de densidad se procedió según el protocolo siguiente: Los glóbulos blancos (WBC) se contaron en frotis de sangre en un portaobjetos fijado con metanol durante 1 min. Posteriormente se realizó la tinción de May-Grünwald-Giemsa-Wright. Los leucocitos se visualizaron a microscopía óptica con aceite de inmersión (x 100). Se contabilizaron los diferentes glóbulos blancos de 100 campos elegidos al azar y se establecieron los porcentajes correspondientes.

Para el ensayo realizado durante 2014, el ensayo con dos dietas se empleó un nuevo protocolo basado en la técnica de citometría de flujo: utilizamos un fluorocromo que mide el potencial de membrana mitocondrial que es capaz de diferenciar las poblaciones leucocitarias de los eritrocitos (Inoue et al, 2003). Nosotros utilizamos TMRM que es un catión lipofílico que tiñe casi selectivamente la membrana mitocondrial. El TMRM emite fluorescencia a una longitud de onda de 573 nm al ser excitado a 549 nm. Se utilizó un citómetro de flujo MACSQuant VYB equipado con un láser que emite a 561nm que permite aumentar la sensibilidad de la detección. De esta forma, podemos discriminar las diferentes poblaciones leucocitarias de tenca (linfocitos y trombocitos, neutrófilos, basófilos y monocitos) y detectar cómo afecta el estrés de forma diferencial.

Con carácter general:

Las reacciones enzimáticas se iniciaron mediante la adición del extracto de tejido o del plasma a excepción de la SOD donde se utilizó la xantina oxidasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para transformar 1 μ mol de sustrato / min en las condiciones de ensayo especificadas, excepto para la SOD que se usaron unidades arbitrarias.

Las mediciones espectrofotométricas de los parámetros Hemoglobina, Proteína total, Actividad de "explosión respiratoria" (burst activity), Inmunoglobulinas totales, Globulinas séricas y los ensayos enzimáticos de actividad Peroxidasa, Lisozima, Lipoxigenasa, Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, Glutación peroxidasa (GPX), Glutación reductasa (GR), Glutación s-transferasa (GST), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), DT-Diaforasa (DTD), Malondialdehído (MDA), Lactato deshidrogenasa (LDH), Piruvato kinasa (PK), Citrato sintasa (CS), β -hidroxiacil. CoA deshidrogenasa (HOAD), las transaminasas de muestras de hígado glutámico-oxalacética (GOT) y glutámico pirúvica (GPT), se realizaron por duplicado en microplacas de 96 pocillos (UV-Star® Greiner Bio-One, Alemania) utilizando para la lectura un espectrofotómetro de microplacas Power Wavex (Bio-Tek Instruments, EEUU).

Para las mediciones en muestras de plasma de los parámetros Cortisol, Glucosa, Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, Triglicéridos, las transaminasas GOT (o AST) y GPT (o ALT), las hormonas tiroideas T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina), así como los electrolitos Cl^- , K^+ , Na^+ se utilizó un Analizador Automático COBAS C-System 800 de la marca Roche/Hitachi.

3.4.8. Análisis de composición proximal

Para el análisis la composición proximal de los dos piensos comerciales, así como de los peces enteros (12 por cada situación experimental), se homogeneizaron las muestras y se determinaron los siguientes parámetros en los Servicios de Instrumentación Científica de la UGR (los datos fueron expresaron sobre sustancia fresca, s/sf):

- **Humedad:** el contenido de agua se determinó deshidratando las muestras en una estufa (Hearaeus) a 105°C hasta un peso constante.
- **Cenizas:** se determinaron mediante la incineración total de las muestras en la misma estufa a 500°C durante 12 h.

- **Proteína total:** se determinó con el método de Kjeldahl con el multiplicador de 6,25. El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en las muestras y consiste en dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.

Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La recuperación del nitrógeno y velocidad del proceso pueden ser incrementados adicionando un catalizador (Nollet, 2004).

- Extracción y cuantificación de **lípidos:** se empleó el método de Soxhlet, que supone una extracción semi-continua con un disolvente orgánico (Eter dietílico BUCHI 810). En este método, el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra, la cual queda sumergida en el disolvente. Progresivamente este es sifonado al matraz de calentamiento para repetir de nuevo el proceso. Finalmente, el contenido de lípidos se cuantifica por diferencia de peso (Nielsen, 2003).

- Análisis del **perfil de aminoácidos:** se determinaron por medio de cromatografía de gases de alta eficacia (HPJC) en fase inversa, previa derivatización del hidrolizado de la muestra correspondiente con fenil-isocianato, según el método de Pico-Tag (Cohen *et al.*, 1989) de bondad contrastada por Pérez Martínez (1995). Para la separación y determinación se empleó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6850A con columna de 5 pulgadas, canal único para el inyector y detector con control electrónico de neumática (EPC) de todos los gases.

Inyector capilar Split/splitless (0-100psi) y Detector de Ionización de llama (FID). Torreta autoinyectora 7683B para 8 muestras, Software SW ChemStation GC para sistemas GC.

- **Análisis del perfil lipídico:** se realizó tras la extracción de las muestras según Folch *et al.* (1957). Los ácidos grasos se metilaron con una mezcla de cloroformo: metanol: ácido sulfúrico (100: 100: 1). La separación cromatográfica se realizó con un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies 6890N, con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0,32 mm. La fase líquida empleada fue Supelco-wax 10 con un espesor de película de 0,25 μm . Las condiciones de separación fueron generadas por gas portador de helio y una velocidad de flujo de 1 mm^3 / min . La temperatura del detector fue de 250°C, la del inyector 225°C y la de la columna se mantuvo a 180°C. Las señales del detector se registraron con un dispositivo Philips con una escala de 1,0 mV a una velocidad de cinta de 10 mm / min. Los ácidos grasos individuales se identificaron comparando el tiempo de retención con los estándares de Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

- **Material Extractivo Libre de Nitrógeno (MELM):** se obtuvo por diferencia porcentual a partir de los valores obtenidos de proteína, lípidos y cenizas:

$$\text{MELM (\%)} = 100 - (\text{Proteína (\%)} + \text{Lípidos (\%)} + \text{Cenizas (\%)})$$

3.4.9. Cálculo de parámetros relativos al aprovechamiento de los nutrientes y de la energía de las distintas dietas

De los 12 peces sacrificados por situación experimental correspondiente al ensayo de dietas, se obtuvieron los siguientes índices:

- **Proteína total del lote** = % Proteína de la muestra x Peso total del lote.

- **N Corporal total** = (Peso total del lote x Proteína (%)) / 6,25

- **Coefficiente de eficacia en crecimiento (CEC)** = (Peso final del lote – Peso inicial del lote) (g) / Proteína total suministrada (g).

-
- **Valor productivo de la proteína (VPP)** = $100 \times (\text{Proteína total final del lote} - \text{Proteína inicial total del lote}) / \text{Proteína total suministrada en el alimento (g)}$.

 - **Retención de Lípidos (%)** = $100 \times (\text{Lípidos finales del lote} - \text{Lípidos iniciales}) (\text{g}) / \text{Total lípidos suministrados (g)}$.

 - **Retención de la Energía (%)** = $100 \times (\text{Energía final del lote} - \text{Energía inicial lote}) / \text{Energía total consumida}$.

3.4.10. Procesamiento histológico de las muestras

Los intestinos e hígados para el estudio histológico se fragmentaron en piezas más pequeñas y se fijaron en Bouin (15:5:1, ácido pícrico a saturación: formol: ácido acético glacial) durante 4 días. Después, los tejidos se deshidrataron mediante una serie de alcoholes en concentraciones crecientes: etanol 50% (2h), etanol 70% (2h), etanol 90% (2h), etanol 96% (2h), etanol 100% (1h), etanol 100% (1h) y etanol 100% + sulfato de cobre (1h). Tras la deshidratación se pasó a una fase de aclaramiento con etanol 100%:benzol (1:1) durante 15 min, benzol puro (2 pases de 15 y 30 min) y en una mezcla de benzol:parafina (1:1) durante 30 min. Después, para la inclusión se sometieron a varios pases en parafina (6 h, 8 h y 8 h) para finalmente realizar los bloques en la estación automatizada (Leica EG1150-CH).

Para la obtención de los cortes se utilizó un microtomo Leica RM2235, obteniendo secciones de 10 μm que se recogieron por flotación en portaobjetos tratados con albúmina de Mayer par su mejor adhesión y se dejaron secar en estufa a 35-40 °C durante toda la noche.

Para desparafinar los cortes, se pasaron por xilol (2 pases, 30 min) y una hidratación pasando por concentraciones de alcoholes decrecientes: etanol 100% (2 pases de 2 min), etanol 96% (2 min), etanol 90% (2 min), etanol 70% (2 min), etanol 50% (2 min), agua destilada (1 min).

Para la tinción con Hematoxilina-Eosina, los cortes se sumergieron en Hematoxilina (40-60 seg), se lavaron en agua corriente (5 min), se tiñeron con Eosina (9 min) y se diferenciaron con etanol 90% (2 min). Después se pasó a etanol 96% (2

min), etanol 100% (2 pases de 2 min) y xilol (2 pases de 2 min) para su montaje en medio Eukitt®.

Las muestras se visualizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot y se fotografiaron con la cámara Zeiss Axiocam. Se realizaron 10 medidas en cada pez de la longitud y grosor de las vellosidades intestinales y el espesor de la capa muscular mediante el software Image J (1.5i, National Institute of Health, USA). Se midió el radio de la sección transversal del intestino (valor tomado como 100%) y se calculó el porcentaje al que correspondieron las medidas antes descritas para minimizar las posibles diferencias asociadas al tamaño de los peces.

3.4.11. Test de tolerancia a la glucosa en la tenca.

Las medidas de la concentración de glucosa en sangre para este ensayo se realizaron mediante un glucómetro Glucometer Elite de la casa Bayer con sus correspondientes tiras reactivas.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada grupo experimental, se estimaron el valor medio y el error estándar (SEM). El efecto del sistema de cultivo se determinó mediante ANOVA de un factor. Cuando las diferencias fueron significativas ($P < 0,05$), los grupos experimentales se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan (1955). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software específico SPSS19 (SPSS Inc.).

4. Evaluación del bienestar de la tenca en distintos sistemas de cultivo

4.1. INTRODUCCIÓN

La producción actual de la tenca es limitada debido a su mantenimiento en cultivos tradicionales de baja intensidad. Sin embargo, los precios que alcanza en el mercado para consumo, así como su elección como especie objetivo para los pescadores deportivos, hacen que su demanda esté aumentando, lo que implica una necesaria evaluación de los parámetros que puedan afectar al bienestar de esta especie bajo condiciones de cultivo más intensivas. Tradicionalmente, se ha cultivado en sistemas extensivos o semi-intensivos y se han realizado algunas pruebas experimentales en sistemas intensivos con recirculación (Celada *et al.*, 2007b; Kamler *et al.*, 2006; Pantazis y Hatzinikolaou 2011; Sierra *et al.*, 1995; Wolnicki y Myszowski, 1998; Wolnicki *et al.*, 2006). Aunque esta especie puede adaptarse a estos sistemas de recirculación, varias condiciones evaluadas experimentalmente con anterioridad han dado resultados negativos, mostrando la tenca un crecimiento lento (Bircan *et al.*, 1989), altas tasas de deformidades y elevada mortalidad (Backiel, 1986; Fleig y Gottschalk, 2001; Kaminski *et al.*, 2017). Las principales causas asociadas con estos malos resultados parecen haber sido una alimentación inadecuada, la escasa domesticación y la falta de estudios que evalúen las condiciones óptimas de cultivo.

Hasta la fecha son pocos los ensayos que se han realizado con esta especie para determinar las mejores condiciones para su cultivo, y en la mayoría de ocasiones, estos ensayos se han realizado en acuarios, en los que no parece adaptarse bien esta especie. En este estudio se ha tenido este aspecto en cuenta y las condiciones experimentales que se han propuesto son muy próximas a las condiciones de sistemas de cultivo reales en instalaciones de acuicultura.

En este capítulo se analizan tres diferentes sistemas de cultivo: extensivo (E), con una densidad inicial de 0.07 kg/m^3 , sin control de los parámetros ambientales y alimentación natural; semi-intensivo (S-I), con una densidad inicial de 0.42 kg/m^3 , control parcial de temperatura y con suplemento de comida artificial; e intensivo (I), con una densidad inicial de 2.5 kg/m^3 , control total del foto- y termo-periodo y con exclusiva dieta artificial. En estos tres sistemas se ha evaluado el crecimiento e índices relacionados, índices biométricos, parámetros hematológicos, parámetros bioquímicos, hormonas y electrolitos en plasma, ciertas variables relacionadas con el metabolismo intermediario y el estado oxidativo en hígado y plasma, parámetros inmunológicos, y además se ha realizado un estudio histológico en intestino e hígado.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Crecimiento e índices biométricos de la tenca en distintos sistemas de cultivo

El análisis de las variables relacionadas con el crecimiento, como el peso corporal final, la longitud total final y los índices relacionados derivados de éstos, como el incremento de densidad y tasa de crecimiento instantáneo (TCI), mostraron diferencias significativas entre los tres sistemas de cultivo (Tabla V). Estos índices mostraron valores significativamente más altos en tencas cultivadas bajo el sistema I. Los valores más bajos se obtuvieron en el grupo experimental E y valores intermedios en el grupo S-I.

Tabla V. Crecimiento de la tenca (*Tinca tinca*) e índices relacionados en diferentes sistemas de cultivo.

	E	S-I	I	P
Peso final (g)	11.80±0.22 ^a	19.81±0.67 ^b	23.38±0.75 ^c	<0.001
Longitud total final (mm)	96.87±0.55 ^a	106.75±0.97 ^b	112.72±0.94 ^c	<0.001
K final 100x(g/cm³)	1.27±0.01 ^a	1.52±0.01 ^b	1.50±0.01 ^b	<0.001
TCI (% /día)	0.44±0.01 ^a	0.87±0.02 ^b	1.01±0.03 ^c	<0.001
IHS (%)	0.96±0.09 ^a	1.46±0.10 ^b	1.27±0.05 ^b	<0.001
IGS (%)	4.98±0.89 ^b	5.72±0.67 ^b	3.10±0.37 ^a	0.013
IDS (%)	5.06±0.35 ^c	4.04±0.14 ^b	3.38±0.13 ^a	<0.001
Grasa perivisceral (%)	0.24±0.06 ^a	3.17±0.15 ^b	3.98±0.19 ^c	<0.001
Rendimiento de la carcasa (%)	87.09±0.98 ^b	82.66±0.59 ^a	86.10±0.51 ^b	<0.001
Incremento de densidad (%)	72.31±10.01 ^a	177.00±25.73 ^b	207.41±11.45 ^c	0.001
IC	-----	-----	2.27±0.13	ns
IDef (%)	19.42±0.49 ^a	27.51±0.75 ^b	27.18±1.41 ^b	0.006
Supervivencia (%)	100	99.84±6.10	95.04±3.64	ns

Los valores mostrados son media ± SEM; n = 300, para peso corporal final, longitud total final total, K (Factor de condición final) y TCI (Tasa de crecimiento instantáneo); n = 12 para IHS (Índices hepatosomático), IGS (Índice gonadosomático), IDS (Índice digestivosomático) grasa perivisceral y rendimiento de la carcasa; n = 3 (lotes de peces) para el aumento de densidad, para IC (Índice de conversión alimenticia), IDef (Incidencia de peces con deformidades corporales visibles) y supervivencia. Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$), (ns) no significativa. E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

El índice de grasa perivisceral también reflejó esta misma tendencia, con valores más altos en I seguidos de S-I y finalmente, valores más bajos en E.

Los valores de factor de condición (K), fueron mayores en el grupo S-I, mostrando los valores menores en el grupo E y valores intermedios en I.

El índice hepatosomático, así con el índice de peces deformes (IDef) fueron también menores en peces cultivados en sistema E, pero no mostraron diferencias en entre las tencas de los otros dos sistemas I y S-I.

No fue posible realizar el análisis del índice de conversión del alimento (IC) ya que los grupos experimentales E y S-I tenían acceso a alimento natural que no se pudo cuantificar.

Los valores mayores con respecto al índice gonadosomático (IGS) se observaron en los peces de los cultivos E y S-I, frente a los peces cultivados en las condiciones I.

Los valores más elevados tanto en índice hepatosomático (IHS) como en IGS mostrados por tencas del sistema S-I también condicionaron que este grupo mostrara el valor más bajo en cuanto al rendimiento de carcasa frente a los otros dos grupos I y E. En cuanto a la supervivencia, no se observaron diferencias estadísticas entre los animales en los tres sistemas de cultivo.

4.2.2. Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Los diferentes sistemas de cultivo promovieron diferencias estadísticamente significativas para el cortisol y la glucosa en plasma (Tabla VI), que fueron estadísticamente inferiores en el grupo I en comparación con SI y E.

En el caso de la glucosa el valor más elevado se registró en el grupo S-I y el grupo de peces en cultivo extensivo (E) mostró valores intermedios.

El contenido de colesterol, lipoproteínas (HDL, LDL) y proteínas plasmáticas mostraron valores superiores y estadísticamente significativos en el grupo experimental I. Para estos parámetros, los resultados del grupo S-I mostraron valores intermedios entre los grupos experimentales I y E. Por el contrario, los triglicéridos en plasma fueron significativamente más altos en los peces en cultivos E y S-I.

Las hormonas tiroideas T3 y T4 en plasma siguieron un perfil similar, ya que los peces en cultivo I mostraron valores significativamente menores de ambas hormonas en comparación con el grupo experimental de cultivo E.

Atendiendo a los electrolitos plasmáticos, los peces en cultivo I mostraron valores significativamente menores de Na^+ en comparación con los otros dos grupos (S-I y E) siendo esta tendencia opuesta para la concentración de Cl^- , que aumentó significativamente para el grupo I de peces. No se mostraron diferencias estadísticas entre los animales de los tres sistemas de cultivo en relación al K^+ .

Tabla VI. Efecto de los diferentes sistemas de cultivo sobre parámetros bioquímicos, hormonas y electrolitos en plasma de tencas (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	29.11 \pm 2.81 ^b	27.60 \pm 2.34 ^b	16.35 \pm 2.33 ^a	<0.001
Glucosa (mg/dL)	110.33 \pm 8.45 ^b	144.58 \pm 12.56 ^c	58.46 \pm 4.13 ^a	<0.001
Colesterol (mg/dL)	146.00 \pm 2.42 ^a	175.67 \pm 7.06 ^b	179.83 \pm 6.79 ^c	<0.001
HDL (mg/mL)	61.42 \pm 3.57 ^a	82.83 \pm 4.06 ^b	121.69 \pm 6.06 ^c	<0.001
LDL (mg/mL)	10.50 \pm 0.77 ^a	12.42 \pm 1.33 ^a	15.54 \pm 1.03 ^b	0.006
Triglicéridos (mg/dL)	140.92 \pm 5.65 ^b	167.00 \pm 4.38 ^c	101.54 \pm 4.78 ^a	<0.001
Proteína total (mg/mL)	34.75 \pm 2.16 ^a	52.44 \pm 2.30 ^b	71.11 \pm 2.76 ^c	<0.001
T3 ($\mu\text{g/mL}$)	6.05 \pm 0.79 ^b	5.59 \pm 0.31 ^b	3.59 \pm 0.17 ^a	0.002
T4 (ng/mL)	3.8 \pm 0.5 ^b	0.8 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.1 ^a	<0.001
Cl⁻ (mmol/L)	95.50 \pm 1.41 ^a	94.00 \pm 1.16 ^a	100.85 \pm 1.53 ^b	0.007
K⁺ (mmol/L)	1.05 \pm 0.2	0.68 \pm 0.05	1.35 \pm 0.28	ns
Na⁺ (mmol/L)	140.67 \pm 1.16 ^b	139.75 \pm 1.54 ^b	134.69 \pm 1.47 ^a	0.022

Los valores muestran media \pm SEM siendo n = 12 para HDL (High density lipoprotein), LDL (Low density lipoprotein), T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$). (ns) no significativa. E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

4.2.3. Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Las actividades de las enzimas hepáticas GPT, GOT y CS fueron significativamente mayores en los peces en cultivos E y S-I en comparación con el grupo I (Tabla VII). Por el contrario, las actividades de PK y HOAD fueron mayores en los peces en cultivo I con respecto a E y S-I aunque ésta última (HOAD) no llegó a mostrar diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, la actividad de LDH mostró el valor más alto en S-I en comparación con los grupos E e I.

Tabla VII. Influencia de los distintos sistemas de cultivo en el metabolismo intermediario del hígado de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
GPT (mU/mg proteína)	247.23±40.19 ^{ab}	312.09±30.23 ^b	197.72±19.65 ^a	0.023
GOT (mU/mg proteína)	846.23±139.48 ^{ab}	986.03±95.05 ^b	659.93±69.74 ^a	0.05
CS (mU/mg proteína)	48.13±7.71 ^b	61.66±5.27 ^b	32.34±4.16 ^a	0.02
HOAD (mU/mg proteína)	6.25±0.86	7.18±1.31	11.18±3.61	ns
LDH (U/mg proteína)	1.18±0.21 ^a	2.04±0.21 ^b	1.41±0.25 ^a	0.023
PK (mU/mg proteína)	36.34±5.63 ^a	80.12±7.41 ^a	248.69±42.40 ^b	<0.001

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$), ns (no significativa). GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), CS (Citrato sintasa), HOAD (β -Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Las actividades de todas las enzimas plasmáticas relacionadas con el metabolismo intermediario analizadas mostraron valores estadísticamente significativos más altos en los peces en cultivo E en comparación con los grupos S-I e I, a excepción de la enzima GPT para la que el grupo S-I mostró el valor más alto (Tabla VIII).

Tabla VIII. Influencia de los distintos sistemas de cultivo en el metabolismo intermediario en el plasma de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
GPT (mU/mg proteína)	1.28±0.1 ^{ab}	1.68±0.13 ^b	1.02±0.18 ^a	0.012
GOT (mU/mg proteína)	15.18±1.18 ^b	8.36±0.45 ^a	7.68±1.06 ^a	<0.001
LDH (mU/mg proteína)	75.86±9.21 ^b	27.13±3.36 ^a	40.22±4.01 ^a	<0.001
PK (mU/mg proteína)	31.54±4.96 ^b	13.63±1.15 ^a	14.47±1.30 ^a	0.002

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

4.2.4. Estado oxidativo en hígado y en plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Los valores de actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado fueron estadísticamente más altos en los grupos E y S-I que en I (Tabla IX).

Tabla IX. Influencia del sistema de cultivo en el estado oxidativo del hígado de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
SOD (U/mg proteína)	254.26±17.15 ^b	295.08±27.06 ^b	173.07±8.61 ^a	0.001
Catalasa (U/mg proteína)	214.68±21.65 ^b	232.79±17.91 ^b	141.91±9.32 ^a	0.001
GPX (mU/mg proteína)	170.18±21.22 ^a	236.55±16.23 ^b	163.46±10.19 ^a	0.006
GR (mU/mg proteína)	13.49±0.99 ^b	11.79±0.89 ^b	6.95±0.32 ^a	<0.001
GST (mU/mg proteína)	142.60±14.14	150.53±13.89	110.20±7.00	ns
DTD (mU/mg proteína)	5.76±1.30 ^{ab}	7.29±0.83 ^b	3.94±0.22 ^a	0.026
G6PDH (mU/mg proteína)	79.88±14.89 ^a	136.66±12.3 ^b	92.31±7.73 ^a	0.08
MDA (mg/mL)	6.08±1.89	6.06±0.81	5.89±0.58	ns

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P \leq 0.05$). ns (no significativo). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), MDA (Malondialdehído), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para la actividad de SOD, CAT, GR, G6PDH y DTD. Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de MDA entre los grupos experimentales.

En la tabla X se muestra que las actividades de las enzimas antioxidantes analizadas en plasma (SOD, CAT, GPX, GR y GST) fueron significativamente mayores en los animales cultivados en el sistema E en comparación con los peces del grupo en cultivo I. Los resultados del grupo S-I mostraron valores intermedios entre los grupos experimentales I y E.

Tabla X. Influencia del sistema de cultivo en el estado oxidativo del plasma de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
SOD (U/mg proteína)	4.36±0.26 ^c	2.57±0.07 ^b	1.8±0.16 ^a	<0.001
Catalasa (mU/mg proteína)	661.58±144.45 ^b	500.56±101.64 ^{ab}	284.56±55.23 ^a	0.05
GPX (mU/mg proteína)	15.51±1.35 ^b	5.85±0.66 ^a	3.43±0.50 ^a	<0.001
GR (mU/mg proteína)	1.54±0.19 ^b	0,53±0.04 ^a	0.34±0.04 ^a	<0.001
GST (mU/mg proteína)	195.68±25.60 ^b	146.56±15.59 ^{ab}	122.18±10.43 ^a	0.027
DTD (mU/mg proteína)	0.14±0.05	0.10±0.02	0.04±0.01	ns

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$). ns (no significativo). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

4.2.5. Parámetros inmunológicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo

En cuanto a los parámetros inmunológicos analizados (Tabla XI), los resultados revelaron valores significativamente menores de inmunoglobulina total y contenido de globulina sérica en los peces cultivados en sistema E frente a los otros dos grupos,

observándose además los mayores valores respecto a la inmunoglobulina total en el grupo I.

No se observaron diferencias significativas en la actividad hemolítica ni tampoco en la de hemaglutinación entre los tres grupos experimentales.

Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores de hematocrito, de hemoglobina y de la actividad respiratoria de leucocitos (burst activity), aunque estas tres variables presentaban una tendencia similar a la encontrada en las actividades peroxidasa, lisozima y lipoxigenasa, que sí mostraron diferencias significativas, siendo los valores mayores correspondientes al grupo experimental de cultivo E y menores al grupo I.

Tabla XI. Influencia de diferentes sistemas de cultivo en el perfil inmunológico en plasma de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
Globulina sérica (mg/mL)	30.89±5.42 ^a	88.38±4.01 ^c	62.67±5.97 ^b	0.0001
Inmunoglobulina total (mg/mL)	23.41±2.00 ^a	36.21±2.13 ^b	54.70±2.93 ^c	0.0001
Actividad hemolítica (Ln)	5.92±0.08	6.33±0.19	6.00±0.08	ns
Hemoaglutinación (Ln)	5.92±0.15	6.42±0.15	5.92±0.15	ns
Actividad respiratoria (D.O.)	0.27±0.01	0.26±0.01	0.25±0.01	ns
Actividad peroxidasa (D.O.)	2.51±0.26 ^c	2.02±0.27 ^b	1.03±0.13 ^a	0.0001
Actividad lisozima (µg/mL of equiv.HEWL)	1.74±0.31 ^b	1.50±0.16 ^b	0.60±0.13 ^a	0.0001
Actividad lipoxigenasa (mU/mg proteína)	0.30±0.01 ^c	0.23±0.01 ^b	0.16±0.00 ^a	0.0001
Hematocrito (%)	31.17±1.59 ^b	29.45±1.14 ^b	23.51±1.32 ^a	0.022
Hemoglobina (g / L)	18.39±1.53	17.39±0.51	15.82±0.40	ns
Linfocitos / granulocitos	15.27±3.10 ^a	16.72±3.95 ^a	27.14±2.26 ^b	0.05

Los valores son la media ± SEM (n = 12). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). ns (no significativa). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

La relación entre linfocitos y granulocitos presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) siendo el grupo experimental I en que mostró valores más altos ($27,14 \pm 2,26$)

en comparación con los grupos SI y E que manifestaron valores similares entre sí ($16,72 \pm 3,95$ y $15,27 \pm 3,10$, respectivamente).

4.2.6. Análisis histológico del digestivo de la tenca en distintos sistemas de cultivo

4.2.6.1. Estudio histológico del intestino de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Los cortes histológicos del intestino de la tenca en los tres sistemas de cultivo mostraron diferencias morfológicas significativas (Tabla XII, Fig. 22).

Tabla XII. Influencia de los distintos sistemas de cultivo en la morfología del intestino de la tenca (*Tinca tinca*).

	E	S-I	I	P
<u>Intestino proximal</u>				
Longitud vellosidades (%)	21.94±1.18 ^a	25.02±0.85 ^a	39.90±2.66 ^b	<0.001
Grosor vellosidades (%)	8.44±0.61	8.84±0.35	8.32±0.50	ns
Espesor capa muscular (%)	18.15±2.08 ^a	26.18±1.07 ^b	22.35±1.68 ^b	0.024
<u>Intestino medial</u>				
Longitud vellosidades (%)	32.22±0.93 ^a	44.62±0.77 ^b	46.92±1.18 ^b	<0.001
Grosor vellosidades (%)	11.66±0.54	11.17±0.67	11.05±0.60	ns
Espesor capa muscular (%)	12.10±0.65 ^a	17.52±0.88 ^c	14.34±0.84 ^b	<0.001

Los valores indican media \pm SEM, n = 10, del porcentaje con respecto al radio de la sección transversal analizada. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativo). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

En el grupo experimental E, las vellosidades fueron más cortas y la capa muscular menos gruesa frente a los demás grupos, tanto en el intestino proximal como en el medial, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las vellosidades del intestino proximal de estos peces en cultivo E frente al grupo S-I. El

espesor de la capa muscular fue mayor en el grupo S-I tanto en el intestino proximal como en el medial, aunque solo en este último se mostraban diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los grupos de cultivo extensivo e intensivo.



Figura 22. Influencia de los distintos sistemas de cultivo en la morfología del intestino proximal de la tenca (*Tinca tinca*). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo). Las imágenes corresponden a tres secciones transversales del intestino proximal donde se observa un mayor diámetro de la luz intestinal en los peces en cultivo E, además de un deterioro de las vellosidades de la mucosa intestinal. Los peces en cultivo I, mostraron una superficie de absorción intestinal incrementada, ligada a un diámetro de la luz intestinal más reducido. Tinción Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 1.000 µm.

Un análisis más detallado a mayores aumentos del intestino proximal (Fig. 23) mostró un deterioro de la parte apical de las vellosidades en los peces cultivados en los sistemas extensivo (E) y semi-intensivo (S-I) que afectó al epitelio, donde se observa un aumento del espacio entre células epiteliales y una retracción de las mismas. Además, en determinadas zonas se observa incluso una protrusión del corion hacia la luz intestinal. Por otro lado, en las secciones de intestino de peces en cultivo intensivo (I) se observa que la integridad de las vellosidades apenas está afectada, con un borde en cepillo claro y definido. Además, estos animales mostraron un aumento de la superficie de absorción con una elevada longitud de las vellosidades asociada a la aparición de numerosos pliegues.

En el intestino medial no se observó un deterioro tan evidente de las vellosidades en ningún grupo experimental (resultados no mostrados).

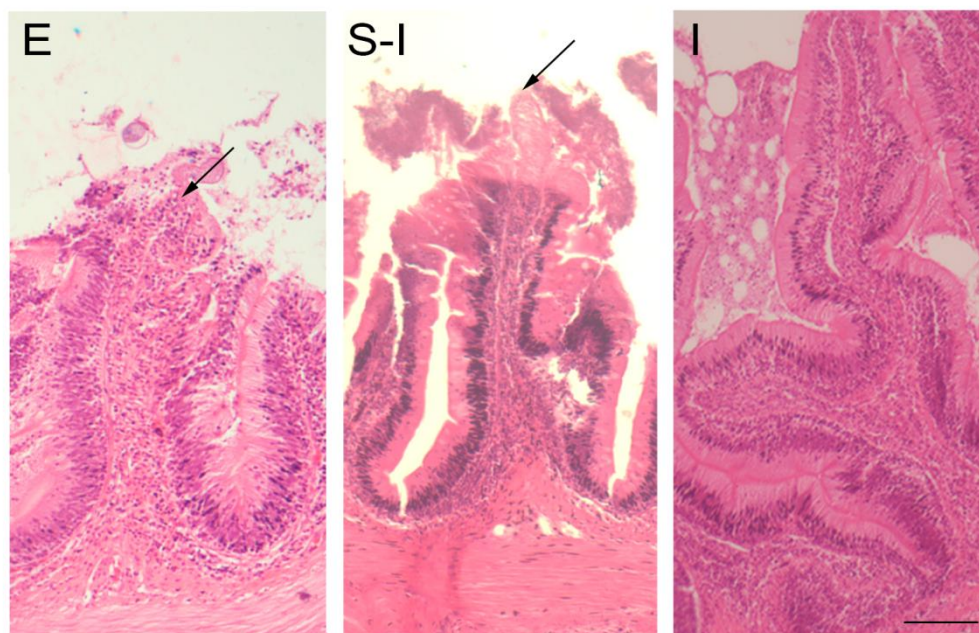


Figura 23. Micrografía de vellosidades del intestino proximal de tenca (*Tinca tinca*) en las tres condiciones de cultivo. Se observa un deterioro y protrusión del corion (c) en la zona apical de las vellosidades (flecha), con separaciones entre las células epiteliales en los animales bajo cultivo extensivo (E) y semi-intensivo (S-I). Los animales bajo cultivo intensivo (I) mostraron un tejido sin deterioro en vellosidades con un aumento de la superficie de absorción debida a un alto número de pliegues de la mucosa. Tinción Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 100 µm.

4.2.6.2. Estudio histológico del hígado de la tenca en distintos sistemas de cultivo

El análisis microscópico del hígado de tenca (Fig. 24) mostró algunas diferencias relativas en animales bajo diferentes condiciones de cultivo. En los peces del cultivo extensivo, los hepatocitos mostraron un citoplasma de aspecto homogéneo, mientras que en los grupos S-I e I los hepatocitos presentaban un citoplasma menos teñido y con aspecto granular.

Con relación a la irrigación vascular, los animales E mostraron una moderada dilatación de los sinusoides, en algunos casos con presencia de células sanguíneas y que no fue tan patente en los dos restantes grupos.

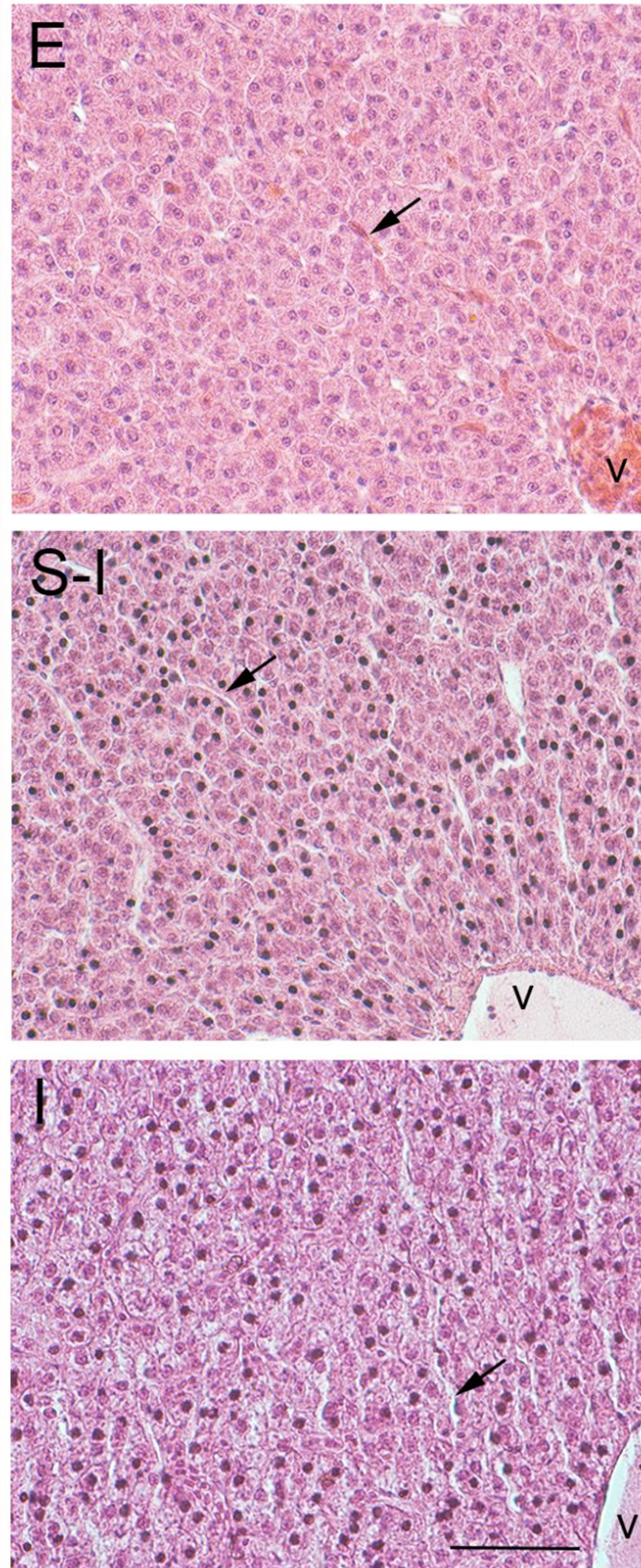


Figura 24. Micrografía del hígado de la tenca (*Tinca tinca*) en las tres condiciones de cultivo. Se observan cordones de hepatocitos con sinusoides sanguíneos (flecha). V (vena post-sinusoidal). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo). Tinción Hematoxilina-Eosina. Escala: 100 μ m.

4.3. DISCUSIÓN

La acuicultura es actualmente la alternativa a la producción de proteínas de origen animal para el consumo humano. Pero la piscicultura aún necesita muchos avances en aspectos de bienestar animal para garantizar que un aumento en la producción sea paralelo al esfuerzo por evitar el sufrimiento de los animales durante su cultivo por lo que hoy en día, el bienestar de los peces es un aspecto prioritario a considerar en la piscicultura (Huntingford *et al.*, 2006). Para ello, se necesitan estudios como este, que tienen como objetivo mostrar cuáles son las condiciones de cultivo más apropiadas para una especie con un interés creciente en la acuicultura, como es la tenca.

Por otro lado, uno de los desafíos más importantes en la acuicultura es proporcionar al consumidor productos de buena calidad, de acuerdo con sus características nutricionales, organolépticas y sanitarias (Sanchez-Muros *et al.*, 2016).

El estudio de las características biométricas, hematológicas, bioquímicas e histológicas de las especies de peces en cultivo es necesario para mejorar los sistemas productivos en acuicultura, ya que estas son herramientas importantes para discriminar entre animales sanos, enfermos o estresados. (O'Neal y Weirich, 2001; Melis y Anedda, 2014).

El presente estudio se centra en la evaluación de parámetros e índices relacionados con el crecimiento, la actividad metabólica y el estado oxidativo, así como de diferentes parámetros hematológicos, con especial énfasis en aquellos relacionados con la respuesta inmune, además del análisis histológico del intestino e hígado de esta especie mantenida en tres sistemas de cultivo diferentes: intensivo (I, tanques circulares, densidad inicial $2,5 \text{ kg} / \text{m}^3$ y condiciones de cultivo controladas y aisladas del medio natural: temperatura, fotoperiodo, alimentación regular diaria), semi-intensivo (SI, estanques en invernadero, densidad inicial $0,42 \text{ kg} / \text{m}^3$, temperatura parcialmente controlada, alimentación natural más suplemento con alimento artificial y fotoperiodo natural) y extensivo (E, estanques con vegetación natural en el fondo, densidad inicial de población de $0,07 \text{ kg} / \text{m}^3$, temperatura, fotoperiodo y alimentación naturales).

4.3.1. Crecimiento e índices biométricos de la tenca en distintos sistemas de cultivo

El cultivo intensivo de peces implica generalmente aumento en las densidades utilizadas. En este sentido, varios estudios han mostrado que el hacinamiento está relacionado con la respuesta al estrés en los peces (Ellis *et al.*, 2002; Jentoft *et al.*, 2005; Procarione *et al.*, 1999; Sánchez-Muros *et al.*, 2016). Asimismo, se había mostrado una relación inversa entre la densidad y el crecimiento en la tenca (Fleig y Gottschalk, 2001; Rennert *et al.*, 2003). Sin embargo, en este estudio, se mostró un aumento significativo del crecimiento y los índices relacionados en tencas bajo el régimen de cultivo intensivo (I), en comparación con los sistemas semi-intensivo (S-I) y extensivo (E) (Fig. 25). Esta relación directa entre la densidad y el crecimiento de la tenca concuerda con los resultados obtenidos por Celada *et al.* (2007a) y Pantazis (2012).

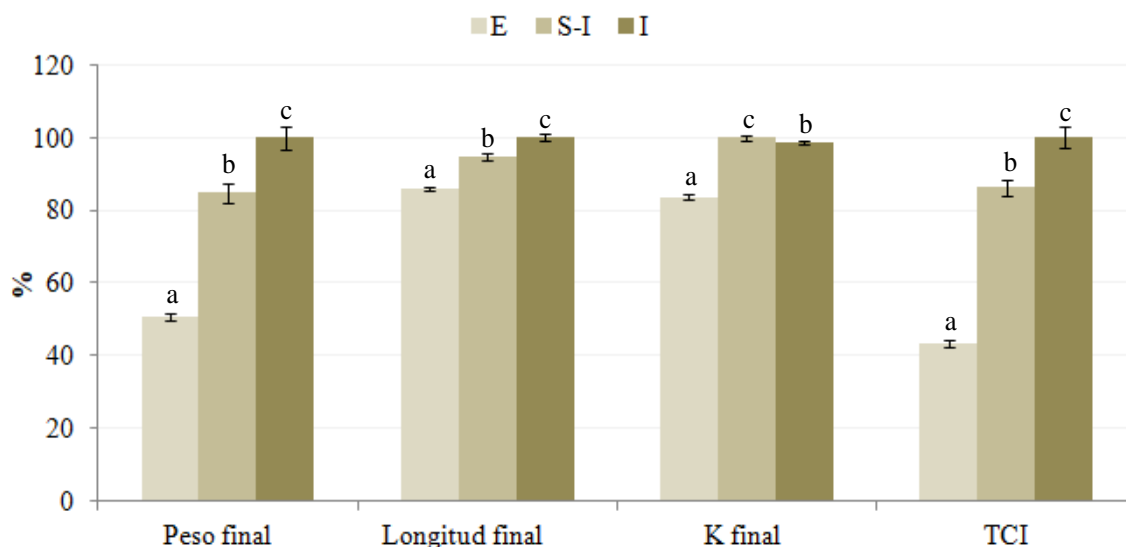


Figura 25. Datos de crecimiento individual en tencas (*Tinca tinca*) cultivadas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100. (n = 315). Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). K (Índice de condición), TCI (Tasa de crecimiento instantáneo), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Además, el mayor crecimiento observado en el grupo experimental de cultivo I puede estar influenciado por otros parámetros inherentes a este sistema de cultivo como temperatura, fotoperiodo y alimentación controlados. Contrariamente, en las otras

condiciones de cultivo ensayadas (S-I y E) parece haberse desencadenado una respuesta natural hacia algunas variables como el fotoperiodo y termoperiodo, hecho que, como se discutirá más adelante, fue determinante para su desarrollo gonadal.

