



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Máster Universitario en Acuicultura
Valencia

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Efecto de la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en el estrés oxidativo de la *Seriola dumerili*

Presentado por

Gómez Barbero, Eugenia

Para la obtención del

Máster Universitario en Acuicultura Valencia

Curso: 2019/2020

Fecha: Extraordinaria Diciembre

Tutor: Tomás Vidal, Ana

Cotutor: Martínez Llorens, Silvia

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis tutoras Ana y Silvia por todo su apoyo a la hora de realizar el trabajo.

A mi pareja por estar ahí siempre y ayudarme en todo lo que podía.

A mis padres y familiares por su apoyo y comprensión.

A Marina por el apoyo moral y su gran amistad.

Resumen

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la sustitución total y parcial del aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales sobre la supervivencia y el estrés oxidativo en la *Seriola dumerili*. Se trabajó con ejemplares de un peso inicial de 175 g que fueron alimentados con 4 piensos con un 0% (FO 100), 75% (FO 25) y 100% (con FO 0+ o sin probiótico FO 0) de sustitución de aceite de pescado por una mezcla de aceites de linaza, girasol y palma. Después de 109 días de experimentación se pudo comprobar que la supervivencia fue inferior en los tratamientos con el 100% de sustitución de aceite de pescado, independientemente de que tuviera probiótico o no. En referencia a la actividad de los enzimas antioxidantes, las cuales se analizaron en el hígado, intestino anterior y posterior, no se observaron diferencias significativas con excepción de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las dietas FO 100 y FO 0, en concreto en el tejido del hígado. En el resto de las actividades no hubo diferencias relevantes. En cuanto a los niveles de glutatión total, reducido y oxidado y el índice de estrés oxidativo analizados en el hígado, no se observó diferencias significativas. Con relación a los niveles de peroxidación lipídica analizados en el hígado, intestino anterior y posterior, músculo blanco y rojo, se pudo observar que existen diferencias significativas entre las dietas FO 100, FO 0 y FO 0+ en diversos tejidos. Respecto a los parámetros hematológicos, se observa que los niveles de triglicéridos, cortisol y hemoglobina, el número de glóbulos rojos y el porcentaje de hematocrito, no mostraron diferencias significativas entre las diferentes dietas. Si bien hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol entre los grupos que contenían aceite de pescado (FO 100 y FO 25), en la cantidad de glucosa de la dieta FO 25 en comparación con las dietas FO 100 y FO 0+ y en el nivel de lactato deshidrogenasa de la dieta FO 100 con respecto al resto. Así pues, una sustitución del 100% de aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales, disminuye la supervivencia de los peces, no siendo mejorada por la adición de *Lactobacilos brevis* y *L. buchneri*. En cambio, sí que benefició en la actividad de las enzimas antioxidantes como la glucosa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. En los parámetros referidos al estrés oxidativo, no se han observado diferencias significativas, por tanto, no se puede concluir que la sustitución haya afectado al estrés de los peces.

Palabras clave: estrés oxidativo, ácidos grasos, aceites vegetales, aceite de pescado, *Seriola dumerili*.

Resum

En el present treball s'ha estudiat l'efecte de la substitució total i parcial de l'oli de peix per una mescla d'olis vegetals sobre l'estrès oxidatiu en la *Seriola dumerili*. Es va treballar amb exemplars d'un pes inicial de 175 g que van ser alimentats amb 4 pinsos amb un 0% (FO 100), 75% (FO 25) i 100% (amb FO 0+ o sense probiòtic FO 0) de substitució d'oli de peix per una mescla d'olis de llinosa, gira-sol i palma. Després de 109 dies d'experimentació es va poder comprovar que la supervivència va ser inferior en els tractaments amb el 100% de substitució d'oli de peix, independentment que tinguera probiòtic o no. En referència a l'activitat dels enzims antioxidants, les quals es van analitzar en el fetge, intestí anterior i posterior, no es van observar diferències significatives amb excepció de la Glucosa-6-fosfate deshidrogenasa en les dietes FO 100 i FO 0, en concret en el teixit del fetge. En la resta de les activitats no va haver-hi diferències rellevants, encara que es va poder apreciar una tendència descendent a mesura que la substitució d'oli de peix era superior. Quant als nivells de glutatión total, reduït i oxidat i l'índex d'estrès oxidatiu analitzats en el fetge, no es va observar diferències significatives. En relació amb els nivells de peroxidació lipídica analitzats en el fetge, intestí anterior i posterior, múscul blanc i roig, es va poder observar que existeixen diferències significatives entre les dietes FO 100, FO 0 i FO 0+ en diversos teixits. Respecte als paràmetres hematològics, s'observa que els nivells de triglicèrids, cortisol i hemoglobina, el nombre de glòbuls rojos i el percentatge d'hematòcrit, no van mostrar diferències significatives entre les diferents dietes. Si bé va haver-hi diferències significatives en els nivells de colesterol entre els grups que contenien oli de peix (FO 100 i FO 25), en la quantitat de glucosa de la dieta FO 25 en comparació amb les dietes FO 100 i FO 0+ i en el nivell de lactat deshidrogenasa de la dieta FO 100 respecte a la resta. Així doncs, una substitució del 100% d'oli de peix per una mescla d'olis vegetals, disminueix la supervivència dels peixos, no sent millorada per l'addició de *Lactobacilos brevis* i *L. buchneri*. En canvi, sí que va beneficiar en l'activitat dels enzims antioxidants com la glucosa, la *glutatión peroxidasa i la catalasa. En els paràmetres referits a l'estrès oxidatiu, no s'han observat diferències significatives, per tant, no es pot concloure que la substitució haja afectat l'estrès dels peixos.

Paraules clau: estrès oxidatiu, àcids grassos, olis vegetals, oli de peix, *Seriola dumerili*.

Abstract

In the present work, the effect of the total and partial substitution of fish oil by a mixture of vegetable oils on oxidative stress in *Seriola dumerili* has been studied. We worked with specimens of an initial weight of 175 g that were fed with 4 feeds with 0% (FO 100), 75% (FO 25) and 100% (with FO 0+ or without probiotic FO 0) of substitution of olive oil. fish for a blend of linseed, sunflower and palm oils. After 109 days of experimentation, it was found that survival was lower in the treatments with 100% replacement of fish oil, regardless of whether it had a probiotic or not. Regarding the activity of antioxidant enzymes, which were analyzed in the liver, foregut and posterior intestine, no significant differences were observed except for Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the FO 100 and FO 0 diets, specifically in liver tissue. In the rest of the activities there were no relevant differences, although a downward trend could be seen as the substitution of fish oil was higher. Regarding the levels of total, reduced and oxidized glutathione and the oxidative stress index analyzed in the liver, no significant differences were observed. Regarding the levels of lipid peroxidation analyzed in the liver, fore and back intestine, white and red muscle, it was observed that there are significant differences between the FO 100, FO 0 and FO 0+ diets in various tissues. Regarding the hematological parameters, it is observed that the levels of triglycerides, cortisol and hemoglobin, the number of red blood cells and the percentage of hematocrit, did not show significant differences between the different diets. Although there were significant differences in cholesterol levels between the groups that contained fish oil (FO 100 and FO 25), in the amount of glucose in the FO 25 diet compared to the FO 100 and FO 0+ diets and in the lactate dehydrogenase level of diet FO 100 with respect to the rest. Thus, a 100% replacement of fish oil by a mixture of vegetable oils decreases the survival of the fish, not being improved by the addition of *Lactobacilli brevis* and *L. buchneri*. On the other hand, it did benefit the activity of antioxidant enzymes such as glucose, glutathione peroxidase and catalase. In the parameters referring to oxidative stress, no significant differences have been observed, therefore, it cannot be concluded that the substitution has affected the stress of the fish.

Key words: oxidative stress, fatty acids, vegetable oils, fish oil, *Seriola dumerili*.

Abreviaturas

AA → Ácido Ascórbico

ADN → Ácido Desoxirribonucleico

AGE → Ácidos Grasos Esenciales

AOAC → Association of Official Agricultural Chemists

ARA → Ácido Araquidónico

CAT → Catalasa

Col → Colesterol

DHA → Ácido Docosahexaenoico

EPA → Ácido Docosapentaenoico

FAME → Fatty Acid Methyl Ester

FO → Aceite de Pescado, Fish Oil

G6PDH → Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GB → Grasa Bruta

Glc → Glucemia

GPX → Glutation Peroxidasa

GR → Glutation Reductasa

GSH → Glutation Reducido

GST → Glutation Transferasa

GSSG → Glutation Oxidado

HCT → Hematocrito

Hb → Hemoglobina

HUFA → Ácido Grasos Altamente Insaturados, Highly Unsaturated Fatty Acids

LAC → Laboratorio de Acuicultura

LDH → Lactato Deshidrogenasa

LPO → Peroxidación Lipídica

MDA → Malondialdehído

MUFA → Ácidos Grasos Monoinsaturados, Monounsaturated Fatty Acid

NQO1 → DT-diaforasa (NAD(P)H-quinona oxidoreductasa)