Cabe señalar que el menor porcentaje de deformidades corporales detectadas en los peces bajo cultivo E en comparación con los animales S-I e I (Fig 26), coincide con ensayos previos en tenca en condiciones de cultivo similares, que sugieren la posibilidad de deficiencias nutricionales asociadas al régimen de alimentación artificial (Kamler, *et al.*, 2006; Pantazis y Hatzinikolaou, 2011; Rennert, *et al.*, 2003; Wolnicki, *et al.*, 2006). Las tencas en condiciones S-I e I compartieron un régimen de alimentación a base de pienso con una formulación no específica para tenca (alimento para ciprínidos). En este sentido, un estudio exhaustivo sobre los requerimientos nutricionales específicos de la tenca facilitaría la formulación de una dieta balanceada para esta especie que minimizara estos problemas.

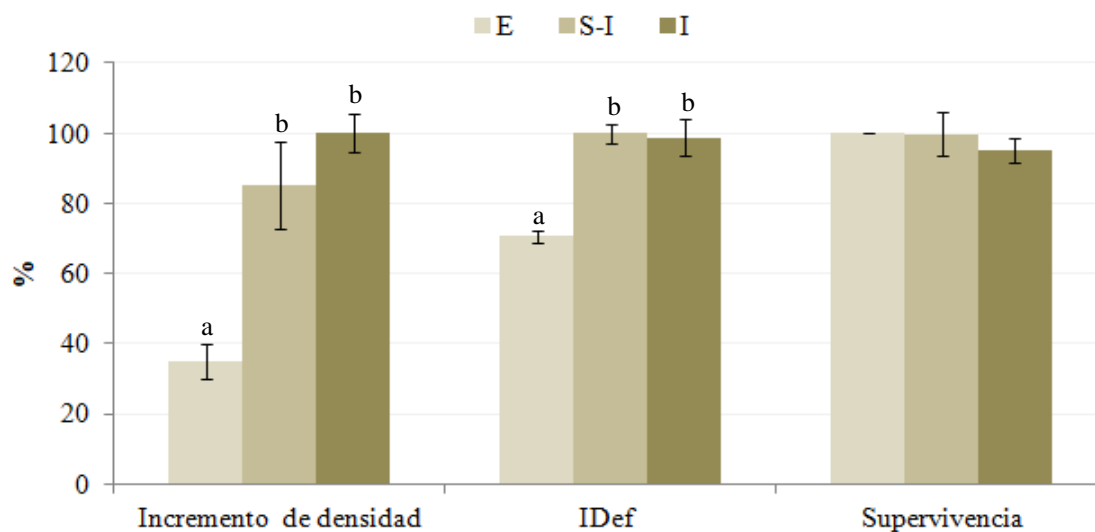


Figura 26. Datos de crecimiento por lotes en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, siendo $n = 3$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$), IDef (Incidencia de peces con deformidades corporales visibles), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Respecto a la supervivencia de los peces registrada en este estudio, todos los grupos mostraron valores altos y muy satisfactorios, sin diferencias significativas entre ellos, mayores en cualquier caso a los resultados expresados por otros autores como Celada *et al.* (2007) en condiciones controladas y similares a los obtenidos por Pantazis

(2012) para peces de similar tamaño. En estudios realizados por otros autores en cultivos en estanques, que podrían representar condiciones similares a las de los grupos E y S-I, se encontraron mortandades próximas al 50% de la población (Füllner y Pfeifer, 1994).

Debido a la imposibilidad de estimar el alimento natural presente en las condiciones de cultivo E y S-I, el índice de conversión del alimento (IC) solo pudo estimarse en peces bajo cultivo I (Tabla V). Aun así, los resultados muestran que este índice (IC) fue aparentemente mejor que los resultados proporcionados por otros autores para la misma especie y en peces de tamaño similar (Pantazis, 2012; Pantazis y Hatzinikolaou, 2011).

En este ensayo, la alimentación artificial aportada a los peces de las condiciones experimentales S-I e I implicó un suministro superior de nutrientes que, de acuerdo con los parámetros biométricos analizados, podría estar relacionado con un aumento de reservas en el hígado y un consecuente aumento del índice hepatosomático (IHS) observado en estos animales en comparación con aquellos mantenidos con alimentación exclusivamente natural (Fig. 27).

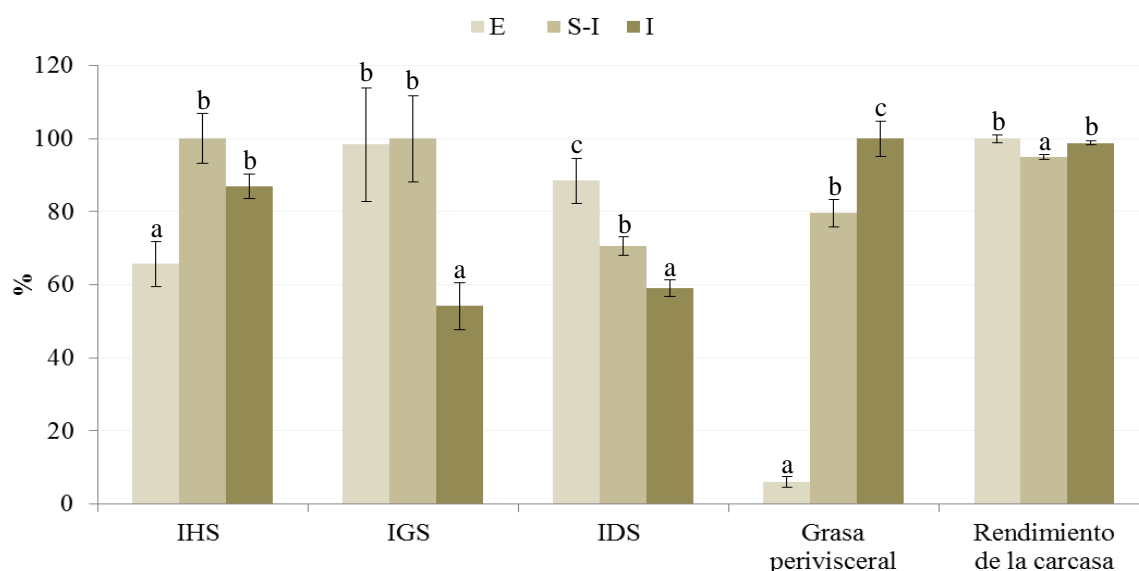


Figura 27. Resultados biométricos en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), IHS (Índice hepatosomático), IGS (Índice gonadosomático), IDS (Índice digestivosomático), Grasa perivisceral, y Rendimiento de la carcasa E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Los peces sin este aporte de nutrientes y con la alta demanda energética mantenida para hacer frente al desarrollo gonadal pudieron ver mermadas sus reservas hepáticas de glucógeno, observándose así un menor IHS.

Xu *et al.* (2001) encontraron resultados en perca (*Perca fluviatilis*) que demostraban una relación directa entre los niveles de lípidos en la dieta y el porcentaje de lípidos almacenados en el hígado. En este sentido, la mayor ingesta de lípidos también explicaría la mayor acumulación de grasa perivisceral en los lotes S-I y I (De Pedro, *et al.*, 2001; Grigorakis, *et al.*, 2002; Nassour y Léger, 1989; Peres y Oliva-Teles, 1999).

En los peces mantenidos bajo condiciones de cultivo E se observó una relación inversa entre IHS y IGS. Esta correlación inversa ha sido observada en otras especies (Kang, *et al.*, 2013). En este sentido, la influencia del fotoperiodo y natural habría y quizás el termoperiodo, habrían desencadenado la maduración gonadal en estos peces, promoviendo una movilización de las reservas nutricionales de los tejidos como el hígado hacia las gónadas en desarrollo (Guijarro, *et al.*, 2003; MacFarlane y Norton, 1999). Además, este proceso se vería acentuado por una ingesta insuficiente para cubrir el aumento en demanda energética asociada con el proceso reproductivo. Por otro lado, los peces del grupo experimental S-I, alimentados parcialmente con alimentos artificiales, a pesar del desarrollo gonadal, no manifestaron una disminución de IHS como ocurre en las tencas bajo cultivo E.

Por lo tanto, cabe esperar que el desarrollo gonadal en los grupos E y S-I haya condicionado un menor crecimiento de estos con respecto a los peces cultivados en el sistema I.

El rendimiento de la carcasa es un parámetro de crecimiento que tiene una importante repercusión para el consumo (Basso *et al.*, 2011). Los peces cultivados bajo las condiciones E mostraron valores de rendimiento de la carcasa más altos pero sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a los peces del grupo I. Además, estos peces (E) mostraron un factor de condición (K) más bajo, relacionado posiblemente con la falta casi total de grasa perivisceral y un IHS relativamente menor que les dió un aspecto más silvestre. Este hecho representarían un factor muy positivo en cuanto a su comercialización, pero desde el punto de vista de la producción no supondría una ventaja ya que el crecimiento de estos peces fue notablemente menor.

4.3.2. Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo

De acuerdo con las fases de respuesta al estrés, se ha descrito que el estrés primario se manifiesta con el aumento de los niveles de cortisol en plasma (Acerete *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2012; Jentoft *et al.*, 2005). En este sentido, se han encontrado opiniones diversas sobre los efectos del hacinamiento en la respuesta al estrés, mostrando niveles altos del cortisol (Pickering y Stewart, 1984), niveles más bajos (Dhabhar *et al.*, 1995; Vijayan y Leatherland, 1988; Wojtaszek *et al.*, 2002) o ausencia de cambios (Aalimahmoudi *et al.*, 2016; Hasanali pour *et al.*, 2013; Rafatnezhad *et al.*, 2008).

Varios estudios indican que los niveles de cortisol en el plasma pueden ser más altos en los peces sexualmente maduros (Barry *et al.*, 2001; Milla *et al.*, 2009; Rocha y Reis-Henriques 1999; Westring *et al.*, 2008; Ya-yi *et al.*, 2001). Estos resultados respaldarían los datos encontrados en el presente estudio, ya que los peces E y S-I, con mayor IGS (Fig. 27), presentaron niveles significativamente más elevados de cortisol plasmático que los peces cultivados en el sistema I (Fig. 28).

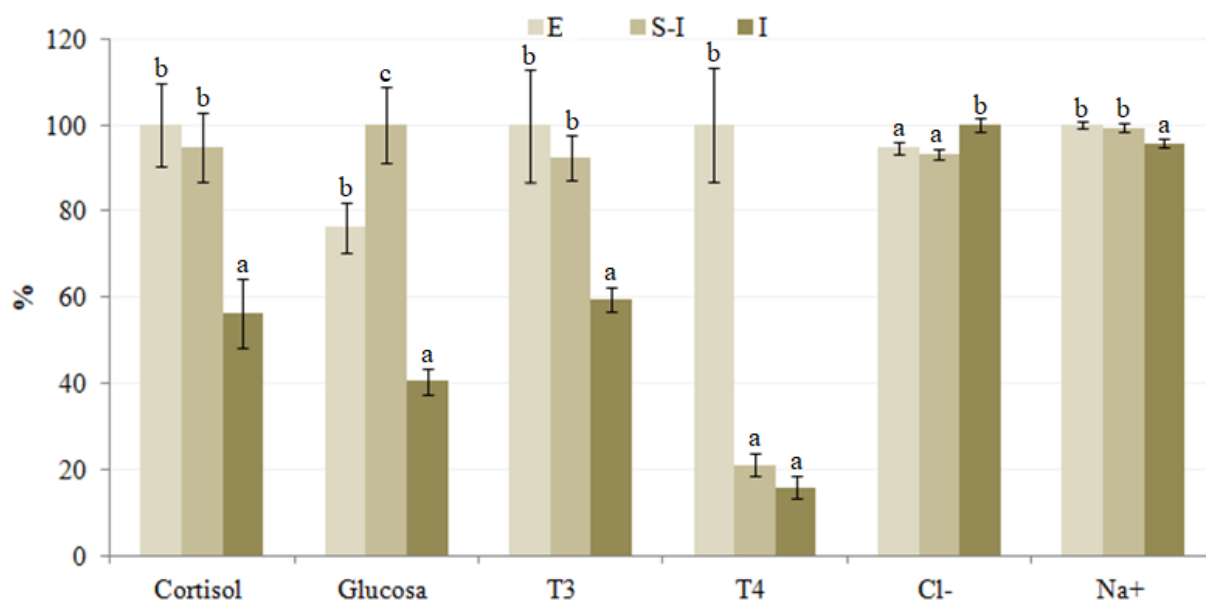


Figura 28. Parámetros bioquímicos, hormonas e iones en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12, Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Por otro lado, los cambios en los niveles de glucosa en plasma podrían considerarse un indicador útil del estrés agudo en peces, aunque según otros autores este parámetro sería menos preciso que el cortisol (Wedemeyer *et al.*, 1990; Pottinger, 1998; Cho *et al.*, 2015).

La liberación de catecolaminas en la respuesta primaria al estrés también promueve un aumento en la glucosa plasmática mediante la estimulación de la glucogenolisis y, a más largo plazo, de la activación de la gluconeogénesis mediada por cortisol (Bonga, 1997; Cho *et al.*, 2015; Tort *et al.*, 2004). Por otro lado, hay otros factores que pueden desencadenar un aumento de la glucemia, como el estado nutricional, la edad y el estado de maduración o la temperatura del agua. En este estudio, los niveles más altos de glucosa en plasma se obtuvieron en los peces de los grupos experimentales S-I y E. La maduración gonadal, expresada como un mayor valor de IGS (Fig. 27), podría explicar el nivel más alto de cortisol en estos peces y, en consecuencia, los niveles de glucosa también más altos, que fueron significativamente mayores en animales S-I.

El hecho de que los peces con mayor densidad inicial (condiciones de régimen intensivo I, 2,5 kg/m³) mostraran los valores más bajos de cortisol y glucosa (Fig. 28) sugeriría que estos animales no estaban bajo una condición estresante, siendo estos resultados corroborados por los mejores datos obtenidos en cuanto a los parámetros de crecimiento en estos animales (Fig. 25). Parece que la densidad a la que se encontraban los peces estaba dentro del rango adecuado de condiciones de cultivo para esta especie, y también, el mantenerlos alejados de las fluctuaciones ambientales naturales (fotoperiodo y temperatura) han podido evitar el efecto sobre la fisiología de los peces como ocurriría en los grupos experimentales S-I y E.

Varios factores bióticos y abióticos pueden afectar la liberación de hormonas tiroideas en los peces (Grau, 1988). En este sentido, se han encontrado resultados contradictorios con respecto a los efectos del cortisol sobre los niveles de las hormonas tiroideas. Así, diferentes tipos de estrés o tratamiento con cortisol disminuyen los niveles plasmáticos de T4 y/o T3 en diversas especies de peces (Arjona *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 1991; Coimbra y Reis-Henriques 2007; Pickering *et al.*, 1982; Redding *et al.*, 1984; Vijayan *et al.*, 1990). Las hormonas tiroideas tienen un papel fundamental en los procesos reproductivos de los peces y actúan en combinación con la gonadotropina para influir en el desarrollo ovárico de especies como carpín rojo, *Carassius auratus* (Hurlburt, 1977). Otros autores encontraron que los niveles séricos altos de hormonas

tiroideas pueden ser necesarios para la correcta utilización de los alimentos y de la movilización de lípidos necesarios para la maduración de los ovocitos (Pavlidis *et al.*, 2000) y este hecho posiblemente justificaría los valores más altos encontrados en las tencas bajo cultivos E y S-I.

El equilibrio iónico de los peces se puede ver afectado por situaciones de estrés de diversa índole (Bonga, 1997; Postlethwaite y McDonald, 1995), y el cortisol ejerce un papel crucial en la regulación de este equilibrio iónico (Mommsen *et al.*, 1999). Altos niveles de cortisol promoverían la activación de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa y también una disminución significativa en la concentración plasmática de Na^+ y Cl^- . En este estudio, se observaron altos niveles de Cl^- en peces cultivados a mayor densidad, mientras que, por el contrario, presentaban valores más bajos de Na^+ (Carneiro y Urbinati, 2001; da Rocha *et al.*, 2004; Laiz-Carrion *et al.*, 2003; Postlethwaite y McDonald, 1995; Ruane *et al.*, 2002). Esto podría explicarse por la existencia de un transporte independiente de Na^+ y Cl^- que, según Evans *et al.* (2011), en peces de agua dulce está acoplado al transporte de otros iones como NH_4^+ , H^+ o HCO_3^- . Diversos autores (Tomasso *et al.*, 1980; Twitchen y Eddy, 1994) han mostrado que el pez gato de canal (*Ictalurus punctatus*) y la trucha arcoiris expuestos a altos niveles ambientales de NH_3 y NH_4^+ presentaban una disminución en el Na^+ plasmático. Esto podría explicar los resultados mostrados en peces en cultivo intensivo, que presentaban una concentración total de nitrógeno amoniacal (TAN) en agua algo mayor que los lotes S-I y E ($0,97 \pm 0,74$ del grupo I frente a $0,27 \pm 0,16$ y $0,26 \pm 0,11$ mg / L de los grupos S-I y E, Tabla II).

Los cambios en algunos parámetros plasmáticos como colesterol, lipoproteínas, triglicéridos o proteínas totales podrían ser indicativos de una función fisiológica afectada en los peces (Ajani, 2015, Cileček, 2011; Mares *et al.*, 2007; Wagner y Congleton, 2004). La literatura es escasa con respecto a resultados sobre los cambios en los metabolitos plasmáticos en tencas en condiciones estresantes.

En el presente estudio se encontró que el colesterol, el HDL, el LDL y las proteínas totales aumentaban con la intensificación del cultivo, al contrario que los niveles de triglicéridos, que disminuían (Fig. 29). Los menores niveles de colesterol hallados en los peces en cultivo E y S-I podrían estar relacionados con su uso como precursor de las hormonas sexuales esteroideas que podría asociarse con su maduración gonadal, de acuerdo con (Hemre *et al.*, 2002; Nagahama, 1994).

A pesar de que algunos autores declararon un aumento significativo de proteínas plasmáticas en peces bajo estrés agudo (Demers *et al.*, 1994), otros mostraron una disminución en el colesterol y las proteínas en pargo (*Pagrus major*) bajo estrés por manejo (Biswas *et al.*, 2006), disminución de las proteínas plasmáticas en carpines dorados (*Carassius auratus*) sometidos a estrés crónico (Eslamloo *et al.*, 2014) y aumento de triglicéridos en el rodaballo (*Scophthalmus rhombus*) bajo condiciones de hacinamiento (Herrera *et al.*, 2012).

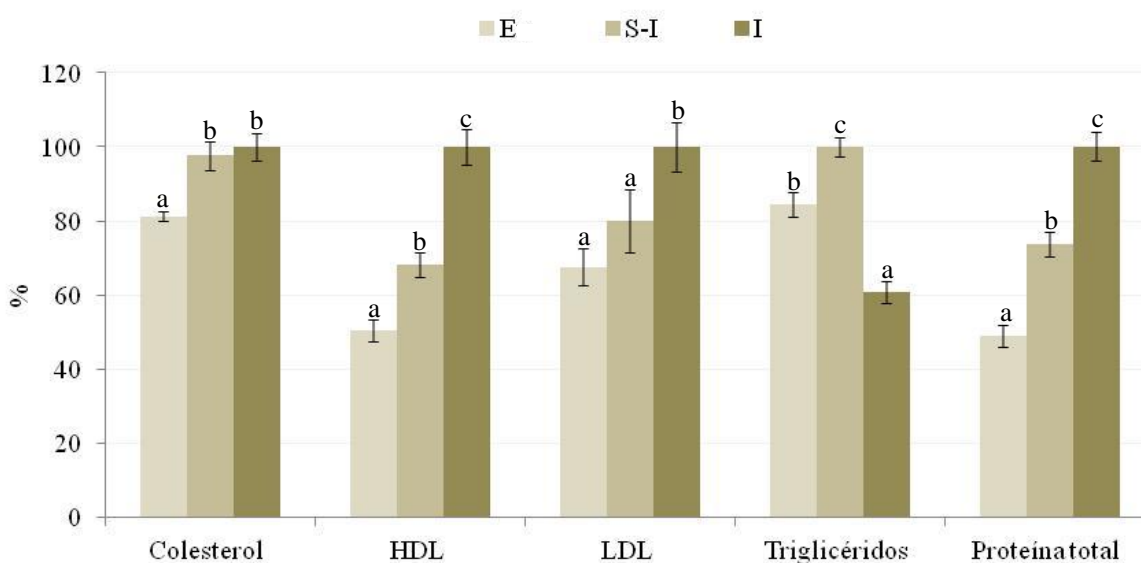


Figura 29. Parámetros bioquímicos en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). HDL (High density lipoprotein), LDL (Low density lipoprotein). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Estos resultados previos apoyarían el presente estudio, en el que los niveles de metabolitos plasmáticos analizados (colesterol y proteínas totales) indicarían una mejor condición general en peces en cultivo intensivo (I), seguido de semi-intensivo (S-I) y extensivo (E). Además, los animales bajo cultivo intensivo mostraron el mejor crecimiento que indudablemente podría suponer un mejor estado de bienestar.

4.3.3. Actividad enzimática relacionada con el metabolismo intermediario de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Las enzimas transaminasas GPT y GOT, que están involucradas en el metabolismo de los aminoácidos, mostrarían una movilización de estas moléculas en el hígado (Ballantyne, 2001). En este estudio, la actividad de ambas enzimas fue significativamente mayor en los peces en los sistemas de cultivo E y S-I (Fig. 30). Este hecho unido a una mayor actividad citrato sintasa (CS) apoyaría una activación de los procesos oxidativos para cubrir una mayor demanda de energía necesaria para la maduración gonadal de estos peces. Por el contrario, los peces en cultivo intensivo I, que no se vieron afectados por las fluctuaciones ambientales y, por lo tanto, no manifestaron maduración gonadal, no mostraron una activación relevante de estas rutas.

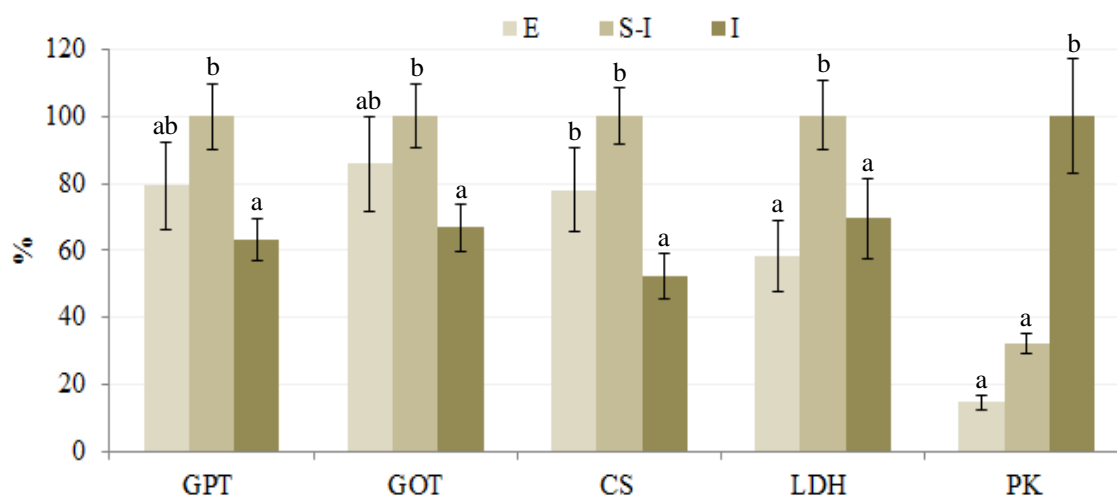


Figura 30. Influencia del sistema de cultivo en el metabolismo intermediario del hígado de tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), CS (Citrato sintasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Por otro lado, podría argumentarse que los peces del grupo I tenían otras vías metabólicas activas, como la movilización de los lípidos apoyada por menores niveles de triglicéridos en el plasma (Fig. 29), o la utilización de los carbohidratos, reflejada por el aumento de la actividad PK en el hígado (Fig. 30). De hecho, varios estudios indicaron un aumento en la vía glucolítica por la actividad PK, en respuesta a los altos

niveles de carbohidratos en los alimentos (Metón *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2016). Las enzimas HOAD y PK son claves en la generación de Acetil CoA, sustrato que se metabolizaría a lo largo del ciclo de Krebs.

Los valores de las transaminasas plasmáticas (Fig. 31) son consistentes con los descritos previamente en el hígado de los peces, mostrando una mayor actividad GOT y GPT en los sistemas de cultivo E y S-I. En algunos estudios se observa que los valores plasmáticos de estas enzimas, asociados a los valores de LDH y PK, podría ser atribuible a cierto daño hepático (Kristoffersson *et al.*, 1974; Asztalos y Nemcsok, 1985) aunque también podrían estar asociados al desprendimiento fisiológico normal de hepatocitos (Schmidt y Schmidt, 1974) más que la ruptura del tejido hepático.

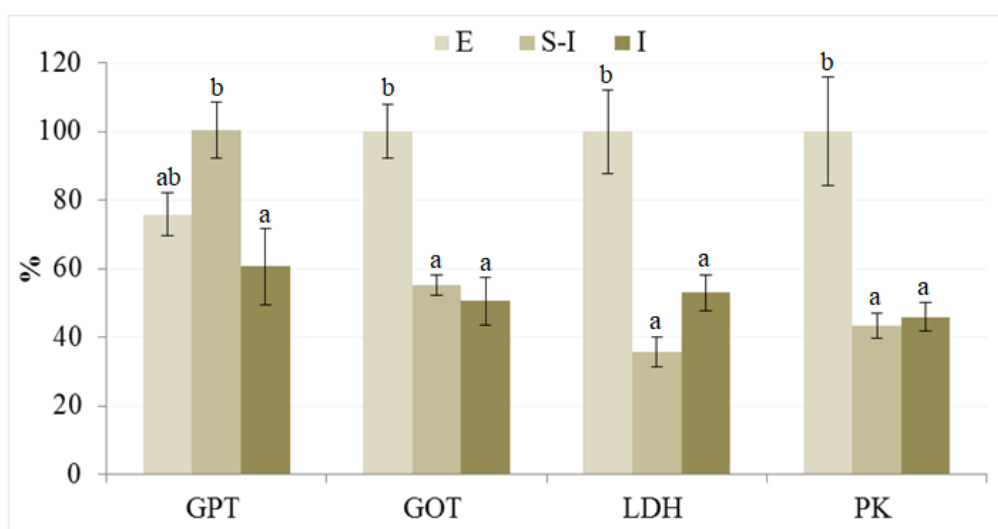


Figura 31. Influencia del sistema de cultivo en el metabolismo intermediario en plasma de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

4.3.4. Estado oxidativo de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Varios estudios desvelan que un desequilibrio en el estado oxidativo podría estar asociado a alteraciones fisiológicas (Davies, 2000; Díaz *et al.*, 2010; Furné *et al.*, 2009, 2016; Hidalgo *et al.*, 2017; Kücükbay, *et al.*, 2009; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2012, 2013; Sturve *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2015; Trenzado *et al.*

al., 2009). De hecho, la peroxidación lipídica (medida como MDA) se propone como un buen indicador de estrés / estado de bienestar en peces (Sanz *et al.*, 2012; Sánchez-Muros *et al.*, 2014, 2016). En el presente estudio, la tenca bajo condiciones de cultivo extensivo y semi-intensivo mostraron una mayor actividad antioxidante hepática en comparación con los peces en un sistema de cultivo intensivo (Fig. 32). Esto parecería coincidir además con una actividad significativamente mayor de la glucosa 6P-deshidrogenasa (G6PDH), enzima que proporciona potencial reductor (NADPH) necesario para regenerar el glutatión reducido por medio de la actividad de la glutatión reductasa (GR).

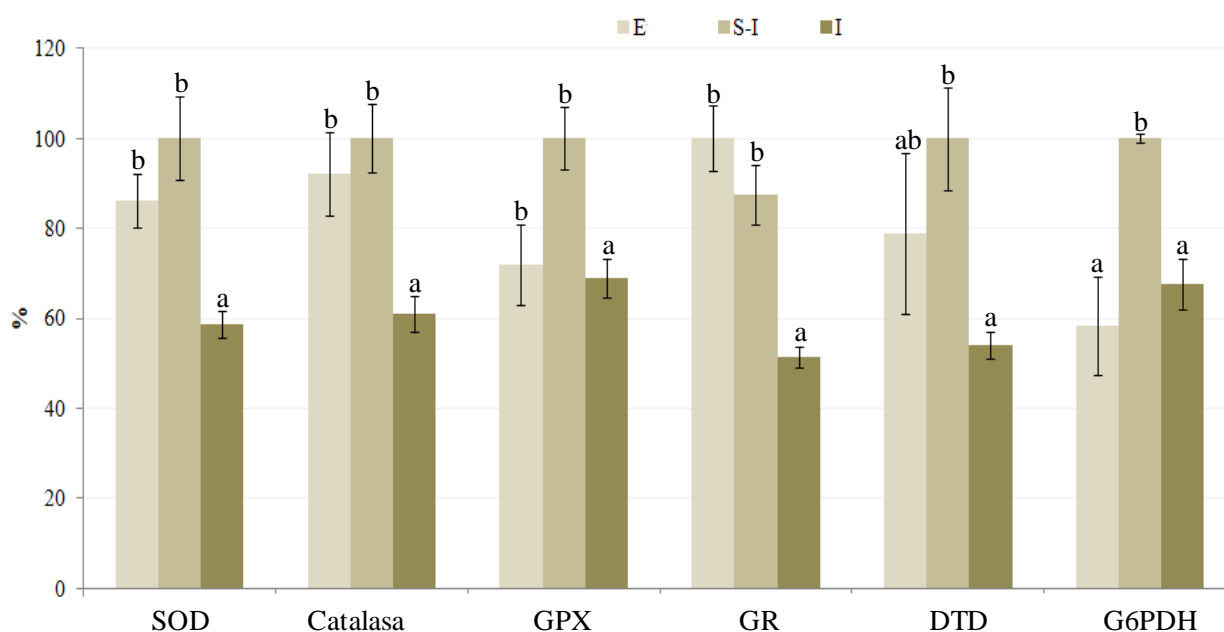


Figura 32. Influencia del sistema de cultivo en el estado oxidativo del hígado de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutatión peroxidasa), GR (Glutatión reductasa), GST (Glutatión-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Los resultados parecen indicar que la influencia de las fluctuaciones ambientales en los peces en los sistemas de cultivo E y S-I habrían promovido una maduración gonadal asociada a una activación general metabólica seguida por un aumento de los sistemas antioxidantes para prevenir el daño oxidativo.

Los valores de MDA hepáticos son similares en los tres grupos experimentales sin mostrar diferencias significativas, lo que indicaría la efectividad de los sistemas antioxidantes, principalmente en peces cultivados en los sistemas E y S-I.

De forma similar, la respuesta antioxidante en plasma reveló valores más altos de actividad SOD, CAT, GR, GPX, GST y DTD en tencas bajo el sistema de cultivo E, mostrando valores intermedios S-I y la actividad antioxidante más baja en el sistema de cultivo I (Fig. 33).

Estos resultados están de acuerdo con estudios de otros autores (Gabryelak *et al.*, 1983) que establecían un efecto de los cambios estacionales en las defensas antioxidantes en algunas especies tales como la tenca, que mostraron valores más altos en primavera, de acuerdo con el comienzo del período de maduración de los peces.

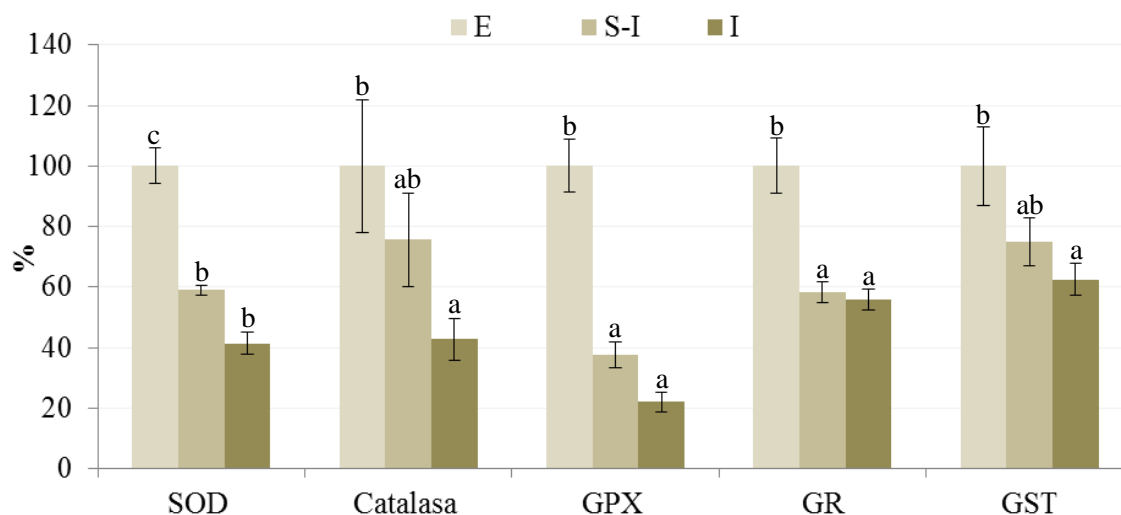


Figura 33. Influencia del sistema de cultivo en el estado oxidativo en hígado de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

Además, las fluctuaciones de temperatura y especialmente los valores elevados de concentración de oxígeno en agua (que en peces en el sistema de cultivo E alcanzaron 120% de saturación) podrían explicar en parte una activación del sistema de defensas antioxidantes en peces E y S-I para prevenir la oxidación de lípidos (niveles de MDA) en una condición hiperóxica (Halliwell y Gutteridge, 1989; Lushchak *et al.*, 2005; Bagnyukova, 2006).

4.3.5. Parámetros inmunológicos en el plasma de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Los cambios encontrados en algunos parámetros hematológicos de los peces dentro de unos límites ambientales tolerables no pueden considerarse como efectos patológicos, sino como parte de mecanismos reguladores o de adaptación (Ivanc *et al.*, 2005).

Los valores de hemoglobina (Hg) y hematocrito (Ht) pueden aumentar en varias especies para hacer frente a la demanda de oxígeno por parte de determinados tejidos asociada a una mayor tasa metabólica bajo condiciones de estrés (Abdel-Tawwab M, 2005; Acerete *et al.*, 2004; Cnaani *et al.*, 2004; Tort *et al.*, 2004). De hecho, Trenzado *et al.* (2009) observaron un aumento significativo del hematocrito en la trucha arco iris en condiciones de alta densidad.

Por otro lado, otros estudios relacionan el aumento de estos parámetros con ciclos estacionales, encontrando en la tenca niveles máximos en los meses de primavera y verano (Collazos, *et al.*, 1998; Guijarro, *et al.*, 2003). Acorde con estos estudios, en nuestro caso, encontramos un aumento de algunos parámetros sanguíneos en los peces bajo los sistemas de cultivo S-I y E, que posiblemente se asocie con la respuesta al fotoperiodo natural y la temperatura. Así hemos podido constatar un descenso del hematocrito en los peces bajo condiciones I, de mayor intensificación (Fig. 34).

Niveles elevados prolongados de cortisol en plasma pueden afectar al estado inmunológico del pez (Ashley, 2007; Conte, 2004; Demers y Bayne, 1994; Ellis *et al.*, 2012). En pequeños vertebrados además, se sabe que parámetros como la temperatura y el fotoperiodo tienen capacidad de inmunomoduladores. Por lo tanto, se ha demostrado el efecto de la temperatura sobre el sistema inmune de los peces tanto para la inmunidad específica como para los mecanismos inmunes no específicos (Collazos, *et al.*, 1995).

Con respecto al nivel de inmunoglobulinas plasmáticas, los resultados obtenidos en el presente estudio revelan una relación inversa con respecto a la concentración de cortisol en plasma, mostrando que los animales en cultivo I tienen los valores más altos de inmunoglobulinas. Esta relación está de acuerdo con resultados previos mostrados por otros autores (Chen *et al.*, 2002; Nagae *et al.*, 1994). Este efecto también puede estar relacionado con la disminución de los linfocitos (linfopenia) causada por altos niveles de cortisol, en el caso de los peces de los grupos S-I y E, ya que estos leucocitos son principales responsables de la producción de inmunoglobulinas. También

deberemos tener en cuenta la mayor cantidad de proteína total en plasma, presente en los peces en condiciones intensivas (Fig. 29), y que la medida de inmunoglobulinas se realiza a partir del análisis de estas proteínas totales.

Por otro lado, algunos autores han evidenciado la falta de diferencias significativas en los niveles totales de globulina de los peces bajo estrés (Eslamloo *et al.*, 2014). En la tenca, las variaciones estacionales de las globulinas se han descrito anteriormente indicando valores más altos en verano y más bajos en invierno (Guijarro *et al.*, 2003), aunque valores más altos podrían también ser efecto de un mejor estado nutricional (Fig. 34).

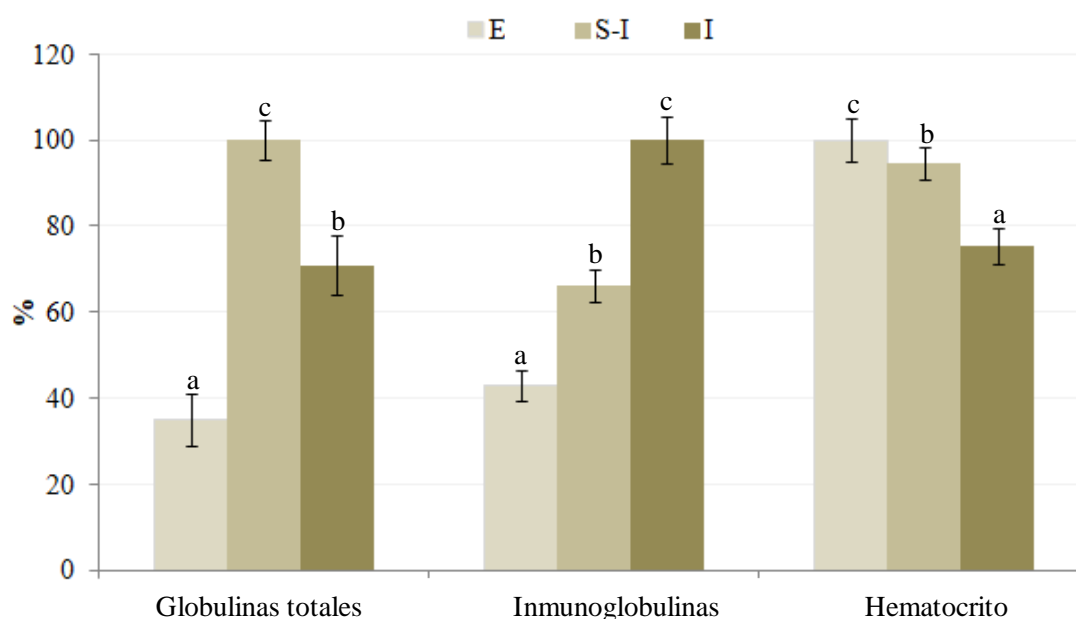


Figura 34. Parámetros Sanguíneos en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$, Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

En este estudio, los valores más bajos de las globulinas se mostraron en peces en cultivo E. Estos peces, aunque fueron sometidos a un fotoperiodo de primavera-verano, podrían presentar un peor estado nutricional asociado con una dieta más escasa. Además, los valores más bajos en globulinas totales y en inmunoglobulinas podrían estar asociados con una menor cantidad de proteínas totales en plasma encontrada en los peces de sistema extensivo según podemos ver en la figura 29. A este respecto, el grupo experimental S-I mostró los valores más altos y esto podría deberse a que convergen las

dos condiciones descritas, la alimentación adecuada y respuesta a la variación estacional natural.

La actividad peroxidasa es un potente agente bactericida donde el peróxido de hidrógeno actúa como oxidante de un sustrato reducido contribuyendo así al mantenimiento del equilibrio redox del sistema inmune (Guardiola *et al.*, 2014). Gabryelak *et al.* (1983) encontraron una relación directa entre la actividad peroxidasa y la estacionalidad en la tenca, mostrando los valores más altos en primavera. Estos datos estarían de acuerdo con nuestros resultados, ya que los peces que parecen haber respondido a un fotoperiodo y a los cambios de temperatura naturales mostraron también los valores más altos de actividad peroxidasa (Fig. 35).

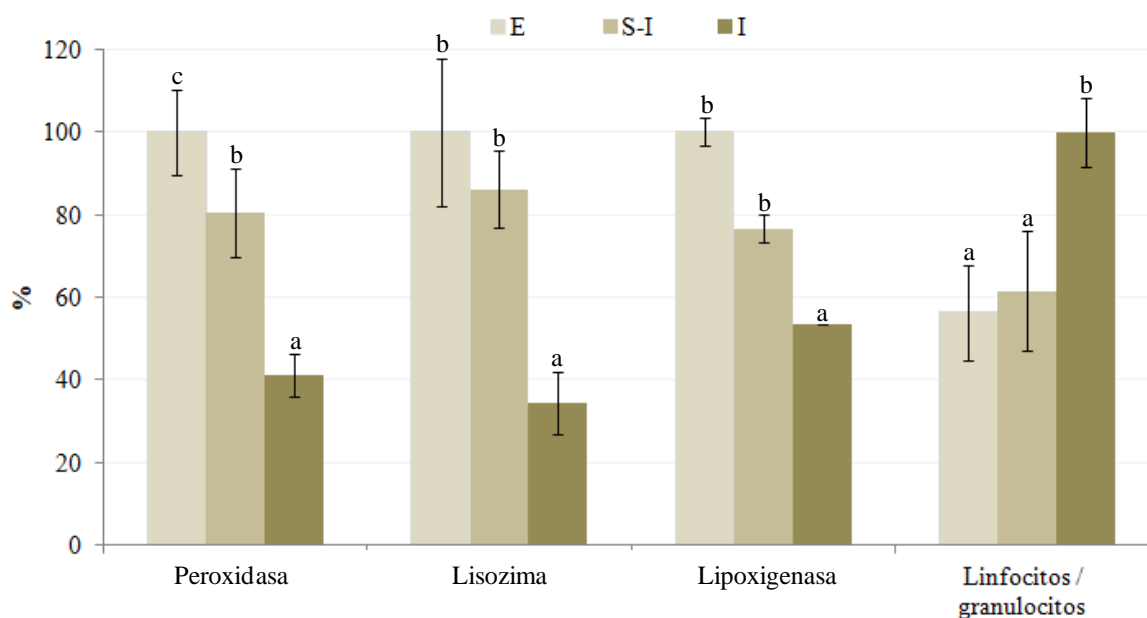


Figura 35. Parámetros inmunológicos en tencas (*Tinca tinca*) mantenidas bajo distintos sistemas de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas, (P < 0.05). E (Extensivo), S-I (Semi-intensivo) e I (Intensivo).