PB → Proteína Bruta

PD → Proteína Digestible

PUFA → Ácidos Grasos Poliinsaturados, Poly-Unsaturated Fatty Acid

OSI → Índice de Estrés Oxidativo, Oxidative Stress Index

RAS → Sistema de Recirculación Acuícola

RBC → Glóbulos Rojos

ROS → Especies Reactivas del Oxígeno, Reactive Oxygen Species

SOD → Superóxido Dismutasa

tGSH → Glutation Total

XOD → Xantina Oxidada

XDH → Xantina Deshidrogenasa

ÍNDICE

Resumen.....	III
Resum.....	IV
Abstract	V
Abreviaturas.....	VI
1 Introducción	1
1.1 <i>Seriola dumerili</i>	1
1.2 Los aceites vegetales como fuente de sustitución del aceite de pescado	1
1.3 Efecto de la alimentación sobre el estrés	3
1.3.1 Mecanismos de defensas antioxidantes	4
1.3.2 Daños oxidativos causados a biomoléculas	6
1.3.3 Implicaciones del estrés oxidativo en la producción de peces	8
2 Justificación y objetivos del trabajo	9
3 Material y métodos	10
3.1 Condiciones experimentales y ensayo de crecimiento	10
3.2 Formulación y fabricación de las dietas	12
3.3 Análisis químicos	13
3.4 Análisis de actividades enzimáticas.....	13
3.5 Análisis peroxidación lipídica	14
3.6 Análisis hematológicos.....	14
3.7 Análisis estadístico	14
4 Resultados	15
4.1 Perfil de ácidos grasos de los piensos	15
4.2 Curva de supervivencia acumulada.....	17
4.3 Análisis de resultados de actividades enzimáticas.....	17
4.4 Análisis de resultados de glutatión y índice de estrés oxidativo.....	18
4.5 Análisis de resultados de niveles de peroxidación lipídica	19
4.6 Análisis de resultados de parámetros hematológicos	19
5 Discusión	20
6 Conclusiones.....	23
7 Bibliografía	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación (g kg ⁻¹) y composición proximal (%) de cada una de las dietas.	12
Tabla 2. Composición de ácidos grasos (g 100 g ⁻¹ en peso húmedo) de las dietas.....	16
Tabla 3. Actividades enzimáticas antioxidantes ¹ en el hígado, el intestino anterior y el intestino posterior de la seriola mediterránea (<i>S. dumerili</i>) alimentadas con las dietas experimentales durante 109 días.	18
Tabla 4. Glutathion total (tGSH), reducido (GSH), oxidado (GSSG) e índice de estrés oxidativo (OSI) en el hígado de la seriola mediterránea (<i>S. dumerili</i>) alimentada las dietas experimentales durante 109 días. 18	
Tabla 5. Niveles de peroxidación lipídica (nmol MDA g ⁻¹ tejido) en hígado, intestino anterior, intestino posterior, músculo blanco y músculo rojo de la seriola mediterránea (<i>S. dumerili</i>) alimentada con las dietas experimentales durante 109 días.....	19
Tabla 6. Parámetros hematológicos de <i>S. dumerili</i> alimentadas con las dietas experimentales. ...	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tanques de la línea 2 en el LAC, donde se llevó a cabo la prueba de crecimiento. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).	10
Figura 2. Tanques de la línea 2 en el LAC, donde se llevó a cabo la prueba de crecimiento. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).	11
Figura 3. Esquema de trabajo al final del experimento, donde se indica el número de ejemplares de <i>S. dumerili</i> utilizados en los diferentes análisis realizados. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).....	11
Figura 4. Preparación de la dieta FO 0+ con los probióticos. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).	13
Figura 5. Supervivencia acumulada. Los valores representan la media \pm error estándar (n = 7). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05), prueba de Bonferroni.....	17

1 Introducción

1.1 *Seriola dumerili*

La especie *Seriola dumerili*, es más conocida como pez limón o jurel del mediterráneo, está incluida en el género de los perciformes perteneciente a la familia *Carangidae*. Es una especie pelágica, comúnmente se puede encontrar en aguas oceánicas, durante el desove se acerca a las costas por protección y mayor alimentación para sus crías. Principalmente, su alimentación consta de peces y crustáceos de caparazón blando, aunque los ejemplares más pequeños (menores de 8 cm de longitud), debido a su tamaño y a su etapa de desarrollo se alimentan mayoritariamente de zooplancton (Badalamenti *et al.*, 1995). Tanto en Europa como en América del Norte es un pez muy apreciado. Su carne está considerada de alta calidad por el consumidor al tener un bajo contenido en grasa, y por el productor por poseer un gran valor comercial (Nakada, 2000).

La *Seriola dumerili* posee una alta tasa de crecimiento en condiciones de producción (Jover *et al.*, 1999), puede llegar a conseguir y superar el kg de peso al año de vida y los 6 kg de peso en 2,5 años, estos valores son 10 veces superiores a los de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) en el mismo período de crecimiento (Muraccioli *et al.*, 2000). Estos factores han contribuido a que se convierta en una especie interesante en acuicultura. La empresa Futuna Blue trabaja con esta especie y ha conseguido la producción y venta de alevines desde 2012 en España. Actualmente, dicha empresa es la única productora y comercializadora de alevines y juveniles de España. Si que es cierto, que hay otras empresas e instituciones investigadoras que están trabajando en conseguir buenos alevines, a su vez están mejorando el transporte para no se produzca una gran mortalidad. Esto es debido a que son bastante frágiles y hay que tener en cuenta a partir de qué edad y tamaño se puede realizar el traslado de sistemas de recirculación acuícola (RAS) a instalaciones marinas, las cuales no tienen el mismo control que en los sistemas RAS, que tienen todos los parámetros del agua y cantidad de alimentación controlados.

Los requerimientos de ácidos grasos esenciales (AGE) y metabolismo de esta especie, como de otras especies marinas, es de vital importancia, sobre todo el nivel de *n-3* ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) que contenga su alimentación, puesto que son fundamentales para numerosos procesos metabólicos, como para el correcto funcionamiento del sistema inmune, la formación de gónadas y el índice de fecundidad, el cual aumenta a medida que aumentan los niveles de HUFA. Los piensos para *Seriola* deben de contener un 15% de lípidos y de éstos el contenido en *n-3* HUFA tiene que estar entre 2,1% a 3,1% para obtener las mejores tasas de crecimiento y eficiencia del alimento (Jover *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1992; Vidal *et al.*, 2008).

1.2 Los aceites vegetales como fuente de sustitución del aceite de pescado

En los últimos años, los esfuerzos se han centrado en sustituir el aceite de pescado en los piensos por grasas o aceites procedentes de plantas y animales terrestres (Bowyer *et al.*, 2012). Esto es debido a que tanto las harinas como los aceites de pescado están realizados con peces salvajes procedentes de pesca extractiva. A lo que lleva, es que se está alimentando a los peces que se producen con fuentes de proteína y lípidos fabricados con peces salvajes, lo cual no es nada sostenible ni desde el punto de vista económico ni medioambiental. Por todo ello, gran parte de la investigación en acuicultura se ha enfocado en la sustitución de las harinas y los aceites de pescado en piensos para peces por otros más sostenibles, que no comprometan los parámetros productivos, ni la calidad de la carne. Se ha demostrado en numerosos estudios que los aceites vegetales son una opción viable para sustituir al aceite de pescado en piensos para peces, que no afecta ni al crecimiento de los peces ni a la eficiencia nutritiva del alimento siempre y cuando éstos se incluyan

en la proporción adecuada y aporten un nivel óptimo de AGE (Turchini *et al.*, 2009). El empleo de aceites vegetales se ha comprobado en otras especies tanto en marinas como *Psetta máxima* (Regost *et al.*, 2003) y *Diplodus puntazo* (Piedecausa *et al.*, 2007), como en salmónidos en el *Salmo salar* L. (Bell *et al.*, 2003; Torstensen *et al.*, 2004).

Los requerimientos específicos de ácidos grasos esenciales (AGE) son mayores en los que respecta al ácido docosahexaenoico (DHA) y al ácido eicosapentanoico (EPA) que, para el ácido araquidónico (ARA), esto es debido a que el DHA está presente en concentraciones muy altas en las membranas de células neurales y visuales y el EPA es un componente principal de los fosfolípidos estructurales de las membranas celulares. Lo que se quiere decir con esto es que son muy importantes porque están presentes en procesos esenciales para el organismo funcione correctamente. La insuficiencia de estos ácidos grasos afecta en mayor medida a los alevines de especies marinas ya que son fundamentales para el desarrollo neuronal, visual y estructural (Sargent *et al.*, 1999). Por otro lado, es importante también considerar las necesidades de ARA porque se ha visto que en algunas especies marinas existen unos requerimientos específicos.

Los aceites de palma, soja, colza y girasol son los más empleados en la sustitución de aceites de pescado por su precio más económico (Benedito Palos *et al.*, 2010). Se caracterizan por ser pobres en ácidos grasos *n-3* y ricos en *n-6* y *n-9*, principalmente ácido linoleico (18:2*n-6*) y oleico (18:1*n-9*). La proporción de cada uno en el pienso varía en función de factores nutritivos y económicos. La formulación de piensos basados en aceites vegetales deberá tener un *adecuado* balance entre ácidos grasos saturados y monoinsaturados así los peces lo utilizarán como fuente de energía. Por ejemplo, el aceite de soja es el aceite de origen vegetal de mayor disponibilidad en el mercado mundial. El aceite de palma es el más rentable económicamente, además, posee altos niveles de ácidos grasos saturados y en bajas cantidades de 18:2*n-6* (ácido linoleico). Esta composición lo convierte en candidato potencial para sustituir el aceite de pescado en piensos, puesto que su valor energético en especies como *Oncorhynchus mykiss*, genera un buen crecimiento. No obstante, su ausencia en *n-3* HUFA restringe su uso en elevadas cantidades (Karalazos, 2007).