La lisozima es una enzima bactericida que hidroliza el peptidoglicano que integra la pared celular bacteriana. La lisozima en los peces tiene una capacidad mayor que la de las aves y los mamíferos, eliminando directamente los patógenos bacterianos Gram positivos y negativos sin la intervención de la actividad del complemento (Ellis, 1999; 2001). En la bibliografía se ha mostrado un aumento (Demers y Bayne, 1997; Mock y Peters, 1990; Montero *et al.*, 1999) y también disminución (Caruso *et al.*, 2002; Yildiz, 2006) de actividad en respuesta a diferentes factores estresantes. En este estudio,

los resultados muestran que la actividad de la lisozima fue mayor en los peces sometidos a los sistemas de cultivo S-I y E, que fueron los que mantuvieron las condiciones ambientales más naturales. En esta línea, encontramos estudios que establecen una relación directa entre el fotoperiodo primavera-verano y la actividad lisozima en la tilapia del Nilo (Atwood *et al.*, 2003), halibut (Bowden *et al.*, 2004) y trucha arcoiris (Burgos *et al.*, 2004).

La actividad lipoxigenasa (LOX) presente en los tejidos del pez (Hsieh *et al.*, 1988; Liu y Pan, 2004) cataliza la formación de metabolitos bioactivos implicados en procesos inflamatorios e inmunológicos (Henderson, 1994; Samuelsson *et al.*, 1987). La lipoxigenasa produce una gama de ácidos grasos monohidroxilados como eicosanoides que pueden estar implicados en la regulación del sistema inmune por sus efectos directos sobre células tales como macrófagos y linfocitos o indirectos a través de las citoquinas (Rowley *et al.*, 1995). Se ha manifestado una mayor actividad LOX de los animales enfermos en comparación con la misma actividad tisular de los sanos (Liu y Pan, 2004). En este estudio, los animales bajo condiciones de cultivo intensivo (I) mostraron una actividad disminuida en comparación con aquellos cultivados en S-I y E. Nuevamente, encontramos signos de buena salud y bienestar en los peces de cultivo I.

Según varios autores, el estrés produce en vertebrados una reducción global de linfocitos (Ellis, 1977; Pickering, 1984) y un aumento significativo de granulocitos circulantes en el plasma (Benfey y Biron, 2000; Demers y Bayne, 1994; Dhabhar *et al.*, 1995, 1996; Van Rijn y Reina, 2010; Wedemeyer, 1990; Witeska *et al.*, 2015). Los valores de linfocitos y granulocitos obtenidos en el presente estudio se encontraban dentro de un rango normal en la tenca (Modra *et al.*, 1998).

Los valores más altos de linfocitos se observaron en peces en cultivo I en comparación con los presentados en peces bajo un régimen semi-intensivo y extensivo. Por el contrario, se encontraron valores más bajos de granulocitos en peces bajo sistema intensivo y mostraron valores significativamente más altos en peces en condiciones S-I y E. De acuerdo con este perfil, los peces en cultivo intensivo mostraron una relación de linfocitos/granulocitos mayor en comparación con los otros dos sistemas de cultivo. Este hecho podría volver a ser indicativo de que el grupo I no se encontraba bajo condiciones que pudieran causar algún tipo de estrés. Por el contrario los peces mantenidos en los sistemas de cultivo S-I y E mostraron un menor valor de la relación linfocitos/granulocitos que podría estar asociado a altos niveles de cortisol plasmático que, como se mencionó anteriormente, estarían condicionados por efecto del

fotoperiodo natural primavera-verano. Estos resultados estarían respaldados por estudios previos en tilapia que muestran aumento de granulocitos y disminución de linfocitos en primavera y verano, posiblemente asociados a una respuesta al estrés bajo variaciones estacionales (Jerónimo *et al.*, 2011).

Uno de los mecanismos bactericidas más importantes conocidos en los peces es la actividad de explosión respiratoria (burst activity). Varios autores han demostrado una reducción en esta actividad en diferentes especies de peces sometidos a estrés, como dorada (*Sparus aurata*), lubina (*D. Labrax*) o tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Barton e Iwama 1991a; Montero *et al.*, 1999; Vazzana *et al.*, 2002). Witeska *et al.* (2015) encontraron una disminución en esta actividad en el cacho (*Leuciscus cephalus*) sometido a estrés de confinamiento pero no en la carpa común (*Cyprinus carpio*) sometidas al mismo tratamiento de estrés. En este estudio no se manifestaron diferencias significativas en este parámetro entre tencas cultivadas en los diferentes sistemas de cultivo (Tabla XI).

Una mayor concentración de neutrófilos en sangre y mayor actividad peroxidasa en los grupos E y S-I podrían asociarse con el aumento de las sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Algunos autores relacionaban el aumento de especies reactivas con la actividad del estallido respiratorio de neutrófilos y macrófagos (Rossi, 1986; Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000; Eslamloo *et al.*, 2014). Este hecho apoyaría una mayor actividad de los mecanismos de contención y defensa ante el estrés oxidativo observado por estos grupos experimentales E y S-I frente al grupo I (Figuras 32 y 33).

La evaluación del sistema del complemento se usa ampliamente como indicador de respuesta inmunitaria asociado a efectos tales como activación celular, fagocitosis, quimiotaxis, reacción inflamatoria y lisis de células extrañas y patógenos (Bayne y Gerwick, 2001; Robertsen, 1999). Las alteraciones en la actividad hemolítica se pueden utilizar para evaluar la influencia de varios factores, como infecciones, el impacto ambiental y la nutrición, sobre la actividad lítica del sistema del complemento (Holland y Lambris, 2002). Los resultados obtenidos con el suero de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) indicaron que un desafío bacteriano promovió la activación de los parámetros de inmunidad innata manifestados en la actividad hemolítica más alta de los peces inoculados (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). En el presente estudio no se mostraron diferencias en este parámetro, lo que llevó a pensar que ninguna de las condiciones experimentales (E, S-I e I) promovió un estado patológico que condujera a un proceso infeccioso posterior.

4.3.6. Análisis histológico del digestivo de la tenca en distintos sistemas de cultivo

4.3.6.1. Estudio histológico del intestino de la tenca en distintos sistemas de cultivo

Las diferencias morfológicas observadas en el intestino proximal de las tencas cultivadas en distintos sistemas de cultivo parecen indicar un claro efecto de los factores ambientales que han generado una respuesta fisiológica y metabólica con el fin de hacer frente a las alteraciones o procesos desarrollados en el organismo como la maduración gonadal. En la literatura, se ha puesto de manifiesto que una situación de estrés agudo, no es suficiente para producir alteraciones a nivel tisular en el intestino de peces (Olsen *et al.*, 2008). Sin embargo, la movilización de reservas energéticas ligada a un incremento de la actividad celular sostenida en el tiempo, puede traducirse en un deterioro a nivel tisular. En el presente estudio, este efecto se pone claramente de manifiesto cuando se analiza la morfología y la citoarquitectura intestinal. Los animales bajo condiciones de cultivo extensivo mostraron un deterioro apical de las vellosidades intestinales que afectó tanto al epitelio como al corion (Fig. 23). Estudios previos, ya pusieron de manifiesto que los mecanismos adaptativos del pez frente a circunstancias comprometidas relacionadas con el tipo de alimentación provocaron una afectación de la mucosa intestinal ligada a procesos proteolíticos (Ostaszewska *et al.*, 2006). Los procesos degenerativos en los enterocitos observados en este bloque se traducirían en una afectación de la capacidad de absorción, que unido a una menor disponibilidad del alimento, justificaría el menor crecimiento mostrado en estos animales.

Curiosamente este efecto a nivel histológico se manifestó en menor grado en los animales bajo cultivo semi-intensivo (S-I) no apareciendo en aquellos peces cultivados bajo condiciones intensivas (I). De nuevo, y a la vista de los parámetros enzimáticos y bioquímicos analizados, se pone de manifiesto la influencia de los factores ambientales forzando la maquinaria homeostática en el pez y de cómo dicho efecto puede verse minimizado por un aporte exógeno de alimento. El hecho de contar con una disponibilidad energética extra, haría que los procesos catabólicos con fines energéticos no se activaran de forma tan patente, no afectando por tanto a la integridad celular.

Finalmente, otro aspecto destacable es la relación directa entre el consumo de alimento exógeno y el porcentaje de grasa perivisceral. En este sentido, los animales

bajo cultivo intensivo pusieron de manifiesto desde un punto de vista histológico un mayor depósito de tejido adiposo en capas circundantes al tubo digestivo.

4.3.6.2. Estudio histológico del hígado de la tenca en distintos sistemas de cultivo

El análisis histológico hepático de los animales en cultivo extensivo mostró un parénquima donde los hepatocitos presentaban un citoplasma bastante homogéneo (Fig. 24). Es bien conocido el papel de los hepatocitos actuando como células de reserva de moléculas energéticas como glucógeno o lípidos. Como ya se ha comentado previamente, la influencia de las condiciones ambientales en estos animales podría haber promovido un incremento de sus necesidades energéticas para hacer frente a determinados procesos que alteran la homeostasis del pez como la maduración gonadal, explicando así una movilización de las reservas hepáticas (Bonga, 1997; Tort *et al.*, 2004). Desde el punto de vista histológico esto explicaría el descenso de depósitos y que en último término se habría traducido en un descenso del índice hepatosomático. Dicha activación de la glucogenolisis explicaría niveles elevados de la glucosa plasmática en este grupo. De igual manera, la movilización lipídica y la alimentación menos rica en los animales bajo cultivo extensivo justificaría la ausencia de depósitos de reserva en el citoplasma de estos hepatocitos.

El incremento de la actividad de las enzimas hepáticas asociadas con el metabolismo intermediario, como las transaminasas (GPT/GOT) y la citrato sintasa (CS) en animales en cultivo extensivo y semi-intensivo (Fig. 30), sostenido en el tiempo podría haber causado una alteración tisular en estos animales, observándose una dilatación de los senos hepáticos (Ostaszewska *et al.*, 2006). En parte, el aumento de la actividad GPT/GOT a nivel plasmático (Fig. 31) podría apoyar cierta alteración tisular. De igual manera, el hígado juega un papel crucial en la producción de lipoproteínas y globulinas, de tal forma que una afectación hepática se podría traducir en una alteración de los niveles plasmáticos de las mismas (Javed y Usmani, 2015), tal como manifiestan sus valores significativamente inferiores en animales sometidos a cultivo extensivo (Figuras 29 y 34).

5. Efecto de la densidad de cultivo sobre el bienestar de la tenca

5.1. INTRODUCCIÓN

En la acuicultura, los peces están sometidos a diferentes fuentes de estrés debido a las prácticas inherentes del proceso productivo, como el manejo, la captura y el confinamiento; con mucho, la causa más común de estrés es la densidad de población inadecuada (Rotllant *et al.*, 1997). Tal es así que El Consejo de Bienestar de los Animales de Granja (1996), puso de relieve que la densidad de población utilizada en la piscicultura comercial es un "factor crucial que afecta el bienestar de los peces".

Desde un punto de vista económico en la acuicultura intensiva, la inversión en instalaciones y los gastos asociados al proceso productivo requieren del aumento de la densidad de los cultivos para maximizar el rendimiento y los beneficios empresariales (Iguchi *et al.*, 2003; Rafatnezhad *et al.*, 2008; Badiola *et al.*, 2012; Tan, C., 2018). Pero como ya se ha mencionado, el aumento de la densidad debe ser controlada por diversos motivos que atañen al bienestar de los peces cultivados.

Los sistemas RAS (Recirculating Aquaculture System) son una buena opción ante la limitación de espacio y de fuentes de suministro de aguas en condiciones adecuadas para el cultivo intensivo (Badiola *et al.*, 2012), reducen considerablemente el uso del agua y la generación de residuos, aumentan el control de algunos parámetros medioambientales y facilitan el control sanitario de los animales, ya que aísla el sistema del medio ambiente (Verdegem *et al.*, 2006; Dalsgaard *et al.*, 2013). Se trata de sistemas donde el agua circula varias veces a través de filtros tanto mecánicos, como químicos y biológicos (Losordo *et al.*, 1998; Piedrahita, 2003). Además, en muchas ocasiones son implementados con sistemas de aporte extra de oxígeno, desinfección por ultravioleta o inyección de ozono y provistos de controladores de temperatura y de otras variables.

La intensificación de los cultivos, sobrepasando las capacidades del sistema, puede llevar asociado inconvenientes como la degradación de la calidad del agua con el aumento de nitrógeno en sus distintas formas, aumento de fosfatos, disminución de oxígeno disuelto, cambios del pH y de otros parámetros (Diana y Fast, 1989; Tidwell *et al.*, 1998, Sharma y Chakrabarti, 2004, Biswas *et al.*, 2006). Además existe una amplia bibliografía que relaciona el estrés con el aumento de la densidad de cultivo de peces por encima de la densidad adecuada (Holm *et al.*, 1990; Vijayan *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1993; Bjornsson, 1994; Yin *et al.*, 1995; Tort *et al.*, 1996; Alanara *et al.*, 1996; Lefrancois *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2003; Dibattista *et al.*, 2005;

Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Turnbullet *et al.*, 2005; Bolasina *et al.*, 2006; David, 2006; North *et al.* 2006; Xu *et al.*, 2006; Ashley, 2007; Costas *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010; Attia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Sanz *et al.*, 2012, 2013,). Se pueden llegar a encontrar efectos negativos también desde un punto de vista comercial, provocando que la textura de la carne y el color de los peces cambie, dando lugar a un deterioro de la calidad del producto (Johnston, 1999, Van der Salm, 2004).

Por otro lado encontramos evidencias que revelan que los efectos negativos de la elevada densidad no se producen en todas las especies de peces ni circunstancias de cultivo. Así, estudios en especies como la lubina, (*Dicentrarchus labrax*) (Papoutsoglou *et al.*, 1998; Lupatsch *et al.*, 2010), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Bromage, *et al.*, 2006), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Martínez y Fernández, 1991), en el salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Berg y Danielsberg, 1992), del fletán de California (*Paralichthys californicus*) (Merino, *et al.*, 2007), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Jorgensen *et al.*, 1993), el pez conejo moteado, (*Siganus rivulatus*) (Saoud, *et al.*, 2008) o el esturión (*Huso huso*) (Aalimahmoudi *et al.*, 2016) y en otros tantos ejemplos, se pone de manifiesto el efecto positivo de la alta densidad en los cultivos.

En el caso concreto de la tenca, se ha constatado un marcado carácter gregario (García-Ceballos, *et al.*, 1998) y se ha comprobado que también puede adaptarse a los sistemas de cultivo intensivo (Wang *et al.*, 2006; Kamler *et al.*, 2006; Celada, 2007, 2009; Pantazis y Apokotou, 2009, Pantazis, 2012) pero no se han descrito detalladamente las condiciones óptimas para su cultivo bajo estas condiciones, y menos aún en peces adultos o sub-adultos. Así pues, debido a que la densidad de cultivo depende de la especie y de las condiciones ambientales, no se pueden extrapolar datos de otros sistemas o de otras especies para el cultivo intensivo de tenca y coincidiendo con la opinión de otros autores (Celada *et al.*, 2007, 2009), se deberían realizar más estudios al respecto, que repercutan positivamente sobre el bienestar de los animales, su crecimiento y la calidad del producto final ofrecido al consumidor.

En esta Tesis Doctoral se ha evaluado el efecto de diferentes densidades de cultivo intensivo: densidad control (CD, inicial de 2,5 kg / m³), una alta densidad (AD, densidad inicial de 5 kg / m³) y un último grupo experimental con una densidad menor (BD, 1,6 kg / m³), sobre variables fisiológicas relacionadas con el crecimiento, bioquímica sanguínea, enzimas del metabolismo intermediario, el estado oxidativo y del estado inmunológico de la tenca (*Tinca tinca*).

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Crecimiento e índices biométricos de la tenca bajo distintas densidades de cultivo

Los peces cultivados a distintas densidades; Alta densidad (AD), Control densidad (CD) y Baja densidad (BD), durante 15 semanas fueron analizados para evaluar parámetros de crecimiento, índices relacionados e índices biométricos (Tabla XIII).

Tabla XIII. Parámetros de crecimiento e índices relacionados en la tenca (*Tinca tinca*) bajo diferentes densidades de cultivo.

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
Peso final (g)	21.46±0.66 ^a	23.38±0.75 ^{ab}	24.21±0.71 ^b	0.019
Longitud total final (mm)	110.11±0.99 ^a	112.72±0.94 ^{ab}	114.28±0.92 ^b	0.007
K final 100 x (g / cm³)	1.47±0.01 ^a	1.50±0.01 ^b	1.51±0.01 ^b	0.005
TCI (% /días)	0.92±0.03	1.01±0.0	1.06±0.02	ns
HSI (%)	1.36±0.06	1.27±0.05	1.25±0.06	ns
GSI (%)	3.79±0.62	3.10±0.37	3.49±0.37	ns
IDS (%)	3.23±0.26	3.38±0.13	3.48±0.12	ns
Rendimiento de carcasa (%)	84.47±0.70	86.10±0.51	85.67±0.58	ns
Grasa perivisceral (%)	4.16±0.29	3.98±0.19	4.43±0.18	ns
Incremento de densidad (%)	170.81±2.60 ^a	207.41±11.45 ^b	227.90±4.93 ^b	0.004
IC	2.33±0.04	2.27±0.13	2.08±0.04	ns
IDef (%)	22.98±1.78	27.18±1.41	29.45±3.18	ns
Supervivencia (%)	90.9±2.73	95.04±3.64	97.49±1.74	ns

Los valores mostrados son media ± SEM; n = 300, para peso corporal final, longitud total final total, K (Factor de condición) y TCI (Tasa de crecimiento instantáneo); n = 12 para IHS (Índices hepatosomático), IGS (Índice gonadosomático), IDS (Índice digestivosomático), rendimiento de la carcasa y grasa perivisceral; n = 3 (lotes de peces) para el aumento de densidad, para IC (Índice de conversión alimenticia), IDef % (Incidencia de peces con deformidades corporales visibles) y supervivencia. Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$), ns (no significativa). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

Las variables peso corporal final y longitud total, además del índice de condición (K), que relaciona estas dos variables, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales AD y BD, siendo los valores mayores correspondientes a los peces cultivados a menor densidad. El grupo de densidad control, mostró valores intermedios pero sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos grupos salvo para la variable K.

El incremento de densidad de los animales en cultivo también fue mayor significativamente en los peces con una menor densidad inicial (BD).

El resto de variables determinadas como TCI, IHS, IGS, grasa perivisceral, rendimiento de la carcasa, IC, IDef y supervivencia no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

5.2.2. Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo

La tabla XIV muestra los resultados referentes a parámetros bioquímicos en los que podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales analizados. Respecto de los niveles de cortisol, glucosa, colesterol, triglicéridos y proteína total, se obtuvieron los valores más bajos en el grupo AD, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de densidad control (CD) en cuanto a cortisol, glucosa y colesterol. Los valores más altos se encontraron en el grupo de cultivo en baja densidad (BD). En el caso de los triglicéridos y la proteína total, no hubo diferencias significativas entre los grupos de CD y BD, pero sus valores sí fueron significativamente superiores a los mostrados por el grupo AD.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a lipoproteínas de alta y de baja densidad (HDL y LDL) ni con respecto a las hormonas tiroideas T3 y T4.

Alguno de los electrolitos plasmáticos también mostraron diferencias significativas, observándose los valores más altos en K^+ y más bajos en Na^+ para el grupo AD. En el caso del K^+ , su valor más bajo se observó en el grupo experimental BD, no habiendo hallado diferencias estadísticamente significativas entre los otros dos grupos. En el caso del Na^+ , se observó un valor intermedio en el grupo CD. Para el Cl^- no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

Tabla XIV. Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca (*Tinca tinca*) en diferentes densidades de cultivo.

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
Cortisol (µg/dL)	12.65±1.74 ^a	16.16±2.04 ^{ab}	21.73±2.98 ^b	0.37
Glucosa (mg/dL)	47.83±4.52 ^a	58.46±4.13 ^{ab}	68.83±5.07 ^b	0.11
Colesterol (mg/dL)	166.25±4.81 ^a	179.83±5.67 ^{ab}	185.42±5.55 ^b	0.45
HDL (mg/mL)	120.75±3.86	121.69±6.06	125.58±2.48	ns
LDL (mg/mL)	15.25±0.77	15.54±1.03	16.67±0.50	ns
Triglicéridos (mg/dL)	85.73±3.78 ^a	101.54±4.78 ^b	107.42±6.45 ^b	0.18
Proteína total (mg/mL)	57.71±3.33 ^a	71.13±2.65 ^b	68.24±2.14 ^b	0.04
T3 (µg/mL)	3.26±0.10	3.59±0.17	3.56±0.18	ns
T4 (ng/dL)	0.08±0.03	0.15±0.02	0.11±0.01	ns
CL⁻ (mmol/L)	98.42±1.97	100.85±1.53	101.17±1.89	ns
K⁺ (mmol/L)	3.03±0.50 ^b	1.35±0.28 ^a	1.16±0.13 ^a	0.01
Na⁺ (mmol/L)	131.75±2.17 ^a	134.69±1.47 ^{ab}	138.58±0.84 ^b	0.03

Los valores son media ± SEM, n = 12. HDL (High-density lipoprotein), LDL (Low-density lipoprotein), T3 (triyodotironina), T4 (tiroxina). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.2.3. Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado y en plasma de la tenca bajo distintas densidades de cultivo

En la tabla XV se muestra que los valores de las enzimas transaminasas GPT y GOT son más bajos en el grupo CD que en los otros dos grupo. En el caso de la enzima HOAD, el valor más elevado corresponde al grupo AD y no existen diferencias estadísticamente significativas entre CD y BD.

Por último, no se observan diferencias estadísticas entre grupos para las enzimas CS, LDH y PK hepáticas.

Tabla XV. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado de la tenca (*Tinca tinca*).

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
GPT (mU/mg proteína)	221.38±16.94 ^{ab}	197.72±19.65 ^a	250.61±19.65 ^b	0.03
GOT (mU/mg proteína)	831.24±78.50 ^b	659.93±69.74 ^a	841.08±39.38 ^b	0.046
CS (mU/mg proteína)	40.57±7.36	32.34±4.16	31.80±1.81	ns
HOAD (mU/mg proteína)	20.10±1.50 ^b	11.18±3.60 ^a	11.04±1.17 ^a	0.007
LDH (U/mg proteína)	2.07±0.17	1.41±0.25	1.77±0.21	ns
PK (mU/mg proteína)	337.13±40.45	248.69±42.40	259.25±28.93	ns

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), CS (Citrato sintasa), HOAD (β -Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

Para las enzimas determinadas en el plasma de la tencas cultivadas en diferentes densidades tampoco se observaron diferencias significativas (Tabla XVI). Se pueden apreciar valores mayores en las actividades de las enzimas GOT, LDH y PK en el grupo experimental de alta densidad AD pero sin marcar diferencias significativas en ningún caso.

Tabla XVI. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en plasma de tenca (*Tinca tinca*).

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
GPT (mU/mg proteína)	1.15±0.15	1.03±0.19	1.22±0.11	ns
GOT (mU/mg proteína)	10.14±0.98	7.68±1.06	7.85±0.41	ns
LDH (mU/mg proteína)	47.01±4.50	40.22±4.01	40.78±4.44	ns
PK (mU/mg proteína)	16.24±1.62	14.47±1.30	14.66±2.03	ns

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). (GOT) Glutamato oxaloacetato transaminasa. (GPT) Glutamato piruvato transaminasa. (LDH) Lactato-deshidrogenasa, (PK) Piruvato kinasa, AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.2.4. Estado oxidativo del hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo

Como se aprecia en la tabla XVII, todas las actividades enzimáticas analizadas en el hígado de la tenca, excepto la DTD (DT-Diaforasa), mostraron una tendencia a aumentar cuanto mayor fue la densidad de cultivo pero sin llegar a marcar diferencias significativas entre los grupos experimentales. También los valores de MDA siguieron esta misma tendencia, aunque en este caso el grupo experimental de baja densidad (BD), con el valor más bajo, presentó diferencias significativas respecto de los otros grupos AD y CD.

Tabla XVII. Efecto de la densidad de cultivo sobre el estado oxidativo del hígado de la tenca (*Tinca tinca*).

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
SOD (U/mg proteína)	199.53±22.55	173.07±8.61	170.05±5.09	ns
Catalasa (U/mg proteína)	150.31±24.87	141.91±9.32	140.79±11.75	ns
GPX (mU/mg proteína)	197.86±18.14	163.46±10.19	152.16±8.26	ns
GR (mU/mg proteína)	8.46±0.52	6.95±0.32	7.78±0.45	ns
GST (mU/mg proteína)	131.36±22.51	110.20±7.00	120.08±4.73	ns
DTD (mU/mg proteína)	3.94±0.67	3.94±0.22	4.35±0.38	ns
G6PDH (mU/mg proteína)	92.48±6.67	92.31±7.93	88.86±3.36	ns
MDA (mg/mL)	6.12±0.56 ^b	5.89±0.39 ^b	4.05±0.50 ^a	0.019

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$). ns (no significativo), SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), MDA (Malondialdehído), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

En la tabla XVIII podemos observar que los parámetros relacionados con el estado oxidativo determinados en el plasma de las tencas cultivadas a distintas densidades de cultivo, no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales evaluados, tal como ocurrió en el hígado.

Tabla XVIII. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas antioxidantes en plasma de tenca (*Tinca tinca*).

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
SOD (U/mg proteína)	2.15±0.23	1.80±0.16	1.91±0.04	ns
Catalasa (mU/mg proteína)	236.11±29.43	284.56±55.23	328.79±38.70	ns
GPX (mU/mg proteína)	4.19±0.23	3.43±0.49	4.47±0.29	ns
GR (mU/mg proteína)	0.36±0.03	0.34±0.04	0.44±0.03	ns
GST (mU/mg proteína)	157.18±19.51	122.18±11.42	132.65±2.70	ns
DTD (mU/mg proteína)	0.06±0.01	0.04±0.01	0.06±0.01	ns

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Las letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05), ns (no significativa). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.2.5. Parámetros inmunológicos en la tenca en distintas densidades de cultivo

Los resultados que podemos ver en la tabla XIX indican valores estadísticamente inferiores para las inmunoglobulinas en el grupo experimental de alta densidad (AD) con respecto al grupo de densidad control (CD) y con valores intermedios, sin diferencias significativas, para el grupo de baja densidad (BD).

Se obtuvieron valores superiores para la actividad hemolítica y lipoxigenasa en el grupo experimental AD respecto de los otros grupos CD y BD.

Para el resto de parámetros evaluados, es decir, globulina, capacidad de hemoaglutinación, actividad respiratoria de los linfocitos, actividad peroxidasa, actividad lisozima, hematocrito, hemoglobina, porcentaje de linfocitos, porcentaje de granulocitos y la relación entre ellos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales asociadas al aumento de la densidad de cultivo.

Tabla XIX. Efecto de la densidad de cultivo en el estado inmunológico del plasma de la tenca (*Tinca tinca*).

	AD (5 kg/m ³)	CD (2.5 kg/m ³)	BD (1.6 kg/m ³)	P
Globulina sérica (mg/mL)	68.21±9.34	62.67±6.16	70.27±6.27	ns
Inmunoglobulina total (mg/mL)	41.17±4.67 ^a	54.7±2.81 ^b	49.31±2.71 ^{ab}	0.01
Actividad hemolítica (Ln)	6.29±0.18 ^b	6.00±0.08 ^{ab}	5.58±0.19 ^a	0.019
Hemoaglutinación (Ln)	5.67±0.22	5.92±0.15	5.67±0.22	ns
Actividad respiratoria (D.O.)	0.25±0.01	0.26±0.01	0.27±0.01	ns
Actividad peroxidasa (D.O.)	1.41±0.16	1.03±0.13	1.25±0.11	ns
Actividad lisozima (µg/mL of equiv.HEWL)	0.81±0.30	0.60±0.13	1.19±0.13	ns
Actividad lipoxigenasa (mU/mg proteína)	0.21±0.01 ^b	0.16±0.01 ^a	0.17±0.01 ^a	<0.001
Hematocrito (%)	26.29±0.01	23.51±0.01	26.87±0.01	ns
Hemoglobina (g/L)	15.86±0.52	15.82±0.40	17.21±0.54	ns
Linfocitos (%)	95.09±0.79	94.94±0.38	93.84±0.91	ns
Granulocitos (%)	3.09±0.51	3.54±0.38	4.13±0.76	ns
Linfocitos / granulocitos	36.54±7.63	37.56±11.55	35.21±7.08	ns

Los valores son la media ± SEM (n = 12). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.3. DISCUSIÓN

La densidad de cultivo es una de las variables más importantes a tener en cuenta en los sistemas intensivos de acuicultura ya que para muchas especies puede ser un factor limitante. Una densidad de cultivo concreta puede tener efectos positivos o negativos sobre el crecimiento de los peces, y esta interacción parece ser específica de la especie (Merino *et al.*, 2007).

Existen multitud de estudios en este sentido que tratan de encontrar la densidad adecuada para cada especie cultivada, en base a su crecimiento, su estado de salud y de otros parámetros indicadores de bienestar. Aunque resulta difícil encontrar información precisa, ya que la densidad óptima de cultivo parece depender de múltiples factores como la especie, la edad de los peces o el tipo de sistema de cultivo (Ellis *et al.*, 2002).

Menu y Person-Le Ruyet, (1991) reportaron densidades óptimas entre 2 y 10 kg / m³ para el lenguado *Solea senegalensis* y el rodaballo *Scophthalmus maximus*. Bernabé *et al.*, (1991) estimaron entre 5 y 10 kg / m³ la densidad adecuada para la dorada *Saparus aurata*, Willoughby (1999) estableció entre 10 y 15 kg / m³ la densidad apropiada para algunos salmónidos y Fátima *et al.* (2018) encuentran en *Catla catla* y *Labeo rohita* efectos negativos asociados a la densidad por encima de 4.4 kg / m³. Con los actuales y modernos sistemas RAS, mucho más eficientes, se están aumentando estas cifras y actualmente se describen densidades hasta de 50 kg / m³ para la trucha arcoiris o 120 kg / m³ en anguila europea adulta (Dalsgaard *et al.*, 2013), aunque en anguilas juveniles no se recomienda sobrepasar los 25 kg / m³ (McCarthy *et al.*, 1996).

Centrando la atención en la tenca, también son múltiples los estudios que han intentado establecer el nivel adecuado de densidad de cultivo para la especie. Así Celada *et al.* (2007) llegaron a densidades finales máximas de 16,53 kg / m³, y Pantazis (2012) observó que tencas sub-adultas (11 g de peso) crecían mejor a unas densidades iniciales de 2,5 Kg / m³ que a 1,4 Kg / m³.

En este bloque se ha analizado el efecto de distintas densidades de cultivo en la tenca en sistemas intensivos con recirculación. Se han evaluado variables productivas y de crecimiento, parámetros bioquímicos, referentes al estado oxidativo y también metabólico e inmunológicos. Las densidades ensayadas han sido, una densidad control (inicial de 2,5 kg / m³) que se denominó grupo experimental CD (Control de densidad), una densidad inicial de 5 kg / m³, es decir, el doble de esta densidad control, que se denominó AD (Alta Densidad) y un último grupo experimental con una densidad menor que la control, de 1,6 kg / m³ al que se denominó BD (Baja densidad).

5.3.1. Crecimiento e índices biométricos de la tenca bajo distintas densidades de cultivo

Aunque ya hemos comentado que algunos autores encuentran efectos negativos en la alta densidad de cultivo en tenca (Fleig y Gottschalk, 2001; Rennert, *et al.*, 2003) y en otras especies (Ruane *et al.*, 2002; Ellis, *et al.*, 2002; Gang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Okereke *et al.*, 2015), los datos de Celada *et al.* (2007) y de Pantazis (2012)

muestran efectos positivos de la alta densidad en la tenca bajo condiciones de cultivo adecuadas.

La figura 36 muestra que el crecimiento de las tencas sometidas a una mayor densidad ha sido significativamente menor tanto en peso como en longitud, aunque sin diferencias significativas con el grupo control CD. Esto indicaría lo que indicaría que las condiciones, a pesar de tratarse del doble de densidad de cultivo que en el control, no han generado efectos negativos en el crecimiento. En el capítulo anterior se hacía mención a este hecho, habiendo comprobado que el cultivo en sistemas menos intensivos no suponía beneficios para la tenca sino, al contrario, la exposición a sistemas poco intensificados con escaso control de los parámetros ambientales podría provocar la activación de procesos reproductivos nada aconsejables para la producción acuícola industrial de esta especie.

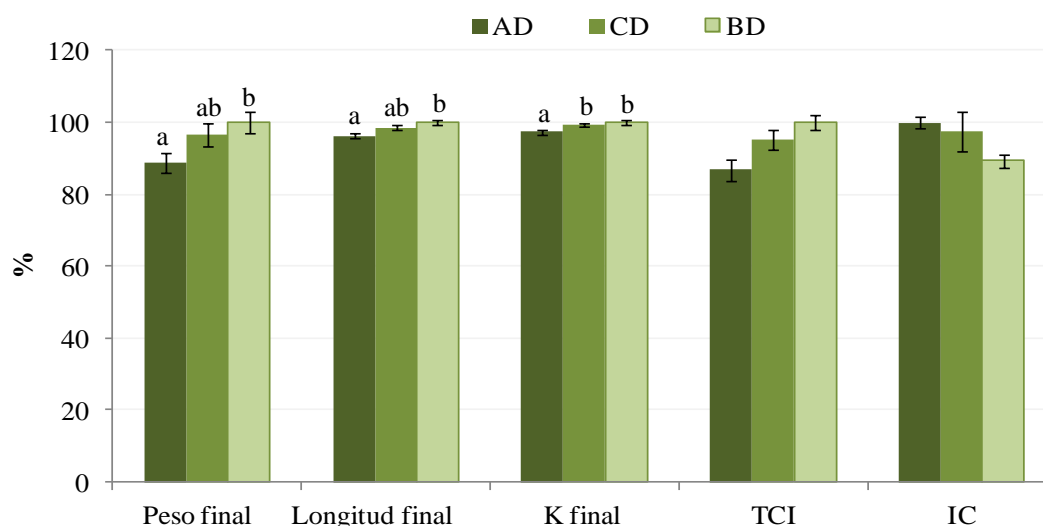


Figura 36. Datos de crecimiento en tencas (*Tinca tinca*) cultivadas bajo distintas densidades de cultivo. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, siendo $n=315$ para las variables Peso final, Longitud final y K final (Índice de condición) y TCI (Tasa de crecimiento instantáneo) y $n = 3$ para IC (Índice de conversión alimenticia). Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

En cualquier caso los resultados conseguidos durante esta Tesis se pueden considerar mejores que los publicados hasta la fecha, ya que se triplicó el peso de los peces en tan solo 100 días de ensayo, obteniendo densidades finales de $13,54 \text{ kg} / \text{m}^3$, partiendo de peces de $7,19 \text{ g}$ y llegando a $21,49 \text{ g}$. Aunque Celada *et al.* (2007)

consiguieron densidades de $16,58 \text{ kg} / \text{m}^3$, estos datos no pueden ser del todo comparables ya que el experimento duró 120 días, se realizó con alevines de $0,58 \pm 0,17 \text{ g}$, se alimentó con piensos con un 60% de proteína, 16% de grasas y con suplemento de alimento vivo en forma de *Artemia salina*. Pantazis (2012), partiendo de peces de 11g y con una densidad inicial $2,5 \text{ kg} / \text{m}^3$, consiguió una densidad máxima de $4,56 \text{ kg} / \text{m}^3$ a los 217 días de ensayo. Ribeiro (2016) en su tesis de Máster consigue triplicar el peso de juveniles de tenca de 4.8 g llegando hasta 15. 58 g pero en densidades finales de cultivo de $4,6 \text{ kg} / \text{m}^3$, similares a las consideradas como baja densidad (BD) en nuestro estudio ($1,6 \text{ kg} / \text{m}^3$ iniciales y $5,25 \text{ kg} / \text{m}^3$ de densidad final)

Las diferencias en peso y longitud encontradas entre el grupo de alta densidad (AD) y el de baja densidad (BD) se han podido deber, no a la densidad como tal, sino a otros condicionantes del cultivo. Otros autores encuentran una reducción de la ingesta y consecuentemente menor crecimiento por efecto de la competencia por la comida, tanto en trucha arcoiris como trucha alpina cultivadas a altas densidades (Alanara *et al.*, 1996). Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo donde los peces mantenidos a baja densidad (BD) habrían tenido un mejor acceso a la comida al haber un solo comedero automático en cada depósito.

Los valores de TCI (Tasa de crecimiento instantáneo) y el resto de variables analizadas relacionadas con el crecimiento e índices biométricos como IHS, IGS, IDS, rendimiento de la carcasa, grasa perivisceral, IC, IDef, y supervivencia, que se pueden observar en la tabla XIII no mostraron diferencias significativas que apoyarían la hipótesis de que la alta densidad de cultivo en condiciones controladas no conlleva efectos negativos.

5.3.2. Parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca bajo distintas densidades de cultivo

Los niveles de cortisol y de glucosa fueron más bajos en los peces sometidos a mayor densidad aunque no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Fig. 37). Algunos autores han descrito una relación inversa entre los niveles de cortisol y el aumento de densidad de cultivo en salmónidos relacionándolo con una

adaptación a estrés de tipo crónico (Pickering y Pottineger 1987; Vijayan y Leatherheat, 1988).

Lupatch *et al.* (2010), por el contrario, hallaron mayores concentraciones de cortisol en lubinas a mayor densidad, y otros autores observaron que no se producían cambios del cortisol plasmático en relación con la densidad de cultivo (Rafatnezhad *et al.*, 2008; Hasanalipour *et al.*, 2013; Aalimahmoudi *et al.*, 2016). Se han mostrado, por lo tanto, diversas respuestas del cortisol frente a la alta densidad en especies y sistemas de cultivo diferentes. Así, podemos asumir que los niveles de cortisol como respuesta al estrés crónico por alta densidad deben ser tomadas en consideración junto con otras variables para determinar la situación real de estrés o pérdida de bienestar. En nuestro caso las diferencias no son significativas entre el grupo cultivado a alta densidad y control. Únicamente se pueden considerar diferencias significativas al comparar el grupo de alta densidad frente al de baja densidad.

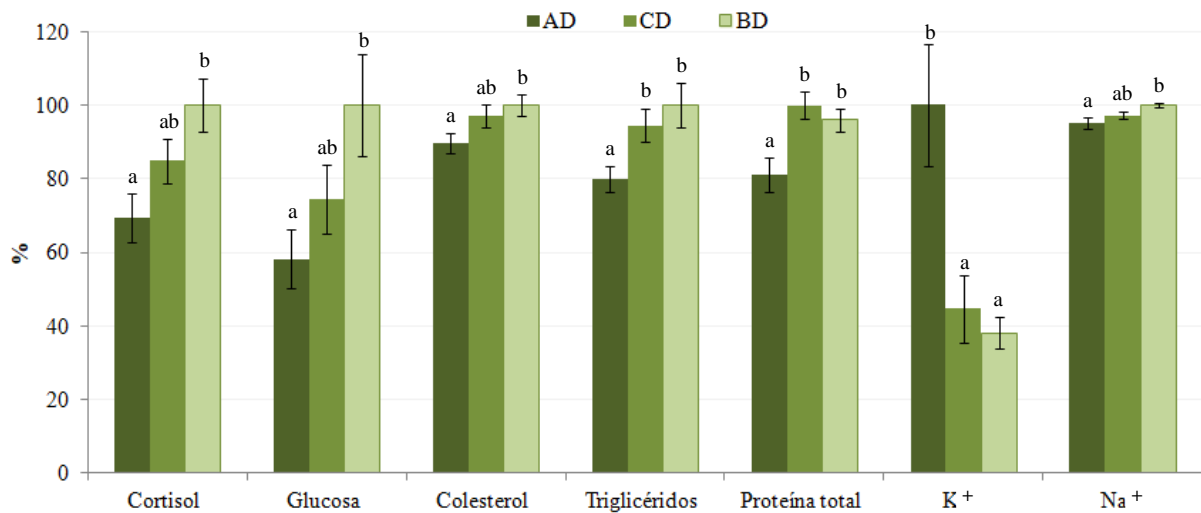


Figura 37. Efecto de la densidad de cultivo sobre parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca (*Tinca tinca*) Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas, (P < 0.05). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

Con respecto a la glucosa se puede observar que sigue la misma dinámica que el cortisol, lo que concuerda con lo expresado por otros autores en referencia a que aumentos de cortisol llevan asociados generalmente aumentos en los niveles de glucosa. (Vijayan *et al.*, 1989; Barton e Iwama, 1991; Bonga, 1997; Pottinger *et al.*, 2000; Tort *et al.*, 2004; Cho *et. al.*, 2015).

Los niveles obtenidos de glucosa en este estudio son, a pesar de la existencia de diferencias significativas entre los grupos AD y BD, valores normales en la tenca según lo descrito por De Pedro *et al.* (2005), estimando entre 50 y 85 mg / dL de glucosa en sangre, dependiendo de la estacionalidad. Patrice (2009) concluyó que las medidas de glucosa en sangre pueden ser un buen indicativo de estrés en ciprínidos pero considera necesarios incrementos de entre 3 y 5 veces sobre los valores normales para ser relacionados con signos de estrés.

En este estudio se ha encontrado una relación inversa entre la densidad de cultivo y los niveles de colesterol en sangre. Esto resultados concuerdan con los mostrados por Aalimahoudi *et al.* (2016) en esturión (*Huso huso*). Aalimahoudi aseguró además que los peces cultivados en alta densidad (6 kg/m³) no parecían estresados en comparación con el resto de densidades (1,5 y 3 kg/m³) en base al resto de variables que analizaron. Wedemeyer *et al.* (1990) concluían que un aumento en el colesterol en sangre podría ser consecuencia de una dieta no balanceada más que un efecto directo de una situación de estrés. Como se ha comentado, los peces sometidos a baja densidad podrían disponer del alimento con mayor facilidad y aprovechar mejor los nutrientes ante esta ventaja. Este hecho se vería reflejado tanto en el crecimiento como en los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteínas totales, tal y como se observa en la figura 37. También en cuanto las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL) se observa esta tendencia, aunque, en este caso sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (Tabla XIV).

El cortisol es una pieza fundamental en la regulación del equilibrio iónico de los peces (Mommsen, *et al.*, 1999). Muchos factores estresantes que alteran los niveles de cortisol, terminan afectando también a su equilibrio iónico (Bonga, 1997; Martemyanov, 2013, 2014; Kulkarni, 2015). Niveles elevados de cortisol activarían la Na⁺/K⁺-ATPasa y una consecuente disminución en la concentración plasmática de K⁺ y el aumento de Na⁺, respaldando los resultados mostrados.

Las hormonas tiroideas analizadas en este estudio no mostraron diferencias significativas. Esto puede volver sugerir que las densidades de cultivo analizadas no suponen un elemento de estrés para la tenca ya que algunos autores sugieren una disminución de la T4 en *Salvelinus fontinalis* en alta densidad (Vijayan and Leatherland 1988) o de T3 ante densidades de cultivo elevadas en distintas especies (Lupatsch *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Kpundeh *et al.*, 2013; Hasanlipour, 2014).

5.3.3. Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo

El hígado es uno de los órganos diana más importantes en la respuesta adaptativa al estrés, y es un tejido metabólico fundamental para la administración del sustrato energético (Moon, 2004).

Se ha demostrado que el cortisol, en los casos de estrés en peces, promueve una actividad metabólica dirigida a la obtención de sustratos energéticos, ya sea a partir del glucógeno almacenado o de la gluconeogénesis (Vijayan *et al.*, 1990, 1997; Martínez Porchas *et al.*, 2009). De este modo los recursos energéticos son desviados reduciéndose la energía disponible para otros fines como el crecimiento o la reproducción. El cortisol parece favorecer la movilización de proteínas (Davis *et al.*, 1985) de lípidos (Sheridan, 1986) y de carbohidratos (Vijayan y Leatherland, 1989) que aportarán diversos precursores para la obtención de glucosa.

En el presente estudio, las variaciones en las enzimas transaminasas hepáticas GTP y GOT no pueden ser claramente interpretadas ya que los datos más bajas enzimas se obtuvieron en el grupo control (CD), mientras que valores superiores se obtuvieron tanto alta como en baja densidad, sin mostrar diferencias significativas (Fig. 38).

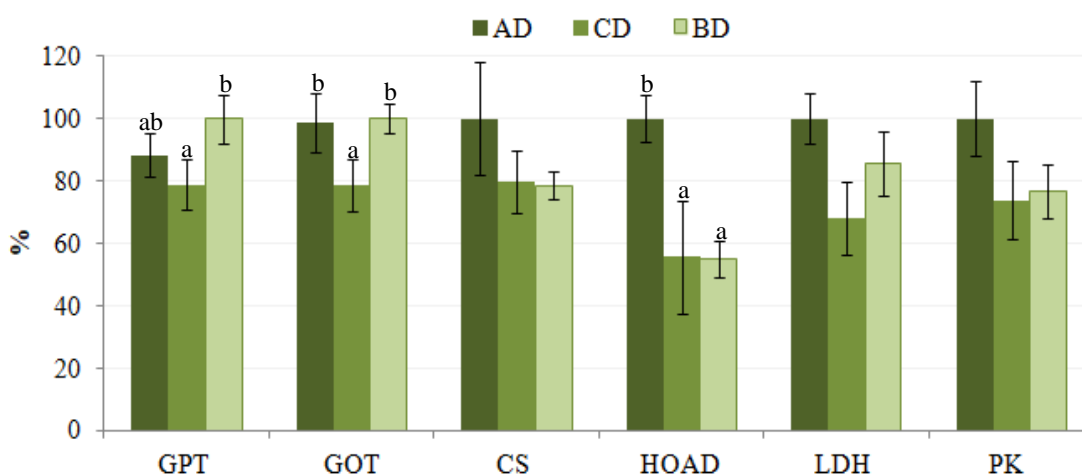


Figura 38. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en el hígado de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). GPT (Glutamato piruvato transaminasa), GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), CS (Citrato sintasa), HOAD (β -Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

Algunos autores han obtenido resultados que sugerirían que el estrés por confinamiento no supondría activación de estas enzimas (Trenzado *et al.*, 2003). Otros autores afirman que un aumento de cortisol si puede afectar a las enzimas aminotransferasas aumentando su actividad (Davis *et al.*, 1985). Con respecto a la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos y de los carbohidratos, se obtuvieron valores superiores en las los peces cultivados en alta densidad, aunque solo mostró diferencias estadísticamente significativas la enzima HOAD. Este hecho pudo estar promovido por el mayor esfuerzo a la hora de conseguir el alimento realizado por estos peces. El incremento de la enzima HOAD, implicada en la β -oxidación lipídica, indicaría una utilización de los lípidos con fines energéticos en estos animales, como ponen de manifiesto otros autores en condiciones de alta densidad de cultivo (Vijayan *et al.*, 1990; Tolussi *et al.*, 2010).

Cuando se analizaron estas enzimas en plasma, aunque siguieron la misma tendencia que en el hígado para las distintas densidades, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 39).

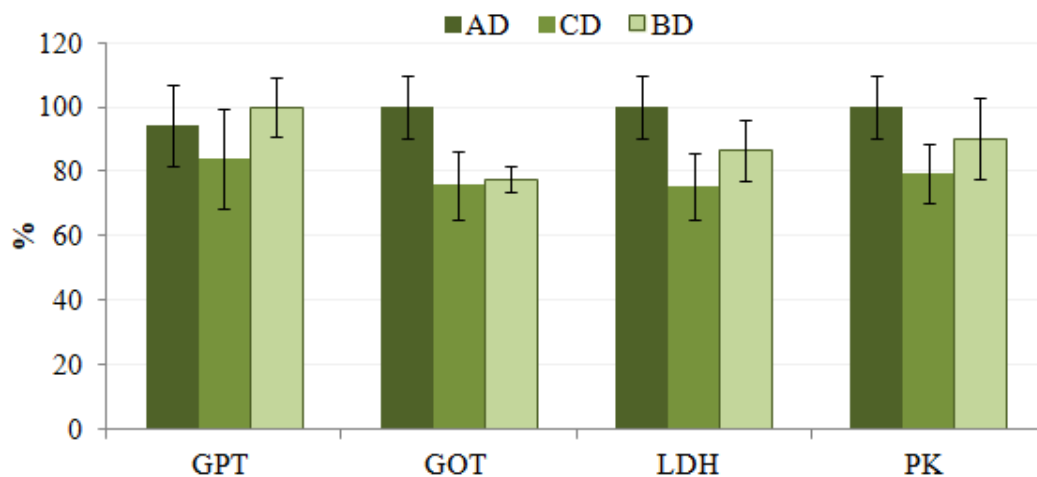


Figura 39. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en el plasma de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. GPT (Glutamato piruvato transaminasa), GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.3.4. Estado oxidativo del hígado y plasma de la tenca en distintas densidades de cultivo

La determinación del potencial enzimático antioxidante en plasma e hígado en tencas sometidas a las diferentes densidades de cultivo, se realizó con el objetivo de estudiar hasta qué punto el estado oxidativo se veía afectado por el cultivo a alta densidad (Figuras 40 y 41), como indican algunos estudios consultados (Alanara *et al.*, 1996). El único parámetro que reflejó un cambio estadísticamente significativo en el estado oxidativo en animales con distintas densidades de cultivo fue el MDA en hígado, con un menor valor en los peces cultivados a menor densidad. Este hecho podría explicarse por una menor actividad física derivada de esa menor densidad de cultivo y de una menor competición para conseguir el alimento. De cualquier forma los valores de MDA en el grupo AD son semejantes a los CD, por lo que podemos afirmar que el cultivo a alta densidad no afecta al estado oxidativo de la tenca en condiciones controladas de cultivo intensivo.

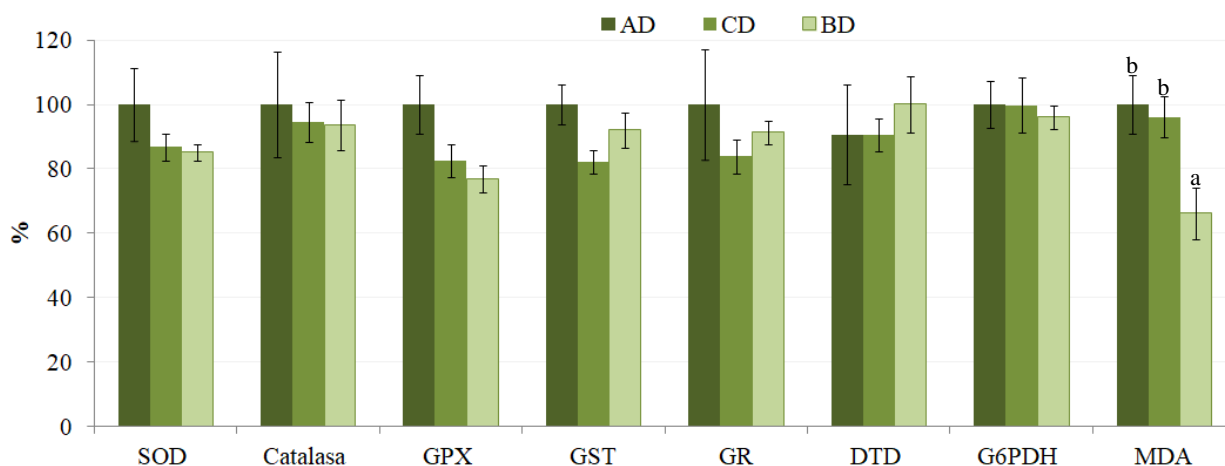


Figura 40. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el estado oxidativo en el hígado de la tenca (*tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutatión peroxidasa), GR (Glutatión reductasa), GST (Glutatión-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), MDA (Malondialdehído), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

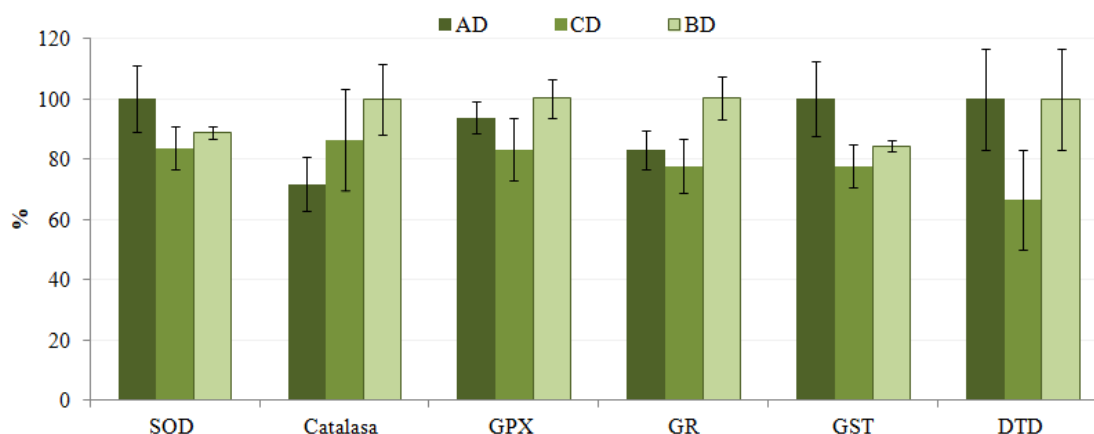


Figura 41. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el estado oxidativo en el plasma de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100. SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

5.3.5. Parámetros inmunológicos en la tenca en distintas densidades de cultivo

El estrés causado en algunas especies por la alta densidad puede tener efectos negativos como efectos supresores del sistema inmune (Pickering, 1984; Barton *et al.*, 1987; Wedemeyer, 1996; Einarsdottir *et al.*, 2000; Costas *et al.*, 2011) y una reducción en la capacidad de resistencia a enfermedades (Pickering, 1992; Bálsamo, 1997). Algunos autores por ejemplo, encuentran un descenso de la actividad lisozima, que es un potente antibacteriano, ante incrementos de cortisol (Mock y Peters, 1990; Demers y Bayne, 1997; Fevolden *et al.*, 2002; Noth *et al.* 2006), aunque en el presente estudio no se mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a esta variable entre los grupos.

Por otro lado, varios autores encuentran efectos de activación de este sistema inmune innato bajo estrés agudo (Demers y Bayne, 1997, Marlowe *et al.*, 2009), aunque según Eslamloo *et al.* (2014) se puede encontrar una activación del sistema inmune innato durante los primeros momentos tras estrés agudo pero una depleción general de este sistema trascurridos varios días bajo la situación de estrés agudo repetitivo o un estrés crónico como sería el cultivo a alta densidad. Además, algunos autores han

llegado a mostrar resultados con activación o supresión del sistema inmune como respuesta a un mismo agente estresante (Dhabhar, 2002, 2008) dependiente de diversos condicionantes.

Los resultados del presente estudio mostraron algunos elementos de activación del sistema inmune innato (Fig. 42) como la activación de la lipoxigenasa, involucrada en procesos pro inflamatorios, en el caso de los peces sometidos a alta densidad. También podemos apreciar un descenso en el caso de las inmunoglobulinas en este mismo grupo experimental frente al resto.

El resto de las variables analizadas han dado resultados con diferencias estadísticamente no significativas y podemos afirmar entonces que no se produjeron efectos negativos descartables sobre el sistema inmune de los peces como consecuencia de las distintas densidades de cultivo analizadas.

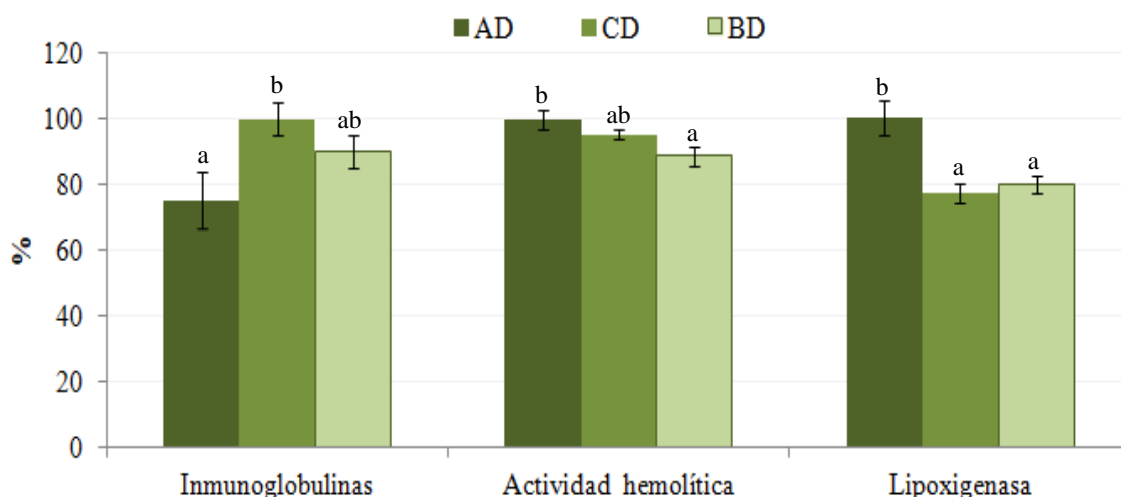


Figura 42. Efecto de la densidad de cultivo sobre la actividad de enzimas relacionadas con el estado oxidativo en el plasma de la tenca (*tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas, (P < 0.05). AD (Alta densidad), CD (Densidad de control) y BD (Baja densidad).

Resumiendo podemos coincidir con lo expresado por Barandica, (2010) en que las situaciones de estrés en los peces alteran (aumentan o disminuyen) gran número de parámetros inmunes, pero que son difíciles de identificar debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos involucrados, si comparamos con lo que se conoce en vertebrados superiores.

6. Efecto de la dieta sobre el bienestar de la tenca en cultivo intensivo

6.1. INTRODUCCIÓN

La nutrición de las especies en cultivo suele generar uno de los mayores costes de producción para cualquier empresa de este sector acuícola. Además supone una de las piedras angulares para el mantenimiento del bienestar de los animales. No solo es importante la formulación de estas dietas sino también la estabilidad de los componentes que la forman, la conservación adecuada para evitar el deterioro de los nutrientes, la disponibilidad tanto por cantidad como por tamaño o una correcta administración, son elementos fundamentales a la hora de establecer una alimentación óptima para cualquier especie (Harper *et al.*, 2009).

Una mala alimentación, ya sea por deficiencia en nutrientes esenciales en su formulación, por la incapacidad para su asimilación o por un protocolo erróneo en el suministro, puede suponer, no solo un retraso en los ciclos de producción y una correspondiente pérdida económica, sino también la una alteración del estado de bienestar de los animales con resultados, en ocasiones, desastrosos. Muchos procesos patológicos que se producen en las instalaciones de acuicultura vienen acompañados o han tenido su origen en una deficiente alimentación (Lall, 2000; Barandica, 2010). Además, una inadecuada alimentación puede tener consecuencias directas como por ejemplo el descenso de reservas que se observaría histológicamente en órganos y tejidos como el hígado o la musculatura, pero además puede ocasionar otra serie de complicaciones asociadas con situaciones de estrés como una búsqueda más activa del alimento, competencia por los recursos, y el incremento del esfuerzo energético en situaciones de debilidad. Todo ellos puede desencadenar la cascada de respuestas al estrés que no harán otra cosa que agudizar el problema de deficiencia alimenticia (Barton y Schreck 1987; Vijayan *et al.* 1997).

En la actualidad, en gran parte de las especies de peces cultivadas se conoce sus necesidades nutritivas. Los primeros estudios que comenzaron con la trucha en la década de los años 70 (Cowey *et al.* 1977; De la Higuera, 1977; García-Gallego *et al.* 1981; Cho *et al.* 1990; Sanz *et al.*, 2000), dieron paso al conocimiento de la nutrición de otras especies de peces, de agua dulce como la anguila y el esturión (García-Gallego *et al.* 1993; Hidalgo *et al.* 1993; Sanz *et al.* 1993; Suárez *et al.* 1995; Sanz *et al.* 2005;

Furné *et al.* 2016) y, con posterioridad, marinos (Company *et al.*, 1999; Pérez-Jiménez *et al.* 2009).

En el caso concreto de la tenca parece no haber un criterio uniforme sobre sus necesidades nutricionales y muchos de los estudios publicados hasta la fecha parecen evidenciar que aún no se ha conseguido una dieta adecuada para esta especie y mucho menos un protocolo de alimentación adecuado. Su alimentación hasta la actualidad se ha basado en fórmulas que han funcionado con éxito en otras especies cultivadas como carpas, salmónidos e incluso peces marinos como la dorada o la lubina, pero parecen necesarios más estudios para conocer los requerimientos nutricionales específicos para la tenca.

Según Gray y Dauble (2001) la tenca es una especie herbívora, según otros autores puede llegar a alimentarse incluso de detritus (Wydoski y Whitney, 2003), pero la generalidad de estudios consultados proponen que la tenca es una especie omnívora aunque con preferencias notorias hacia los invertebrados acuáticos (Weatherley, 1959; Ranta y Nuutinen, 1984; Giles *et al.*, 1990; Michel y Oberdorff, 1995; Pérez-Bote *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000).

Los estudios realizados hasta el momento sobre alimentación artificial de la tenca se centran principalmente en las fases post-larvarias (Takashima, 1989; Quirós *et al.*, 1998, 2000 y 2003; Alvariño *et al.* 2001; De Pedro *et al.*, 2001; Wolnicki *et al.*, 1998, 2003, 2006; Mamcarz *et al.*, 2006; Celada *et al.*, 2007a, 2007b; Marês *et al.*, 2007, 2011; Kujawa *et al.*, 2009; González-Rodríguez *et al.* 2014) y en pocas ocasiones se han estudiado peces en fases de desarrollo más avanzados.

La gran mayoría de las especies de peces estudiadas actualmente, que por lo general son carnívoras, parecen poseer una baja capacidad para utilizar los hidratos de carbono a nivel metabólico, lo cual se refleja en un efecto hiperglucémico (Moon, 2001). Dicha condición se asemeja a lo que ocurre en humanos que padecen *diabetes mellitus*, en los que existe una incapacidad (intolerancia) a recuperarse rápidamente frente una dosis elevada de glucosa.

Una de las herramientas para determinar dicha capacidad fisiológica es la aplicación de un test de tolerancia a la glucosa (TTG), basado en la administración de una dosis concreta de glucosa. El tiempo requerido para recuperarse de la hiperglucemia depende, además de la especie de pez, de la dosis suministrada, y de la forma en la que se administra la glucosa, que puede ser oral, intravenosa o intraperitoneal.

La administración intravenosa de glucosa (250 mg / kg de pez) en el pez gato americano (*Ameiurus punctatus*) produce una respuesta hiperglucémica que es sostenida durante 11 h (Ottolenghi *et al.*, 1995). Sin embargo, cuando la glucosa es administrada oralmente (1.670 mg / kg de pez) la hiperglucemia es mantenida solo durante 6 h en dicha especie (Wilson and Poe, 1987). Cuando la vía de administración es similar, diversos estudios muestran una variación que parece estar relacionada con el hábito alimenticio de cada una de las especies. En la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), de hábito carnívoro, la administración intraperitoneal de glucosa (300 mg / kg) produce hiperglucemia durante 18 h (Harmon *et al.*, 1991), mientras que en tilapia (*Tilapia mossambica*), herbívoro, la administración de glucosa (2.000 mg / kg) por esta vía produce una respuesta hiperglucémica que es sostenida solo durante 6 h (Wright *et al.*, 1998). En el test vía oral, la tolerancia a la glucosa en la carpa común (*Cyprinus carpio*), de hábito omnívoro, es mayor que en el pargo (*Pagrus major*), que podría considerarse carnívoro, siendo aún menor en el medregal (*Seriola quinqueradiata*), especie netamente carnívora (Furuichi y Yone, 1981). De forma similar, cuando se ha administrado glucosa en forma intravenosa (250 mg / kg de pez) en el pez gato (*Ameiurus melas*), de hábitos omnívoros, se ha encontrado que la tolerancia es mayor que en especies carnívoras como la anguila americana (*Anguilla rostrata*) o la trucha arco iris (Peres *et al.* 1999; Legate *et al.*, 2001; Moon, 2001; Polakof *et al.*, 2011).

Consecuentemente, estos estudios sugieren que aquellas especies con un carácter principalmente herbívoro u omnívoro tienen una mayor tolerancia a la glucosa que especies carnívoras, independientemente de la forma en que se administre el compuesto.

A pesar de las grandes variaciones en la anatomía estructural y funcional del tracto gastrointestinal de las especies analizadas, los estudios realizados hasta la fecha evidencian la presencia en todos los peces de un aparato enzimático suficiente para hidrólisis y absorción de carbohidratos simples y también de los más complejos, (Krogdahl *et al.*, 2005). No obstante se ha demostrado que, en comparación con las especies omnívoras o herbívoras, las especies carnívoras presentan unas menores actividades de amilasa intestinal (Hidalgo *et al.*, 1999) y de isomaltosa-sacarasa del ribete en cepillo (Harpaz y Uni, 1999) , una menor capacidad de captación de glucosa por los enterocitos (Buddington *et al.*, 1987), una menor capacidad de unión a la insulina por los receptores, un menor número de receptores en el músculo esquelético (Parrizas *et al.*, 1994) y una menor regulación de las enzimas gluconeogénicas por la presencia de carbohidratos en la dieta (Kamalam, 2017).

No obstante también hay diferencias en el grado de utilización de los carbohidratos dentro de un mismo hábito alimentario (Figueiredo-Silva *et al.*, 2013; Panserat *et al.*, 2002).

En lo que se refiere a la utilización de dietas artificiales por los peces, se ha visto que los salmónidos mantienen un nivel de glucosa en plasma elevado después de alimentarse con una dieta rica en hidratos de carbono (Baños *et al.*, 1998; Blasco *et al.*, 2001). Ello puede ser debido, al menos en trucha arco iris, a la posible existencia de un ciclo fútil en la fosforilación de la glucosa en el hígado y en el músculo esquelético (Skiba-Cassy *et al.*, 2013).

Debido a que no existen piensos específicos para la tenca, en su cultivo intensivo se utilizan piensos formulados para otras especies de peces. En este capítulo se estudia la utilización por la tenca de dos dietas de uso común en la industria piscícola, una adecuada para la dorada, especie considerada de carácter carnívoro (Inicio Plus 868) que conformó el grupo experimental A; y otra para la tilapia considerada herbívora (mezcla al 50% de Efico Alpha 845 y Efico Alpha 830) que sería el grupo B, ambas diseñadas para estadíos juveniles. La evaluación de parámetros relacionados con la utilización nutritiva y metabólica, con el estado oxidativo e inmunológico, así como su estudio histológico en las tencas alimentadas con ambos piensos arrojarán luz acerca de las repercusiones que, a nivel fisiológico tienen los piensos comerciales anteriormente descritos. Finalmente, el estudio de la tolerancia a la glucosa en la tenca puede ser una herramienta más para el conocimiento de sus necesidades nutricionales que facilite una correcta formulación de dietas artificiales específicas.

6.2. RESULTADOS

Aunque los piensos comerciales empleados en este ensayo se acompañaban de su composición proximal, se realizaron los análisis pertinentes para determinar los valores exactos de macronutrientes y el perfil de aminoácidos de cada una de las dietas empleadas. Los datos de composición de las dietas según nuestros propios análisis fueron los expresados en la tabla XX. Podemos apreciar pequeñas variaciones respecto de los valores mostrados inicialmente por los fabricantes (Tabla IV).

Tabla XX. Composición proximal de las dietas experimentales.

Composición de la dieta (% S/SF)	Pienso de Dorada	Pienso de Tilapia
Humedad	6.34	6.56
Proteína	46.94	39.86
Grasa	20.72	5.66
Minerales	7.97	8.12
MELN*	18.03	39.81
Energía (MJ / kg)	22.36	19.34

*MELN: Materias Extractivas Libres de Nitrógeno. Energía = 23.7 kJ /g proteína, 39.5 kJ/ g, grasas y 17.2 kJ/ g (Tomás-Vidal *et al.*, 2011)

6.2.1. Efectos de la dieta sobre el crecimiento e índices biométricos de la tenca en cultivo intensivo

En la tabla XXI podemos apreciar como los datos de crecimiento han mostrado diferencias significativas entre los dos grupos experimentales analizados a excepción de los resultados de incidencia de peces deformes y de supervivencia, que no mostraron diferencias significativas.

Tabla XXI. Datos de producción por lotes en tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales diferentes.

	A	B	P
Peso inicial lote (Kg)	12.50±0.00	12.50±0.00	ns
Peso final lote (Kg)	40.44±1.99 ^b	32.29±0.68 ^a	0.018
Δ Peso lote (%)	223.53±15.92 ^b	158.31±5.42 ^a	0.018
Tasa de alimentación (%/día)	2.46±0.27	2.46±0.27	ns
IC	2.06±0.16 ^a	2.65±0.09 ^b	0.013
IDef (%)	23.81±2.52	26.67±1.45	ns
Supervivencia (%)	93.51±4.00	88.31±1.84	ns

Los datos muestran medias ± SEM, n = 3. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). Δ Peso (Incremento de peso), IC (Índice de conversión alimenticia), IDef % (Incidencia de peces con Deformidades corporales visibles), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Con respecto a todas las variables de crecimiento de los lotes analizados en su conjunto se pudo observar que los valores más elevados se obtuvieron en los peces alimentados con pienso de dorada (Grupo A) a excepción de la variable IC (índice de conversión del alimento), que fue significativamente superior en los peces alimentados con el pienso de tilapia (Grupo B).

En el análisis de los peces de forma individual (Tabla XXII) se observó que el peso individual ha sido superior en el grupo experimental A, pero en cuanto a la longitud total final no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas. El índice de condición, como consecuencia, también fue mayor en los peces del grupo A.

Tabla XXII. Datos biométricos y de crecimiento individual en tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales.

	A	B	P
Peso inicial (g)	5.98±0.18	5.98±0.18	ns
Peso final (g)	20.69±0.70 ^b	17.49±0.62 ^a	0.001
L. Total inicial (mm)	79.26±0.54	79.26±0.54	ns
L. Total final (mm)	109.32±0.82	107.31±0.97	ns
K inicial 100x (g/cm³)	1.17±0.02	1.17±0.02	ns
K final 100x (g/cm³)	1.44±0.01 ^b	1.26±0.01 ^a	<0.001
TCI	0.92±0.02 ^b	0.75±0.03 ^a	<0.001
IHS (%)	1.08±0.12	0.97±0.09	ns
IGS (%)	3.37±0.17	3.30±0.41	ns
IDS (%)	3.67±0.15 ^b	2.97±0.15 ^a	0.002
Grasa perivisceral (%)	6.43±0.82 ^b	4.45±0.24 ^a	<0.001
Rendimiento de la carcasa (%)	82.82±0.35 ^a	87.15±0.45 ^b	<0.001

Los datos reflejan medias ± SEM, siendo n=300, para las variables peso inicial y final, longitud inicial y final, índices de condición inicial y final (K) y TCI (Tasa de crecimiento instantáneo); n=12, para las variables IHS (Índice hepatosomático), IGS (Índice gonadosomático), IDS (Índice digestivosomático), grasa perivisceral y rendimiento de la carcasa. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Los índices hepatosomático y gonadosomático no mostraron diferencias significativas pero sí lo hicieron el índice digestivosomático y la grasa perivisceral, mostrando valores más elevados para el grupo alimentado con pienso para carnívoros (A). Contrario resultado tuvo el rendimiento de la carcasa que fue significativamente superior en el grupo experimental B.

6.2.2. Evaluación de la composición corporal y de la utilización de la energía y los nutrientes de la dieta en la tenca

En la tabla XXIII se observa como los peces alimentados con pienso de tilapia (B) mostraron los valores más elevados en cuanto a cenizas y proteína. El valor más bajo de proteínas lo mostró el grupo inicial (IN) y un valor intermedio se observó en los peces alimentados con pienso de dorada (A).

La humedad fue menor en el grupo A seguida del B y un valor más alto fue obtenido en el grupo IN.

El grupo inicial mostró por otro lado, los valores más bajos en cuanto a grasas y energía. El valor más alto en grasas se observó en los peces alimentados con la dieta de dorada, más rica en este nutriente (grupo A).

Tabla XXIII. Composición corporal (s/sf) de la tenca (*Tinca tinca*) alimentada con dos piensos comerciales distintos.

	IN	A	B	P
Humedad (%)	76.95±0.17 ^c	67.20±0.36 ^a	73.59±0.19 ^b	<0.001
Proteína (%)	13.73±0.17 ^a	14.50±0.17 ^b	15.36±0.15 ^c	<0.001
Grasas (%)	3.80±0.22 ^a	10.07±0.59 ^c	6.43±0.31 ^b	<0.001
Cenizas (%)	2.83±0.04 ^b	2.17±0.07 ^a	3.12±0.09 ^c	<0.001
Energía (MJ / Kg)	3.72±0.08 ^a	6.21±0.21 ^c	4.98±0.11 ^b	<0.001

Los datos muestran media ± SEM, n = 12. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). IN (Lote inicial de peces) A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

En la tabla XXIV se observa que todas las variables analizadas muestran diferencias significativas y que presentan un valor mayor en el grupo A, a excepción de la retención de lípidos que fue mayor en el grupo B.

Las variables VPP (Valor productivo de la proteína), CEC (Coeficiente de eficacia en crecimiento) y la retención de energía fueron similares en ambos grupos y no mostraron diferencias.

Tabla XXIV. Utilización de la energía y los nutrientes de la dieta en la tenca (*Tinca tinca*).

	A	B	P
N corporal inicial lote (g)	264.00±0.00	264.00±0.00	ns
N corporal final lote (g)	936.59±14.93 ^b	794.38±11.65 ^a	0.014
Ganancia de N corporal (g)	672.90±14.93 ^b	530.69±11.65 ^a	0.014
N ingerido lote (g)	4.273.42±0.00 ^b	3.335.48±0.00 ^a	<0.001
VPP (%)	15.49±0.75	15.55±0.50	ns
CEC (%)	1.12±0.08	1.02±0.03	ns
Total lípidos ingeridos (Kg)	11.78±0.00 ^b	2.96±0.00 ^a	<0.001
Total energía ingerida (MJ/kg)	1.27±0.00 ^b	0.96±0.00 ^a	<0.001
RL (%)	30.77±4.22 ^a	54.81±3.91 ^b	0.015
RE (%)	18.90±1.67	15.76±0.60	ns

Los datos reflejan medias ± SEM, siendo n=12, VPP (Valor Productivo de la Proteína), CEC (Coeficiente de Eficacia en Crecimiento), RL (Retención de Lípidos), RE (Retención de Energía). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.2.3. Efectos de la dieta sobre el perfil de aminoácidos de la tenca en cultivo intensivo

En la tabla XXV se aprecia como las distintas dietas no han supuesto diferencias significativas entre los grupos A y B para ningún aminoácido. Sí que han mostrado algunas diferencias con respecto al grupo inicial IN, que mostró valores más elevado para los aminoácidos glutamina, histidina y alanina, y valores más bajo para los

aminoácidos tirosina y metionina con respecto a los valores obtenidos en los grupos experimentales A y B.

Tabla XXV. Perfil de aminoácidos en la tenca (*Tinca tinca*) alimentada con dos dietas comerciales diferentes.

% sobre el total	Pienso D	Pienso T	IN	A	B	P
ASP	15.26	12.57	19.56±1.62	19.17±1.01	20.07±0.35	ns
SER	6.39	6.90	7.06±0.52	6.22±0.48	6.00±0.19	ns
GLU	11.20	21.82	15.04±1.28 ^b	12.74±0.82 ^a	12.10±0.24 ^a	0.048
GLY	10.39	12.22	8.44±1.96	11.73±0.53	11.06±0.95	ns
HIS	4.30	4.87	2.84±1.29 ^b	1.34±0.49 ^{ab}	0.24±0.24 ^a	0.042
ARG	1.84	1.36	4.16±0.51	3.55±0.51	4.74±0.26	ns
THR	2.63	0.52	3.18±0.59	3.66±0.59	4.06±0.14	ns
ALA	11.83	9.69	11.60±0.48 ^b	9.73±0.58 ^a	9.85±0.24 ^a	0.021
PRO	6.91	10.10	5.59±0.43	5.76±0.45	5.45±0.17	ns
CYS	0.00	0.00	0.00±0.00	1.26±0.63	0.15±0.10	ns
TYR	1.44	0.00	0.40±0.12 ^a	0.83±0.16 ^{ab}	1.36±0.29 ^b	0.021
VAL	6.87	3.47	4.35±0.43	4.36±0.46	4.81±0.15	ns
MET	0.00	0.00	0.26±0.19 ^a	1.05±0.28 ^b	1.00±0.08 ^b	0.033
LYS	4.74	2.20	7.26±0.44	6.53±0.71	7.54±0.23	ns
ILE	1.52	1.79	1.46±0.42	2.93±0.58	2.44±0.18	ns
LEU	12.26	11.38	7.15±0.31	6.92±0.58	7.06±0.19	ns
PHE	2.43	1.09	1.65±0.30	2.22±0.49	2.06±0.06	ns

Los datos muestran media ± SEM del porcentaje sobre el total, n = 12. En amarillo se marcan los aminoácidos esenciales. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). Pienso D (Dorada), Pienso T (Tilapia), IN (Lote inicial de peces), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.2.4. Efectos de la dieta sobre el perfil lipídico de la tenca en cultivo intensivo

El perfil lipídico de los piensos y de las tencas analizadas se muestra en la tabla XXVI. De forma general se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo inicial (IN) respecto de los otros dos grupos, A y B.

El contenido de AGS (Ácidos grasos saturados) fue mayor en el pienso de dorada pero menor en el caso de los peces alimentados con esta dieta (Grupo A) si los comparamos con los otros dos grupos IN y B.

El caso contrario ocurrió con los AGI (Ácidos grasos insaturados), que fueron más abundantes en el pienso de tilapia pero cuyo valor más elevado se encontró en los peces alimentados con dieta de dorada. En este caso, el valor más bajo de AGI se detectó en los peces del grupo inicial.

Con respecto al conjunto de AGP (Ácidos Grasos Poli-insaturados) encontramos una mayor cantidad de estos en el pienso de tilapia, pero los valores fueron iguales en los peces alimentados con cualquiera de las dos dietas evaluadas (Grupos A y B). El valor de AGP fue significativamente menor en el grupo IN con respecto a los anteriores.

En el caso de los ácidos grasos tipo n-6 ocurrió exactamente igual, aunque en este caso, el valor mayor correspondió con la dieta de tilapia, pero tampoco se observaron diferencias entre los grupos A y B. De nuevo el grupo inicial (IN) presentó el valor más bajo con diferencias estadísticamente significativas respecto de los otros dos grupos.

Encontramos una posible relación entre los ácidos grasos n-3, que fueron más abundantes en la dieta de dorada y esto parece reflejarse en los peces alimentados con esta dieta (grupo A), encontrando en ellos un valor significativamente más alto respecto a los otros dos grupos.

Los peces del grupo B alimentados con el pienso de tilapia, con menos lípidos y proteína, son los que presentaron mayor cantidad de ácidos grasos saturados, menor cantidad de n-3 y menor relación n-3/n-6 si los comparamos con los otros dos grupos de tencas IN y A.

Tabla XXVI. Perfil lipídico de la tenca (*Tinca tinca*) alimentada con dos dietas comerciales diferentes.

% sobre el total	D	T	IN	A	B	P
Undecanoico (C11:0)	0.12	0.06	0.17±0.01 ^b	0.04±0.02 ^a	0.06±0.00 ^a	0.02
Laurico (C12:0)	0.16	0.06	0.19±0.01 ^c	0.08±0.01 ^b	0.03±0.01 ^a	0.01
Mirístico (C14:0)	2.61	1.89	4.78±0.20 ^c	2.95±0.08 ^b	2.23±0.02 ^a	< 0.001
Miristoleico (C14:1)	0.04	0.05	0.10±0.02	0.06±0.02	0.06±0.00	ns
Pentadecanoico (C15:0)	0.35	0.27	0.71±0.05 ^b	0.42±0.02 ^a	0.32±0.01 ^a	< 0.001
Palmítico (C16:0)	23.21	21.48	32.47±0.27 ^c	22.40±0.93 ^a	26.69±0.40 ^b	0.001
Palmitoleico (Z C16:1n9)	3.61	2.20	11.05±0.51 ^b	7.83±0.09 ^a	8.29±0.14 ^a	< 0.001
Margarico (C17:0)	0.38	0.28	0.60±0.01 ^b	0.27±0.04 ^a	0.24±0.01 ^a	0.001
Estearico C18:0)	4.31	3.02	3.59±0.30 ^b	2.67±0.09 ^a	2.66±0.12 ^a	0.016
Oleico (Z C18:1n9)	26.31	21.73	23.82±0.69 ^a	30.39±0.92 ^b	29.34±0.71 ^b	0.007
Acido W7(C18:1n7)	6.66	5.40	7.14±0.20	6.80±0.76	6.53±0.15	ns
Linoleico (ZC18:2n6)	22.23	36.51	8.21±0.29 ^a	14.85±1.67 ^b	17.73±0.43 ^b	0.007
Araquídico (C20:0)	0.00	0.00	0.00±0.00	0.06±0.06	0.00±0.00	ns
Eicosenoico, cis11 (C20:1)	0.00	0.00	0.00±0.00	1.12±0.21	0.00±0.00	ns
Linoléico (C18:3n3)	2.94	2.19	1.78±0.21 ^b	0.81±0.07 ^a	1.84±0.04 ^b	0.001
Eicosadienoico, cis11,14 (20:2)	0.00	0.00	0.13±0.13 ^a	0.45±0.04 ^b	0.00±0.00 ^a	0.05
Eicosatrienoico, cis8,11,14 (C20:3n6)	0.00	0.00	0.00±0.00	0.25±0.02	0.00±0.00	ns
Erucico (C22:1n9)	0.00	0.00	0.00±0.00	0.27±0.03	0.00±0.00	ns
Eicosatrienoico cis11,14,17 (C20:3)	0.04	0.56	0.31±0.01 ^b	0.04±0.04 ^a	0.14±0.00 ^a	0.003
Tricosanoico (C23:0)	0.00	0.00	0.00±0.00	0.04±0.04	0.00±0.00	ns
Araquidónico (C20:4n6)	0.46	0.23	0.74±0.03 ^b	0.46±0.04 ^a	0.46±0.02 ^a	0.003
Docosadienoico cis 13,16 (C22:2)	0.24	0.18	0.29±0.07 ^{ab}	0.52±0.04 ^b	0.15±0.07 ^a	0.17
Lignocérico (C24:0)	0.07	0.03	0.11±0.02 ^b	0.01±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a	0.12
EPA, cis 5,8,11,14,17 (C20:5n3)	0.53	1.46	1.10±0.05 ^a	2.61±0.26 ^b	1.00±0.05 ^a	0.002
Nervónico (C24:1)	0.12	0.06	0.21±0.03 ^b	0.03±0.03 ^a	0.08±0.01 ^a	0.006
DHA, cis 4,7,10,13,16,19 (C22:6n3)	3.53	2.23	2.54±0.09 ^a	4.50±0.30 ^b	2.1±0.17 ^a	0.001
Σ AGS	31.21	27.09	42.59±0.23 ^c	28.94±1.04 ^a	32.27±0.53 ^b	< 0.001
Σ AGI	66.71	72.80	57.40±0.24 ^a	71.00±1.10 ^c	67.73±0.53 ^b	< 0.001
Σ AGMI	36.74	29.44	42.32±0.27	46.50±1.35	44.30±0.90	ns
Σ AGPI	29.97	43.36	14.96±0.40 ^a	24.05±2.40 ^b	23.44±0.51 ^b	0.028
Σ n-3	7.04	6.44	5.72±0.14 ^a	7.96±0.65 ^b	5.10±0.19 ^a	0.012
Σ n-6	22.93	36.92	9.24±0.27 ^a	16.09±1.76 ^b	18.34±0.38 ^b	0.01
Σ n-3 / Σ n-6	0.31	0.17	0.62±0.00 ^c	0.50±0.02 ^b	0.28±0.01 ^a	< 0.001

Los datos muestran media ± SEM del porcentaje sobre el total de lípidos, n = 3. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). Σ AGS (Ácidos Grasos Saturados = C11+C12+C14+C15+C16+C17+C18+ C20+C22+C:3+C:4), Σ AGI (Ácidos Grasos Insaturados =C14:1+C16:1n9+C18:1n9+C18:1n7+C18:2n6+C20:1+C18:3n3+C20:2+C20:3n6+C22:1n9+C20:3+ C20:4n6+C22:2+C20:5n3+C24:1+C22:6n3), Σ AGMI (Ácidos Grasos Mono-insaturados = C14:1+C16:1n9+C18:1n9+C18:1n7+ C20:1+C22:1n9+C24:1), Σ AGPI (Ácidos Grasos Poli-insaturados = C18:2n6+C18:3n3+C20:2+ C20:3n6+C20:3+C20:4n6+C22:2+C20:5n3+C22:6n3), Σ n-3 (Ácidos Grasos tipo n-3 = C18:3n3+ C20:5n3+ C22:6n3), Σ n-6 (Ácidos Grasos tipo n-6 = C18:2n6+C20:3n6+C20:4n6), D (Pienso de dorada), T (Pienso de tilapia), IN (Lote inicial de peces) A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.2.5. Efectos de la dieta sobre parámetros bioquímicos en el plasma de la tenca en cultivo intensivo

La Tabla XXVII muestra los valores de parámetros bioquímicos analizados en el plasma donde se han obtenido diferencias estadísticamente significativas tanto entre los grupos experimentales entre sí como al comparar éstos con los datos de los peces al inicio del experimento.