El aceite de girasol contiene altos niveles de linoleico (65,7%) y consecuentemente, presenta la misma limitación que el aceite de soja. Su valor energético es similar e incluso superior. El aceite de colza representa una buena alternativa para sustituir el aceite de pescado, dado que es muy rico en oleico y bajo en linoleico (20%). El aceite de linaza, a diferencia del resto de aceites vegetales mencionados, contiene gran cantidad de ácido linolénico (18:3*n-3*). Se demostró que la sustitución del 50% de aceite de pescado por mezcla de aceites de palma y linaza, resultó efectiva para juveniles de *S. dumerili* sin afectar al crecimiento, la eficiencia del alimento y la salud de los peces (Monge-Ortiz *et al.*, 2018).

El aceite de colza puede llegar a ser un sustituto del aceite de pescado, como se comprobó en un estudio con salmón, donde piensos con un 50% de este aceite como fuente lipídica no afectaron a la tasa de crecimiento, la eficiencia del alimento ni la salud de dicha especie (Bell *et al.*, 2001).

Además de los aceites vegetales, una posible alternativa al aceite de pescado son las grasas de origen animal (mantecas de cerdo, restos de aves de corral o grasas de ternera y cordero), que además tienen un precio inferior (Benedito Palos *et al.*, 2010), aunque su producción es menor que la de los aceites. Las grasas de origen animal como sustitutas del aceite de pescado son ricas en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y en *n-6* ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), pero igual que los aceites vegetales, les faltan HUFA como el DHA y EPA (Bowyer *et al.*, 2012).

En los trabajos realizados por Huang (2008) y Bowyer *et al.*, (2012) se concluyó que, al sustituir el aceite de pescado por grasa de ave en su totalidad, enriquecida en ácido oleico (18:1*n-9*), no

hubo disminución en la tasa de crecimiento de los juveniles de *Seriola lalandi*. Por el contrario, en otro estudio en el que se sustituyó en su totalidad por grasa de vacuno, sí se vio afectado el valor nutricional y perfil de ácidos grasos de juveniles de trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Bayraktar & Bayir, 2012).

Una buena solución a las deficiencias individuales de ácidos grasos de los aceites y las grasas alternativas al aceite de pescado es la combinación de varias fuentes vegetales, así compensando sus deficiencias y mejorando el perfil de ácidos grasos (AG) de la mezcla, con el objetivo de sustituir la mayor cantidad de aceite de pescado posible a menor coste (Monge-Ortiz *et al.*, 2018).

Una alta sustitución de las harinas y aceites de pescado en los piensos para los peces carnívoros puede llegar a tener consecuencias negativas sobre el sistema inmune, el crecimiento y la salud intestinal de los peces. Para abordar este problema se añaden aditivos como son los probióticos en los piensos; lo cual está demostrado que fortalece el sistema inmune de los peces y mejora la digestibilidad de los nutrientes (Akhter *et al.*, 2015). De hecho, en otras especies como *Oreochromis niloticus* y *Solea senegalensis* se ha comprobado que el uso de probióticos en piensos mejora no solo la digestibilidad de los nutrientes, sino también al aumento del estrés de los peces (como se va a describir en el siguiente apartado) y por lo tanto a la supervivencia (Aly *et al.*, 2008).

1.3 Efecto de la alimentación sobre el estrés

En producción intensiva los peces pueden llegar a estar sometidos a muchos factores que les pueden inducir estrés como la densidad de población, la manipulación tanto en pesaje, como en procedimientos sanitarios, la alimentación, la calidad del agua (temperatura y oxígeno disuelto, o mínimos niveles de amoníaco, nitritos, nitratos...). Todos estos factores pueden afectar negativamente al bienestar de los peces y, por tanto, su productividad y rentabilidad causando un impacto económico importante (Bertotto *et al.*, 2010, 2011; Oliva-Teles, 2012). Pottinger *et al.*, (2003) mostró la importancia de investigar la viabilidad de los peces producidos selectivamente, como es el caso de la trucha arcoíris, con tal de reducir lo máximo posible su respuesta al factor estrés, seleccionando los genes de los peces más resistentes y mejorando las prácticas utilizadas en la acuicultura (Øverli *et al.*, 2006). Es de vital importancia estudiar los métodos para mejorar la inmunidad y/o disminuir las respuestas al estrés, especialmente con el uso de nutrientes y otros compuestos. Algunos de estos compuestos que ya han sido probados, son el ácido ascórbico en *Sparus aurata* (Ortuño *et al.*, 2003), en *Oncorhynchus mykiss* (Dabrowski *et al.*, 2004), o en *Colossoma macropomum* (Chagas & Val, 2006), vitamina E en *Sparus aurata* (Montero *et al.*, 2001); (Ortuño *et al.*, 2003), ácidos grasos en *Sparus aurata* (van Anholt *et al.*, 2004), β - glucanos en *Oncorhynchus mykiss* (Jeney *et al.*, 1997) o en *Pseudosciaena crocea* (Zeng *et al.*, 2016), o betaína en *Labeo rohita* (Kumar *et al.*, 2012).

Otros factores que producen estrés son los radicales libres, los cuales son especies químicas, moléculas o átomos, que existen de forma independiente, que contienen uno o más electrones desapareados en su último orbital electrónico (Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell *et al.*, 1992). En general, las especies reactivas más importantes son las derivadas del oxígeno ROS y a su vez las derivadas de compuestos nitrogenados, denominados especies de nitrógeno reactivo (RNS) (Halliwell y Gutteridge, 2000). La vida aerobia, depende del oxígeno y esto trae consigo la formación de especies de radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos “Especies Reactivas del Oxígeno” (ROS) que pueden interactuar con biomoléculas esenciales provocando alteraciones en su estructura y función, que pueden poner en peligro la integridad celular. Para tratar de minimizar estos efectos tóxicos, los sistemas biológicos cuentan con mecanismos de defensa antioxidantes que pueden o no ser enzimáticos, los cuales poseen la capacidad de controlar la presencia y los efectos de estos productos (Sies, 1986). Cuando los agentes oxidantes (ROS)

superan la capacidad de los mecanismos antioxidantes, a esta situación que se genera se le denomina estrés oxidativo. ROS se produce a velocidad constante controlada cuando el metabolismo celular se produce de manera normal (B. Halliwell *et al.*, 1993). En cambio, cuando los peces están en situaciones estresantes como alteraciones nutricionales, ROS puede llegar a aumentar radicalmente e inducir a estrés oxidativo. En consecuencia, las variaciones en la composición de la dieta (Bañuelos-Vargas *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2012; Kiron *et al.*, 2011; Lin & Shiao, 2007; López-Bote *et al.*, 2001; Menoyo *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2013; Ostbye *et al.*, 2011; S. Peng *et al.*, 2008; Rueda-Jasso *et al.*, 2004), el nivel de proteína/energía de los piensos (Alvarez *et al.*, 1998, 1999; C. Castro *et al.*, 2012; Pérez-Jiménez *et al.*, 2009) o las fuentes de energía no proteicas (Wang *et al.*, 2014) se han relacionado con modificaciones de la susceptibilidad de los peces a la peroxidación lipídica (LPO).

Por otra parte, las situaciones de estrés clásico producen alteraciones en los mecanismos de respuesta antioxidante (Davies, 1995; George *et al.*, 2000), promoviendo la activación de vías catabólicas con fines energéticos, lo que produciría un aumento de la tasa metabólica y de la producción de radicales libres, desembocando en último término en un equilibrio de los sistemas antioxidantes (Ross *et al.*, 2001).

1.3.1 Mecanismos de defensas antioxidantes

Antioxidante es la sustancia capaz de inhibir o retarda significativamente la oxidación de un sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2000). Los mecanismos de los sistemas antioxidantes actúan suprimiendo la generación de radicales libres, neutralizándolos y reparando los daños producidos (Peña de la A, 1997).

1.3.1.1 Enzimas antioxidantes

1.3.1.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

El superóxido dismutasa o SOD, pertenece a un grupo de metaloproteínas las cuales producen peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno causado por catalizar la dismutación del radical (O_2^-) y, consecuentemente, iniciando la cascada de generación de radicales del oxígeno.

Cabe destacar que no habiendo un aumento de glutatión reductasa y catalasa, no significa que no pueda haber una elevada actividad de SOD, la cual implique un aumento en la producción de H_2O_2 , pudiendo llegar a ser tóxico (Pérez Jiménez, 2008).

1.3.1.1.2 Catalasa (CAT)

La catalasa o CAT, es una enzima ferriporfirínica formada por cuatro subunidades. Esta enzima presenta una doble función: sirve de acelerante de la separación de H_2O_2 en agua y oxígeno y, además, produce la oxidación de compuestos reducidos tales como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles.

La catalasa se localiza prácticamente en la totalidad de los tejidos animales, mostrando concentraciones y actividades más elevadas en hígado y eritrocitos. Esta enzima está principalmente en los peroxisomas.

1.3.1.1.3 Glutatión peroxidasa (GPX)

El glutatión peroxidasa o GPX, juega un papel importante en la eliminación de H_2O_2 , a su vez es capaz de reaccionar con hidroperóxidos. Existen dos tipos de GPX: las selenio-dependientes y las selenio-independientes.

La GPX selenio-dependiente, tiene como requisito la presencia de glutatión reducido (GSH) para descomponer el H_2O_2 , al contrario que la catalasa que no le hace falta. Se localiza en la mayoría de los tejidos, siendo más importante su presencia en el hígado y corazón, encontrándose principalmente en el citosol, aun así, se ha encontrado también en mitocondrias y retículo endoplasmático, pero en menor medida. La GPX selenio-independiente no muestra gran afinidad por el H_2O_2 , mejor dicho, se cree que actúa como isoenzima de la glutatión transferasa (GST) (Carmagnol *et al.*, 1983). La GPX selenio-independiente se encuentra en el citosol, mitocondrias y en cualquier fracción celular que contenga membrana.