Tabla XXVII. Bioquímica, hormonas y electrolitos en plasma de tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con distintas dietas.

	IN	A	B	P
Cortisol (µg/dL)	8.85±0.87 ^a	15.65±2.36 ^b	18.60±1.58 ^b	0.14
Glucosa (mg/dL)	80.00±5.04	81.09±5.10	77.00±5.79	ns
Colesterol (mg/dL)	174.60±6.13 ^b	199.55±3.62 ^c	156.42±4.94 ^a	0.0001
HDL (mg/mL)	68.20±2.36 ^a	138.18±10.88 ^b	85.75±3.39 ^a	0.0001
LDL (mg/mL)	15.00±1.13 ^b	14.36±0.89 ^b	11.25±0.75 ^a	0.023
Triglicéridos (mg/dL)	129.67±3.89	126.64±11.68	153.25±6.46	ns
Proteína total (mg/mL)	41.58±6.74 ^b	45.71±2.67 ^b	29.95±2.27 ^a	0.002
T3 (µg/mL)	3.13±0.08 ^a	4.42±0.08 ^b	5.59±0.16 ^c	0.0001
T4 (ng/dL)	0.23±0.03 ^b	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.0001
Cl⁻ (mmol/L)	109.80±0.13 ^a	109.27±1.35 ^a	115.50±0.85 ^b	0.0001
K⁺ (mmol/L)	0.57±0.02 ^a	1.14±0.16 ^b	0.77±0.09 ^{ab}	0.021
Na⁺ (mmol/L)	148.40±2.14 ^a	149.09±1.97 ^a	155.75±1.21 ^b	0.017

Los valores son media ± SEM (n = 12 peces). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), (ns) no significativa. HDL (High density lipoprotein). LDL (Low density lipoprotein), T3 (Triyodotironina), T4 (Tiroxina). IN (Peces iniciales), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Así, encontramos como el cortisol fue más elevado en los peces de los grupos A y B frente al grupo inicial, aunque entre ellos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Con respecto al colesterol total también se hallaron diferencias significativas, pero obteniendo los valores más bajos en el grupo B, valores intermedios en el grupo inicial y los valores más altos en el grupo A.

Con respecto a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) también se encuentran los valores mayores significativamente en el grupo experimental A respecto de los otros dos grupos IN y B, que no mostraban diferencias significativas entre ellos.

Tanto el colesterol de baja densidad (LDL) como la proteína total fueron menores significativamente en el grupo B frente a los otros dos grupos analizados (IN y A).

Con respecto a las hormonas tiroideas, los valores más elevados de forma estadísticamente significativa de la T3 se encontraron en el grupo B, un valor intermedio en el grupo A y el valor más bajo en el grupo inicial. En el caso de la hormona T4 ocurrió al contrario con los valores más altos en el grupo inicial (IN), pero no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos alimentados con las dos dietas (A y B).

Al analizar los electrolitos se observaron valores superiores de Cloro (Cl^-) y sodio (Na^+) en el grupo experimental B frente a los grupos IN y A. En cambio para el potasio (K^+) el valor más elevado correspondió al el grupo experimental A, mostrando un valor intermedio para el grupo B y un valor significativamente menor para el grupo inicial.

No se encontraron diferencias significativas ni en los niveles de glucosa ni en los triglicéridos plasmáticos entre los tres grupos experimentales.

6.2.6. Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el metabolismo intermediario de la tenca en cultivo intensivo

Según se muestra en la tabla XXVIII existen diferencias estadísticamente significativas en varias enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario de las tencas alimentadas con dos dietas diferentes en cuando a su contenido en proteína y grasas.

En primer lugar, las enzimas transaminasas presentaron el valor más bajo en el grupo de peces con una dieta más pobre (B) frente a los peces del stock inicial IN y los peces alimentados con dieta para carnívoros (A). Para el caso concreto de la GPT no se

marcaron diferencias significativas entre los peces de los grupos A y B, aunque la tendencia fue similar a la presentada por la otra enzima transaminasa analizada GOT.

Para las enzimas HOAD y FBPasa los valores significativamente más altos se encontraron en el grupo de stock inicial, mientras que no presentaron diferencias en los grupos tratados con distintas dietas (A y B).

La enzima G6PDH presentó el valor más alto en los peces con dieta de herbívoros (B), un valor intermedio para los peces alimentados con dieta de carnívoros (A) y finalmente el valor más bajo se observó en los peces del stock inicial.

Las enzimas LDH, PK y HK mostraron los valores más bajos en los peces alimentados con pienso para carnívoros (A). Para la LDH el valor más elevado correspondió al grupo inicial (IN) y se observó un valor intermedio sin llegar a marcar diferencias estadísticamente significativas con los otros dos grupos (IN y B). La enzima HK mostró el valor más bajo para los peces del grupo A y valores intermedios con diferencias significativas para el grupo B.

Tabla XXVIII. Influencia de la alimentación en el metabolismo intermediario del hígado de tenca (*Tinca tinca*).

	IN	A	B	P
GOT (mU/mg proteína)	505.85±21.33 ^b	513.06±24.14 ^b	422.31±9.85 ^a	0.006
GPT (mU/mg proteína)	272.30±4.15 ^b	202.41±28.33 ^{ab}	142.10±19.30 ^a	0.005
CS (mU/mg proteína)	26.35±1.08	26.30±2.15	27.79±1.20	ns
HOAD (mU/mg proteína)	20.22±2.23 ^b	10.00±1.06 ^a	10.32±1.29 ^a	0.003
G6PDH (mU/mg proteína)	30.69±1.34 ^a	70.07±5.39 ^b	113.70±6.18 ^c	<0.001
FBPasa (mU/mg proteína)	15.87±0.76 ^b	11.73±0.77 ^a	11.83±0.81 ^a	0.035
LDH (U/mg proteína)	5.68±0.07 ^b	3.11±0.77 ^a	4.46±0.18 ^{ab}	0.035
PK (mU/mg proteína)	277.07±9.45 ^b	161.16±21.99 ^a	312.14±17.61 ^b	<0.001
HK (mU/mg protein)	38.81±3.46 ^c	14.81±1.95 ^a	25.43±3.48 ^b	0.001

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P \leq 0.05$). ns: no significativo. GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), GPT (Glutamato piruvato transaminasa), CS (Citrato sintasa), HOAD (β -Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), G6PDH (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa), FBPasa (Fructosa-1,6-bisfosfatasa), LDH (Lactato-deshidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), HK (Hexokinasa), IN (Peces iniciales), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.2.7. Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el estado oxidativo de la tenca en cultivo intensivo

En la tabla XXIX, se muestran diferencias estadísticamente significativas en casi todas las variables relacionadas con el mantenimiento del estado oxidativo de los peces, exceptuando la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa.

Con respecto a la GPX no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos A y B pero sí de éstos con respecto al grupo Inicial (IN), que mostró el valor más alto.

En el caso de la GST ocurrió de manera similar aunque en este caso el grupo A mostró un valor intermedio sin diferencias significativas respecto de los otros dos grupos IN y B.

Tabla XXIX. Influencia de la alimentación en el estado oxidativo del hígado de la tenca (*Tinca tinca*).

	IN	A	B	P
SOD (U/mg proteína)	111.62±7.37	121.80±5.89	101.33±5.66	ns
Catalasa (U/mg proteína)	88.01±6.94	93.43±8.39	83.43±5.75	ns
GPX (mU/mg proteína)	38.89±0.51 ^b	28.68±1.72 ^a	31.56±1.36 ^a	0.007
GR (mU/mg proteína)	7.58±0.24 ^a	10.74±0.68 ^b	12.97±0.32 ^c	0.0001
GST (mU/mg proteína)	297.98±6.50 ^b	235.61±18.17 ^{ab}	189.39±22.31 ^a	0.025
DTD (mU/mg proteína)	2.04±0.12 ^a	1.75±0.16 ^a	2.68±0.14 ^b	0.0001
G6PDH (mU/mg proteína)	30.69±1.34 ^a	70.07±5.39 ^b	113.70±6.18 ^c	0.0001
FRAP (mg/mL)	391.93±11.16 ^b	329.06±11.27 ^a	447.33±13.06 ^c	0.0001
TEAC (mg/mL)	440.44±23.09 ^{ab}	395.66±16.43 ^a	474.46±5.58 ^b	0.002
MDA (mg/mL)	5.04±0.51 ^a	7.51±0.88 ^b	4.08±0.19 ^a	0.002

Los valores indican media ± SEM (n = 12). Diferentes letras denotan una diferencia significativa ($P < 0.05$). ns (no significativo). SOD (Superóxido dismutasa), GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), G6PDH (Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), FRAP (capacidad antioxidante total del plasma), TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al trolox), MDA (Malondialdehído), IN (Peces iniciales), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Las enzimas GR, DTD, G6PDH, FRAP y TEAC mostraron los valores más elevados en los peces del grupo B, mientras que el MDA mostró el nivel más bajo en este mismo grupo aunque sin diferencias significativas frente al grupo inicial (IN).

Por otro lado, la GR alcanzó el valor más alto en el grupo B y el más bajo en el lote de peces iniciales (IN), mostrando el grupo A un valor intermedio pero significativamente distinto con respecto a los otros dos. Esta misma dinámica se observó para la enzima G6PDH.

El grupo B también mostró el valor más elevado en las variables DTD, FRAP y TEAC. Con respecto a la DTD, los grupos IN y A no mostraban diferencias significativas. En el caso de la variable FRAP sí se obtuvieron diferencias significativas mostrando el valor más bajo el grupo A y un valor intermedio pero también con diferencias significativas, el grupo de peces iniciales IN.

Finalmente la variable MDA mostró diferencias significativas para los IN y B respecto al grupo A, que fue el de mayor valor en MDA.

6.2.8. Efecto de la dieta sobre parámetros inmunológicos de la tenca en cultivo intensivo

La tabla XXX muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y de éstos respecto del grupo inicial de peces, en algunos parámetros inmunológicos.

Para las globulinas encontramos valores más altos en el grupo A frente a los peces del grupo IN y al grupo B que no mostraron diferencias entre sí.

En el caso de la actividad lisozima, los valores más elevados se encuentran en los grupos A y B y el valor más bajo corresponde al grupo de peces iniciales (IN). Esta misma dinámica la encontramos en el porcentaje de linfocitos. En el caso contrario estarían el porcentaje total de granulocitos, el porcentaje de granulocitos eosinófilos y el de monocitos, que mostraron el valor más elevado en el grupo IN.

El valor de hematocrito fue diferente significativamente entre los grupos A y B, no mostrando diferencias significativas ninguno de ellos con los peces al inicio del experimento.

Tabla XXX. Parámetros hematológicos e inmunológicos en tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con distintas dietas.

	IN	A	B	P
Globulinas totales (mg/mL)	34.74±4.74 ^a	53.47±1.58 ^b	42.10±2.58 ^a	0.0001
Inmunoglobulina total (mg/mL)	18.34±1.11	19.49±1.93	14.65±2.07	ns
Actividad respiratoria (D.O.)	-	0.13±0.01	0.13±0.03	ns
Actividad peroxidasa (D.O.)	1.32±0.26	1.71±0.21	1.44±0.09	ns
Actividad lisozima (µg/mL of equiv. HEWL)	1.36±0.16 ^a	1.99±0.18 ^b	1.96±0.11 ^b	0.036
Hematocrito (%)	31.46±1.26 ^{ab}	29.58±0.59 ^a	33.78±0.65 ^b	0.001
Hemoglobina (mg/dL)	-	27.50±1.32	32.20±3.95	ns
Linfocitos (%)	67.39±3.24 ^a	77.04±2.15 ^b	76.07±1.94 ^b	0.05
Granulocitos (%)	15.17±2.16 ^b	8.96±1.42 ^a	7.55±1.02 ^a	0.011
Granulocitos eosinófilos (%)	11.04±2.21 ^b	4.46±0.67 ^a	4.01±0.49 ^a	0.0001
Granulocitos basófilos (%)	4.12±0.35	4.50±0.86	3.25±0.62	ns
Monocitos (%)	7.29±1.42 ^b	2.70±0.45 ^a	3.91±0.69 ^a	0.005
Linfocitos / granulocitos	5.05±0.91	11.72±2.14	13.70±2.89	ns

Los datos muestran medias ± SEM, n = 12. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativa). HEWL (Hen Egg White Lysozyme). IN (Peces iniciales), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.2.9. Test de tolerancia a la glucosa en la tenca

Se realizó el test de tolerancia a la glucosa mediante inyección intraperitoneal en tenca y en trucha común, como especie control de referencia. Se puede apreciar en la figuras 43a que a lo largo del ensayo no se producen diferencias significativas en ambas especies con una dosis de 200 mg / kg de pez, y comparando cada especie con sus respectivos controles tratados con suero fisiológico (NaCl al 0,9 %).

Se obtuvo un incremento respecto a los valores iniciales, a las 2 horas de la inyección en ambas especies, tanto en los grupos tratados con glucosa como en los controles tratados con suero fisiológico.

En la figura 43b se muestran el TTG de los peces tratados con glucosa 1.000mg / kg de pez. La tenca experimentó un aumento estadísticamente significativo frente a los controles, con valor máximo a las 2 horas ($298,9 \pm 16,49$ mg / mL y $170,33 \pm 17,20$ mg / mL, respectivamente), recuperando los valores iniciales a las 4 h tras la inyección.

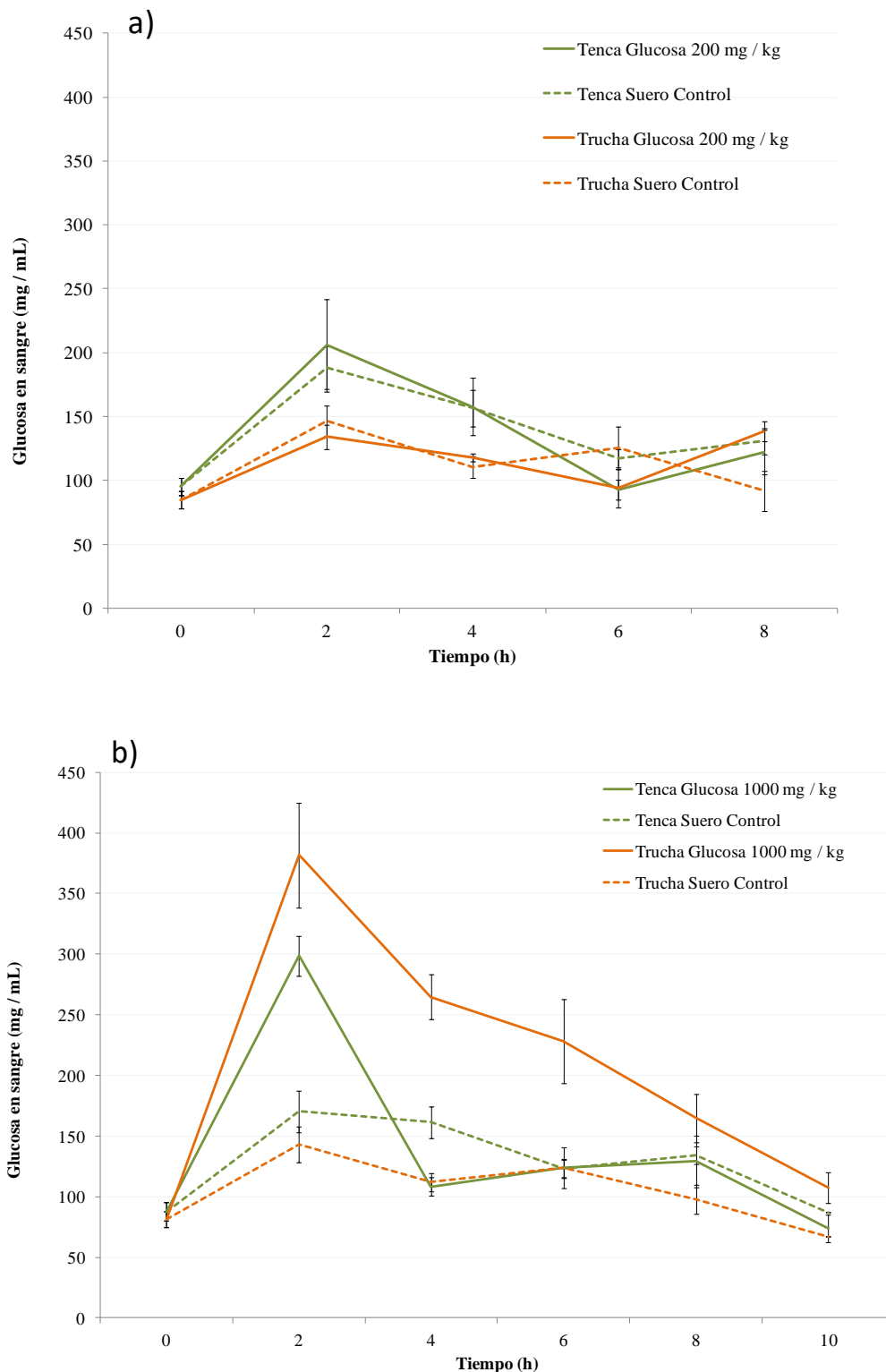


Figura 43. Test de tolerancia a la glucosa en tenca (*Tinca tinca*) y trucha común (*Salmo trutta*), con dosis de 200 mg/kg (a) y 1.000 mg/kg (b). Los valores indican media \pm SEM, n=6.

Por el contrario, en la trucha común se observó un aumento significativo respecto a los controles a las dos horas ($381,6 \pm 42,92$ mg / mL y $142,83 \pm 14,89$ mg / mL,

respectivamente) y se mantuvo un mayor nivel hiperglucémico hasta pasadas 10 h tras la inyección, cuando los valores de glucosa en sangre de las truchas tratadas volvieron a ser similares a los de los controles.

6.2.10. Análisis histológico en tencas alimentadas con dos dietas distintas

6.2.10.1. Análisis histológico en el intestino

El estudio histológico del intestino de la tenca puso de manifiesto en los animales alimentados con piensos pobres en proteína y lípidos y presentaron diferencias respecto a la longitud y grosor de las vellosidades en el intestino medial, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos dietas en el proximal (Tabla XXXI). Estas diferencias se ponen de manifiesto principalmente al comparar el intestino medio, mostrando el grupo A una menor luz intestinal debido a un alargamiento de sus vellosidades (Fig. 44).

Tabla XXXI. Influencia de dieta en la morfología del intestino proximal y medial de la tenca (*Tinca tinca*).

	A	B	P
<u>Intestino proximal</u>			
Longitud vellosidades (%)	44.19±2.21	44.60±1.07	ns
Grosor vellosidades (%)	10.54±0.41	10.21±0.44	ns
Espesor capa muscular (%)	19.02±1.45	18.62±0.47	ns
<u>Intestino medial</u>			
Longitud vellosidades (%)	77.50±2.83 ^b	46.76±1.43 ^a	<0.001
Grosor vellosidades (%)	14.71±0.98 ^b	9.65±0.57 ^a	<0.001
Espesor capa muscular (%)	18.75±0.88	18.82±1.41	ns

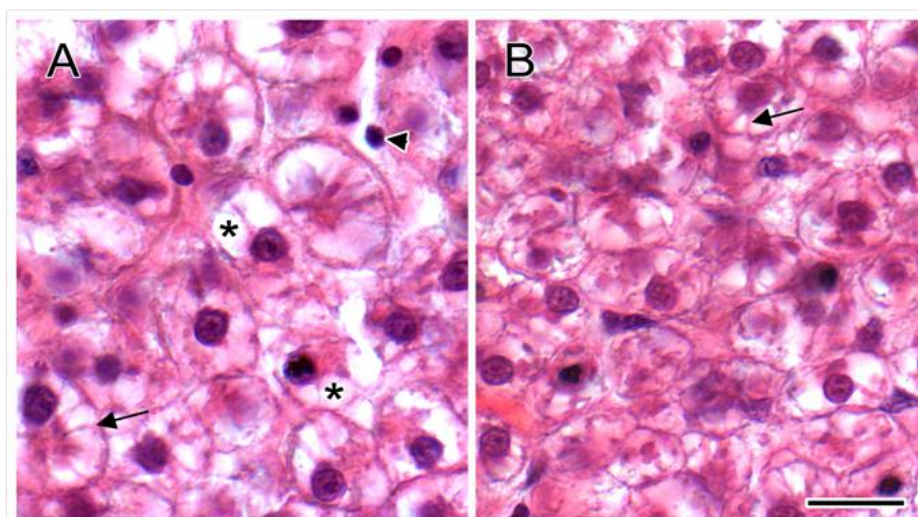
Los valores indican media ± SEM n = 10 del porcentaje con respecto al radio de la sección transversal analizada. Diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$), ns (no significativo). A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).



Figura 44. Influencia de los piensos en la morfología del intestino medial de la tenca (*Tinca tinca*). Secciones transversales del intestino medial mostraron que los peces alimentados con pienso de dorada (Grupo A) mostraron claramente una mayor longitud de las vellosidades y menor la luz intestinal que los alimentados con pienso de tilapia (Grupo B). Tinción de Hematoxilina-Eosina. Barra de escala = 400 μ m.

6.2.10.2. Análisis histológico en el hígado

Cuando se analizó el tejido hepático, se observó un mayor volumen citoplasmático de los hepatocitos y con zonas menos teñidas, posiblemente asociadas a reservas energéticas, en los peces del grupo A (Fig. 45). En ambos casos, se observaron zonas de tinción acidófila con disposición radial en el hepatocito, que podría estar asociada a depósitos de glucógeno.



Figuras 45. Sección histológica del parénquima hepático de tencas alimentada con pienso de dorada (A) y pienso de tilapia (B). Los asteriscos señalan depósitos de lípidos neutros. Las flechas indican una probable disposición radial de glucógeno. La punta de flecha marca una posible célula inmunitaria. Tinción de Hematoxilina-Eosina. Barra = 10 μ m.

6.3. DISCUSIÓN

Se podría decir que los costes principales de la producción acuícola se deben a la alimentación, pudiendo alcanzar hasta el 70% de los gastos generales (Thompson *et al.*, 2008). Las harinas y aceites de pescado empleadas principalmente para la composición de los piensos comerciales resulta cada vez más costoso tanto económicamente como desde el punto de vista medioambiental. La continua dependencia de la harina de pescado como principal fuente de proteínas para los piensos de peces no parece sostenible (Williams, 2009), ya que los recursos de harina y aceite de pescado son limitados y sus precios cada vez más elevados (Hardy 2008). Por esto el uso de productos alternativos como proteínas y aceites vegetales es cada vez más común.

En la tenca se han realizado en las últimas décadas diversos estudios en este sentido con resultados muy variados y en general poco satisfactorios. Algunos autores encontraron crecimientos muy reducidos (Quiros & Alvarino, 1998; Wolnicki & Myszkowski, 1998; Quiros *et al.*, 2003; Mareš *et al.*, 2007), altas tasas de mortalidad (Quiros & Alvarino, 1998; Quiros *et al.*, 2003; Rennert *et al.*, 2003; Celada *et al.*, 2009) y aumento de los casos de deformaciones corporales (Rennert *et al.*, 2003; Kamler *et al.*, 2006; Wolnicki *et al.*, 2006; Myszkowski *et al.*, 2010; Kaminski *et al.*, 2017).

Evidentemente el estudio presentado en este capítulo no supone un ensayo de nutrición clásico donde se evalúan los piensos experimentales formulados con un fin concreto. Dado que no existen comercialmente fórmulas ajustadas para la tenca, la finalidad de este ensayo es estudiar las repercusiones de dos piensos con distinta formulación sobre diferentes parámetros fisiológicos relacionados con el bienestar de la tenca en cultivo intensivo. Estos piensos están diseñados, el primero de ellos específicamente para alimentar a doradas, es decir, una especie considerada como carnívora (pienso D) y el segundo para alimentar a tilapias, especie descrita como herbívora (pienso T).

El análisis de la composición proximal realizado para comprobar los datos de los piensos comerciales utilizados (Inicio Plus 868 para dorada y 50 % de Efico Alpha 845 + 50% de Efico Alpha 830 para tilapia) confirmó un mayor porcentaje de proteína en el pienso D (47%) que en el T (40%), un mayor porcentaje de lípidos también en el pienso D (21%) frente al T (6%) y en consecuencia, el MELN en T fue superior (40% en T frente a 18% en D).

Con respecto a la composición en aminoácidos, el aminograma reflejó la ausencia de metionina y de cisteína en ambos piensos y una mayor cantidad de los aminoácidos esenciales treonina, lisina y fenilalanina en el pienso D. Precisamente las primeras deficiencias aminoacídicas en los peces se descubrieron para la metionina, esencial para el óptimo crecimiento de las especies acuícolas, y que la presencia de cisteína reduce la necesidad de metionina dietaria para un óptimo crecimiento (Dabrowski et al., 2007) . Es destacable que en estas fórmulas no aparezcan ninguno de los dos aminoácidos, posiblemente debido a una limitación del método de medida. Además no aparece triptófano, cuyo déficit se asocia a la aparición de deformidades como escoliosis y lordosis (Goodwin, 1983).

Ambas dietas presentan un alto contenido en energía (mayor en el pienso D) y en relación P/E (semejante en ambos piensos) lo que nos indicaría que estos piensos estarían diseñados para peces en fase juvenil. En la actualidad, los piensos disponibles en el mercado presentan un amplio intervalo de niveles de energía (15,6 – 22,7 MJ / kg), y de relaciones proteína/energía (16,6 – 22,6 g / MJ), para las diferentes especies incluso superiores, como en el rodaballo que puede ascender hasta 31 – 34 g / MJ .

6.3.1. Efectos de la dieta sobre el crecimiento e índices biométricos de la tenca en cultivo intensivo

En la figura 46 se puede observar como la dieta D ha promovido un mayor crecimiento en peso de los peces que podría estar relacionado con un mayor acúmulo lipídico observado como mayor índice de grasa perivisceral y en consecuencia un mayor índice de condición corporal (K). Por el contrario, este grupo de peces presentaría menor rendimiento de la carcasa.

En los trabajos realizados hasta la fecha que se han podido consultar relacionados con crecimiento de tencas juveniles, los datos de TCI (Tasa de crecimiento instantáneo) irían desde los 0,61 % / día (Quirós *et al.*, 2003) hasta los 2,55 % / día (Kelmer *et al.*, 2006), aunque en todos estos casos los peces eran mucho menores en tamaño y edad que los utilizados en este trabajo. Se asume que las tasas de crecimiento específicas de los peces, como en otros animales, disminuyen al aumentar el tamaño corporal, tanto en

el propio desarrollo ontogénico de los individuos como al comparar entre distintas especies (Winemiller *et al.*, 1992; Cury y Pauly, 2000).

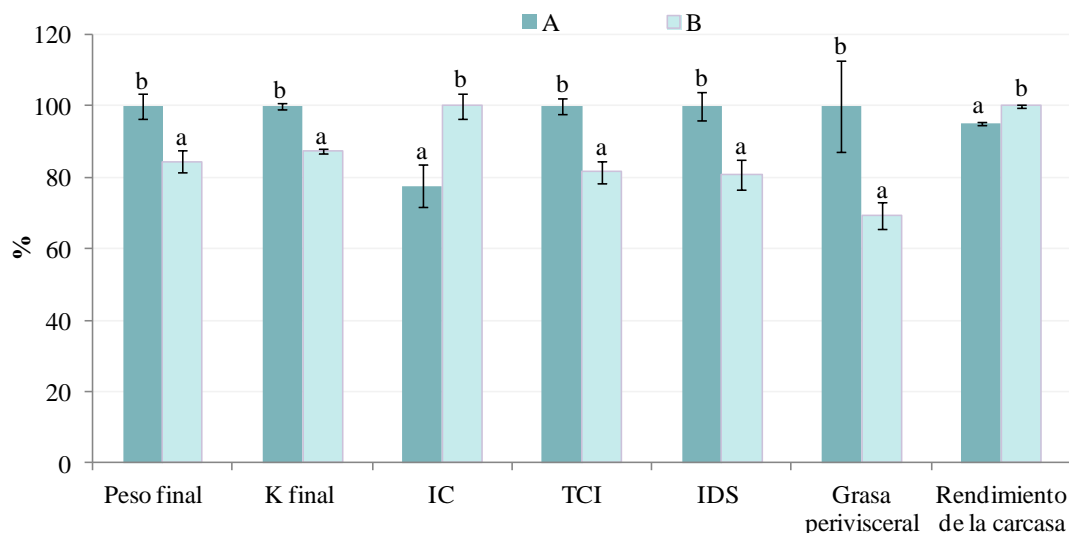


Figura 46. Datos biométricos y de crecimiento individual de tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$), siendo $n = 315$, para las variables peso final, índices de condición final (K) y Tasa de crecimiento instantáneo (TCI), $n = 3$ para IC (Índice de conversión del alimento), $n = 12$ para las variables IDS (Índice digestivosomático), grasa perivisceral y rendimiento de la carcasa. A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Para tencas de pesos y edades similares a los analizados en este estudio, los mayores valores de TCI han sido mostrados por Ribeiro (2016) en su tesis de Máster consiguiendo entre 1,02 y 1,08 %/día, pero en densidades finales de cultivo de 4,6 kg / m³. Pantazis (2012), partiendo de peces de 11 g y con una densidad inicial 2,5 kg / m³ consiguió un valor máximo de TCI de 0,3 %/día. En el presente estudio, los datos de los peces alimentados con la dieta de dorada han sido de 0,92 %/día, significativamente superiores a los mostrados en los peces del grupo B (alimentados con pienso de tilapia) de 0,75 %/día, lo que indica que los peces crecieron suficientemente bien.

En la valoración sobre los índices de conversión alimenticia, aunque en el presente estudio han sido mejores con diferencias significativas en el grupo experimental A frente al B, ambos resultados se pueden considerar aceptables, con valores en torno a 2,5 kg de pienso por cada kg de pescado producido. Datos aún mejores han sido mostrados por otros autores, pero de nuevo habría que considerar el

menor tamaño de los peces empleados (< 1 g) y la densidad máxima alcanzada de $2,5$ kg / m³ (González-Rodríguez *et al.*, 2014) y de $4,6$ kg / m³ (Ribeiro, 2016), frente a los $8,09$ kg / m³ obtenidos en los peces del grupo A y los $6,46$ kg / m³ del grupo B en el presente estudio. Además en el caso de Gonzalez-Rodríguez las dietas empleadas se formularon principalmente con harina y aceite de pescado.

Desde el punto de vista del piscicultor, alimentar a la tenca con la dieta de dorada sería aparentemente más rentable que hacerlo con la dieta de tilapia ya que parecen obtenerse más kg totales de pescado pero puede no ser así. Es bien conocido que los macronutrientes que más encarecen las dietas son las proteína, seguido de los lípidos y por último los carbohidratos. Además, para la mayoría de especies cultivadas, las fuentes proteicas y lipídicas principales suelen ser la harina y el aceite de pescado, que además de suponer un elevado coste económico también suponen un coste ecológico a tener en cuenta (Tacon, 1998; Williams, 2009).

Por tanto, el empleo de una dieta diseñada para herbívoros, con menos costes de producción tanto económicos como ecológicos podría compensar las diferencias en crecimiento de los peces. Pero, ¿y desde la consideración del grado de salud/bienestar del pez?. El análisis de los parámetros e índices fisiológicos e histológicos realizado puede arrojar luz sobre este aspecto.

6.3.2. Evaluación de la composición corporal y de la utilización de la energía y los nutrientes de la dieta en la tenca

La figura 47 muestra que no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B respecto al uso de la proteína que contenían los piensos respectivos, tal como reflejan los valores de coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) y el valor productivo de la proteína (VPP). Esto sugiere que la proteína en ambas dietas se ha utilizado con fines de crecimiento de forma similar. Los valores obtenidos durante el presente trabajo están en línea con los mostrados por otros autores en ensayos con distintas dietas para la tenca. Así, Cileček *et al.* (2011) obtuvieron valores entre $1,12$ y $1,28$ de CEC empleando dietas con un 57% de proteína y un 15% de grasas en peces de menos de $0,1$ g y con una densidad inicial de $1,15$ kg / m³. Datos similares obtuvieron Mareš *et al.* (2007) con peces iniciales de $1,19$ g iniciales a una densidad inicial de 4 kg / m³ y llegando a doblar esta densidad en 120 días de ensayo. En este

trabajo se consiguió triplicar el peso de los peces en 100 días, pasando de 6 g a 20 g en el grupo A y llegando a 17,5 g en el grupo B.

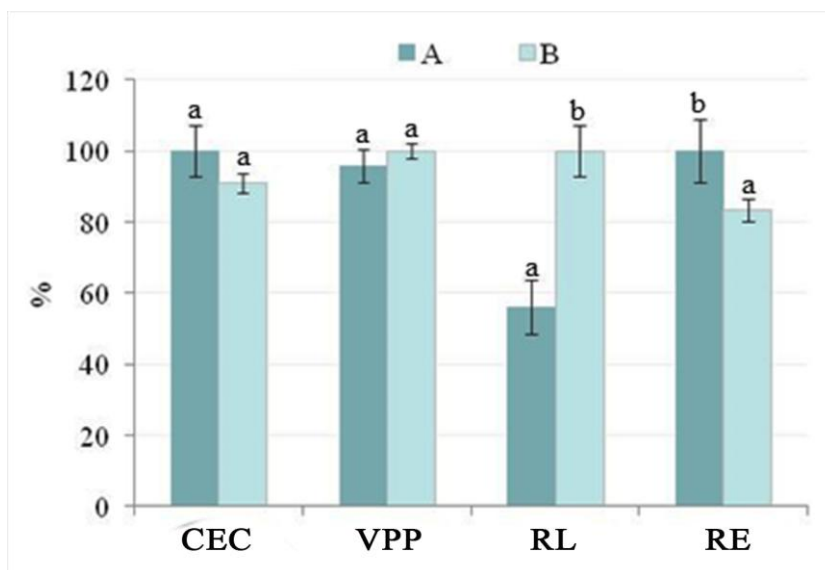


Figura 47. Utilización por la tenca (*Tinca tinca*) de los macronutrientes y la energía de dos dietas comerciales. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). CEC (Coeficiente de eficacia en crecimiento), VPP (Valor productivo de la proteína), RL (Retención de lípidos), RE (Retención de energía), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Los lípidos de la dieta (principalmente triglicéridos) son importantes, no solo como un proveedor de ácidos grasos esenciales (AGE) sino también como una fuente importante de energía y moléculas de señalización. Por lo tanto, los lípidos limitados en la dieta pueden suponer estrés nutricional para los organismos (He *et al.*, 2015).

Por lo que respecta a la capacidad de retención de lípidos (RL), en los animales alimentados con los piensos propuestos se han podido constatar diferencias estadísticamente significativas. Así, los animales alimentados con el pienso de tilapia han mostrado una mayor retención lipídica, lo que era de esperar debido al bajo porcentaje de estos nutrientes que presentaba el pienso de tilapia. Cabe pensar que los carbohidratos ingeridos por este grupo de peces han sido dirigidos a síntesis lipídica como se confirmó en el análisis de actividades enzimáticas.

Finalmente, la proporción de energía retenida ha sido significativamente mayor en los animales alimentados con el pienso de dorada. Es posible que se deba al alto

porcentaje de lípidos (21%) y el alto contenido energético (22 MJ / Kg) que han podido ser excesivos para las necesidades energéticas de estos peces.

6.3.3. Efectos de la dieta sobre el perfil de aminoácidos de la tenca en cultivo intensivo

Las distintas especies de peces presentan diferentes necesidades de proteínas y, además requieren una mezcla bien equilibrada de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) (Wilson, 2002). Una dieta que proporcione los AAE requeridos maximiza el crecimiento y la utilización de alimento (Zhang *et al.*, 2008). En base a ciertos experimentos de dosis-respuesta se han determinado las necesidades de AAs de varias especies de peces (Ahmed, 2012; Khan, 2012; NRC, 2011). Otro método empleado usualmente para estimar los AAE de varias especies de peces es la medición de la composición de AAE del individuo completo (Meyer y Fracalossi, 2005; Bicudo y Cyrino, 2009; Hossain *et al.*, 2011).

Numerosos autores han encontrado una fuerte correlación estadística entre la composición de aminoácidos del individuo y las necesidades de AAE en varias especies de peces (Buchtová *et al.*, 2007; Abimorad y Castellani, 2011; Wilson, 2002; Wilson y Poe, 1985). Tesser *et al.* (2014) comparan la composición del pez pámpano (*Trachinotus marginatus*) con los valores encontrados en otras especies de peces lenguado amarillo (*Pleuronectes ferruginea*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y no se encontraron diferencias importantes. De hecho Mambrini y Kaushik (1995) sugirieron que la composición de aminoácidos de todo el cuerpo no debería ser significativamente diferente para la mayoría de los teleósteos.

Con respecto a la composición aminoacídicas de los piensos, se pone de manifiesto que la dieta D contiene mayor cantidad de AAE treonina, valina, lisina y fenilalanina que la dieta T, lo que indicaría la alta calidad nutricional del pienso de dorada. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la composición de aminoácidos entre los peces alimentados con los dos tipos de dietas (Fig. 48), lo que indicaría que las diferencias en AAs entre las dietas no han

tenido repercusión en la composición corporal ni en la utilización nutritiva de la proteína (Figs. 47 y 48).

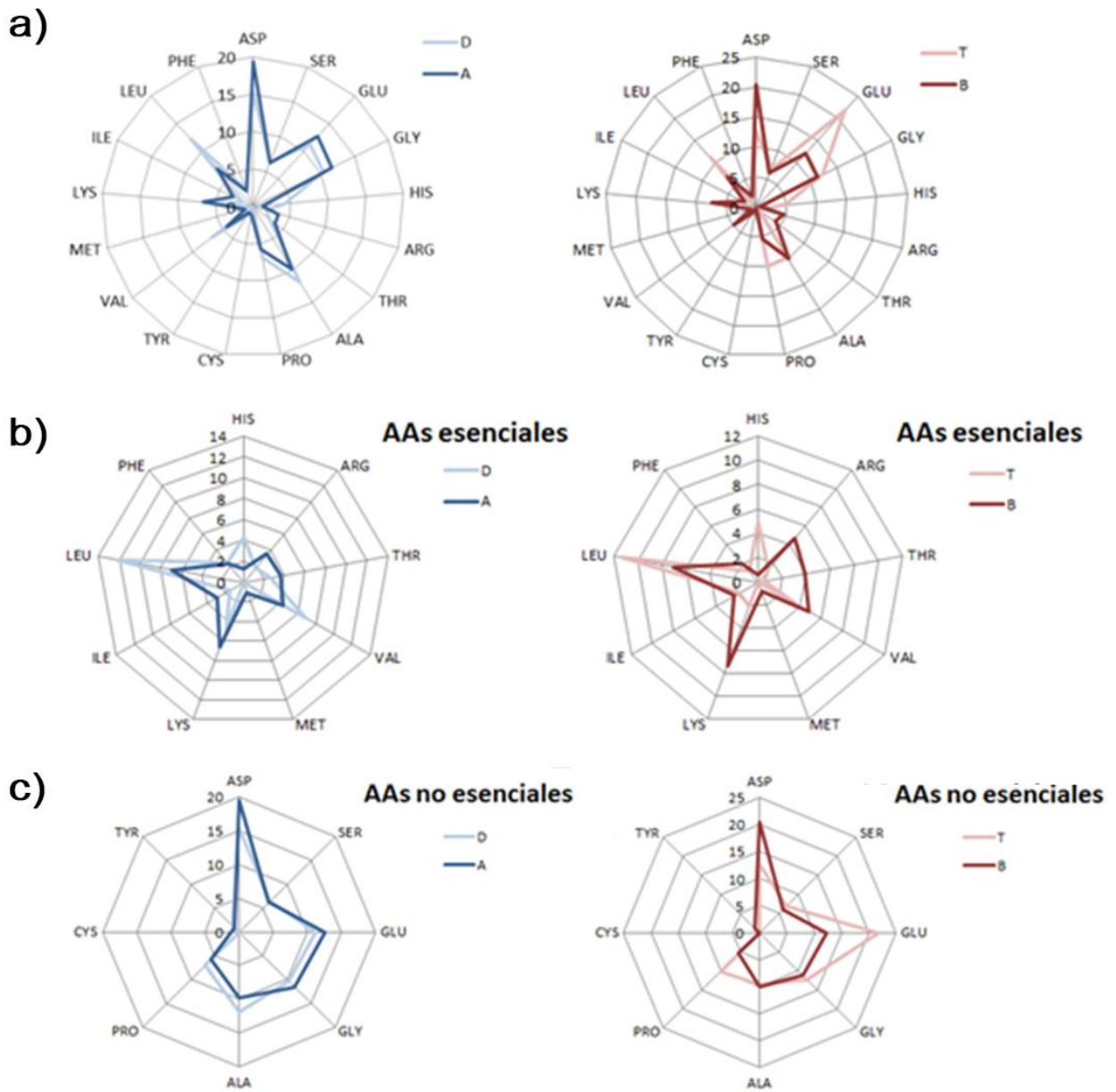


Figura 48. Concentración (%) de aminoácidos totales a), esenciales b) y no esenciales c) para los dos grupos experimentales A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia), con sus correspondientes dietas D y T.

Sí se encontraron diferencias entre los animales del grupo inicial con respecto a los dos grupos experimentales A y B. Estas diferencias se podrían deber al régimen de alimentación natural y al periodo de letargo invernal que tenían los peces justo antes del comienzo del estudio.

El porcentaje de metionina, que no apareció en ninguna de las dietas, fue superior en los dos grupos experimentales frente al grupo inicial, lo que sugiere su presencia en las dietas aunque no llegara a ser detectada. Esto resulta llamativo ya que AAE azufrados como la metionina y la cisteína tienen funciones sinérgicas manifiestas.

Salvando estas excepciones, se podría decir que el perfil aminoacídico de las dietas se ajusta a la composición del animal, hecho que confirmaría los estudios anteriormente comentados acerca de la constancia de la composición en aminoácidos de los teleósteos.

6.3.4. Efectos de la dieta sobre el perfil lipídico de la tenca en cultivo intensivo

Es bien conocida la gran influencia de los lípidos de la dieta sobre el metabolismo, crecimiento y bienestar de los animales. Los peces de agua dulce son capaces de producir algunos ácidos grasos poli-insaturados (AGP), como EPA y DHA a partir de otros AGP de cadena más corta como el linolénico. Las especies marinas no tienen esta capacidad, o lo hacen de forma muy lenta, siendo entonces indispensables los AGP n-3 en su alimentación.

Los AG n-6, especialmente el ácido araquidónico, resultan necesarios aunque en pequeñas cantidades, tanto para las especies marinas como dulceacuícolas. Existen pocos estudios sobre las necesidades cuantitativas y cualitativas de lípidos para la alimentación de la tenca (Turchini *et al.*, 2007; Zake's *et al.*, 2010).

La tenca silvestre se considera un pez semigraso (Blasco *et al.*, 1999), pero en condiciones de cultivo puede llegar a presentar características propias de peces grasos. Esto se ha podido comprobar en el análisis de la composición corporal de los peces del grupo experimental A, con porcentaje de grasa de 10,07 (Tabla XXIII). Este aumento en el contenido lipídico en los peces cultivados con respecto a los salvajes, ha sido referido por otros investigadores en otras especies (Sérot *et al.*, 1998). Este hecho viene

acompañado generalmente por una disminución en el contenido de agua y de cenizas, que también puede ser constatado en la tabla XXIII.

En nuestro estudio sobre el perfil de AG de la tenca se han identificado un total de 10 AGS, entre los cuales, el más abundante ha sido el ácido palmítico, tanto en las dietas como en los peces analizados. Los datos obtenidos muestran valores muy semejantes con respecto al ácido palmítico en ambos piensos. En los animales del grupo inicial (IN), los valores fueron mayores que en el grupo B, siendo el grupo A el que presentó el menor valor. Estos resultados son extrapolables al conjunto de los AGS. El ácido palmítico es reconocido como una importante fuente de energía metabólica durante el crecimiento y estados reproductivos (Huynh *et al.*, 2007) y varios estudios confirman nuestros resultados (Njinkoué *et al.*, 2002; Özogul *et al.*, 2009; Castro-González *et al.*, 2013).

El conjunto de los 7 AGM encontrados, no presentaron diferencias ni entre dietas ni entre grupos de animales. Dentro de los AGM, el ácido oleico destacó por presentar un alto valor en los piensos y en los animales. Numerosos autores concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio en cuanto a que es el ácido oleico el más abundante en los peces, seguido por el palmitoleico (Saito *et al.*, 1999; Özogul *et al.*, 2009; Castro-González *et al.*, 2013).

Los resultados encontrados en el perfil de AGS (palmítico fundamentalmente) y AGM (oleico) en tenca, son semejantes a los expuestos por otros autores en especies de aguas dulces y templadas (Njinkoué *et al.*, 2002; Vasconi *et al.*, 2015).

Se identificaron 9 AGPI entre los que destacó el ácido linoleico, tanto en las dietas como en los animales de los grupos experimentales A y B.

Las cantidades de AG encontradas en la tenca antes del periodo experimental sería $AGM=AGS>AGP$ y en los animales alimentados con ambas dietas $AGM>AGS>AGP$ similar a otras especies dulceacuícolas (Usydus *et al.*, 2012; Castro-Gonzalez *et al.*, 2013). Los peces marinos suelen tener el orden invertido en cuanto a las proporciones de los tres grupos de AG ($AGP>AGM=AGS$) (García-Mesa *et al.*, 2014).

No obstante, otros autores identificaron en un total de 89 especies marinas las siguientes proporciones: $AGS>AGM>AGP$ (24 especies), $AGS>AGP>AGM$ (20 especies), $AGP>AGS>AGM$ (24 especies), $AGP>AGM>AGS$ (6 especies), $AGM>AGS>AGP$ (13 especies) y $AGM>AGP>AGS$ (2 especies) (Castro-Gonzalez *et al.*, 2013).

Almeida y Bueno (2007) en un pez omnívoro de agua dulce (*Brycon cephalus*) encuentra contenidos en ácidos grasos parecidos a los de la tenca en este estudio. La relación n-3/n-6 también es parecida, aunque el contenido en estos AG y en AGP en general, es menor y por el contrario, mayor el total de AGS con respecto a lo encontrado en la tenca en este estudio. Las especies marinas se caracterizan por bajos niveles de linoleico y linolénico y altas concentraciones de EPA y DHA, por ello, el valor de la relación n3/n6 en peces marinos es más alta que en peces dulceacuícolas (Sargent et al., 1995; Piccolo *et al.*, 2008; Grigorakis *et al.*, 2011). García-Mesa *et al.* (2014) en la corvina encontraron relaciones de hasta 4 frente a 0,5-0,3 en este estudio para tenca. Además dentro de una misma especie de pez existe una gran variación en la composición lipídica, ya que esta depende de diversos factores bióticos y abióticos (Almeida y Bueno-Franco, 2007; Tang *et al.*, 2009; Ghaddar y Saoud, 2012). Así García-Mesa *et al.* (2014) encontraron una variación en la relación n-3/n-6 a lo largo del periodo experimental en la corvina de 4 a 0,8 debido a variaciones en la temperatura, tipo de dieta, salinidad, etc.

Con respecto a la posible influencia del perfil lipídico de la dieta sobre la composición de las tencas utilizadas en este estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas para el ácido palmítico y linolenico, y en conjunto para AGS que presentan unos valores mayores en los peces alimentados con la dieta de tilapia. Por el contrario el EPA y DHA, AGI y relación n-3/n6 presentan unos valores mayores en las tencas alimentadas con la dieta para dorada. Estos resultados concuerdan solo en parte con el perfil lipídico de las dietas. La dieta de tilapia no presenta mayores valores de los AGS que están presentes en el animal. Solo hay una correspondencia entre el perfil lipídico de dietas y composición del pez en los AG: DHA, n3, n6, y relación n3/n6. Además si comparamos el total de AGP y en particular n-3 y n-6 de los animales al inicio del experimento con respecto al final, no cabe duda de que la alimentación promueve ese acúmulo de ácidos grasos esenciales.

Por lo general el perfil de ácidos grasos del pez está unido a su contenido en la dieta. Sin embargo cuando la dieta no cubre estrictamente las necesidades nutricionales de una especie determinada, algunos ácidos grasos pueden ser selectivamente depositados, retenidos o utilizados. Este hecho ha sido confirmado tanto en especies marinas como dulceacuícolas (Caballero *et al.*, 2002; Mourente *et al.*, 2005; Turchini *et al.*, 2007; Zake's *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican que la dieta para dorada

refleja su perfil lipídico en los peces de forma más ajustada que la dieta para tilapia (Fig. 49).

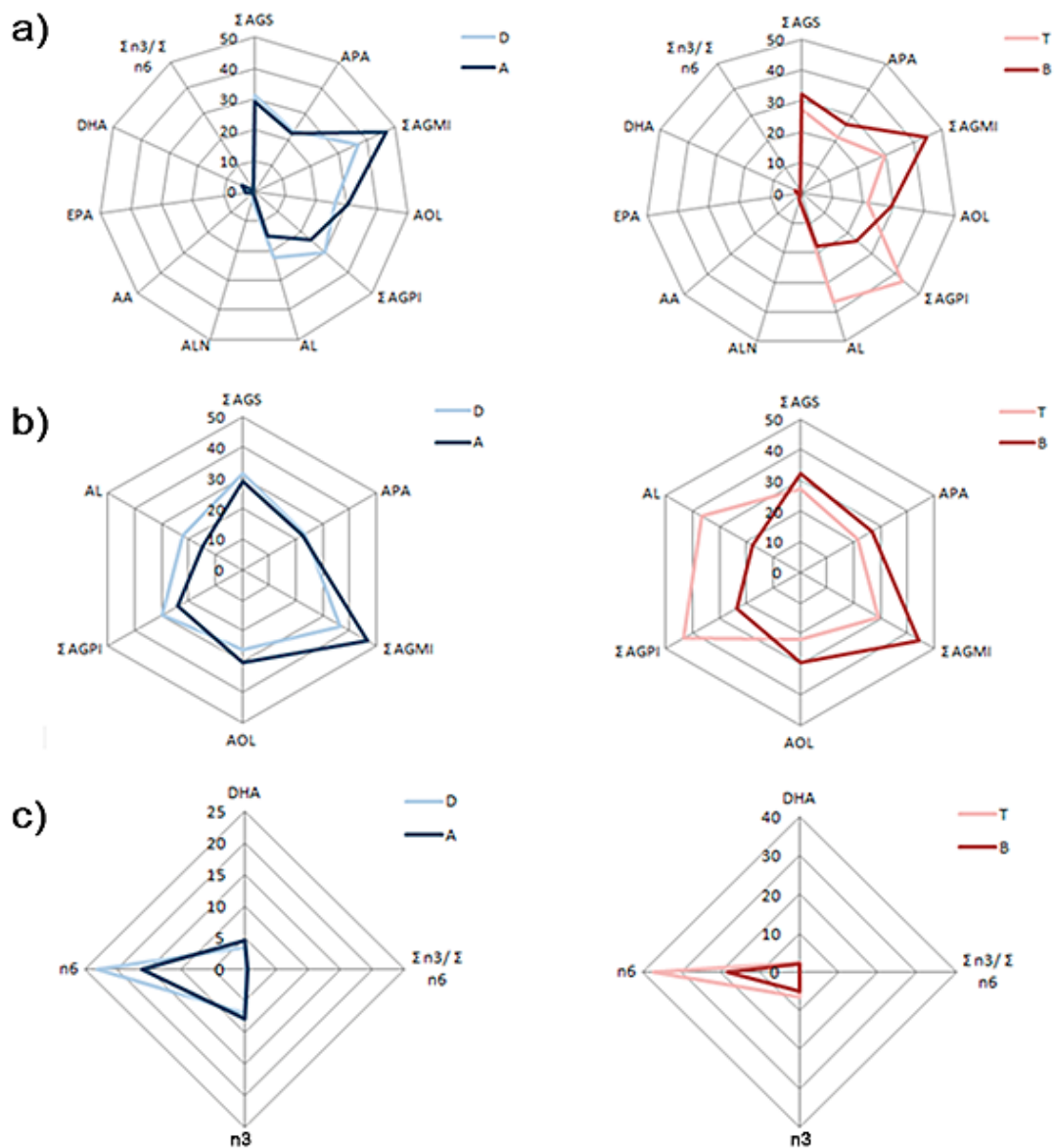


Figura 49. Concentración (%) de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados para los grupos experimentales, A (Peces alimentados con pienso de dorada) y B (Peces alimentados con pienso de tilapia), con sus correspondientes dietas D y T. AA (Ácido araquidónico), AL (Ácido linoleico), ALN (Ácido linolénico), APA (Ácido palmítico), AOL (Ácido oleico), EPA (Ácido eicosapentaenoico), DHA (Ácido docosahexaenoico).

Se podría concluir que la dieta D contiene suficientes lípidos como para su almacenamiento y uso de los excedentes con fines energéticos. Sin embargo, la cantidad reducida de lípidos de la dieta T hace más difícil esta circunstancia. De cualquier forma

en esta última dieta también podemos encontrar que los ácidos grasos esenciales de la dieta si se reflejan en el animal y en este caso cuando solo se representa la cantidad total de n3, n6, DHA y n3/n6 el ajuste entre AG en dieta y en animales es semejante para ambas ensayos (Figura 49). Como se ha comentado anteriormente los ácidos grasos esenciales se incorporan, aún ante una dieta baja en lípidos, ello unido a que la tenca al igual que otros peces de agua dulce podría presentar la capacidad de síntesis de AGP C20 y AGP C22 a partir de C18 (Henderson, 1996), se podrían obtener peces de agua dulce en general y tencas en particular con un perfil lipídico "a la carta" suministrando suficiente cantidad de AGP C18 y/o cantidades adecuadas de n-3 y n-6.

6.3.5. Efectos de la dieta sobre parámetros bioquímicos del plasma de la tenca en cultivo intensivo

La figura 50 muestra que los peces alimentados con una dieta más rica en lípidos y proteínas han promovido, como cabría esperar, una mayor acumulación en el plasma de algunos de los metabolitos analizados como colesterol, lipoproteínas y proteínas totales. Lu *et al.* (2013) encontraron similares resultados en carpa herbívora alimentada con piensos altos en grasas frente a otras carpas alimentadas con menores porcentajes.

Los niveles de cortisol (Fig. 51), aunque de manera no significativa, han sido superiores en los peces alimentados con dieta de tilapia, y esto ha podido ocasionar las diferencias en cuanto a los niveles de Na^+ , que han aumentado, y los niveles de K^+ que se han visto reducidos, hecho que concuerda con lo expresado por diversos autores en cuanto a la activación de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa por acción del cortisol (McCormick y Bern 1989; McCormick *et al.*, 1991; Fontáinhas-Fernandes *et al.*, 2003).

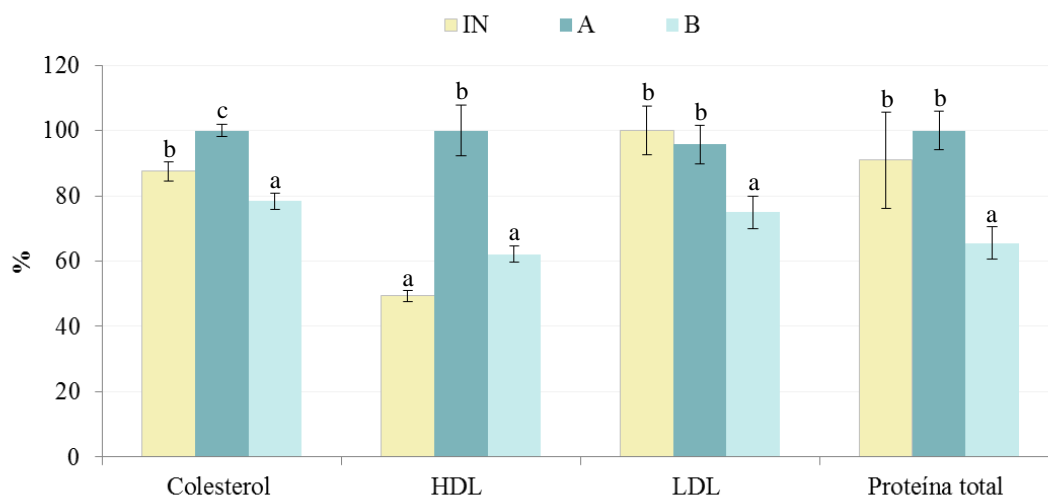


Figura 50. Parámetros bioquímicos en plasma de tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales distintos. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). IN (Lote inicial de peces), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

En cualquier caso, no podemos considerar que los peces alimentados con pienso de tilapia estén sometidos a una situación de estrés. Según observamos también en la figura 51 los niveles de hormonas tiroideas también son superiores en estos peces, aunque solo en el caso de la T3 de manera significativa.

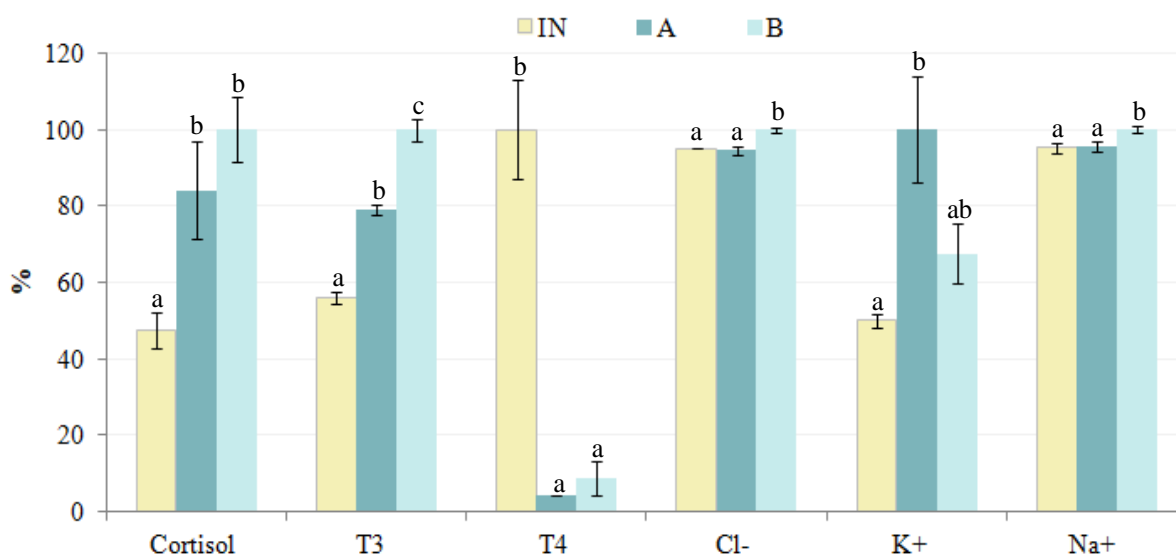


Figura 51. Hormonas e iones en plasma de tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales distintos. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, n = 12. Distintas letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$). IN (Lote inicial de peces), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Altos niveles de las hormonas tiroideas (sobre todo T3) parecen estar asociados a un estado que promovería el crecimiento somático o incluso la reproducción de los peces (Eales y MacLatchy, 1989). Según algunos autores, el cortisol elevado debería haber causado un descenso en los niveles de T3 (Arjona *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 1991; Coimbra y Reis-Henriques 2007; Pickering *et al.*, 1982; Redding *et al.*, 1984; Vijayan *et al.*, 1990) que en este caso no se encontró.

Con respecto a los peces del lote inicial no se puede hacer ninguna valoración comparativa ya que las condiciones de origen, con alimentación natural y pasado un periodo de letargo invernal, eran muy diferentes con respecto a las condiciones experimentales los otros dos grupos y en definitiva la evaluación que se pretendía en este estudio se enfocaba en el efecto las dos dietas.

6.3.6. Efectos de la dieta sobre parámetros relacionados con el metabolismo intermediario de la tenca en cultivo intensivo

La figura 52 muestra diferencias significativas en varias de las enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en las tencas alimentadas con dos piensos distintos. Los peces alimentados con la dieta más rica en proteínas y lípidos (Grupo A) presentaron mayor actividad de las enzimas transaminasas y menor actividad de las enzimas implicadas en las rutas glucolíticas. Estos mismos resultados fueron observados por Walton (1986) en trucha arcoíris alimentadas con piensos ricos en proteína y bajos en carbohidratos, frente a truchas alimentadas con piensos bajos en proteína y ricos en carbohidratos. Otros autores también encontraron respuestas similares, con aumento de las enzimas GTP y GOT en peces alimentados con dietas ricas en proteínas (Metón *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2006). También se encontraron activadas las enzimas transaminasas en carpas herbívoras alimentadas con piensos ricos en grasas frente a otras alimentadas con menos grasas (Lu *et al.*, 2013).

En el caso de los peces alimentados con la dieta de tilapia, con menos porcentajes de proteína y lípidos y más carbohidratos, se han encontrado actividades de las enzimas relacionadas con la vía glucolítica (G6PDH, HK, LDH, PK) incrementadas de forma significativa con respecto a los peces alimentados con la dieta rica en proteína y lípidos. Resultados similares han sido encontrados en el hígado de la tilapia del Nilo alimentada

con dieta baja en lípidos, donde la glucólisis se ha visto activada con el fin de proporcionar más sustrato Acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y mantener los niveles adecuados de estos metabolitos en el hígado (He *et al.*, 2015).

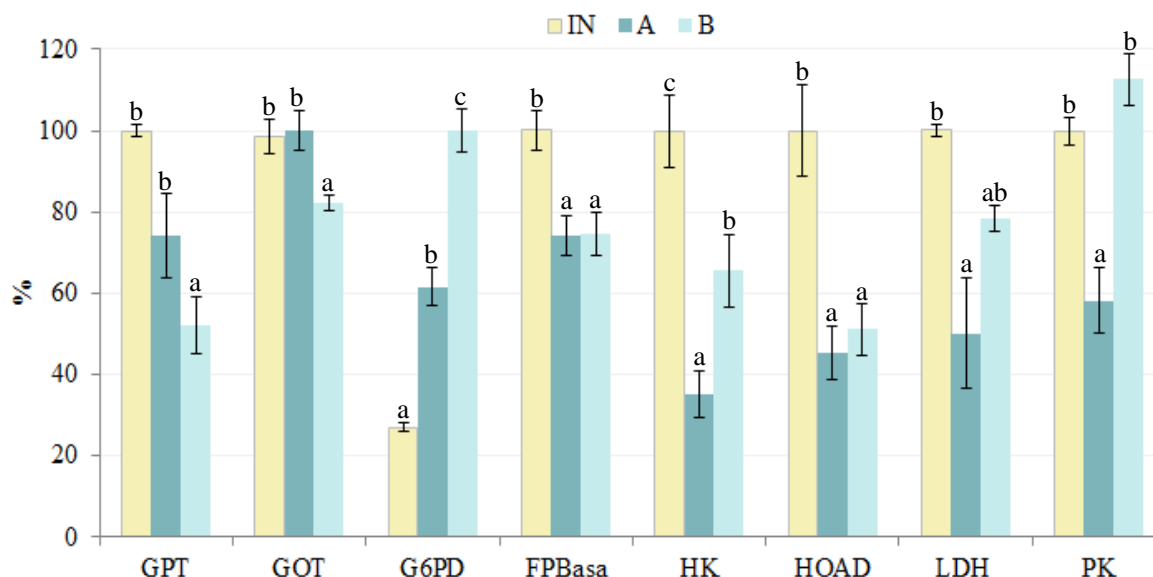


Figura 52. Actividad de enzimas hepáticas relacionadas con el metabolismo intermediario en tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales distintos. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). GPT (Glutamato piruvato transaminasa), GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa), G6PDH (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa), FBPasa (Fructosa-1,6-bisfosfatasa), HK (Hexokinasa), HOAD (β -Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), LDH (Lactato-dehidrogenasa), PK (Piruvato kinasa), IN (Peces iniciales), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.3.7. Efectos de la dieta sobre el estado oxidativo de la tenca en cultivo intensivo

El exceso de lípidos y proteínas en la diets de dorada ha podido ocasionar un elevado esfuerzo metabólico tanto catabólico como anabólico para hacer uso de estos nutrientes con fines energéticos y transformarlos también en sustancias de reserva (Fig. 52). Esto ha podido ocasionar un incremento del estado oxidativo en estos animales, que mantenido en el tiempo ha podido causar una depleción de la capacidad antioxidante total en estos animales. En consecuencia, como podemos observar en la figura 53, los

peces del grupo A, presentaron un elevado nivel de oxidación lipídica expresado en valores más altos de MDA. Por el contrario, los peces del grupo B, aunque mostraron una mayor activación de las rutas relacionadas con el aprovechamiento de los carbohidratos, mostraron una actividad antioxidante más conservada y consecuentemente unos niveles más bajos de MDA.

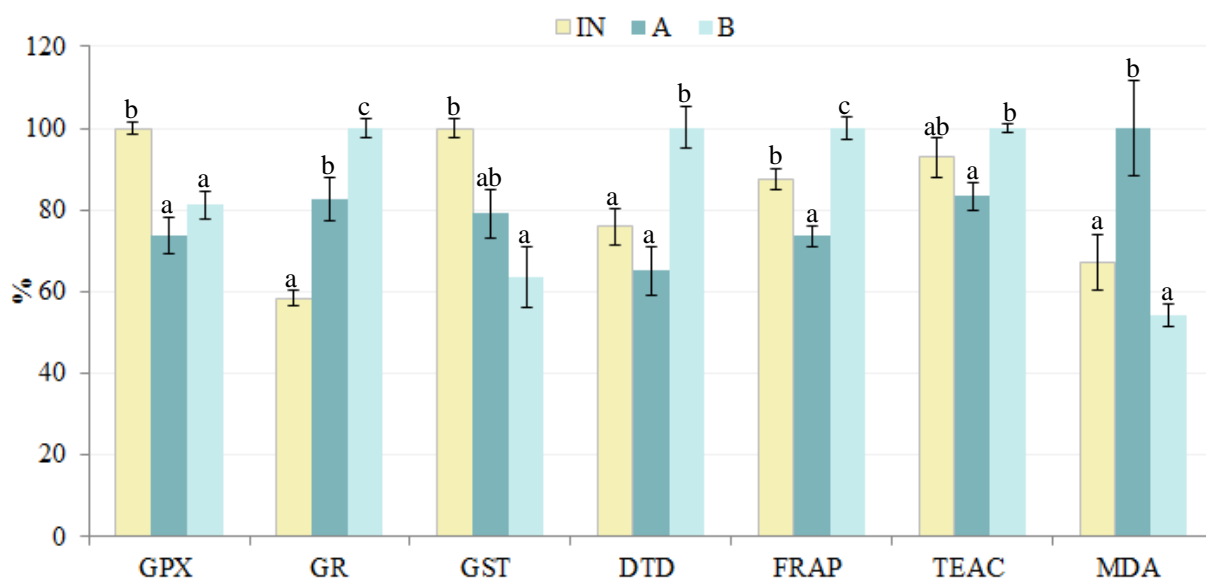


Figura 53. Efecto de la dieta sobre el estado oxidativo del hígado de la tenca (*Tinca tinca*). Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). GPX (Glutación peroxidasa), GR (Glutación reductasa), GST (Glutación-S-transferasa), DTD (DT-diaforasa), FRAP (Capacidad antioxidante total del plasma), TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al trolox), MDA (Malondialdehido), IN (Lote inicial de peces), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

6.3.8. Efectos de la dieta sobre el estado inmunológico de la tenca en cultivo intensivo

El estudio de ciertos parámetros sanguíneos permite evaluar la salud de los peces y diagnosticar posible procesos de inflamación, infección u otros trastornos debidos, entre otras causas, a una dieta inadecuada (Svobodova *et al.*, 1991). Los resultados

obtenidos en este estudio muestran que las distintas dietas no han supuesto un deterioro en el estado de salud general de ninguno de los grupos experimentales A y B (Fig. 54).

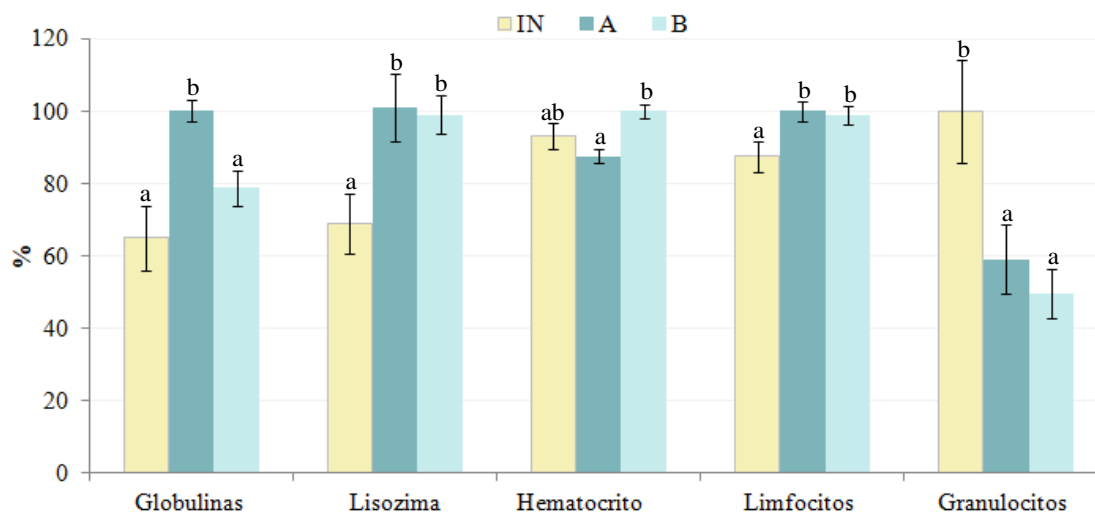


Figura 54. Parámetros hematológicos e inmunes en el plasma de tencas (*Tinca tinca*) alimentadas con dos piensos comerciales distintos. Los datos reflejan medias \pm SEM en porcentajes con respecto al máximo valor de cada variable considerado 100, $n = 12$. Distintas letras denotan diferencias significativas, ($P < 0.05$). IN (Lote inicial de peces), A (Peces alimentados con pienso de dorada), B (Peces alimentados con pienso de tilapia).

Se pueden observar algunas diferencias significativas de los grupos experimentales A y B, respecto del grupo inicial (IN) pero ya se ha mencionado que este grupo inicial se mantenía en unas condiciones muy distintas a las que se dieron durante el periodo experimental. Así, se puede observar una menor actividad del sistema inmune del stock inicial (IN) con valores menores para la lisozima, menor porcentaje de linfocitos y mayor cantidad de granulocitos. Esto podría estar relacionado con las condiciones ambientales y los valores se encontrarían dentro de un rango normal en la tenca (Modra *et al.*, 1998). Algunos autores describen un nivel menor de actividad del sistema inmune de la tenca en los meses de invierno (Collazos *et al.*, 1998), momento en el que este stock inicial fue muestreado.

El grupo IN también presentó menor cantidad de globulinas totales con respecto al grupo A, pero sin diferencias significativas con respecto al grupo B. Estas diferencias pueden responder a una mayor concentración de proteínas en plasma, como consecuencia de una mayor ingesta de este tipo de nutrientes por parte de los peces del grupo A.

6.3.9. Test de tolerancia a la glucosa en tenca

Estudios con glucosa marcada llevados a cabo en varias especies de peces muestran que no existen diferencias esenciales con mamíferos en lo que concierne a los porcentajes de dicha glucosa que se destinan a consumo energético inmediato, se excretan en orina o aparecen en macromoléculas de reserva. Lo que sí parece claramente diferente es la tasa a que ocurren dichos procesos, claramente más reducidos en peces que en mamíferos (Krogdahl *et al.*, 2005). Estudios posteriores han confirmado, por una parte, la existencia de diferencias interespecíficas dentro de los propios peces en aspectos tales como la tasa de turn-over de la glucosa, el tiempo de tránsito de la misma, etc., y por otra parte, que la tasa general del metabolismo glucídico es claramente inferior a la de los endotermos mamíferos, lo que se interpretó como una «cierta dificultad» para la utilización metabólica de los glúcidos (sea por déficits enzimáticos o endocrinos).

Una manifestación recurrente de esta circunstancia podría surgir de la reiteración de pruebas de «tolerancia a la glucosa» que coincidían en que, tras la administración de una determinada dosis oral de esta sustancia, la hiperglucemia resultante era mucha más marcada y duradera que en mamíferos, aunque con diferencias interespecíficas. Así, en la carpa y otras especies herbívoras u omnívoras, esa respuesta era menos severa (menos intensa y/o menos duradera) que, por ejemplo, en seriola, dorada u otras especies carnívoras (Harmon *et al.*, 1991; Blasco *et al.*, 1996). En ocasiones, a estas hiperglucemias mantenidas seguían episodios de hepatomegalia con aumento de los niveles hepáticos de glucógeno; una vez más, estas respuestas eran menos marcadas en especies omnívoras como ciertas tilapias o carpas (García-Gallego y Sanz, 1987).

El objetivo de este estudio no era encontrar explicaciones a esta denominada cierta intolerancia a la glucosa sobre todo en peces carnívoros, sino ayudar a catalogar a la tenca dentro de un hábito alimentario definido. Así pues, gracias a los resultados obtenidos (Figura 43), se puede plantear que la tenca presente un hábito alimentario distinto del previsto para la trucha común, considerada un pez carnívoro. El tiempo de estabilización de la glucemia después de una dosis determinada de glucosa en tenca es más rápido que en la trucha y este hecho es más palpable cuando la dosis de glucosa aumenta.

6.3.10. Análisis histológico en tencas alimentadas con dos dietas distintas

6.3.10.1. Análisis histológico en el intestino

La influencia de los componentes dietarios en la morfología y arquitectura intestinal es un aspecto a considerar a la hora de evaluar la adecuación de la fórmula dietaria para una determinada especie. Los resultados obtenidos en este estudio pusieron de manifiesto un alargamiento en las vellosidades intestinales de las tencas alimentadas con dietas con mayor contenido en lípidos/proteínas, que además incluían probióticos. Sin embargo, las vellosidades de las tencas alimentadas con pienso de tilapia no presentaron variaciones en longitud ni en grosor en comparación con los peces de cultivo intensivo (Grupo experimental I) del ensayo de sistemas de cultivo (Tabla XII).

La incorporación de suplementos en la dieta, tales como los probióticos, ha revelado su papel beneficioso promoviendo un mejor aprovechamiento de los componentes dietarios y favoreciendo el estado inmunológico del animal (Ringø *et al.*, 2010). Estudios previos han puesto de manifiesto en tilapia que la incorporación de probióticos en piensos producía un efecto beneficioso sobre la morfología intestinal, aumentando la capacidad de absorción intestinal, crecimiento y estado inmunitario de los peces (Ringø *et al.*, 2010; Nakandakare *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2018). En el presente estudio solo el pienso de dorada presentaba probióticos, lo que ha podido contribuir al buen estado de la mucosa intestinal en estos peces así como en un aumento de la superficie de absorción reflejado por un alargamiento de las vellosidades del intestino medial. Todo esto habría promovido un mejor estado nutricional en estos animales asociado a un mayor crecimiento y tasa de supervivencia.

6.3.10.2. Análisis histológico en hígado

El hígado es un órgano con un papel fundamental en el metabolismo lipídico de tal forma que cualquier cambio asociado a la composición de la dieta puede desencadenar alteraciones en su citoarquitectura. El estudio del tejido hepático en tenca mostró la presencia de hepatocitos poligonales, con el núcleo centrado y un volumen citoplasmático mayor en aquellos animales alimentados con pienso con un alto nivel de

lípidos (A). En ambas dietas, se observó una zona de tinción acidófila con disposición radial en la tinción de hematoxilina-Eosina, que de acuerdo con Kühnel (2005) correspondería a acúmulos de glucógeno.

Debido al tratamiento para la fijación del tejido, los lípidos presentes en los hepatocitos se muestran como un espacio claro rodeado de un halo de citoplasma eosinófilo (Herrerías Gutiérrez *et al.*, 1996) que fueron más evidentes en los peces con dieta de dorada. Esto está de acuerdo con los estudios de Kowalska *et al.*, (2011) en *Sander lucioperca* en los que el grado de vacuolización de los hepatocitos estaba directamente relacionado con el contenido lipídico de la dieta. Estudios en tenca han mostrado que dietas que superan un 12% de lípidos pueden dar lugar a procesos patológicos ligados a un mayor acúmulo lipídico, asociado a una dificultad de asimilación de los mismos en los hepatocitos (Ostaszewska *et al.*, 2006), aunque no se han observado estas evidencias en el presente estudio.

El perfil de ácidos grasos en dieta podría haber condicionado una acumulación lipídica en los hepatocitos (Demska-Zakęś *et al.*, 2012). Niveles más altos de linoleico en la dieta de tilapia podría haber promovido un cese en la síntesis de fosfolípidos ligado a una acumulación de lípidos en sus hepatocitos (Kowalska *et al.* 2011). De hecho, los peces alimentados con dietas ricas en lípidos mostraron mayor porcentaje de grasa perivisceral y menor actividad G6PDH, indicativo de una reducida actividad lipogénica que podría estar condicionado por el mayor aporte de grasa dietaria.

Por otro lado, el hecho de que los animales del grupo B (dieta rica en hidratos) mostraran una mayor actividad de enzimas pertenecientes a la vía glucolítica podría explicar un uso predominante de fuentes hidrocarbonadas como sustrato energético, que concuerda con la menor cantidad aparente de depósitos de glucógeno en los hepatocitos.

En términos generales se confirma el papel del hígado como órgano de reserva de sustratos energéticos, ya que los resultados muestran que un elevado aporte de moléculas energéticas en dieta se traduce en depósito de las mismas en los hepatocitos.

7. Discusión general

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio exhaustivo sobre parámetros relacionados con la salud y el bienestar de la tenca bajo distintos sistemas de cultivo, en distintas densidades y con diferentes dietas para poder conocer con más profundidad las condiciones óptimas de su producción en acuicultura.

Las distintas condiciones de cultivo en las que se ha mantenido la tenca en este estudio correspondían con un sistema Intensivo (I, densidad inicial $2,5 \text{ kg/m}^3$ y condiciones de cultivo totalmente controladas: temperatura, fotoperiodo y alimentación), Semi-intensivo (S-I, estanques en invernadero, densidad inicial $0,42 \text{ kg/m}^3$, temperatura parcialmente controlada, alimentación natural más suplemento con alimento artificial y fotoperiodo natural) y Extensivo (E, estanques con vegetación natural en el fondo, densidad inicial de $0,07 \text{ kg/m}^3$, temperatura, fotoperiodo y alimentación naturales). Estas condiciones han promovido diferencias en cuanto al estado de bienestar de los peces, a pesar de que en cada una de ellas, se ha procurado el mantenimiento del estado sanitario y se han minimizado otros condicionantes que pudieran alterar la salud y bienestar de los animales, como manejos inadecuados u otros factores de estrés. No obstante, se ha podido constatar que la intensificación del cultivo, con la aplicación de sistemas tecnificados que han permitido el aislamiento de las variaciones ambientales, ha favorecido el cultivo de la tenca, obteniéndose mayores índices de crecimiento y un estado fisiológico general adecuado. Los análisis realizados han mostrado unos valores productivos y biométricos dentro de los esperados para esta especie, y de manera general, mejores que los resultados mostrados por otros autores hasta la fecha, al menos tratando de tencas de esta misma edad y estado de desarrollo.

Los parámetros bioquímicos que se han analizado en el plasma de las tencas también han corroborado la hipótesis de un mejor estado general para los peces del grupo de cultivo intensivo. La dieta regular y constante, además de la estabilidad del sistema, han promovido mayores concentraciones plasmáticas de los metabolitos analizados como colesterol, lipoproteínas y proteínas totales. La alimentación empleada ha aportado a estos peces una cantidad suficientes nutrientes para su crecimiento y para la acumulación de los excedentes en forma de reservas energéticas. Se ha podido comprobar que en el caso de los peces cultivados en los otros dos sistemas de cultivo la actividad enzimática ha estado encaminada a movilizar sus reservas propias (en el caso de los peces del grupo E) o a derivar los recursos obtenidos de la dieta hacia procesos de

maduración gonadal (en E y S-I), limitando así el crecimiento y la acumulación de reservas .

Como consecuencia de esta mayor actividad metabólica en los peces de los grupos S-I y E, se ha podido constatar un aumento de la actividad de defensa oxidativa para mantener al organismo en un estado oxidativo aceptable, lo cual se ha reflejado en unos valores de MDA sin diferencias significativas entre los tres grupos.

Una mayor actividad general del sistema inmune también se ha observado en los peces bajo las condiciones de S-I y E y podrían corresponder con una respuesta natural a las variaciones ambientales a las que estaban sometidos, ya que no se han detectado patologías, ni deterioro del estado de salud, ni bajas apreciables en ninguno de los grupos.

A pesar de los buenos resultados generales obtenidos por los peces cultivados en sistema intensivo, siguen existiendo algunos hándicaps que superar. Uno de ellos ha sido el elevado índice de peces deformes que parece incrementarse como consecuencia de una alimentación artificial no balanceada (grupos I y S-I), confirmando los resultados obtenidos por otros autores en esta especie.

El buen estado general de los peces cultivados en condiciones de intensificación se ha confirmado con el análisis histológico. A nivel intestinal, los animales bajo condiciones de cultivo E, y algo menos los de S-I, mostraron cierta afectación de la citoarquitectura de las vellosidades del intestino proximal. La presencia de presas vivas en la alimentación natural de los peces en cultivo en E y S-I podría estar implicada en esta alteración, teniendo en cuenta que la tenca carece de estómago y el inicio de los procesos digestivos ocurrirían a este nivel.

Respecto al hígado podemos confirmar que la activación metabólica derivada de las respuestas fisiológicas de los peces de los grupos E y S-I a cambios ambientales parece traducirse en una movilización de las reservas energéticas del citoplasma de los hepatocitos al comparar con los otros sistemas de cultivo.

Una vez confirmado que el cultivo en condiciones de intensividad de la tenca es el más adecuado de los analizados, y que no supone un deterioro de su estado de salud y bienestar, queda examinar si la densidad en este modelo de cultivo puede provocar variaciones en su estado de bienestar. Así, en el segundo bloque de esta Tesis Doctoral se analizó el efecto de la densidad en el cultivo intensivo de la tenca. Se plantearon nuevamente tres grupos experimentales: el grupo control (CD, densidad inicial 2,5 kg/m³), similar al que se había empleado en el ensayo anterior denominado Intensivo,

un grupo que denominamos alta densidad (AD, densidad inicial 5 kg/m^3) que, según la bibliografía consultada, podíamos considerar una densidad elevada para esta especie, y por último un grupo de densidad inferior (BD, densidad inicial $1,6 \text{ kg/m}^3$).

Los resultados de este segundo ensayo mostraron que en las tres condiciones, los peces prácticamente triplicaron su peso inicial en el periodo experimental de 105 días, con un peso y longitud finales ligeramente superiores en el grupo de menor densidad (BD) e inferior para el grupo de alta densidad (AD). Por ello, este crecimiento no se tradujo en una diferencias estadísticamente significativa de la tasa de crecimiento instantáneo (TCI).

Tampoco hubo diferencias en los índices biométricos entre los tres grupos, ni en las tasas de deformidad, ni en supervivencia y tampoco en el índice de conversión del alimento, por lo que podemos afirmar que todos los grupos mostraron de forma similar resultados satisfactorios.

En lo que respecta a los parámetros bioquímicos analizados en el plasma, se han observado de forma general valores más bajos en el grupo de AD, aunque en la mayoría de los casos sin diferencia significativa respecto al grupo control (CD). Estas diferencias encontradas podrían estar asociadas a una mejor alimentación en el caso de los peces del grupo BD, no en cantidad ni en calidad, ya que todos los peces comían el mismo pienso y en la misma dosis diaria (2,5% sobre la biomasa total) pero sí en términos de accesibilidad, ya que el número de comederos fue igual en todos los grupos experimentales. En el caso de baja densidad BD, el acceso al alimento pudo suponer menor esfuerzo y un menor gasto energético que en los otros grupos.

Las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo intermediario analizadas en plasma y en hígado no presentaron diferencias relevantes que hicieran presumir alteraciones asociadas a la densidad de cultivo. Únicamente se podría destacar la actividad de la enzima HOAD, superior en los peces del grupo AD, y que podría asociarse a un uso mayor de los recursos lipídicos de la dieta por parte de estos peces para solventar el mayor esfuerzo realizado en la obtención del alimento. El resto de enzimas implicadas en el metabolismo energético de los lípidos y de los hidratos de carbono parecen estar también más elevadas en los peces de AD como consecuencia de la mayor actividad física realizada para acceder al alimento. Esta activación metabólica también podría haber causado un aumento en los mecanismos antioxidantes aunque los resultados mostrados no presentaban diferencias estadísticamente significativas. La hipótesis de un mayor esfuerzo para acceder al alimento de los peces de los grupos AD

y CD se ve corroborada por los valores menores estadísticamente significativos del MDA en los peces del grupo BD.

En lo relativo al estado inmunológico de los peces del ensayo de densidad, tampoco se encontraron evidencias de un deterioro del estado de salud y bienestar en ninguno de los grupos analizados. De todas las variables estudiadas, únicamente se obtuvieron diferencias significativas en el caso de las inmunoglobulinas, que como en el estudio anterior, aparecieron más elevadas en los peces mejor alimentados y con mayor cantidad de proteínas totales en plasma. El resto de variables relacionadas con el estado inmunológico tampoco se vieron afectadas por la densidad de cultivo.