Según donde se encuentre el H_2O_2 dentro de la célula, esto determinara la actividad de la CAT como de la GPX. Ya que la catalasa se sitúa sobre todo en los peroxisomas y la GPX se ubica principalmente en el citosol (Halliwell y Gutteridge, 2000). En condiciones fisiológicas normales, la GPX es más relevante frente a la catalasa. En cambio, a elevadas concentraciones de H_2O_2 , aumenta considerablemente la actividad de la catalasa, según demostró el estudio de Cohen y Hochstein (1963).

1.3.1.1.4 Glutatión reductasa (GR)

La glutatión reductasa o GR, es una flavoproteína, la cual cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG), que usa NADPH como donador de H. La responsable de mantener la concentración intracelular de glutatión reducido (GSH) es la GR (Beutler, 1969; Staal *et al.*, 1969). Su distribución es muy parecida a la de la GPX, localizándose mayoritariamente en el citosol y en menor medida en mitocondrias y retículo endoplasmático.

1.3.1.1.5 Glutatión transferasa (GST)

La glutatión transferasa o GST, tiene un papel considerable en la detoxificación y excreción de xenobióticos, al generar conjugados con la glutatión impulsando su posterior eliminación del organismo. La forma que se encarga de la eliminación de xenobióticos es la citosólica, la cual se localiza en el retículo endoplasmático en la zona de eliminación de tóxicos endógenos.

1.3.1.1.6 DT-diaforasa (NAD(P)H-quinona oxidoreductasa) (NQO1)

La DT-diaforasa es conocida como NAD(P)H:quinona óxido reductasa o como NQO1, es una flavoproteína citosólica. Gracias a la gran plasticidad de su sitio activo, presenta especificidad a un amplio número de sustratos, lo que le otorga múltiples funciones fisiológicas (Faig *et al.*, 2001), apareciendo así implicada como sistema de detoxificación. La DT-diaforasa participa en el metabolismo endógeno de las quinonas, éstas poseen largas colas hidrofóbicas y en su estado reducido (hidroquinonas) protegen a las membranas celulares frente al daño por peroxidación lipídica, contrarrestando así los efectos prooxidantes del ciclo redox. La DT-diaforasa se caracteriza por su capacidad para utilizar NADH y NADPH como donador de electrones (Daniel, 1993). Esto rompe el ciclo redox prooxidante previniendo la formación de radicales superóxidos dependientes de las quinonas y que a su vez pueden llevar a la formación de peróxido de hidrógeno y radicales de hidroxilo.

1.3.1.2 Sustancias antioxidantes

Las sustancias antioxidantes son moléculas de gran importancia protectora frente a la oxidación, las cuales van siendo consumidas durante la protección, por lo que cada vez deben ser reemplazadas la gran mayoría a través de la alimentación (Felton, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2000). Existen dos tipos de moléculas antioxidantes, las hidrosolubles o las liposolubles.

1.3.1.2.1 Antioxidantes hidrosolubles

La **glutation** es un tripéptido formado por glutamina, cisteína y glicina. La cisteína tiene un grupo de los sulfhidrilo (-SH), el cual le concede la capacidad antioxidante, siendo este capaz de estar en su forma reducida (GSH) pasar a su forma oxidada (GSSG), consiguiendo transferir el poder reductor a los radicales libres para poder detener la cascada de oxidación. A su vez, la glutatión sirve como sustrato de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y dehidroascorbato reductasa, para la conversión de dehidroascorbato a ascorbato (Halliwell y Gutteridge, 2000).

El **ácido úrico** es el producto resultante hasta la oxidación de hipoxantina y xantina por acción de la xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa (XOD y XDH). Trabaja captando ROS del tipo anión OH, $^1\text{O}_2$, RO_2 (peroxilo) y OHCl/OCl^- , originando productos menos tóxicos.

Las **proteínas captadoras de iones metálicos**, entre estas podemos encontrarnos las captadoras de hierro, ferritina o transferrina; las captadoras de cobre como la ceruloplasmina, albúmina e histidina. Hay otras que están asociadas al mantenimiento de la homeostasis del cobre y zinc, la detoxificación de metales no esenciales como cadmio y mercurio, y la captación de OH^- y $^1\text{O}_2$, las cuales son las metalotioneínas, las catecolaminas y el glucagón.

La **vitamina C o ácido ascórbico (AA)** es capaz de pasar de estar reducido a oxidado mediando dos procesos oxidativos monovalentes consecutivos. Actúa como reductor de moléculas como anión OH, HO_2^- , O_2^- . El AA es recuperado gracias a la enzima dehidroascorbato reductasa con ayuda de la glutatión.

1.3.1.2.2 Antioxidantes liposolubles

La **ubiquinona o coenzima Q**, forma parte de la cadena de transporte electrónica y a su vez cuando esta reducida actúa como un potente antioxidante en las membranas (Cadenas, 1995).

Los **β -carotenos** derivan de la vitamina A o ácido retinoico, los cuales reaccionan con los radicales peroxilo y alcoxilo, interrumpiendo los procesos de peroxidación lipídica y quelan al $^1\text{O}_2$ (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La **vitamina E o tocoferol** es un compuesto formado por un grupo hidroxicromona y una cadena de fitilo. Tiene conocidas que se sepa ocho isoformas y se pueden dividir en dos grupos según el grado de saturación de la cadena fitilo. El α -tocóferol es más activo biológicamente hablando. Destaca por su capacidad de eliminación del $^1\text{O}_2$, entre otros. Es altamente conocido por su influencia a la hora de evitar la propagación de la peroxidación lipídica.

El ácido ascórbico interviene en la regeneración del tocoferol, por lo tanto, se vio que hay un efecto sinérgico entre el tocoferol y el ácido ascórbico (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.3.2 Daños oxidativos causados a biomoléculas

1.3.2.1 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son altamente susceptibles a los radicales libres, produciéndose radicales de azúcares por la reacción con el OH^- .

En condiciones normales, los monosacáridos son capaces de reducir el O_2 , autooxidándose y formando cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como O_2^- , la autooxidación es catalizada por metales de transición. La glucosa es capaz de unirse a los grupos amino terminal, iniciando su glicación y generando productos que son muy reactivos y alteran la estructura espacial proteica y

su funcionalidad. Tanto la autooxidación como la producción de estos productos están íntimamente relacionados a través de la interacción con metales de transición.

1.3.2.2 Proteína

Los radicales libres son capaces de actuar sobre residuos aminoácidos de proteínas originando entrecruzamientos catalíticos, cambios conformacionales y pérdida de función. Este daño proteico es rápidamente reparado por la actuación de proteasas, las cuales evitan la acumulación de proteínas dañadas, manteniendo el balance entre daño y reparación.

1.3.2.3 Ácidos nucleicos

OH^\cdot y H_2O_2 son los principales radicales libres implicados en el daño sobre el ADN. El efecto de estos radicales provoca alteraciones en el material genético, como son aumento de mutaciones, entrecruzamientos, roturas de cromátidas o pérdidas de fragmentos cromosómicos. Se ha observado en varias especies, que situaciones de estrés oxidativo dan lugar a un acortamiento de la longitud relativa de los telómeros, pudiendo considerarse como un bioindicador del estrés a largo plazo (Monaghan, 2010; von Zglinicki, 2002). La fragmentación de las cromátidas y las modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas son las alteraciones más frecuentes en el material genético.

1.3.2.4 Lípidos

La peroxidación lipídica es una de las consecuencias del estrés oxidativo, entendiéndose como la oxidación de ácidos grasos en un proceso autocatalítico e incontrolable que da lugar a la formación de hidroperóxidos de estos ácidos grasos y una serie de productos secundarios, incluyendo aldehídos (en especial el malondialdehído) cetonas y alcoholes. Todos los ácidos grasos del organismo son susceptibles a la peroxidación lipídica, pero se alterarán con más facilidad los insaturados, entre los que se encuentran los más apreciados en nuestra dieta, *n-3* y *n-6* HUFA.

La oxidación de los HUFA y PUFA en las biomembranas puede producir alteraciones funcionales y patológicas. Los peces con un elevado contenido en *n-3* HUFA son muy vulnerables al daño oxidativo, por lo tanto, resulta fundamental una alta protección antioxidante para el bienestar fisiológico de los animales.

El organismo posee dos mecanismos de defensa frente al fenómeno de la peroxidación lipídica: captación de radicales libres y un sistema enzimático que permite la destrucción de algunos compuestos intermediarios. Los captadores de radicales libres son antioxidantes como la vitamina A y, sobre todo, la vitamina E. La vitamina C suele estar unida a la vitamina E; de hecho, es una captadora hidrosoluble del O_2 , mientras que la vitamina E es una donadora de protones muy activa en medio liposoluble. El segundo mecanismo de defensa, la primera enzima implicada es el SOD, que dismuta el anión superóxido en H_2O_2 . El H_2O_2 es altamente tóxico para la célula, debe ser reducido por la catalasa que los transforme en agua y oxígeno (Corraze, 2004).

La peroxidación lipídica tiene múltiples efectos adversos. Puede provocar en los peces una reducción de la actividad de enzimas como amilasa, lipasa o tripsina. A su vez, a nivel metabólico pueden aparecer alteraciones como esteatosis hepática o inhibición de algunas enzimas del ciclo de Krebs. Sin embargo, el síntoma que se encuentran con mayor frecuencia es la carencia de vitamina E que puede haberse consumido en las reacciones de eliminación de radicales libres. Esto produce una distrofia muscular y lisis de los hematíes de los peces. Para el consumidor, a parte de la distrofia muscular, que hace que la textura de la carne sea inaceptable, es posible que la coloración de la carne disminuya y altere su sabor. A todo esto, se añade una disminución de la calidad dietética debida a la destrucción parcial de los ácidos grasos más valorados para la salud humana y la de vitamina E (Corraze, 2004).