En definitiva, el cultivo de la tenca en las condiciones de alta densidad ensayadas en este trabajo no ha supuesto efectos negativos comparando con el grupo control, pero por el contrario, se ha conseguido una productividad muy elevada en relación a la infraestructura e instalaciones utilizadas.

El último bloque de análisis que componen esta Tesis Doctoral pretendía evaluar posibles efectos de la dieta sobre los parámetros indicadores de salud y bienestar en la tenca. Para ello se utilizaron dos dietas comerciales diseñadas para especies muy distintas en cuanto a hábitos alimenticios y necesidades nutricionales. Una considerada adecuada para la dorada (Inicio Plus 868, grupo experimental A) y otra para la tilapia (Mezcla al 50% de Efico Alpha 845 y Efico Alpha 830, grupo experimental B). Estas dos dietas se diferenciaban en la cantidad de lípidos que contenían (20% en la dieta de dorada frente a 6% en la de tilapia), en el contenido proteico (47% frente al 39%) y en el contenido de carbohidratos (18% frente a 40%). Además, la formulación expresada por los fabricantes mostraba un mayor contenido de materias primas vegetales en el caso de la dieta de tilapia y por el contrario una menor cantidad en el pienso de dorada, con ausencia total de aceites de origen vegetal. Esta última dieta presentaba adicionalmente probióticos y extracto de levaduras que no presentaba la dieta de tilapia.

Las condiciones de cultivo en este último ensayo (densidad inicial 2,5 kg/m³ y condiciones de cultivo totalmente controladas: temperatura, fotoperiodo y alimentación) fueron similares a las empleadas en los grupos experimentales intensivo (I) y control de densidad (CD) de los capítulos 4 y 5, respectivamente, de esta Tesis.

Las diferencias en la composición de las dietas aportaron unos mejores resultados de crecimiento para los peces del grupo A, con un menor índice de conversión del alimento (IC), aunque los valores obtenidos por las tencas alimentadas

con dieta de tilapia estuvieron próximos a los expresados en la bibliografía consultada para tencas de edades y estados de desarrollo similares.

El mayor crecimiento del grupo A fue debido principalmente a la acumulación de grasas perivisceral, ya que la longitud fue similar a las tencas alimentadas con la dieta de tilapia.

La retención de energía, ha sido, como cabría esperar, mayor en los peces alimentados con la dieta más rica, pero no así la retención de lípidos que ha sido más efectiva significativamente en los peces alimentados con la dieta más pobre. Este hecho se ha podido ver favorecido por una conversión de otros nutrientes, carbohidratos concretamente, en los lípidos necesarios, que han sido sin ninguna duda deficientes en la dieta de tilapia.

En cuanto al efecto de la dieta sobre el perfil de aminoácidos final de los peces no encontramos diferencias significativas en este estudio. Se ha puesto de manifiesto que la dieta D contenía mayor cantidad AAs esenciales como treonina, valina, lisina y fenilalanina que la dieta T pero este hecho no ha repercutido ni en la composición de los peces ni en la utilización nutritiva de la proteína, como se observa en los índices CEC (Coeficiente de eficiencia en crecimiento) y VPP (Valor productivo de la proteína), que no han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Es un hecho conocido que la composición de AAs se mantiene sin diferencias significativas en la mayoría de los teleosteos, independientemente de su alimentación.

En lo relativo al perfil lipídico, los resultados de composición final de los peces del grupo A ha coincidido con el perfil de la dieta suministrada, pero, en el caso de los peces alimentados con pienso de tilapia, con menor cantidad de lípidos, la coincidencia ha sido menor, a excepción de los AG esenciales como n-3 y n-6. Es sabido que, tanto en especies dulceacuícolas como marinas, si la dieta no cubre estrictamente las necesidades nutricionales de la especie, algunos ácidos grasos pueden ser selectivamente depositados, retenidos o transformados para cubrir estas deficiencias, como ha podido ocurrir en el caso de las tencas del grupo B, alimentados con una dieta pobre en lípidos.

En este estudio también se han podido constatar cambios a nivel bioquímico en el plasma de las tencas debidos a la utilización de las distintas dietas. Así, hemos podido observar una mayor acumulación de metabolitos como colesterol, lipoproteínas y proteínas totales en el plasma de las tencas alimentadas con la dieta más rica en lípidos y proteínas. Con respecto a las hormonas analizadas, aunque en la hormona T4 no se

han encontrado diferencias, sí se observaron en la hormona T3, lo que podría estar relacionado con una mayor síntesis endógena de lípidos y de AGs esenciales a partir de otros precursores lipídicos y no lipídicos dada la pobre cantidad de lípidos presentes en la dieta de tilapia.

La actividad enzimática relacionada con el metabolismo intermediario de los dos grupos A y B ha mostrado una relación directa con respecto a la dieta suministrada, y se ha podido comprobar como los peces del grupo A han presentado mayor actividad en el conjunto de enzimas destinadas a la transformación de nutrientes excedentes (proteínas y lípidos) en sustancias de reserva y también como fuentes principales de energía metabólica. Por el contrario, los peces alimentados con pienso más rico en hidratos de carbono, es decir los peces del grupo B, han mostrado una actividad enzimática general destinada a la utilización de estos hidratos de carbono como fuente principal de energía y también como precursores para la síntesis de otras moléculas con funciones estructurales y no tanto con fines de reserva.

Con respecto al estado oxidativo, los peces del grupo A presentan un elevado nivel de oxidación lipídica como se puede observar en los valores de MDA mostrados. Esto podría deberse al elevado esfuerzo metabólico tanto catabólico como anabólico que ha podido suponer la gran cantidad tanto de proteínas como de lípidos en su dieta. Un estado oxidativo elevado mantenido en el tiempo en los peces del grupo A pueden haber causado una depleción de la capacidad antioxidante total en estos animales. Por el contrario, los peces del grupo B, aunque mostraron una mayor activación de las rutas relacionadas con el aprovechamiento de los carbohidratos, mostraron una actividad antioxidante más conservada y consecuentemente unos niveles más bajos de MDA.

Mediante el Test de Tolerancia a la Glucosa se ha comprobado la capacidad de la tenca para asimilar hidratos de carbono de forma más eficiente que otras especies como la trucha común, que se utilizó en este ensayo como ejemplo de especie carnívora y presumiblemente con menor capacidad para asimilar estos nutrientes. Los resultados obtenidos mostraban que la tenca tratada con una dosis intraperitoneal de 1.000 mg/kg de pez era capaz de recuperar los valores iniciales de glucemia en tan solo 4 horas, mientras que la trucha en las mismas condiciones necesitó más de 10 h para recuperar sus valores basales glucémicos.

Se ha podido constatar que las diferentes dietas no han supuesto un deterioro apreciable en el estado inmunológico de los peces. Se puede destacar una mayor

concentración de globulinas totales en el caso de los peces del grupo A, aunque, como ha ocurrido en los ensayos anteriores y también en concordancia por lo mostrado en la bibliografía consultada, este hecho puede tener que ver con una mejor alimentación. El resto de parámetros inmunes analizados no ha mostrado diferencias significativas en este ensayo.

Desde el punto de vista histológico, la influencia de la composición de la dieta se puso de manifiesto a nivel intestinal, observándose una mayor longitud de las vellosidades en el intestino medial de los peces alimentados con la dieta D, que iría asociada a una mayor capacidad de absorción. Este hecho podría deberse a una mejor calidad nutricional de la dieta de dorada acentuada por la presencia de probióticos.

A nivel hepático, los peces alimentados con la dieta más energética (dieta D) presentaron mayor acumulación de depósitos lipídicos y/o de glucógeno en comparación con los alimentados con la dieta de tilapia. Otro aspecto a destacar sería que los hepatocitos del grupo B mostraron una apariencia similar a los de los peces de cultivo intensivo (I) del bloque 4 de esta Tesis, que eran alimentados con un pienso similar.

Finalmente, se podría considerar que el conjunto de estudios realizados en la tenca, presentados en esta Tesis Doctoral, contribuyen a un mayor conocimiento de las condiciones adecuadas de cultivo intensivo y de sus necesidades nutricionales para la correcta formulación de futuras dietas artificiales.

8. Conclusiones

A partir de los resultados de esta Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. De los tres sistemas de cultivo ensayados en la tenca (*Tinca tinca*): Intensivo (I, densidad inicial $2,5 \text{ kg/m}^3$ y condiciones de cultivo totalmente controladas: temperatura $22,4 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodo 14:10 y alimentación controlada), Semi-intensivo (S-I, estanques en invernadero, densidad inicial $0,42 \text{ kg/m}^3$, temperatura parcialmente controlada, alimentación artificial más suplemento con alimento natural y fotoperiodo natural) y Extensivo (E, estanques con vegetación natural en el fondo, densidad inicial de $0,07 \text{ kg/m}^3$, temperatura, fotoperiodo y alimentación naturales), hemos de decir que:

- Las tencas en cultivo Intensivo mostraron una mejora de los parámetros e índices de crecimiento, acompañada por un metabolismo dirigido principalmente a un crecimiento somático, un mejor estado oxidativo, inmunológico e histológico en comparación con los peces de los otros sistemas de cultivo.

- El aislamiento de las condiciones ambientales naturales en los peces de cultivo Intensivo ha limitado la activación de los procesos de desarrollo gonadal, a diferencia de lo ocurrido en los peces cultivados en los sistemas E y S-I.

- El cultivo Intensivo ha sido el que ha favorecido un mejor estado de salud y bienestar en los animales.

2. El cultivo Intensivo de la tenca, a una densidad inicial de 5 kg/m^3 proporciona unos resultados óptimos de crecimiento, y el conjunto de parámetros indicativos de salud y bienestar (metabólicos, de estado oxidativo e inmunológicos) no presentó diferencias destacables en comparación con los peces cultivados a menor densidad ($2,5 \text{ kg/m}^3$ y $1,6 \text{ kg/m}^3$).

3. La alimentación de subadultos de tenca (*Tinca tinca*) con dos dietas comerciales, una de dorada (50% de proteínas, 22% de lípidos, 19 % de MELN, s/ss) y otra para tilapia (43% de proteínas, 6% de lípidos y 43% de MELN, s/ss) ha promovido:

- Un mejor crecimiento e índice de conversión del alimento en los peces alimentados con la dieta formulada para dorada. El crecimiento se ha debido a un mayor acúmulo de grasa perivisceral, a diferencia de los peces alimentados con el pienso de tilapia, que han mostrado un mayor rendimiento de la carcasa y un aspecto más asilvestrado.
- La utilización nutritiva de la proteína por la tenca fue semejante tanto para el pienso de dorada como para el de tilapia, a pesar de que la proporción de ciertos aminoácidos esenciales fue mayor en el pienso de dorada.
- Existe una equivalencia entre el perfil de ácidos grasos totales de la dieta de dorada y el de los peces alimentados con esta dieta, a diferencia de los animales alimentados con la dieta para tilapia, con un nivel lipídico deficiente, que solo muestran equivalencia en los ácidos grasos esenciales.
- Las repercusiones metabólicas de las dos dietas han derivado en una mayor utilización de proteínas y lípidos en los peces alimentados con pienso de dorada y una mayor utilización de carbohidratos en los peces alimentados con pienso de tilapia.
- El estado oxidativo hepático en las tencas alimentadas con pienso de tilapia se ha mantenido más conservado que el de los peces alimentados con pienso de dorada.
- A nivel histológico, las tencas alimentadas con pienso de dorada han mostrado un mayor depósito de reservas energéticas en hígado y un mejor estado de la citoarquitectura intestinal.

4. El cultivo intensivo de la tenca (*Tinca tinca*) a una densidad inicial de 5 kg/m³ bajo recirculación y control de las condiciones ambientales, se muestra como una alternativa adecuada para la industrialización de esta especie sin menoscabar su estado de salud y bienestar. La consecución de una dieta adecuada para la tenca constatado, en este trabajo, como un pez omnívoro, que aúne los efectos positivos de la dieta comercial formulada para dorada y de la dieta comercial formulada para la tilapia, y minimice los efectos negativos referidos, fundamentalmente a un exceso de energía proteica y lipídica en la primera y un defecto en la cantidad de lípidos en la segunda, no cabe duda que, optimizaría la producción y el bienestar de los animales en este modelo de sistema de cultivo.

9. Bibliografía

- Aalimahmoudi, M., Marammazi, J.G., Motazavizade, S.A., 2016. Effects of stocking density on blood cortisol, glucose and cholesterol levels of beluga juveniles (*Huso huso* Linnaeus, 1758) cultured in subtropical climate. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 4, 400–404.
- Abdel-Tawwab M, M.M., Sharaf SM, Ahmad MH, 2005. Effect of crowding stress on some physiological functions of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fed different dietary protein levels. *Int. J. Zool. Res.* 1, 41–47.
- Abimorad EG, Castellani D., 2011. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari–do–rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. *Bol Inst Pesca*. 37, 31–38.
- Abou, Y., Fiogbe, E.D., Micha, J.C., 2007. Effects of stocking density on growth, yield and profitability of farming Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., fed Azolla diet, in earthen ponds. *Aquac. Res.*, 38, 595–604.
- Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*. 237, 167–178.
- Aebi, H., 1984. Catalase "in vitro". *Methods Enzymol.* 105, 121–127.
- Ahmad, M., Qureshi, T.A., Singh, A.B., 2012. Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate contents on the viscera composition and organ Indices of *Cyprinus carpio* communis fingerlings. *African Journal of Biotechnology*. 11 (33), 8361–8366.
- Ahmed, I., 2012. Dietary amino acid L–tryptophan requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), estimated by growth and haemato–biochemical parameters. *Fish Physiol Biochem* . 38, 1195–1209.
- Ajani, E.K., Setufe, S.B., Oyebola, O.O., 2015. Effects of stoking density on haematological functions of juvenile Afican catfish (*Clarias gariepinus*) fed varying crude protein levels. *African Journal of food Science*. 9, 65–69.
- Alanara, N., Brannas, E., 1996. Dominance-feeding behavior in Arctic charr and Rainbow trout: the effect of stocking density. *Journal of Fisheries Biology*. 48, 242–254.
- Alas, A., Altindag, A., Yilmaz, M., Kirpik, M.A., Ak, A. (2009). Feeding Habits of Tench (*Tinca tinca* L., 1758) in Beysehir Lake (Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 10: 187–194.
- Almeida, N.M., Bueno, M.R., 2007. Fatty acid composition of total lipids, neutral lipids and phospholipids in wild and farmed matrinxá (*Brycon cephalus*) in the Brazilian Amazon area. *J Sci Food Agric*. 87, 2596–2603.
- Alvariño, J. M. R.; Quirós, M.; San Juan, L. D.; Jover, M., 2001: Respuesta productiva de alevines de tenca (*Tinca tinca*) alimentados con piensos con diferentes contenidos de grasa y proteína. *Monografías de ICCM* 4, 352–355.
- Anderson, J., Jackson, J.A., Matty, A.J. and Capper, B.S., 1984. Effect of dietary carbohydrate and fibre on the Tilapia (*Oreochromis niloticus* L). *Aquaculture*. 37, 303–314.
- Anderson, D.P., Siwicki, A.K., 1995. Basic hematology and serology for fish health programs. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines.
- Andrade, Á.B., Machado, L.F., Hostim-Silva, M., Barreiros, J.P, 2003. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46, 373–382.
- Arai, S., 1981. A purified test diet for Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fry. *B Jpn Soc Sci Fish*. 47, 547–550.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., del Rio, M.P.M., Flik, G., Mancera, J.M., Klaren, P.H.M., 2011. Effects of cortisol and thyroid hormone on peripheral outer ring deiodination and osmoregulatory parameters in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Endocrinology*. 208, 323–330.
- Arlinghaus R, Wirth M, Rennert B, 2003. Digestibility measurements in juvenile tench (*Tinca tinca* L.) by using a continuous filtration device for fish faeces. *J Appl Ichthyol*. 19, 152–156.
- Ashley, P., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behavior Science* 104, 199–235.

- Asztalos, B., Nemcsok, J., 1985. Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp, *Cyprinus carpio* (L.), sera. *Camp. Biochem. Physiol.*, 82, 214-219.
- Avlijaš, S., Ricciardi, A., Mandrak, N.E., 2017. Eurasian Tench (*Tinca tinca*): the next Great Lakes invader. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 00, 1–11
- Atwood, H.L., Tomasso, J.R., Webb, K., Gatlin, D.M., 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. *Aquaculture Research*. 34, 241–251.
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J. 2012. Recirculating aquaculture systems (ras) analysis: main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. 51, 26–35.
- Backiel, T., 1986. Masking effect of variability of growth on its estimation in juvenile tench, *Tinca tinca* (L.), reared at different temperatures. *Pol. Arch. Hydrobiol.* . 33, 69–95.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of gold fish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325–331.
- Baird, S. F. 1879. Report of the Commissioner of Fish and Fisheries for 1875-1876. Part IV. U.S. Commission of Fish and Fisheries, Washington, D.C.
- Ballantyne, J.S., 2001. Amino acid metabolism. P. Wright, P. Anderson (Eds.), *Fish physiology*, Academic Press, New York. 77-107.
- Baños, N., Baro, J., Castejon, C., Navarro, I. and Gutierrez, J., 1998. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul. Pept.* 77, 55–62.
- Barandica, L.M., Tort, L. B., 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32, 267–284. ISSN 0370 - 3908.
- Barry, T.P., Unwin, M.J., Malison, J.A., Quinn, T.P., 2001. Free and total cortisol levels in semelparous and iteroparous chinook salmon. *Journal of Fish Biology*. 59, 1673–1676.
- Barton B.A., Schreck C.B., 1987. Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*. 62, 299-310.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. . *Ann. Rev. Fish. Dis.* 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.
- Basso, L., Ferreira, M.W., Silva, A.R., 2011. Efeito do peso ao abate nos rendimentos dos processamentos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63, 1260–1262.
- Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 725–743.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes. R., 1992. Effects of dietary conditions on the exocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei). *Aquaculture*. 101, 163–176.
- Benfey, T.J., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*. 184, 167–176.
- Benzer, S.S., Gul, A., Yilmaz, M., 2009. Growth properties of Tench (*Tinca tinca* L., 1758) living in Hirfanh Reservoir (Kirsehir, Turkey). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 8, 219–224.
- Benzer, S. S., Gul, A., and Yilmaz, M., 2010. Growth properties of tench (*Tinca tinca* L., 1758) living in Kapulukaya Dam Lake, Turkey. *Kastamonu Education Journal*. 18, 839–849.
- Bergmeyer, H. U., Bernt, E., 1974. Glutamate-pyruvate transaminase, UV-assay, manual method. In: Bergmeyer H. U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York. 2, 752–758.
- Bernier, N.J., Flik, G., Klaren, P.H.M., 2009. Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes. In *Fish Physiology*. 28, 235–311.
- Bicudo, J.A.A., Cyrino, J.E.P., 2009. Estimating Amino Acid Requirement of Brazilian Freshwater Fish from Muscle Amino Acid Profile. *J World Aquacult Soc.* 40, 818–823.

- Billard, R., Flajshans, M., 1995. The current state of research and culture of tench, *Tinca tinca* Linnaeus (1758). *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42, 219–225.
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Pilarski, F., Sebastiao, F.A., Urbinati, E.C., 2013. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia.* 65, 1745–1751.
- Bircan, R., Sakai, K., Takashima, F. 1989. Effect of food amount on growth of tench larvae, *Tinca tinca*. *La mer.* 27, 15–18.
- Biswas, A.K., Seoka, M., Tanaka, Y., Takii, K., Kumai, H., 2006. Effect of photoperiod manipulation on the growth performance and stress response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture.* 258, 350–356.
- Biswas, J. K., Sarkar, D., Chakraborty, P., Bhakta, J.N., Jana, B.B., 2006. Density dependent ambient ammonium as the key factor for optimization of stocking density of common carp in small holding tank. *Aquaculture* 261, 952–959.
- Bjornsson, B., 1994. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture.* 123, 259–270.
- Blanton, M.L., Specker, J.L., 2007. The hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Critical Reviews in Toxicology.* 37, 97–115.
- Blasco, J., Fernandez-Borras, J., Marimon, I., Requena, A., 1996. Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J. Comp. Physiol.* 165, 534–541.
- Blasco, J., Marimón, I., Viaplana, I., Fernández-Borrás, J., 2001. *Fish Physiology and Biochemistry.* 24, 247–258.
- Blasco, M., Fernandez, M.D., Palomino, L., Pula, H.J., 1999. La comercialización de productos alternativos en Extremadura: la tenca, la rana y el lagarto. *Consejería de Agricultura y Comercio, Depósito Legal. BA-270-1999.* 208 p. ISBN 84-8107-032-7.
- Bonga, S.E.W., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews.* 77, 591–625.
- Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y., Tanaka, M., 2006. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 259, 432–443.
- Bonvini, E., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Brachelente, C., Mongile, F., Gatta, P. P., Bonaldo, A., 2015. Feeding common sole (*Solea solea*) juveniles with increasing dietary lipid levels affects growth, feed utilization and gut health, *Aquaculture*, Volume. 449, 87–93.
- Bonvini, E., Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Grandi, M., Fontanillas, R., Viroli, C., Gatta, P. P., 2018. Feeding European sea bass with increasing dietary fibre levels: Impact on growth, blood biochemistry, gut histology, gut evacuation, *Aquaculture.* 494, 1–9.
- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I.R., 2004. Seasonal variation of serum lysozyme levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology.* 17, 129–135.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brambell Report, 1965. London: HMSO. ISBN 0 10 850286 4.
- Bromage, E.S., Ye, J.M., Kaattari, S.L., 2006. Antibody structural variation in rainbow trout fluids. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology.* 143, 61–69.
- Brown, P.B., 1995. Using whole-body amino acid patterns and quantitative requirements to rapidly develop diets for new species such as striped bass (*Morone saxatilis*). *J Appl Ichthyol.* 11, 342–346.
- Brown, S.B., Maclatchy, D.L., Hara, T.J., Eales, J.G., 1991. Effects of Cortisol on Aspects of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine Metabolism in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). *General and Comparative Endocrinology.* 81, 207–216.

- Buchtová, H., Svobodov, Z., Kocour, M., Velsek, J., 2007. Amino acid composition of edible parts of three year-old experimental scaly crossbreds of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). *Aquac Res.* 38, 625–634.
- Buddington, R.K., Hilton, J.W., 1987. Intestinal adaptations of rainbow trout to changes in dietary carbohydrate. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 253, G489–G496.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Burgos, A., Valenzuela, A., Gonzalez, M., Klempau, A., 2004. Non-specific defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during artificial photoperiod. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.* 24, 240–245.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 214, 253–271.
- Cannon, W. B., 1929. Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. Brandford. Boston.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Carrillo, M., Bromage, N., Zanuy, S., Serrano, R., Prat, F., 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture.* 81, 351–365.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxa, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport. *Aquaculture Research.* 32, 297–304.
- Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C., Proteau, J.P., 2002. Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research.* 33, 999–1008.
- Castro-González M. I., Maafs, A. G., & Galindo, C., 2013. Perfil de ácidos grasos de diversas especies de pescados consumidos en México *Rev. Biol. Trop.* 61, 1981–1998.
- Celada, J.D., Aguilera, A., Carral, J.M., Saez-Royuela, M., Melendre, P.M., Perez, J.R., 2007a. Effects of stocking density on survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture International.* 15, 461–465.
- Celada, J.D., Carral, J.M., Rodriguez, R., Saez-Royuela, M., Aguilera, A., Melendre, P., Martin, J., 2007b. Tench (*Tinca tinca* L.) larvae rearing under controlled conditions: density and basic supply of *Artemia nauplii* as the sole food. *Aquaculture International.* 15, 489–495.
- Chen, W.H., Sun, L.T., Tsai, C.L., Song, Y.L., Chang, C.F., 2002. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. *General and Comparative Endocrinology.* 126, 90–100.
- Cho C.Y., Kaushik S.J., 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Review of Nutrition and Dietetics.* 61, 132–172.
- Cho HC, K.J., Kim HB, Baek HJ., 2015. Effects of Water Temperature Change on the Hematological Responses and Plasma Cortisol Levels in Growing of Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara*. *Development & Reproduction.* 19, 19–24.
- Chrousos, G. P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology.* 5, 374–381.
- Cileček, M., Baranek, V., Vitek, T., Kopp, R., Mareš, J., 2011. Production effect of different commercial feeds on juvenile tench (*Tinca tinca* L.) under the intensive rearing conditions. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.,* LIX, 6, 93–98.
- Claver, I. y Díaz De La Lastra, E., 1983. Localización de áreas para uso acuícola en la provincia de Badajoz (Facies léntica). CEOTMA. MOPU.
- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., Hulata, G., 2004. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research.* 35, 1434–1440.
- Código Sanitario para los Animales Acuáticos (OIE) 20ª edición (2017). ISBN: 978-92-95108-47-9.
- Cohen, S.A., Meys, M., Tarvin TL., 1989. The Picotag Method. A Manual of Advanced Techniquies for Amino Acid Analysis. Waters Millipore, Millford, MA, USA.

- Coimbra, A.M., Reis-Henriques, M.A., 2007. Tilapia larvae aroclor 1254 exposure: Effects on gonads and circulating thyroid hormones during adulthood. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 79, 488–493.
- Collazos, M.E., Barriga, C., Ortega, E., 1995. Seasonal-variations in the immune-system of the cyprinid *Tinca tinca* - phagocytic function. *comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 18, 105–113.
- Collazos, M.E., Ortega, E., Barriga, C., Rodriguez, A.B., 1998. Seasonal variation in haematological parameters in male and female *Tinca tinca*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 183, 165–168.
- Company R., Caldach-Giner, J.A., Perez-Sanchez, J., Kaushik, S.J., 1999. Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*. 12, 23–30.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*. 86, 205–223.
- Correa, C.F., Cerqueira, V.R., 2007. Effects of stocking density and size distribution on growth, survival and cannibalism in juvenile fat snook (*Centropomus parallelus*, Poey). *Aquaculture Research*. 38, 1627–1634.
- Costa, L.D.F., Miranda-Filho, K.C., Severo, M.P., Sampaio, L.A., 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture*. 285, 270–272.
- Costas B, Conceição LEC, Aragão C, Martos JA, Ruiz-Jarabo I, Mancera JM, *et al.*, 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*. 316, 68–76.
- Cowey, C.B., de la Higuera, M., y. Adron, J.W., 1977. The effect of diet composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*. 38, 385–395.
- Cudmore, B., Mandrak, N.E., 2011. Biological synopsis of Tench (*Tinca tinca*). *Can. MS Rpt. Fish. Aquat. Sci.* 2948, v + 20p.
- Cury P, Pauly D., 2000. Patterns and propensities in reproduction and growth of marine fishes. *Ecol Res.* 15, 101–106.
- Dabrowski, K., Arslan, M., Terjesen, B.F., Zhang, Y., 2007. “The effect of dietary amino acid imbalances on feed intake: Is there a neurological sensing of deficiency present in fish?” *Aquaculture*. 268, 136–142.
- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K., Pedersen, P., 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: current status and future perspectives. *Aquac. Eng.* 53, 2–13.
- Da Rocha, R.M., Carvalho, E.G., Urbinati, E.C., 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxa *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquaculture Research*. 35, 245–249.
- Davie, A., Quero, C. M., Bromage, N., Treasurer, J., Migaud, H., 2007. Inhibition of sexual maturation in tank reared haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) through the use of constant light photoperiods. *Aquaculture*, 270, 379–389,.
- Davies, K. J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 50, 279–289.
- Degani, G. and Viola, S., 1987. The protein sparing effect of carbohydrates in the diet of eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*. 64, 283–291.
- De la Higuera, M., Murillo, A., Varela, G., Zamora, S. The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56A: 37-41. 1977.
- De La Rosa Lucas, I. (1996) Tesis Doctoral. “Contribuciones Al Estudio De La Especie *Tinca tinca* Linneo 1758 (Pisces Cyprinidae)”. Universidad: ZARAGOZA. Centro de lectura: Facultad de Veterinaria.

- De Pedro, N., Guijarro, A.I., Delgado, M.J., Lopez-Patino, M.A., Pinillos, M.L., Alonso-Bedate, M., 2001. Influence of dietary composition on growth and energy reserves in tench (*Tinca tinca*). *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie*. 17, 25–29.
- De Pedro, N., Guijarro, Ai., López-Patiño, Ma, Martínez-Álvarez, R. And Delgado, Mj., 2005. Daily and seasonal variations in hematological and biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*. 36, 12, 1185–1196
- Demers, N.E., Bayne, C.J., 1994. Plasma-Proteins of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Immediate Responses to Acute Stress. *Modulators of Fish Immune Responses*. 1, 1–10.
- Demers, N.E., Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 21, 363–373.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of Stress on Immune Cell Distribution - Dynamics and Hormonal Mechanisms. *Journal of Immunology*. 154, 5511–5527.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution - Role of adrenal steroid hormones. *Journal of Immunology*. 157, 1638–1644.
- Dhabhar, F.S., 2002. Stress-induced augmentation of immune function—the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immun*. 16, 785–798.
- Dhabhar, F.S., 2008. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection versus immunopathology. *Allergy Asthma Clin. Immunol*. 4, 2–11.
- Diana, J.S., Fast, A.W., 1989. The effects of water exchange rate and density on yield of the walking catfish, *Clarias fuscus*. *Aquaculture* 78, 267–276.
- Di Battista, J.D., Anisman, H., Whitehead, M., Gilmour, K.M., 2005. The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol*. 208, 2707–2718.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8, 1103–1123.
- Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandich, A., Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319–328.
- Díaz, E., Furné, M., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Domezain, A, Sanz, A., 2010. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Aquaculture*. 307, 123–129.
- Doadrio, I. 2001. Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. 364 pp.
- D'Orbcastel, E.R., Ruyet, J.P.L., Le Bayon, N., Blancheton, J.P., 2009. Comparative growth and welfare in rainbow trout reared in recirculating and flow through rearing systems. *Aquacultural Engineering* 40, 79-86.
- Drozd, R., Panicz, R., Jankowiak, D., Hofsoe, P., Drozd, A. and Sadowski, J., 2014. Antioxidant enzymes in the liver and gills of *Tinca tinca* from various water bodies. *J. Appl. Ichthyol*. 30, 2–6.
- Duncan, D.B., 1955. Multiple Range and Multiple F Tests. *Biometrics*. 11, 1–42.
- Duncan, I.J.H., 1996. Animal welfare defined in terms of feelings. *Acta Agric. Scand. A Suppl*. 27, 29–35.
- Duncan, I.J.H., Petherick, J.C., 1991. The implications of cognitive processes for animal welfare. *J. Anim. Sci*. 69, 5017–5022.
- Duncan, I.J.H., Fraser, D., 1997. Understanding animal welfare. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*, CAB International. University Press, Cambridge, pp. 19–31.
- Duncan, I.J.H., 2005. Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*. 24, 483–492.

- Eales, J. G., and MacLatchy, D. L. (1989). The relationship between T3 production and energy balance in salmonids and other teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 289–293.
- Eales, J.G., 2006. Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. In *Fish Endocrinology*, pp 767–808.
- Einarsdottir, I.E., Nilssen, K.J., Iversen, M., 2000. Effects of rearing stress on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) antibody response to a non-pathogenic antigen. *Aquacult. Res.* 31, 923–930.
- Ellis, A.E., 1977. Leukocytes of Fish - Review. *Journal of Fish Biology.* 11, 453–491.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology.* 9, 291–308.
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology.* 25, 827–839.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology.* 61, 493–531.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., Lopez-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Overli, O., Martins, C.I.M., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry.* 38, 163–188.
- Elvira, B., 1995. Native and exotic freshwater fishes in Spanish river basins. *Freshwater Biology.* 33, 103–108.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37, 277–285.
- Eslamloo, K., Akhavan, S.R., Fallah, F.J., Henry, M.A., 2014. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. *Fish & Shellfish Immunology.* 37, 147–153.
- Evans, D.H., 2011. Freshwater Fish Gill Ion Transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. *Acta Physiologica.* 202, 349–359.
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. & Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. *Journal of Fish Biology.* 75, 784–796.
- Fatima, S., Izhar, S., Usman, Z., Rashid, F., Kanwal, Z., Jabeen, G., Latif, A. A., 2018. Effects of High Stocking Density on Condition Factor and Profile of Free Thyroxine and Cortisol in *Catla catla* (Hamilton, 1822) and *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 18, 217–221.
- Farm Animal Welfare Council, 1996. Report on the welfare of farmed fish. FAWC, Surbiton, Surrey.
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., & Faggio, C. ,2015. The Influence of Acute Handling Stress on Some Blood Parameters in Cultured Sea Bream (*Sparus Aurata* Linnaeus, 1758). *Italian Journal of Food Safety*, 4, 4174.
- Fevolden, S., Røed, K.H., Fjalestad, K.T., 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture* 205, 61–75.
- Figueiredo-Silva, A.C., Saravanan, S., Schrama, J.W., Panserat, S., Kaushik, S., Geurden, I., 2013. A comparative study of the metabolic response in rainbow trout and Nile tilapia to changes in dietary macronutrient composition. *Brit. J. Nutr.* 109, 816–826.
- Filho, D.W., 1996. Fish antioxidant defences. A comparative approach. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1735–1742.
- Fleig, R., Gottschalk, T., 2001. Schleien im Karpfenteich. *Fischer & Teichwirt.* 52, 129–131.
- Fleig, R., Gottschalk, T., 2001. Schleien im Karpfenteich. *Fischer & Teichwirt.* 52, 129–131.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 115–121.
- Flores Quintana, C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. *Rev.ictiol.* 10, 57–78.
- Foo, J.T.W., Lam, T.J., 1993. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol. *Aquaculture* 115, 133–143.
- Folch J., Lee M. y Sloane Stanley G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

- Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E.F., Reis-Henriques, M^a.A., Coimbra, J., 2003 Effect of cortisol on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus* L., after transference from freshwater to seawater. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55, 562-567.
- Forster, I., Ogata, H.Y., 1998. Lysine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture.* 161, 131-142.
- Fraser, D., Weary, D. M., Pajor, E. A., Milligan, B. N., 1997. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Animal Welfare.* 6, 187-205.
- Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Tinca tinca*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- FSBI (Fisheries Society of the British Isles), 2002. Fish Welfare. Breifing Report 2. Granta Information systems. [http:// www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf](http://www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf).
- Füllner, G., Pfeifer, M., 1994, Möglichkeiten zur Verbesserung der Ergebnisse bei der Aufzucht von Schleien (*Tinca tinca* L.) in Teichen. Teil 1: Einsömmerige Satzschleien. *Fischer & Teichwirt.* 45, 134-138.
- Furné, M. García-Gallego, M.C. Hidalgo, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezain, A. Sanz., 2009. Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition.* 15, 587-595.
- Furné, M., Sanz A., García-Gallego M., Hidalgo, M.C. , Domezain, A., Domezain, J., Morales, A.E. 2009. Metabolic organization of the sturgeon *Acipenser naccarii* A comparative study with rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 289, 161-166.
- Furné, M. García-Gallego, M.C. Hidalgo, A. Sanz., 2016. Effect of dietary macronutrient proportion on intermediate metabolism and oxidative status in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative study. Fish Physiology and Biochemistry.* 42, 1237-1248.
- Furuichi, M., Yone, Y., 1981. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 761-764.
- Gabryelak, T., Piatkowska, M., Leyko, W., Peres, G., 1983. Seasonal-Variations in the Activities of Peroxide Metabolism Enzymes in Erythrocytes of Fresh-Water Fish Species. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology.* 75, 383-385.
- Ghaddar, S., & Saoud, I. P., 2012. Seasonal Changes in Phosphorus Content of Fish Tissue as They Relate to Diets of Renal Patients. *Journal of Renal Nutrition.* 22, 67-71.
- García-Ceballos, E., Martín, J., Escudero, J.C., Perez-Regadera, J.J., 1998. Infillence of light intensity on the spatial disposition of individuals of a tench *Tinca tinca* (L.) population. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 45, 385-392.
- García-Gallego, M., Zamora, S., López, M.A., 1981. The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 68 (B), 457-460.
- García-Gallego, M., Sanz, A., 1987. Capítulo 4, Absorción intestinal en peces. En: *Nutrición en acuicultura II*. Ed. J. Espinosa de los Monteros y U Lubarta. Caicyt. Plan De Formacion De Tecnicos Superiores En Acuicultura. 123-171.
- García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Suárez, M.D., Sanz, A., de la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. II. Influence of dietary lipid level. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105(A): 171-175.
- García Mesa, S., Suárez, M. D., Rincón Cervera, M. A., Guil Guerrero, J. L., González, G., Cárdenas, S., & García Gallego, M. (2014). Time course of muscle fatty acid composition of cultured meagre (*Argyrosomus regius*) during the first sixteen months of a cage culture. *Grasas y Aceites*, 65.
- García, V., Celada, J.D., Gonzalez, R., Carral, J.M., Saez-Royuela, M., Gonzalez, A., 2015. Response of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed practical diets with different protein contents and substitution levels of fish meal by soybean meal. *Aquaculture Research.* 46, 28-38.
- Gatlin, D.M., 1987. Whole-body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the goldfish, golden shiner and fathead minnows. *Aquaculture.* 60, 223-229.

- Gela, D., Flajshans, M., Kocour, M., Rodina, M., Linhart, O., 2006. Tench (*Tinca tinca*) broodstock management in breeding station under conditions of pond culture: a review. *Aquaculture International*. 14, 195–203.
- Giles, N.; Street, M.; Wright, R.M., 1990. Diet composition and prey preference of tench, *Tinca tinca* (L.), common bream, *Abramis brama* (L.), perch, *Perca fluviatilis* L. and Review of the impacts of gambusia, redfin perch, tench, roach, yellowfin goby and streaked goby in Australia roach *Rutilus rutilus* (L.) in two contrasting gravel pit lakes: potential trophic overlap with wildfowl. *Journal of Fish Biology*. 37, 945–957.
- Gokcek, C.K., Akyurt I., 2007. The effect of stocking density on yield, growth, and feed efficiency of himri barbel (*Barbus luteus*) nursed in cages. *Isr. J. Aquacult.-Bamid*, 59, 99–103
- Gonzalez, G.; Maze, R.A.; Dominguez, J.; Pena, J.C., 2000. Trophic ecology of the tench, *Tinca tinca*, in two different habitats in North-West of Spain. *Cybium*. 24, 123–138.
- González-Rodríguez, A., Celada, J.D., Carral, J.M.; Sáez-Royuela, M., García, V., Fuertes, J.B. 2014. Evaluation of Soy Protein Concentrate as Replacement of Fish Meal in Practical Diets for Juvenile Tench (*Tinca tinca* L.). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci*. 14, 807–815.
- Goodwin, F.K., Post, R.M. 1983. 5-Hydroxytryptamine and depression: a model for the interaction of normal variance with pathology. *Br J Clin Pharmacol*. 15,393S-405S
- Grau, E.G., 1988. Environmental-Influences on Thyroid-Function in Teleost Fish. *American Zoologist*. 28, 329–335.
- Gray, R. H. and Dauble, D. D., 2001. Some Life History Characteristics of Cyprinids in the Hanford Reach Mid-Columbus River. *Northwest Science*. 75, 122–137.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A., Hole, M., 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*. 37, 477–484.
- Grigorakis, K., Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Mittakos, I., Nathanailides, C., 2011. Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *Int. J. Food Sci. Tech*. 46, 711–716.
- Grosch, U., Rennert, B., Hilge, V., 2000. Development and use of surface waters, and the fate of the related fisheries in the Berlin area of Germany. *Fisheries Management and Ecology*. 7, 179–188.
- Guardiola, F.A., Gonzalez-Parraga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2014. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 36, 120–129.
- Guerriero, G., Ciarcia, G., 2006. Stress Biomarkers and Reproduction in fish. *Fish Endocrinology Vol.2*. Edited by M Reinecke, G. Zaccone, & B. G. Kapoor Sci Publ Inc Enfield (NH). USA; Plymouth, U.K
- Guijarro, A.I., Lopez-Patino, M.A., Pinillos, M.L., Isorna, E., De Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J., 2003. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *Journal of Fish Biology*. 62, 803–815.
- Gumus, E., Ikiz, R., 2009. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Pakistan Veterinary Journal*. 29, 59–63.
- Gurure, R., Atkinson, J., Moccia, R.D., 2007. Amino acid composition of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) and the prediction of dietary requirements for essential amino acids. *Aquacult Nutr*. 13, 266–272.
- Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jokoby, W. B., 1974: Glutathione-S transferase. The first enzyme step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*. 249, 7130–7139.
- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino acids in food. *J Assoc Off Analyt Chem*. 72, 912–916.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.

- Hamackova, J., Lepicova A., Kozak P., Stupka Z., Kouril J., Lepic P., 2004. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca*) related to water temperature. *Vet. Med. Czech.*, 49, 467–472.
- Harper, C., Wolf, J.C., 2009. Morphologic Effects of the Stress Response in Fish. *ILAR* 50, 387–396.
- Hasanalipour, A., Eagderi, S., Poorbagher, H., Bahmani, M., 2013. Effects of Stocking Density on Blood Cortisol, Glucose and Cholesterol Levels of Immature Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 13, 27–32.
- Haylor, G.S., 1991. Controlled hatchery production of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): growth and survival of fry at high stocking density. *Aquaculture Research*. 22, 405–422.
- Hardy R.W., 2008. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of grains and oilseeds. In: Kamler E, Dabrowski K (eds) *Resource management. Natural, and human and material resources for the sustainable development of aquaculture*. EAS, Spec. Publ. No. 37, 5–14
- Harpaz, S., Uni, Z., 1999. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 124, 155–160.
- He, A.Y., Ning, L.J., Chen, L.Q., Chen, Y.L., Xing, Q., Li, J.M., Du, Z.Y. 2015. Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low- and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiological Reports*, 3, e12485.
- Henderson, W.R., 1994. The Role of Leukotrienes in Inflammation. *Annals of Internal Medicine*. 121, 684–697.
- Henderson, R.J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids, *Arch. Anim. Nutr.* 49, 5–22
- Hengsawat, K., Ward, F.J. & Jaruratjamorn, P., 1997. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture* 152, 67–76.
- Hemre, G.-I., Taranger, G.L., Hansen, T., 2002. Gonadal development influences nutrient utilisation in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* .214, 201–209.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, Sander lucioperca. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 282–292.
- Herrera, M., Ruíz-Jarabo, I., Hachero, I., Vargas-Chacoff, L. Amo, A. Mancera, J. M., 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquaculture International*. 20, 1041–1052.
- Herrerías Gutiérrez, J.M., Díaz Belmont, A. y Jiménez Sáenz, M. 1996. *Tratado de Hepatología Vol. I* Universidad de Sevilla.
- Herrero, M.J., Pascual, M. Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., 2005. Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity in tench (*Tinca tinca*). *Physiology & Behavior*. 84, 595–605.
- Hidalgo, M., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits: proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283.
- Hidalgo, M.C., Sanz, A., García-Gallego, M., Suárez, M.D., de la Higuera, M., 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. I. Influence of dietary carbohydrate level. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105(A), 165–169.
- Hidalgo, M.C., Trenzado, C. E., Furné, M., Beltrán, A., Manzaneda, C., García Gallego, M., Domezain, A., Sanz A., 2017. Tissue-specific daily variation in the oxidative status of sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A comparative study. *Fish Physiology and Biochemistry*. DOI: 10.1007/s10695-017-0356-1. Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 399–420.
- Holm, J.C., Refstie, T., Bo, S., 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 225–232.