1.3.3 Implicaciones del estrés oxidativo en la producción de peces

Se está asistiendo a un incremento notable del interés por el estudio de los mecanismos implicados en la defensa frente al estrés oxidativo en peces tanto por el interés de los datos que pueden aportar para el estudio de la evolución filogenética de estos importantísimos mecanismos de protección como por su aplicación en la detección de diversas fuentes de contaminación ambiental (Avci *et al.*, 2005; Basha & Rani, 2003; Berntssen *et al.*, 2003; Di Giulio *et al.*, 1998; Faig *et al.*, 2001; Filho *et al.*, 1993; Filho & Boveris, 1993; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 1992; Rabie *et al.*, 1972; Radi *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1987; Smith, 1976).

Los tejidos de peces contienen gran cantidad de lípidos poliinsaturados (PUFAs), esenciales para la funcionalidad de las membranas celulares. Una gran cantidad de PUFAs implica un elevado riesgo de estrés oxidativo, ya que los lípidos son las principales dianas de ROS (Abele & Puntarulo, 2004; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

Entre las circunstancias que pueden alterar el equilibrio ataque/defensa frente al estrés oxidativo las relacionadas con la alimentación (composición de la dieta) y/o su restricción (alimentación/ayuno) están recibiendo una amplia atención (Bayir *et al.*, 2011; Furné *et al.*, 2009; Guderley *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2003).

Diferentes estudios están verificando que la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales afecta o no al estrés oxidativo de diferentes especies.

En juveniles de *Dicentrarchus labrax*, se investigó acerca de la sustitución de aceite de pescado por mezcla de aceites vegetales sugiriendo que con unos niveles adecuados de sustitución los peces tendrían una adecuada salud, crecimiento y un óptimo funcionamiento del sistema inmune (Mourente *et al.*, 2007). En la alimentación del *Gadus morhua* se comparó el aceite de pescado tradicional con aceite de subproducto de salmón y aceite de colza, con lo que formularon las siguientes dietas: una solo con aceite de pescado, otra con aceite de pescado y de colza a partes iguales, una tercera dieta con solo aceite de salmón alta calidad y una última solo aceite de salmón baja calidad; y observaron que estas formulaciones no afectaban en gran medida a la salud, a pesar de que, sí que afecta negativamente en el nivel de fosfolípidos y en la composición de AG del hígado (Kjær *et al.*, 2014).

Otros estudios también han visto que las variaciones en nutrientes de la dieta, como carbohidratos y lípidos, puede afectar a la salud de los peces. En juveniles de *Dicentrarchus labrax* comprobaron que una variación en los carbohidratos y en los lípidos afectaron de manera diferente, pero ambos redujeron el estrés oxidativo (Carolina Castro *et al.*, 2015). En juveniles de *Pelteobagrus fulvidraco* estudiaron la proporción óptima de carbohidratos y lípidos en la dieta para que los peces tengan un buen estado de salud y a la vez poder abaratar el coste de ésta, que resultó ser la mejor, la que contenía de carbohidratos de un 24,5% a un 33,5% y de lípidos de un 6% a un 10% aproximadamente. Sin embargo, en las dietas que el contenido en lípidos era muy elevado se observó que puede deprimir significativamente la inmunidad no específica, causar estrés oxidativo y afectar la función hepática, y en el caso de las dietas con alto contenido en carbohidratos tuvo poca influencia sobre los parámetros hematológicos y el estado oxidativo, aun así, podría inducir hipertrofia de las células hepáticas (Wang *et al.*, 2014).

2 Justificación y objetivos del trabajo

La sustitución de harinas y aceites de pescado en alimentos acuícolas sin comprometer el rendimiento y la salud de los peces carnívoros sigue siendo un desafío, especialmente en especies carnívoras

Los aceites vegetales son ricos en ácidos grasos *n-6* y *n-9*, principalmente ácido linoleico (18:2*n-6*) y ácido oleico (OA, 18:1*n-9*), pero carecen de ácidos grasos *n-3*, que son esenciales para el óptimo crecimiento de peces y para el funcionamiento de su sistema inmune (Turchini *et al.*, 2009).

Los AG son precursores de las rutas de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, que por un lado mejoran la producción de eicosanoides inmunoactivos (por ejemplo, prostaglandinas y leucotrienos), mejoran la fluidez, estructura y función de las membranas celulares y, además, regulan la expresión génica y la señalización celular (Chen *et al.*, 2016; Monge-Ortiz *et al.*, 2018). Por lo tanto, la modificación de la composición de ácidos grasos de las membranas celulares dará como resultado alteraciones posteriores de las respuestas de las células inmunitarias. El mecanismo antioxidante que elimina las especies reactivas de oxígeno (ROS) es esencial para la inmunidad de los peces. La producción de ROS se produce a partir de varias fuentes en células vivas, como mitocondrias, NADPH oxidasa, 5-lipoxigenasa y otras enzimas (Novo & Parola, 2008). Un aumento de ROS puede dañar las estructuras celulares, incluida la degradación oxidativa de lípidos en las membranas celulares (es decir, peroxidación de lípidos), especialmente en presencia de grandes cantidades de HUFAs.

Con sustituciones de aceite de pescado moderadas no suelen haber alteraciones a nivel zootécnico en peces carnívoros de alto crecimiento como es la seriola. Sin embargo, a niveles elevados de sustitución puede conllevar un bajo crecimiento, un exceso de lípidos en algunos peces (Du *et al.*, 2017), así como a una reducción de la capacidad antioxidante, además de una menor respuesta inflamatoria e inmune en especies de alto crecimiento como la corvina (Tan *et al.*, 2019). Sin embargo, no se dispone de información al respecto en la seriola mediterránea. Por tanto, el objetivo general de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de las alteraciones sobre los factores zootécnicos, así como el estado oxidativo de la *Seriola dumerili* alimentada con piensos con elevadas sustituciones de aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales

3 Material y métodos

3.1 Condiciones experimentales

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de acuicultura (LAC) del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València. Los peces (juveniles de *S. dumerili*) se obtuvieron de la empresa Futuna Blue S.A. (Cádiz). Un mes antes de iniciar el experimento, los peces se aclimataron a las nuevas condiciones del laboratorio. Durante este periodo, los ejemplares se alimentaron con un pienso control a saciedad aparente dos veces al día durante seis días a la semana. Posteriormente, 300 juveniles con un peso medio inicial de 175 g fueron distribuidos aleatoriamente (25 peces/tanque) en 12 tanques de 1.750 L de capacidad (1.500 L de volumen de agua) (Figura 1). Se formularon 3 piensos experimentales y un pienso control, los cuales se asignaron de forma aleatoria y por triplicado a los tanques. El fotoperiodo fue natural y las condiciones de iluminación fue similar en todos los tanques.

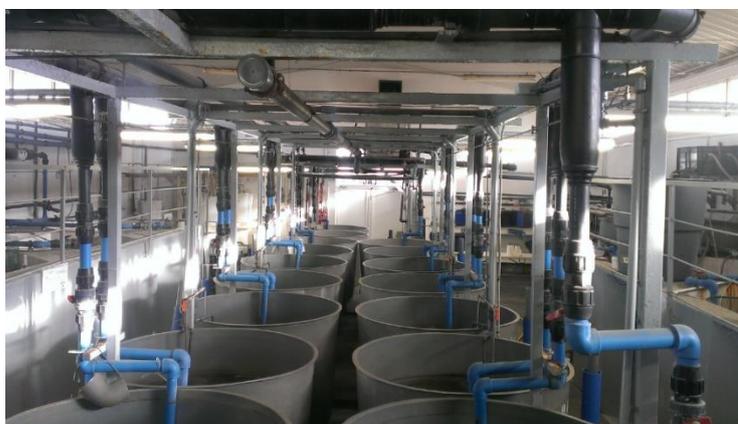


Figura 1. Tanques de la línea 2 en el LAC, donde se llevó a cabo la prueba de crecimiento. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).

Tres veces por semana durante los 109 días del experimento, se tomaron mediciones de la temperatura y concentración de oxígeno del agua, con un oxímetro portátil (OxyGuard Handy Polaris), ($\pm 0,5$ °C y $\pm 0,1$ g. L⁻¹, respectivamente). La salinidad, mediante un refractómetro (Hanna Instruments) (± 2); el pH, con una pH-metro portátil OxyGuard Handy pH ($\pm 0,01$); las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos, mediante test colorímetro (MERCK) ($\pm 0,01$).

La alimentación de los peces durante el experimento fue a saciedad aparente 2 veces al día (09:00 y 16:00 h), durante 6 días a la semana por un tiempo de 109 días. El control de peso de los peces se llevó a cabo mensualmente. Éste se realizó de la siguiente manera: se bajaba el nivel del agua de cada tanque hasta una altura aproximada de 15 cm (Figura 2); inmediatamente con un salabre los peces fueron capturados y colocados en cubas de plástico con agua de los mismos tanques. Se adicionó a razón de 30 mg L⁻¹, el anestésico aceite de clavo de olor (Guinama, Valencia, España) el cual contiene 87% de eugenol. Con los organismos anestesiados, se procedió a pesar y a registrar el peso de estos.



Figura 2. Tanques de la línea 2 en el LAC. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).

Al final de la prueba, 7 peces de cada tanque fueron sacrificados, de ellos se procedió a la toma de muestras de hígado, vísceras, grasa visceral y muestras de sangre tal como se indica en la Figura 3.

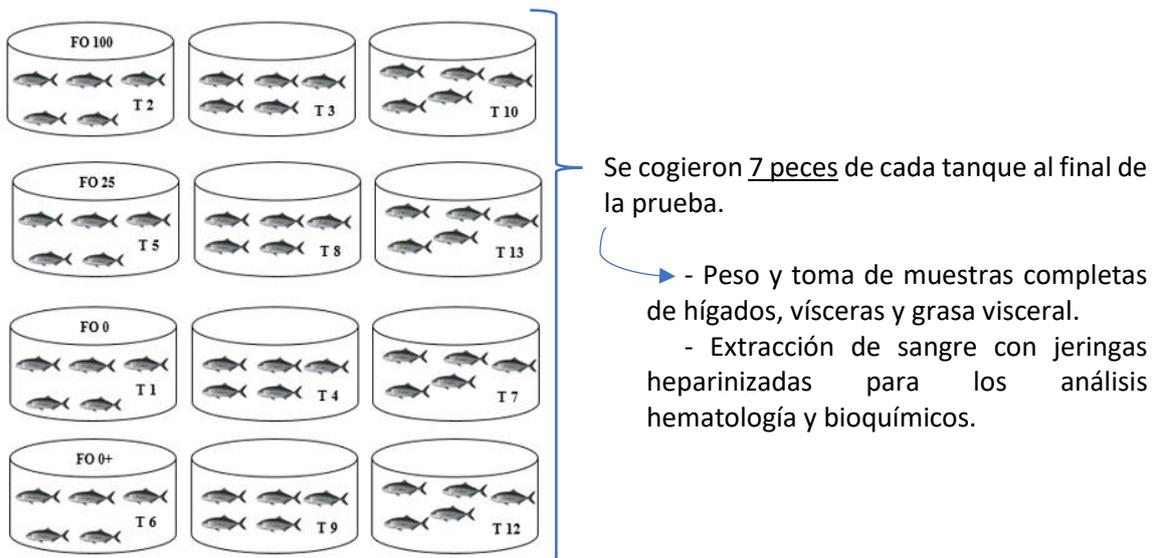


Figura 3. Esquema de trabajo al final del experimento, donde se indica el número de ejemplares de *S. dumerili* utilizados en los diferentes análisis realizados. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).

Para la conservación de las muestras se procedió de la siguiente manera: las de sangre se dejaron reposar a 4 °C durante 2 horas, y posteriormente, fueron enviadas al laboratorio ICTIOVET S.C.P para los análisis correspondientes. Las muestras de hígado, vísceras y grasa visceral fueron conservadas a - 5 °C.

Durante el experimento, la temperatura del agua fluctuó de 17,0 °C a 19,1 °C. La salinidad fue de 30 ± 1 (g L⁻¹). El nivel del oxígeno disuelto fue de $6,7 \pm 0,04$ (mg L⁻¹). El pH vario desde 7,5 a 7,8. Y los niveles de amonio, nitrito y nitratos se mantuvieron en $0,18 \pm 0,07$; $0,37 \pm 0,05$ y $93,2 \pm 6,88$ (mg L⁻¹).

3.2 Formulación y fabricación de las dietas

Se formularon cuatro dietas isolipídicas (15% GB, Grasa Bruta) e isoproteicas (59% PB, Proteína Bruta y 50% PD, Proteína Digestible). Las dietas contenían diferentes niveles de sustitución del aceite de pescado por mezcla de aceites vegetales. La formulación y composición de las dietas se muestra en la Tabla 1.

Las dietas fueron preparadas en la fábrica de piensos del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Para ello se empleó un extruder semiindustrial de la casa Cleextral modelo BC45.

Tabla 1. Formulación (g kg⁻¹) y composición proximal (%) de cada una de las dietas.

MATERIAS PRIMAS	DIETAS		
	FO 100	FO 25	FO 0
HARINA DE PESCADO	350	350	350
HARINA DE TRIGO	100	100	100
GLUTEN DE TRIGO	140	140	140
H. SOJA DESENGRASADA	185	185	185
H. DE CARNE DE IBÉRICO	110	110	110
ACEITE DE PESCADO	95	24	0
ACEITE DE LINAZA	-	28	38
ACEITE DE GIRASOL	-	21	28
ACEITE DE PALMA	-	22	29
^y MIX DE MULTIVITAMINAS Y MINERALES	20	20	20
COMPOSICIÓN PROXIMAL (% EN PESO HÚMEDO)			
MATERIA SECA	87,4	88,8	89,6
PROTEÍNA BRUTA	51,4	53,8	52,4
GRASA BRUTA	13,9	13,4	14,8
CENIZAS	7,3	9,1	7,4
HUMEDAD	12,6	11,2	10,4
ENERGÍA BRUTA (MJ KG ⁻¹)	21,2	21,1	21,7

Harina de pescado (proteína bruta, PB: 70,7%; lípidos bruto, Cl: 8,9%; carbohidratos, CHO: 6,0%; cenizas: 15,1%); harina de trigo (PC: 14,0%; Cl: 2,4%; CHO: 83,0%; cenizas: 2,4%); gluten de trigo (CP: 70,9%; Cl: 1,3%; CHO: 34,1%; cenizas: 1,5%); harina de soja (CP: 34,3%; CL: 1,3%; CHO: 34,1%; cenizas: 1,5%); harina de cerdo ibérico (PC: 66,4%; CL: 16,3%; cenizas: 1,9%).

^y Las vitaminas y la mezcla mineral (los valores son g kg⁻¹, excepto aquellos en paréntesis): Premezcla: 25; Colina, 10; DL-a-tocoferol, 5; ácido ascórbico, 5; (PO4) 2Ca3, 5. Composición premezcla: acetato de retinol, 1.000.000 IU kg⁻¹; calciferol, 500 UI kg⁻¹; DL-a-tocoferol, 10; menadiona sodio bisulfito, 0,8; hidroclorehidrato de tiamina, 2,3; riboflavina, 2,3; clorhidrato de piridoxina, 15; cianocobalamina, 25; nicotinamida, 15; ácido pantoténico, 6; ácido fólico, 0,65; biotina, 0,07; ácido ascórbico, 75; inositol, 15; betaína, 100; polipéptidos 12.

Es importante indicar que la dieta FO 0+ (pienso que no se muestra en la Tabla 1), tiene la misma composición que el pienso FO 0, y se diferencia de esta última porque contenía los probióticos *Lactobacilos brevis* y *L. buchneri*. Está se preparó empleando un pulverizador de plástico aplicando 5 ml de probióticos por cada 500 g de pienso seco (Figura 4).



Figura 4. Preparación de la dieta FO 0+ con los probióticos. Fuente: (Cruz Castellón, 2015).

3.3 Análisis químicos

Los análisis químicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Alimentación del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València. Estos correspondieron a los análisis de ácidos grasos de las dietas y composición de estas; se analizaron de acuerdo con los procedimientos de AOAC (1990): materia seca (105 °C hasta peso constante), cenizas (mediante incineración a 550 °C hasta peso constante), la proteína por el método de Dumas que consiste en la transformación de todas las formas de nitrógeno en N gaseoso por calcinación y su determinación es por conductividad térmica (Analizador de proteína LECO CN 628), y la grasa se extrajo con éter dietílico (sistema de extracción Ankom XT10). Los análisis se realizaron por triplicado.

Los ácidos grasos fueron determinados por síntesis directa de ésteres metílicos (FAME), se prepararon de acuerdo con O'Fallon *et al.* (2007), y se analizaron por cromatografía de gases en un cromatógrafo FINNIGAN FOCUS 6C (AI 3000).

3.4 Análisis de actividades enzimáticas

Se diluyeron muestras de hígado e intestino (n = 7) a 1: 9 y 1: 4, respectivamente, y se homogeneizaron a pH 7,8 en tampón Tris-HCl 100 mM enfriado con hielo que contenía EDTA 0,1 mM y 0,1% (v/v) Triton X-100. Todos los procedimientos se realizaron en hielo. Los homogeneizados se centrifugaron a 30.000 x g durante 30 min a 4 °C y los sobrenadantes resultantes se separaron en alícuotas y se almacenaron a - 80 °C para ensayos enzimáticos adicionales. Todas las actividades enzimáticas se midieron a 37 °C en un lector de microplacas Multiskan GO (Model5111 9200; Thermo Scientific, Nanjing, China).

Se ensayaron las actividades de glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49) como describen (Morales *et al.*, 1990). Las actividades de alanina aminotransferasa (ALAT, EC 2.6.1.2) y aspartato aminotransferasa (ASAT, EC 2.6.1.1) se midieron utilizando kits comerciales de Spinreact, España (ALAT/GPT, ref. 41283; ASAT/GOT, ref. 41273). Las actividades enzimáticas se determinaron controlando los cambios en la absorbancia de NADH o NADP a 340 nm.

Las enzimas del estrés oxidativo se analizaron como sigue: se midió la actividad de superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) a 550 nm por el método ferricitocromo C usando xantina/xantina oxidasa como fuente de radicales superóxidos (McCord & Fridovich, 1969). La actividad de catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó de acuerdo con (Aebi, 1984) midiendo la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno a 240 nm. La actividad del glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) se determinó a 340 nm midiendo la oxidación de NADPH como describen (Morales *et al.*, 2004; Benedito-Palos *et al.*, 2007). La actividad del glutatión peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9) se

ensayó como describen (Flohé & Günzler, 1984). El GSSG generado por GPX fue reducido por GR y la tasa de consumo de NADPH se controló a 340 nm.