- Howell, B.R. (1998). The effect of stocking density on growth and size variation in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*, and sole, *Solea solea*. In: ICES C.M. 1998/L: 10 mimeo.
- Hsieh, R.J., German, J.B., Kinsella, J.E., 1988. Lipooxygenase in Fish Tissue - Some Properties of the 12-Lipooxygenase from Trout Gill. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 680–685.
- Hossain, M.A., Almatar, S.M., James, C.M., 2011. Whole-body and egg amino acid composition of silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788) and prediction of dietary requirements for essential amino acids. *J Appl Ichthyol*. 27, 1067–1071.
- Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandoe, P., Turnbull, J.F., 2006. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*. 68, 332–372.
- Hurlburt, M.E., 1977. Role of Thyroid-Gland in Ovarian Maturation of Goldfish, *Carassius auratus* L. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*. 55, 1906–1913.
- Huynh, M.D., Kitts, D.D., Hu, C. and Trites, A.W., 2007. Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 146, 504–511.
- Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., Ito, F., 2003. The influence of rearing density on the stress response and diseases susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*; 220, 515–523.
- Irwin, S., O'Halloran, J., FitzGerald, R.D., 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178, 77–88.
- ITIS, 2018. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163348#null
- Ivanc, A., Haskovic, E., Jeremic, S., Dekic, R., 2005. Hematological evaluation of welfare and health of fish. *Praxis veterinaria*. 53, 191–202.
- Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C., 1997. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Iwama, G. K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M., 2006. Stress in fish. D.H. Evans, J.B. Claiborne (Eds.), *The Physiology of Fishes*, 3, CRC Press, Boca Raton (Florida), pp. 319–342.
- Janeway, C. A., 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, cop. 55–59.
- Javed, M., & Usmani, N., 2015. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* in habiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 237–242.
- Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A., Andersen, O., 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*. 141, 353–358.
- Jerónimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L., 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 71, 719–725.
- Jiménez Sánchez, J. L., 1997. Historia de la acuicultura en España. *AquaTIC*, nº 1.
- Jobling, M., 1994. *Fish bioenergetics*. Chapman and Hall. London. 309 pp.
- Johnston, I.A., Bernard, L.M., 1982. Ultrastructure and metabolism of skeletal muscle fibres in the tench: effects of long-term acclimation to hypoxia. *Cell Tissue Res* 227, 179–99.
- Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M., 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 110, 191–204.
- Jory, D., Iversen, E., Lewis, R., 1985. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic. *J World Maricult Soc*. 16, 87–94.
- Kamalam, B.S., Medale, F., Panserat, S., 2017. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*. 467, 3–27.
- Kaminski, R., Sikorska, J., Wolnicki, J., 2017. Diet and water temperature affect growth and body deformities in juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquaculture Research*. 48, 1327–1337.

- Kamler, E., Myszkowski, L., Kaminski, R., Korwin-Kossakowski, M., Wolnicki, J., 2006. Does overfeeding affect tench *Tinca tinca* (L.) juveniles? *Aquaculture International*. 14, 99–111.
- Kang, H.-W., Jo, Y.R., Kang, D.Y., Jeong, G.S., Jo, H.S., 2013. Spawning Characteristics and Artificial Hatching of Female Mottled Skate, *Beringraja pulchra* in the West Coast of Korea. *Development & Reproduction*. 17, 247–255.
- Karaas, P., 1990. Seasonal changes in growth and standard metabolic rate of juvenile perch, *Perca fluviatilis*, L. *Journal of Fish Biology*. 37, 913–920.
- Kaushik, S.J., 1998. Whole-body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquat Living Resour.* 11, 355–358.
- Kennedy, M., Fitzmaurice, P. 1970. The biology of the tench in Irish waters. *Proceedings of the Royal Irish Academy*. B, 69, 31–82.
- Khan, F.M.A., 2012. Effects of dietary arginine levels on growth, feed conversion, protein productive value and carcass composition of stinging catfish fingerling *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquacult Int.* 20, 935–950.
- Kissil, G.W., Lupatsch, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2001. Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 200, 363–379.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, *et al.*, 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev.* 35, 1291–1301.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajšhans, M., 2007. Comparison of microsatellite variability in wild and cultured tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*. 272, 147–151.
- Kottelat, M. 1997. European freshwater fishes. *Biologia* 52 Suppl. 5, 1–271.
- Kowalska, A., Zakęs, Z., Jankowska, B. y Demska-Zakęs, K., 2011. Effect of different dietary lipid levels on growth performance, slaughter yield, chemical composition, and histology of liver and intestine of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Czech J. Anim. Sci.* 56, 136–149.
- Krajnović-Ozretić, M., Ozretić, B., 1987. Estimation of the enzymes LDH, GOT and GPT in plasma of grey mullet *Mugil auratus* and their significance in liver intoxication. *Diseases of Aquatic Organisms* 3, 187–193.
- Kristoffersson, R., Broberg, S., Oikari, A. and Pekkarinen, M., 1974. Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike, *Esox lucius* (L.) in brackish water. *Ann. Zool. Fennici* 11, 220–223.
- Küçükbay, F.Z., Yazlak, H., Karaca, I., Sahin, N., Tuzcu, M., Cakmak, M.N., Sahin, K., 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquacult. Nutr.* 15, 569–576.
- Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Tesser, M.B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture*. 368/369, 28–35.
- Kumar, V., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S., 2007. Immunomodulation of Labeo rohita juveniles due to dietary gelatinized and non-gelatinized starch. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 341–353.
- Krogdahl, Å., Hemre, G.I., Mommensen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* 1, 103–122.
- Kvasnička, P., Flajšhans, M., Ráb, P., Linhart, O., 1998. Inheritance studies of blue and golden varieties of tench (Pisces: *Tinca tinca*). *Journal of Heredity*. 89, 553–556.
- Laiz-Carrión, R., Del Río, M.P.M., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology*. 298A, 105–118.
- Lall, S.P., 2000. Nutrition and health of fish. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19–22. Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Lajbner, Z., Linhart, O., Kotlík, P., 2011. Human-aided dispersal has altered but not erased the phylogeography of the tench. *Evol. Appl.* 4: 545–561

- Larsen, H.N., 1964. Comparison of various methods of hemoglobin determination on catfish blood. *Prog. Fish- Cult.* 26, 11–15.
- Larsen, H.N., Snieszko, S.F., 1961. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. *Trans. Am. Fish. Soc.* 90, 139–142.
- Latzko, E., y Gibbs, M., 1970. Alkaline C-Fructose-1,6-di-phosphatase. En: *Methods of enzymatic análisis*, Vol. 2, pp: 881-884. Ed. Bergmeyer, H. U. Academic Press. London.
- Lefrancois, C., Claireaux, G., Mercier, C., Aubin, J., 2001. Effect of density on the routine metabolic expenditure of farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 195, 269–277.
- Legate, N.J., Bonen, A., Moon, T.W., 2001. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, the American eel *Anguilla rostrata* and the black bullhead catfish *Ameiurus melas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 48–59.
- Li, D., Liu, Z., & Xie, C., 2012. Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology and Biochemistry.* 38, 511–20
- Lind, C., Cadenas, E., Hochstain, P. and Ernsten, L., 1990. D-T-Diaphorase: Purification, properties and function. *Methods Enzymol.* 186, 287–301.
- Lillie, R.D., 1954. *Histopathologic technique and practical histochemistry* Ed.2, New York: Blakiston.
- Liu, Y.J., Pan, B.S., 2004. Inhibition of fish gill lipoxigenase and blood thinning effects of green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52, 4860–4864.
- Liu, B., Jia, R., Han, C., Huang, B., Lei, J.L., 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 190, 1-8.
- Löhr G.W., Waller H.D., 1960. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer H.U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 2. Academic Press, London, pp. 636–641.
- Losordo T., Masser, M. Rakocy, J., 1998. Recirculating aquaculture tank production systems: an overview of critical considerations. SRAC Publication, Auburn p. 451.
- Lozano, L., 1990. Los peces fluviales de España. *Memorias de la Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid. Serie de Ciencias Naturales. Tomo V.*
- Lo Presti, R., Kohlmann, K., Kersten, P., Gasco, L., Lisa, C., and Di Stasio, L. 2012. Genetic variability in tench (*Tinca tinca* L.) as revealed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Ital. J. Anim. Sci.* 11, 103–108.
- Lu, K.-le, Xu, W.-na, Li, J.-yi Li, X.-fei, Huang, G.-qing, Liu, W.-bin, 2013. Alterations of liver histology and blood biochemistry in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets. *Fish Sci.* 79, 661–671.
- Lupatsch, I., Santos, G.A., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2010. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture.* 298, 245–250.
- Lukowicz, M.V. Proske, C.H.R., 1979. Production and Reproduction of Tench. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia A*, 14, 109–112.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670–1680.
- MacFarlane, R.B., Norton, E.C., 1999. Nutritional dynamics during embryonic development in the viviparous genus *Sebastes* and their application to the assessment of reproductive success. *Fishery Bulletin.* 97, 273–281.
- Mambrini, M., Kaushik, J., 1995. Indispensable amino acid requirements of fish – correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *J of Appl Ichthyol.* 11, 240–247.
- Manera M., Britti D., 2006. Assessment of blood chemistry normal range in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 69, 1427–1434.
- Mareš, J., Jirásek, J., Baránek, V., Fiala, J. And Kopp, R., 2007. Product effect of various feeds on two size classes of juvenile tench (*Tinca tinca*) under the conditions of intensive rearing. *Acta univ. agric. et silvic Mend. Brun. LV*, 1, 111–116.

- Marlowe AC, Caipang I, Monica F, Brinchmann V., 2009. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. *Aquaculture*. 295, 110–115
- Martínez-Álvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M. and Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 205, 3699–3706.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75–88.
- Mathan, R., Kumar, S. Kurunthachalam, Priya, M., 2010. Alterations in plasma electrolyte levels of a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to acidic pH, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92:1, 149-157
- Matty, A., 1985. *Fish Endocrinology*. Ed. Timber Press, Portland. USA. 265 p.
- Martemyanov, V.I., 1983. Dynamics of electrolyte concentration in freshwater fish under stress, in *Presnovodnye gidrobionty i ikh biologiya* (Freshwater Aquatic Organisms and Biology), Leningrad: Nauka., 237–248.
- Mazeaud, M. M., F. Mazeaud, and E. M. Donaldson, 1977. Primary and secondary effects of stress in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 106, 201–212.
- McDonald G. , Milligan, L. ,1997. Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: *Fish Stress and Health in Aquaculture* (ed. by G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter & C.B. Schreck), pp. 119–144. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- McCarthy, T.K., O'Farrell, M., McGovern, P., Buckley, P., Copley, L. 1996. Management of juvenile eel stocks for fishery enhancement. *Aquaculture Explained*. part 1, 7–40.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- McCormick, S., Shrimpton, J., Carey, J., O'dea, M., Sloan, K., Moriyama, S., Björnson, B., 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*. 168: 221–235.
- McManus, J. F. A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23, 99–108.
- Melis, R., Anedda, R., 2014. Biometric and metabolic profiles associated to different rearing conditions in offshore farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Electrophoresis*. 35, 1590-1598.
- Melo, J.F.B., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 145, 181–187.
- Melo, J.F.B., Lundstedt, L.M., Inoue, L.A.K., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2016. Glycolysis and gluconeogenesis in the liver of catfish fed with different concentrations of proteins, lipids and carbohydrates. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68, 1251–1258.
- Menezes, N.A., Figueiredo, J.L., 1980. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil IV. Teleostei (3)*. Museu de Zoologia–USP, São Paulo; 104 p.
- Metón, I., Mediavilla, D., Casearas, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223–232
- Merino, G.E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture*. 265, 176–186.
- Meyer, G., Fracalossi, D.M., 2005. Estimation of jundiá (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. *Sci Agr.* 62, 401–405.
- Michel, P. Oberdorff, T., 1995. Feeding habits of fourteen European freshwater fish species. *Cybiun.* 19, 5–46.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*. 153, 242–251.

- Milla, S., Mandiki, S.N., Hubermont, P., Rougeot, C., Mélard, C., Kestemont, P., 2009 Ovarian steroidogenesis inhibition by constant photothermal conditions is caused by a lack of gonadotropin stimulation in Eurasian perch. *General and Comparative Endocrinology*. 163, 242–250.
- Mock, A., Peters, G., 1990. Lysozyme Activity in Rainbow-Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Stressed by Handling, Transport and Water-Pollution. *Journal of Fish Biology*. 37, 873–885.
- Modra, H., Svobodova, Z., Kolarova, J., 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Veterinaria Brno*. 67, 215–226.
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., 2010. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 28, 613–621.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9, 211–268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. 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.
- Moon T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 129, 243–249
- Moon T.W., 2004. Hormones and fish hepatocyte metabolism: “the good, the bad and the ugly!”. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 139, 335–345.
- Morales, A.E., García-Rejón, L., de la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 87–93.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G., and Tocher, D.R., 2002. Increased activities of hepatic anti-oxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343–361.
- Myszkowski, L., Kaminški, R., Wolnicki, J., 2003. Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to anesthetic 2-phenoxyethanol. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 142–145.
- Myszkowski L., Kamler E. & Kwiatkowski S., 2010. Weak compensatory growth makes short-term starvation an unsuitable technique to mitigate body deformities of *Tinca tinca* juveniles in intensive culture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 20, 381–388.
- Nagae, M., Fuda, H., Ura, K., Kawamura, H., Adachi, S., Hara, A., Yamauchi, K., 1994. The Effect of Cortisol Administration on Blood-Plasma Immunoglobulin-M (Igm) Concentrations in Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 13, 41–48.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*. 38, 217–229.
- Nakandakare, I. B., Pieroni Iwashita, M. K., de Carla Dias, D., Tachibana, L., Tavares, Ranzani-Paiva, M.J., Romagosa, E., 2013. Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 35, 365–370.
- Nassour, I., Léger, C.L., 1989. Deposition and mobilisation of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Aquatic Living Resources*. 2, 153–159.
- Navarro, F. K. S. P.; Navarro, R. D., 2012. Importância do fotoperíodo no crescimento e na reprodução de peixes. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 36, 94–99.
- Ng, W.K., Hung, S.S.O., 1994. Amino acid composition of whole-body, egg and selected tissues of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*. 126, 329–339.
- Nielsen S. (ed); *Food Analysis Laboratory Manual*; Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, 2003.
- Njinkoue, J.M., Barnathan G., Miralles, J., 2002. Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 131, 395–402.

- Noaksson, E., Linderöth, M., Gustavsson, B., Zebühr, Y., Balk, L., 2005. Reproductive status in female perch (*Perca fluviatilis*) outside a sewage treatment plant processing leachate from a refuse dump. *Sci. Total Environ.* 340, 97–112.
- Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., 1976. Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *TISSUE & CELL.* 3, 511–530
- Nollet, L. (Ed.). 2004. *Handbook of Food Analysis, Second Edition -3 Volume Set.* Boca Raton: CRC Press.
- NRC (National Research Council). 2011. *Nutrient requirements of fish and shrimp.* Washington (USA): The National Academies Press.
- O'Neal, C.C., Weirich, C.R., 2001. Effects of low levels of salinity on production characteristics of fingerling channel catfish reared from fry. *North American Journal of Aquaculture.* 63, 156–160.
- Okereke, C., Edet, O., 2015. Effect of Stocking Densities on Growth and Feed Utilization of Hybrid Catfish (*Clarias gariepinus* X *Heterobranchus longifilis*) Fed at 1% Body Weight. *American Journal of Biology and Life Sciences.* 3, 211–217.
- Ostaszewska T., Korwin-Kossakowski M., Wolnicki J. 2006. Morphological changes of digestive structures in starved tench *Tinca tinca* (L.) juveniles. *Aquacult. Int.* 14, 113-126.
- Orozco, A., Linsler, P.J., Valverde, R. C., 1998. Salinity modifies hepatic outer-ring deiodinating activity in *Fundulus heteroclitus*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 839, 409–411.
- Özogul, Y., Özogul, F., Ççek, E., Polat, A., Kuley, E., 2009. Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea. *International Journal of Food and Science Nutrition.* 6, 464–475
- Padmini, E., Vijaya-Geetha, B., Usha-Rani, M., 2008. Liver oxidative stress of the grey mullet *Mugil cephalus* presents seasonal variations in Ennore Estuary. *Brazilian J. Med. and Biolog. Res.* 41, 951–955.
- Pantazis, P.A., 2012. Effect of Stocking Density on Growth and Survival of Sub-Adult Tench (*Tinca tinca* Linnaeus 1758). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh.* 64.
- Pantazis, P.A., Apokotou, E., 2009. The Effect of Substituting Fishmeal with Alternative Protein Sources on the Growth and Survival of Tench Juveniles (*Tinca tinca* Linnaeus 1758). *Animal Science Review. Official Journal of the Hellenic Society of Animal Production.* 40, 55–62.
- Pantazis, P.A., Hatzinikolaou, A., 2011. The effect of ration level on the growth and survival of sub-adult tench (*Tinca tinca* L. 1758) in a recirculating water system. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology.* 44, 125–130.
- Panserat, S., Perrin, A., Kaushik, S., 2002. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 132, 137–141.
- Papoutsoglou, S.E., Tziha, G., Vrettos, X., Athanasiou, A., 1998. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering.* 18, 135–144.
- Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K., Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defences in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J. Therm. Biol.* 22, 151–156.
- Parrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E., Gutiérrez, J., 1994. Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 266, R1944–R1950.
- Patriche, t. 2009. Importance of glucose determination in the blood of the cyprinids. *Lucrări științifice, Zootehnie și Biotehnologii*, vol. 42, 102–106
- Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P., Scott, A.P., 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common Dentex (*Dentex dentex*). *General and Comparative Endocrinology.* 118, 14–25.
- Perdikaris, C., Gouva, E., Paschos, I., 2010. Status and development prospects for indigenous freshwater finfish and crayfish farming in Greece. *Reviews in Aquaculture.* 2, 171–180.

- Pereira, B.F., Alves, A.L., Senhorini, J.A., Rocha, R.D., Pitol, D.L., & Caetano, F.H. 2014. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). *Int. J. Morphol.*, 32, 773–781.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 1999. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 179, 325–334.
- Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E. Cardenete, G., 2009. Growth performance, feed utilization and body composition of *Dentex dentex* fed on different macronutrient combinations. *Aquaculture Research*. 41 Pages 111–119.
- Pérez Martínez, L. 1995. Determinación cromatografica de aminiácidos previa reacción con fenilisocianato. Influencia de B-glucanasas sobre la digestibilidad de los aminoácidos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Perrow, M. R., A. J. D. Jowitt & S. R. Johnson, 1996. Factors affecting the habitat selection of tench in a shallow eutrophic lake. *J. Fish Biol.* 48, 859–870.
- Peter, M.C.S., 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 198–210.
- Piccolo, G., Bovera, F., De Riu, N., Marono, S., Salati, F., Cappuccinelli, R., Moniello, G, 2008. Effect of two different protein/fat ratios of the diet on meagre (*Argyrosomus regius*) traits. *Ital. J. Anim. Sci.* 7:363–371.
- Pimpicka, E. 1990. Formation of fecundity of tench *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drweckie. *Acta Ichthyol. Pisc.* 20, 53–75.
- Piedrahita, R., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*. 226, 35–44
- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K.O., Kinnula, V.L., 2000. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278, C118–C125.
- Pickering, A.D., 1984. Cortisol-Induced Lymphocytopenia in Brown Trout, *Salmo trutta*-L. *General and Comparative Endocrinology*. 53, 252–259.
- Pickering, A.D., Stewart, A., 1984. Acclimation of the Interrenal Tissue of the Brown Trout, *Salmo trutta*-L, to Chronic Crowding Stress. *Journal of Fish Biology*. 24, 731–740.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Christie, P., 1982. Recovery of the Brown Trout, *Salmo trutta*-L, from Acute Handling Stress - a Time-Course Study. *Journal of Fish Biology*. 20, 229–244.
- Pickering, A.D., 1992. Rainbow trout husbandry–management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125–139.
- Podhorec, P., Socha M., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Policar, T. W., Svinger, V., Gosiewski, G., Kouba, A., Kouril, J., 2012. The effects of water temperature and hormone treatments on circulating LH and ovulation in tench (*Tinca tinca*). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22, 791–796.
- Polakof S., Mommsen T.P., Soengas J.L., 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comp BiochemPhysiol A Mol Integr Physiol.* 160, 123–149.
- Poli, B. M., Parisi, G. Scappini, F., Zampacavallo, G., 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture international*. 13, 29–49.
- Poli, B. M., 2009. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Ital.J.Anim.Sci.* 8, 139–160.
- Postlethwaite, E.K., Mcdonald, D.G., 1995. Mechanisms of Na⁺ and Cl⁻ Regulation in Fresh-Water-Adapted Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Exercise and Stress. *Journal of Experimental Biology*. 198, 295–304.
- Pottinger, T.G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets. *Journal of Fish Biology*. 53, 728-742.
- 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.

- Pula, H.J., Trenzado, C.E., García-Mesa, S., Fallola, C., Sanz, A., 2018. Effects of different culture systems on growth, immune status, and other physiological parameters of tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture*. 485, 101–110.
- Quérat, B., 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. 27-35. (Davey, K.B, Peter, R.E. & Tobe, S.S., eds.) Ottawa, National Research Council of Canada.
- Quirós, M., Alvarino, J. M. R., 2000: Growth and survival of tench larvae fed under different feeding strategies. *J. Appl. Ichthyol.*, 16, 32–35. ISSN 0175-8659.
- Quirós, M., Alvarino, J. M. R., 2001. Crecimiento y supervivencia de juveniles de tenca *Tinca tinca* bajo condiciones controladas de cultivo mantenidas a diferentes densidades y alimentadas con y sin suplemento alimenticio. *Monografías de ICCM* 4, 329–333.
- Quirós, M., Nicodemus, N., Alonso, M., Bartolomé, M., Écija, J. L. And Alvarino, J.M. R., 2003: Survival and growth of juvenile tench (*Tinca tinca*) fed defined diets commonly used to cultural noncyprinid species. *J. Appl. Ichthyol.*, 19:149–151.
- Rad, F., Bozaoglu, S., Gözükar, S. E., Karahan, A., Kurt, G., 2006. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*. 255, 292–300.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Gilani, M.H.T., 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*. 39, 1506–1513.
- Ranta, E.; Nuutinen, V., 1984. Zooplankton predation by rock-pool fish (*Tinca tinca* L. and *Pungitius pungitius* L.): An experimental study. *Annals Zoologici Fennici*. 21, 441- 449.
- Redding, J.M., Schreck, C.B., Birks, E.K., Ewing, R.D., 1984. Cortisol and Its Effects on Plasma Thyroid-Hormone and Electrolyte Concentrations in Fresh-Water and during Seawater Acclimation in Yearling Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*. 56, 146–155.
- Rendón, P.M., Gallardo, J.M., Ceballos, E.G., Regadera, J.J.P., and García, J.C.E., 2003. Determination of substrate preferences of Tench, *Tinca tinca* (L.), under controlled experimental conditions. *J. Appl. Ichthyol*. 19, 138–141.
- Rennert, B., Kohlmann, K., Hack, H., 2003. A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *Journal of Applied Ichthyology*. 19, 161–164.
- Rey Vázquez, G., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell*. 39, 151–160.
- Ribeiro, F. M., 2016. Dissertação de Mestrado Engenharia Zootécnica: Estudos preliminares em tenca (*Tinca tinca*) Avaliação do crescimento e comportamento alimentar. Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro.
- Ringø, E. , Olsen, R. , Gifstad, T. , Dalmo, R. , Amlund, H. , Hemre, G. Y Bakke, A., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*. 16, 117–136.
- Robertsen, B., 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunology*. 9, 269–290.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C.R., 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*. 68, 117–129.
- Rocha, M.J., Reis-Henriques, M.A., 1999. Plasma levels of C-18-, C-19- and C-21-steroids in captive and feral female sea bass. *Journal of Fish Biology*. 55, 26-34.
- Roche, H., A. Buet, F. Ramade, 2003. Ecophysiological characteristics of a population of eels exposed to persistent organic pollutants in Camargue. *Revue d'écologie-La terre et la vie*. 58, 103–126.
- Rollin, X., Mambrini, M., Abbaudi, T., Larondelle, Y., Kaushik, J., 2003. The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Brit J Nutr*. 90, 865–876.
- Rosa, H., 1958. A synopsis of the biological data on the tench, *Tinca tinca* (L.,1758). *FAO* 58, 951.

- Rossi, F. 1986. The O₂ forming NADPH oxidase of phagocytes; nature, mechanisms of activation and function. *Biochem Biophys Acta*. 853, 65–89.
- Rowe, D.K., 2004. Potential effects of tench (*Tinca tinca*) in New Zealand freshwater ecosystem. NIWA Client Report: HAM2004-005. NIWA Project: BOP4221. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd., 28 pp.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloydevans, P., Holland, J.W., Vickers, P.J., 1995. Eicosanoids and Their Role in Immune Modulation in Fish - a Brief Overview. *Fish & Shellfish Immunology*. 5, 549–567.
- Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J., 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquaculture Research*. 33, 777–784.
- Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J., Chatain, B., 2003. Effects of rearing density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in intensive aquaculture. *Aquaculture* 221, 183–206.
- Saito, H., Yamashiro, R., Alasalvar, C., Konno T., 1999. Influence of diet on fatty acids of three subtropical fish, subfamily caesioninae (*Caesio diagramma* and *C. tile*) and family siganidae (*Siganus canaliculatus*). *Lipids*. 34, 1073–1082
- Sammouth, S., d'Orbcastel, E.R., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J.L., Fivelstad, S., Blancheton, J.P., 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering*. 40, 72–78.
- Sampaio, L.A., Tesser, M.B., Burkert, D., 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. *Cienc Rural*. 33, 757–761.
- Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., Serhan, C.N., 1987. Leukotrienes and Lipoxins - Structures, Biosynthesis, and Biological Effects. *Science*. 237, 1171–1176.
- Sánchez-Muros, M.J., Trenzado, C.E., Furné, M., Barroso, F.G., Sanz, A., 2014. Influence of low doses of the herbicide diuron on status oxidative of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Malondialdehyde as biomarker. *International Journal of Aquatic Science*. 5, 130–144.
- Sanchez-Muros, M.J., Sanchez, B., Barroso, F.G., Garcia-Mesa, S., Rufino-Palomares, E.E., Lupianez, J.A., Sanz, A., 2016. Effects of culture densities on feed demand, behavioural tests and on the hepatic and cerebral oxidative status in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Applied Animal Behaviour Science*. 185, 137–145.
- San Juan, F.J., 1995. Limiting factors in the development of natural tench (*Tinca tinca*) population in Spanish reservoirs. A review. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42, 19–25.
- Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García-Gallego M., de la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. III. Influence of the relative proportions of the energy yielding nutrients. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105, 177–182.
- Sanz, A., García Gallego, M., De la Higuera, M., 2000. Protein nutrition in fish: protein / energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 56, 275-282.
- Sanz, A., García Gallego, M., de la Higuera, M., Domezain, J. y Domezain, A. 2005. Patente: Piensos para la alimentación del esturión desde los seis meses de edad hasta tamaño comercial. N. de solicitud: 200100776. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 2025. Entidad titular: Universidad de Granada. Países a los que se ha extendido: Territorio nacional. Empresa/s que la están explotando: Piscifactoría Sierra Nevada.
- Sanz, A., Furné, M., Trenzado C. E., De Haro C., Sánchez-Muros M.J., 2012. Study of the oxidative state, as a marker of welfare, on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) subjected to handling stress. *J World Aquacult. Soc.* 43, 707–715.
- Sanz, A., Trenzado, C.E., Castro, H. Botello, López-Rodríguez, M.J., de Figueroa, J.M. Tierno., 2013. Relationship between brain and liver oxidative state and maximum lifespan potential of different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 165, 358–364.

- Saoud, I.P., Ghanawi, J., Lebbos, N., 2008. Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquaculture International*. 16, 109–116.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183–198.
- Schmidt, E., Schmidt, F. W., 1974. The importance of enzymatic analysis in medicine. Principles. In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 1. Academic Press, New York, p. 6–14.
- Schreck, C., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: *The Biology of Animal Stress*. Eds. G. MOBERG and J. MENCH. p 147–158.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138:32.
- Selye, H., 1946. The General Adaptation Syndrome and the diseases of adaptation. *J. clin. Endocrinol.* 6, 117–230.
- Selye, H. 1985. Stress: Eustress, distress and human perspectives. In: S. Day (ed). *Life stress*. Vol III., Reinhold, New York.
- Sharma, J.G., Chakrabarti, R., 2004. Role of stocking density on growth and survival of catla, *Catla catla*, and rohu, *Labeo rohita*, larvae and water quality in a recirculating system. *Journal of Applied Aquaculture* 14, 171–178.
- Se rot T., Gandemer G. and Demaimay M., 1998. Lipid and fatty acid compositions of muscle from farmed and wild adult turbot. *Aquaculture International*. 16: 331–343.
- Sharma, J.G., Chakrabarti, R., 2004. Role of stocking density on growth and survival of catla, *Catla catla*, and rohu, *Labeo rohita*, larvae and water quality in a recirculating system. *Journal of Applied Aquaculture* 14, 171–178.
- Sierra, A., Sáez-Royuela, M., Carral, J.M., Celada, J.D., Gaudioso, V.R., Muñoz, C., Pérez, J.R., 1995. Response of tench fed different diets under intensive conditions. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42, 207–210.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (Editor), *Oxidative stress*. London: Academic Press; 1985. p 1–8.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G., Ballantyne, J.S., 1990 Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 873–881.
- Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S. and Seiliez, I., 2013. Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 109, 1359–1372
- Small, B.C., Soares, J.H., 1998. Estimating the quantitative essential amino acid requirements of striped bass *Morone saxatilis*, using fillet A/E ratios. *Aquacult Nutr.* 4, 225–232.
- Small, B.C., Davis, K.B., Peters, B.C., 2008. Elucidating the effects of cortisol and stress on economically important trait in channel catfish. *New Am. J. Aquacult.* 70, 223–235.
- Sneddon, L.U., Braithwaite, V.A., Gentle, M.J., 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc. R. Soc. Lond. B*270, 1115–1121.
- Soengas, J.L., Barciela, P., Aldegunde, M., 1995. Variations in carbohydrate metabolism during gonad maturation in female turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biology.* 123,11–18.
- Steffens, W., 1995. The tench (*Tinca tinca*), a neglected pond fish species. *Journal of Applied Ichthyology.* 42, 161–180.
- Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M., Sanz, A., de la Higuera, M., 1995. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 111(A) 421–428.
- Suárez, M.D., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Furné, M., García-Mesa, S., Domezain, A., Alba, I., Sanz, A., 2015. Interaction of dietary energy levels and culture density on growth performance and metabolic and oxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Engineering.* 67, 59–66.
- Sturve, J., Stephensen, E., Förlin, L., 2005. Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Hepatology.* 4:4.

- Sturve, J., Almroth B. C., Förlin L., 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 446–52.
- Surrey, K., 1964. Spectrophotometric Method for Determination of Lipoxidase Activity. *Plant Physiology.* 39, 65.
- Svobodova, Z., Pravda, D. & Palackova, J., 1991 Unified Methods of Haematological Examination of Fish. No. 20. Vodnany: Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Czechoslovakia.
- Svobodova and J. Kolarova, (2004) A review of the diseases and contaminant related mortalities of tench (*Tinca tinca* L.). University of South Bohemia Ceske Budejovice, Research Ins. *Vet. Med. – Czech*, 49, 2004, 19–34.
- Swain, P., Behura, A., Dash, S., Nayak, S.K., 2007a. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 117, 137–141.
- Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P., Sahoo, S.K., Gupta, S.D., Meher, P.K., Sarangi, N., 2007b. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish & Shellfish Immunology.* 22, 38–43.
- Tacon A., 1998, FAO aquaculture production update. *Int. Aquafeeds.* 2, 13-16.
- Tan, C. , Sun, D., Tan, H., Liu, W., Luo, G., Wei, X., 2018. Effects of Stocking Density on Growth, Body Composition, Digestive Enzyme Levels and Blood Biochemical Parameters of *Anguilla marmorata* in a Recirculating Aquaculture System. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 18, 9–16.
- Tang, H., Chen, L., Xiao, C., & Wu, T., 2009. Fatty acid profiles of muscle from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) of different age. *Journal of Zhejiang University -Science B.* 10, 154–158.
- Tesser, M. B., da Silva E. M., Sampaio, L.A., 2014. Whole-body and muscle amino acid composition of Plata pompano (*Trachinotus marginatus*) and prediction of dietary essential amino acid requirements. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 27, 299–305.
- Tibaldi, E., Lanari, D., 1991. Optimal dietary lysine levels for growth and protein utilization of fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed semipurified diets. *Aquaculture.* 95, 297–304.
- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K.D., Inselmann, S., Rosenthal, H., 1999. Growth of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture.* 174, 355–367.
- Thibault, M., Blier, P.U., Guderley, H. E., 1997. Seasonal variation of muscle metabolic organisation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16, 139–155.
- Tidwell, J.H., Webster, C.D., Coyle, S.D., Schulmeister, G., 1998. Effect of stocking density on growth and water quality for largemouth bass *Micropterus salmoides* growout in ponds. *Journal of World Aquaculture Society* 29, 79–83.
- Thompson, K. R., Rawles, S. D., Metts, L. S., Smith, R., Wimsatt, A., Gannam, A. L., Webster, C. D. (2008). Digestibility of dry matter, protein, lipid, and organic matter of two fish meals, two poultry by-product meals, soybean meal, and distiller's dried grains with solubles in partial diets for sunshine bass, *Morone chrysops* X *M. saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39, 352-363.
- Tomás-Vidal, A., Martínez-Llorens, S., Jambriña, C., de Saja, R., Jover, M., 2011. Effects of dietary soybean meal on growth, nutritive efficiency and body composition of cultured tench (*Tinca tinca*). *J. Appl. Ichthyol.* 27, 892–896
- Tomasso, J.R., Wright, M.I., Simco, B.A., Davis, K.B., 1980. Inhibition of Nitrite-Induced Toxicity in Channel Catfish by Calcium-Chloride and Sodium-Chloride. *Progressive Fish-Culturist.* 42, 144–146.
- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernandez, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F., 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture.* 229, 55–65.

- Trenzado, C. Carrick, T. R., Pottinger, T. G., 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 332–340.
- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., Garcí'a-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture.* 254, 758–767.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E., Palma, J.M., de la Higuera, M., 2009. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology.* 149, 440–447.
- Trichet V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41, 356–372.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24–25.
- Turchini et al., 2007. G.M. Turchini, D.S. Francis, S.S. De Silva. 2007. Finishing diets stimulate compensatory growth: results of a study on Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* *Aquac. Nutr.* 13, 351–360
- Twitchen, I.D., Eddy, F.B., 1994. Effects of Ammonia on Sodium-Balance in Juvenile Rainbow-Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquatic Toxicology.* 30, 27–45.
- Usydus, Z., Szlifder-Richert, J., Adamczyk, M., 2012. Variations in proximate composition and fatty acid profiles of Baltic sprat (*Sprattus sprattus balticus*). *Food Chemistry.* 130, 97–103.
- Van de Nieuwegiessen, P.G., Boerlage, A.S., Verreth, J.A. J., Schrama, J.W., 2008. Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Applied Animal Behaviour Science* 115, 233–243.
- Van der Boon, J., Van den Thillart, G.E.E.J.M., Addink, A.D.F., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 100, 47–53.
- Van der Salm, A.L., Martinez, M., Flick, G., Wendelaar Bonga, S. E., 2004. Effect of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 241, 371–386.
- Van Rijn, J.A., Reina, R.D., 2010. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish & Shellfish Immunology.* 29, 534–538.
- Van Weerd J.H., Komen J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp Biochem Physiol. A*, 120, 107–112.
- Vasconi, M.; Caprino, F.; Bellagamba, F.; Busetto, M. L.; Bernadi, C.; Puzzi, C.; Moretti, V. M. 2015. Fatty acid composition of freshwater wild fish in subalpine lakes: a comparative study. *Lipids* 50, 283–302.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E.L., Parrinello, N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture.* 210, 231–243.
- Verdegem, M., Bosma, R., Verreth, J., 2006. Reducing water use for animal production through aquaculture. *Int. J. Water Resour. Dev.* 22, 101–113.
- Vijayan, M.M., Leatherland, J.F., 1988. Effect of Stocking Density on the Growth and Stress-Response in Brook Charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture.* 75, 159–170.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High Stocking Density Alters the Energy-Metabolism of Brook Charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture.* 88, 371–381.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 116, 89–95.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol.* 100C, 187–190.

- Volpato, G. L., Gonc-alves-de-Freitas, E. and Fernandes-de-Castilho, M. (2007). Insights into the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Orgs.* 75, 165–17.
- Wagner, T., Congleton, J.L., 2004. Blood-chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 61, 1066–1074.
- Wahlefeld, A.W, Bergmeyer HU, eds. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press Inc. 1831.
- Wallace, J.C., Kolbeinshavn, A.G., Reinsnes, T.G., 1988. The Effects of Stocking Density on Early Growth in Arctic Charr, *Salvelinus alpinus* (L). *Aquaculture.* 73, 101-110.
- Walpita, C.N., Grommen, S.V.H., Darras, V.M., Van der Geyten, S., 2007. The influence of stress on thyroid hormone production and peripheral deiodination in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology.* 150, 18–25.
- Walton, M. J., 1986. Metabolic effects of feeding a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol. Biochem.* 1, 7–15.
- Wang, J.X., Min, W.Q., Guan, M., Gong, L.J., Ren, J., Huang, Z., Zheng, H.P., Zhang, P., Liu, H.J., Han, Y.Z., 2006. Tench farming in China: present status and future prospects. *Aquaculture International.* 14, 205–208.
- Weatherley, A.H., 1959. Some features of the biology of the tench *Tinca tinca* (Linnaeus) in Tasmania. *Journal of Animal Ecology.* 28, 73-87.
- Wedemeyer GA, B.B., McLeay DJ, 1990. Stress and acclimation. In *Methods For Fish Biology*. Schreck, C. B. & Moyle, P. B., eds), Bethesda, MD: American Fisheries Society, 451–490.
- Wedemeyer, G., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 35–72.
- Wendelaar-Bonga, S.E.W., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- Westring, C.G., Ando, H., Kitahashi, T., Bhandari, R.K., Ueda, H., Urano, A., Dores, R.M., Sher, A.A., Danielson, P.B., 2008. Seasonal changes in CRF-I and urotensin I transcript levels in masu salmon: Correlation with cortisol secretion during spawning. *General and Comparative Endocrinology.* 155, 126–140.
- Weyts F.A.A., Flik, G., Verburg-Van Kemenade, B.M.L., 1998. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Developmental & Comparative Immunology.* 22, 563–572.
- Williams K.C., 2009. A review of feeding practices and nutritional requirements of postlarval groupers. *Aquaculture.* 292, 141–152.
- Wilson, R.P., Poe, W.E., 1985. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp Biochem Phys B.* 80, 385–388.
- Wilson, R.P., 2002. Amino acids and proteins. In: Halver JE, editor. *Fish Nutrition*. San Diego (California): Academic Press; 143–179.
- Winemiller, K.O., Rose, K.A., 1992. Patterns of life-history diversification in North American fishes—implications for population regulation. *Can J Fish Aquat Sci.* 49, 2196–2218.
- Wingfield, J.C., Grimm, A.S., 1977. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol-17 β in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 31, 1–11.
- Witeska, M., Kondera, E., Lugowska, K., Dmowska, A., 2015. Hematological effects of crowding stress in european chub *Leuciscus cephalus* l. and common carp *Cyprinus carpio* l. *Veterinarija ir Zootechnika.* 70.
- White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C., 1986. An evaluation of the Waters Pico–Tag system for the amino–acid analysis of food materials. *J Autom Chem;* 8:170–177.
- Wojtaszek, J., Dziewulska-Szwajkowska, D., Lozinska-Gabska, M., Adamowicz, A., Dzugaj, A., 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology.* 125, 176–183.
- Wolf J.C., Wolfe M.J., 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fi sh. *Toxicol Pathol.* 33,75–85.

- Wolnicki, J., Myszkowski, L., 1998. Evaluation of four commercial dry diets for intensive production of *Tinca tinca* (L.) juveniles under controlled conditions. . Pol. Arch. Hydrobiol. 45, 429–434.
- Wolnicki, J., Myszkowski, L., Korwin-Kossakowski, M., Kaminski, R., Stanny, L.A., 2006. Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. Aquaculture International. 14, 89–98.
- Wood-Gush, D.G.M., Dawkins, M.S., Ewbank, R., 1981. Self-Awareness in Domesticated Animals. Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, England.
- Wright Jr., J.R., O'Hali, W., Yang, H., Han, X.X., Bonen, A., 1998. GLUT-4 deficiency and absolute peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. Gen. Comp. Endocrinol. 111, 20–27.
- Wydoski, R.S., and Whitney, R.R. 2003. Inland Fishes of Washington. 2nd ed. American Fisheries Society, Bethesda, Md., and University of Washington Press, Seattle.
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., Yi, M. 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. 76, 368–379.
- Xu, X.L., Fontaine, P., Melard, C., Kestemont, P., 2001. Effects of dietary fat levels on growth, feed efficiency and biochemical compositions of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture International. 9, 437–449.
- Ya-yi, H., Xiao-dong, H., Yuzuru, S., 2001. Annual changes in plasma levels of cortisol and sex steroid hormones in male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 19, 217–221.
- Yildiz, H.Y., 2006. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum)after exposure to Leteux-Meyer mixture. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences. 30, 265–269.
- Zhang, C., Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Li, H., Zhang, L., 2008. Dietary lysine requirement of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Aquaculture. 283, 123–127.
- Zakes, Z., Jankowska, B., Jarmolowicz, S., Zmijewski, T., Partyka K., DemskaZakes K., 2010. Effects of different dietary fatty acids profiles on the growth performance and body composition of juvenile tench (*Tinca tinca* (L.)) Reviews in Fish Biology and Fisheries. 20, 389–401.