Para la SOD, una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% de la tasa de reducción del ferricitocromo C. Todas las demás actividades enzimáticas se expresaron como unidades (CAT) o miliunidades (G6PDH, GPX y GR) por miligramo de proteína soluble hepática (actividad específica). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato por minuto en las condiciones del ensayo. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con (Bradford, 1976) como se describió anteriormente.

3.5 Análisis peroxidación lipídica

Las concentraciones en hígado e intestino de sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico se determinaron como marcador de peroxidación lipídica (LPO) siguiendo la metodología descrita por (Buege & Aust, 1978).

3.6 Análisis hematológicos

Al final del experimento 7 peces de cada tanque previamente anestesiados se les extrajo muestras de sangre por punción en la vena caudal usando jeringas heparinizadas como anticoagulante. Inmediatamente, las muestras fueron depositadas en eppendorf rotulados previamente heparinizados y almacenados empleando un sistema de refrigeración a 4°C para su posterior análisis.

Se realizaron análisis de las concentraciones de glucosa, LDH, colesterol y triglicéridos fueron determinados por espectrofotometría ultravioleta sensible. El recuento de número de glóbulos rojos fue determinado en cámara Neubauer, el porcentaje de hematocrito por método manual de microhematocrito, la hemoglobina mediante espectrofotometría y el cortisol por quimioluminiscencia. Todos estos análisis como se mencionó fueron realizados por el laboratorio ICTIOVET S.C.P.

3.7 Análisis estadístico

Los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), siguiendo el diseño completamente al azar. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó el test de Newman-Keuls, al nivel de significancia del 5%, empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII.

4 Resultados

4.1 Perfil de ácidos grasos de los piensos

En la Tabla 2, se puede observar que existen algunas diferencias en los AGS totales, los cuales fueron superiores en las dietas con aceites vegetales. En cuanto, a los MUFAs, también fueron superiores en las dietas con aceites vegetales. Dentro de los MUFAs, cabe destacar que, se encontraron concentraciones más elevadas de ácido oleico (18:1 n -9) y de ácido erúcico (22:1 n -9) en las dietas con aceites vegetales, aunque en el 18:1 n -7 no existía mucha variación. En caso de los ácidos grasos palmitoleico (16:1) y vaccénico (18:1 n -7) son superiores en la dieta FO 100, la cual es la que contiene un 100% de aceite de pescado. En los n -6 PUFA, el ácido linoleico (18:2 n -6) fue considerablemente mayor en las dietas con aceites vegetales. Referido a los HUFAs se puede observar cómo va disminuyendo la cantidad de EPA (20:5 n -3) y DHA (22:6 n -3) a medida que la sustitución avanza, esto es debido a que los vegetales que se incorporaron a las dietas no los contenían. Los peces carnívoros como la *S. dumerili* los obtienen de otros peces y estos de las algas marinas que son en sí la alimentación primaria, aunque no de los peces carnívoros, pero al alimentarse de peces herbívoros lo incorporan a su organismo.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (g 100 g⁻¹ en peso húmedo) de las dietas.

	DIETAS			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
14:0	0,319	0,249	0,185	0,160
15:0	0,002	0,003	0,002	0,002
16:0	1,839	2,045	2,122	1,894
17:0	0,052	0,025	0,018	0,016
18:0	0,494	0,510	0,528	0,482
Σ Saturados	2,707	2,831	2,855	2,554
16:1	0,411	0,289	0,204	0,180
18:1_{n-9}	2,643	3,096	3,663	3,270
18:1_{n-7}	0,384	0,307	0,273	0,245
22:1_{n-9}	0,031	0,004	0,007	0,008
Σ Ms	3,470	3,695	4,147	3,703
18:2_{n-6}	1,233	1,395	1,666	1,508
18:3_{n-6}	0,010	0,009	0,010	0,008
20:3_{n-6}	0,010	0,004	0,004	0,005
20:4_{n-6}	0,099	0,061	0,039	0,036
22:4_{n-6}	0,023	0,020	0,010	0,010
Σ n-6 PUFA	1,375	1,488	1,730	1,567
18:3_{n-3}	0,218	1,095	1,637	1,444
20:3_{n-3}	0,015	0,008	0,006	0,005
20:5_{n-3} EPA	0,566	0,453	0,311	0,283
22:5_{n-3}	0,126	0,076	0,047	0,046
22:6_{n-3} DHA	1,264	0,795	0,480	0,448
Σ n-3 PUFA	2,189	2,427	2,481	2,227
Σ n-3 HUFA	1,956	1,324	0,838	0,777
EPA/DHA	0,448	0,569	0,648	0,632
n-3/n-6	1,592	1,631	1,434	1,421

Σ Ms: Sumatorio de ácidos grasos monoinsaturados; Σ n-6 PUFA: Sumatorio de ácidos grasos poliinsaturados de cadena n-6; Σ n-3 PUFA: Sumatorio ácidos grasos poliinsaturados de cadena n-3. Σ n-3 HUFA: Sumatorio de ácidos grasos altamente insaturados de cadena n-3.

4.2 Curva de supervivencia acumulada

En la Figura 5, se presenta la supervivencia acumulada durante el estudio. Se observó diferencias significativas en la dieta FO 100 con las dietas FO 0 y FO 0+. Se muestra cómo en las dietas sin aceite de pescado hubo una menor supervivencia y en concreto, en la FO 0+ se puede ver que desde principio del estudio ya empezó a haber un descenso de esta, por lo que la adicción de probióticos en la dieta FO 0+ no supuso una mejora en cuanto a supervivencia.

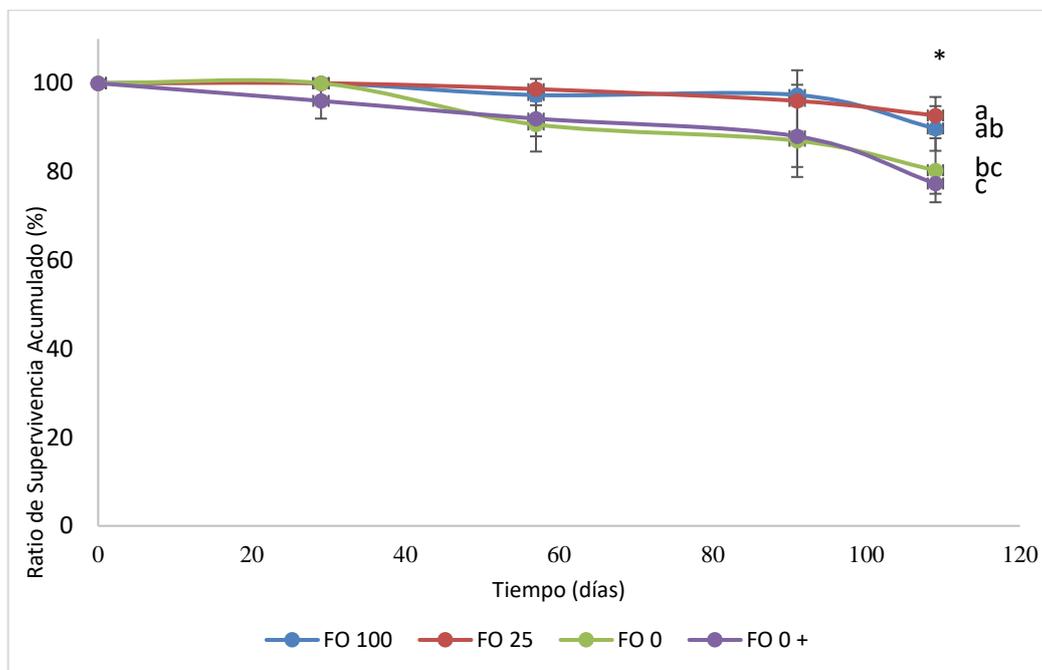


Figura 5. Supervivencia acumulada. Los valores representan la media \pm error estándar ($n = 7$). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$), prueba de Bonferroni.

4.3 Análisis de resultados de actividades enzimáticas

En la Tabla 3, se presentan los resultados de la actividad de los enzimas antioxidantes analizadas en diferentes tejidos; hígado, intestino anterior y posterior. Como se puede observar no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las enzimas con excepción de la *Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*, en concreto entre las dietas FO 100 y FO 0, la cual presentó una mayor actividad en la dieta FO 100 que en la dieta FO 0 en el tejido del hígado. Aunque en el resto de las actividades enzimáticas no hubiera diferencias significativas sí que se puede observar una tendencia descendente en las actividades, en algunos tejidos a medida que aumenta el nivel de sustitución de aceite de pescado.

Tabla 3. Actividades enzimáticas antioxidantes¹ en el hígado, el intestino anterior y el intestino posterior de la seriola mediterránea (*S. dumerili*) alimentadas con las dietas experimentales durante 109 días.

	DIETAS			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Catalasa				
Hígado	808 ± 97,1	695 ± 125,9	596 ± 90,4	746 ± 137,5
Intestino anterior	65,8 ± 13,27	72,8 ± 14,07	64,0 ± 14,07	42,3 ± 15,05
Intestino posterior	26,6 ± 12,15	30,5 ± 14,94	37,7 ± 11,50	12,0 ± 15,30
Superóxido dismutasa				
Hígado	127 ± 18,8	152 ± 18,8	121 ± 18,8	141 ± 91,8
Intestino posterior	74,7 ± 15,75	77,5 ± 19,42	56,5 ± 15,03	39,9 ± 19,22
Glutation reductasa				
Hígado	12,4 ± 0,749	12,0 ± 0,764	13,3 ± 0,746	11,6 ± 0,765
Intestino anterior	58,6 ± 8,56	55,5 ± 8,56	42,5 ± 8,56	30,0 ± 10,48
Intestino posterior	24,0 ± 2,98	23,3 ± 3,70	25,2 ± 2,80	22,0 ± 4,05
Glutation peroxidasa				
Hígado	50,6 ± 5,87	55,8 ± 7,66	58,2 ± 5,49	52,9 ± 7,98
Intestino anterior	435 ± 70,1	443 ± 70,1	324 ± 70,1	289 ± 79,4
Intestino posterior	154 ± 22,0	144 ± 22,0	126 ± 25,4	116 ± 20,7
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa				
Hígado	98,6 ± 11,89 ^a	88,4 ± 15,35 ^{ab}	54,7 ± 11,16 ^b	93,0 ± 15,19 ^{ab}
Intestino anterior	6,42 ± 1,40	5,24 ± 1,48	6,04 ± 1,40	4,03 ± 1,71
Intestino posterior	2,00 ± 0,595	2,85 ± 0,557	3,36 ± 0,557	2,40 ± 0,525

¹ Actividades enzimáticas expresadas como U mg de proteína⁻¹ para catalasa y superóxido dismutasa, y mU mg de proteína⁻¹ para glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los valores representan la media ± error estándar (n = 7). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05), prueba de Bonferroni.

4.4 Análisis de resultados de glutatión y índice de estrés oxidativo

En la Tabla 4, se presentan los resultados del glutatión total, reducido y oxidado y el índice de estrés oxidativo analizados en el hígado de los peces. Como se puede observar, aunque los resultados tuvieron cierta disminución en los peces alimentados con la dieta FO 0, no fueron significativos para llegar a ser una diferencia relevante.

Tabla 4. Glutatión total (tGSH), reducido (GSH), oxidado (GSSG) e índice de estrés oxidativo (OSI) en el hígado de la seriola mediterránea (*S. dumerili*) alimentada las dietas experimentales durante 109 días.

	DIETAS			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
tGSH (nmol g⁻¹ tissue)	1.254 ± 92,8	1.161 ± 84,7	936 ± 92,8	1.025 ± 92,8
GSH (nmol g⁻¹ tissue)	1.211 ± 91,8	1.125 ± 83,8	914 ± 91,8	987 ± 91,8
GSSG (nmol g⁻¹ tissue)	43,3 ± 6,26	35,5 ± 5,72	22,0 ± 6,26	37,7 ± 6,26
OSI (%)	7,09 ± 1,14	6,28 ± 1,04	4,52 ± 1,14	7,44 ± 1,14

Los valores representan la media ± error estándar (n = 7). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05), prueba de Bonferroni.

4.5 Análisis de resultados de niveles de peroxidación lipídica

En la Tabla 5, se presentan los resultados de los niveles de peroxidación lipídica analizados en diferentes tejidos hígado, intestino anterior, intestino posterior, músculo blanco y músculo rojo. Como se puede observar existen diferencias significativas entre las dietas FO 100, FO 0 y FO 0+ en diferentes tejidos.

Con respecto al hígado los niveles fueron mayores en la FO 100 que en la dieta FO 0+. En cambio, los niveles en el intestino anterior resultaron ser, al contrario, más altos en la dieta FO 0+ que en la FO 100. En lo que respecta al músculo rojo los niveles fueron mayores en la FO 100 que en las dietas FO 0 y FO 0+, entre estas últimas no hay diferencias.

Tabla 5. Niveles de peroxidación lipídica (nmol MDA g⁻¹ tejido) en hígado, intestino anterior, intestino posterior, músculo blanco y músculo rojo de la seriola mediterránea (*S. dumerili*) alimentada con las dietas experimentales durante 109 días.

	DIETAS			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Hígado	14,2 ± 0,949 ^a	11,8 ± 0,837 ^{ab}	11,3 ± 0,837 ^{ab}	10,7 ± 0,837 ^b
Intestino anterior	10,8 ± 1,86 ^b	12,6 ± 2,36 ^{ab}	11,7 ± 1,72 ^{ab}	18,2 ± 2,44 ^a
Intestino posterior	11,0 ± 1,59	12,5 ± 1,59	12,6 ± 1,50	11,4 ± 1,59
Músculo blanco	7,74 ± 1,33	6,25 ± 1,54	7,28 ± 1,33	7,15 ± 1,33
Músculo rojo	8,44 ± 0,468 ^a	7,18 ± 0,505 ^{ab}	5,90 ± 0,438 ^b	6,16 ± 0,413 ^b

Los valores representan la media ± error estándar (n = 7). Las diferentes letras de superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05), prueba de Bonferroni.

4.6 Análisis de resultados de parámetros hematológicos

En la Tabla 6, se muestran los resultados de los parámetros hematológicos. Se observa que los niveles de triglicéridos, cortisol y hemoglobina, el número de glóbulos rojos y el porcentaje de hematocrito, no mostraron diferencias significativas entre las diferentes dietas. Si hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol entre los grupos que contenían aceite de pescado (FO 100 y FO 25). También se encontraron diferencias significativas en la cantidad de glucosa de la dieta FO 25 en comparación con las dietas FO 100 y FO 0+, y en el nivel de lactato deshidrogenasa de la dieta FO 100 en comparación con las demás.

Tabla 6. Parámetros hematológicos de *S. dumerili* alimentadas con las dietas experimentales.

	DIETAS			
	FO 100	FO 25	FO 0	FO 0+
Col (mg/dL)	168,21 ± 28,40 ^a	151,36 ± 7,40 ^a	128,36 ± 7,40 ^b	124,42 ± 7,40 ^b
Glc (mg/dL)	71,62 ± 13,08 ^b	129,14 ± 13,08 ^a	97,21 ± 13,08 ^{ab}	82,57 ± 13,08 ^b
Trig (mg/dL)	119,36 ± 44,22	103,79 ± 24,70	107,57 ± 23,53	106,57 ± 19,08
Cortisol (µg/dL)	6,95 ± 5,84	10,21 ± 7,30	7,01 ± 7,73	10,25 ± 4,87
LDH (mg/dL) 104	0,23 ± 0,21 ^a	0,10 ± 0,071 ^b	0,08 ± 0,08 ^b	0,12 ± 0,13 ^b
Hb (g/dL)	10,12 ± 1,40	9,56 ± 2,04	9,84 ± 1,81	8,79 ± 1,71
RBC (n°·106/µL)	2,87 ± 0,27	2,79 ± 0,50	2,95 ± 0,40	2,73 ± 0,44
HCT (%)	38,89 ± 5,41	42,00 ± 5,41	39,61 ± 4,94	37,41 ± 5,41

Los valores representan la media ± error estándar (n = 7). Diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05). Prueba de Newman-Keuls. Col: colesterol; Glc: glucemia; Trig: triglicéridos; LDH: lactato deshidrogenasa; Hb: hemoglobina; RBC: glóbulos rojos; HCT: hematocrito.

5 Discusión

La viabilidad de la sustitución de aceite de pescado por mezcla de aceites vegetales ha sido estudiada en muchas otras especies como *Sparus aurata* (Mourente *et al.*, 2007), *Dicentrarchus labrax* (Kjaer *et al.*, 2014) y *Gadus morhua* (Kutluyer *et al.*, 2017), incluyendo mezclas muy similares a las del presente experimento (linaza, girasol y palma) y no encontrando diferencias en el crecimiento con sustituciones totales. También se han desarrollado previos experimentos similares en juveniles de *Seriola dumerili* (Monge-Ortiz *et al.*, 2018) sin que esta sustitución produjera efectos adversos en el crecimiento, o en los parámetros nutritivos, incluso a niveles de sustitución del 100% de aceite de pescado, ya que los piensos contenían un 52,5% de harina de pescado, lo que aportaba suficientes HUFAs para satisfacer las necesidades de la seriola incluso en la ausencia de aceite de pescado. Al igual que en el trabajo anterior del 2017, no hubo diferencias en el crecimiento, luego un 35% de harina de pescado al contener aproximadamente un 10% de aceite de pescado es suficiente para no perjudicar el crecimiento de estos peces. Aunque las necesidades nutricionales de *S. dumerili* aún se desconocen, especialmente en lo que se refiere a AGE, en estos trabajos se ha comprobado que es posible realizar dietas para seriola spp. con niveles de EPA y DHA alrededor de 0.5% (Guillaume *et al.*, 2004), incluso en el caso de EPA, podría ser con niveles de 0.3%, ya que no se han encontrado diferencias en el crecimiento. En cambio, aunque en el crecimiento no hubo diferencias, sí que las hubo en la supervivencia, disminuyendo ésta en las dietas que no contenían aceite de pescado. Al igual que se ha observado en otras especies se ven afectadas negativamente por la sustitución total de aceite de pescado (Nasopoulou & Zabetakis, 2012; Sales & Glencross, 2011).

Si bien la sustitución del aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales no afectó el crecimiento y los parámetros nutricionales de la seriola mediterránea, sí tiene un efecto negativo en la supervivencia, podría explicarse por la deficiencia de ácidos grasos esenciales en dietas sin aceite de pescado, ya que esta reducción pudo conducir a la inmunosupresión en peces (Montero *et al.*, 1998, 2003), como se ha visto en otras especies de peces. Además, los probióticos adicionados no fueron del todo adecuados, ya que en el caso de la dieta FO 0+, no hubo una reducción en la mortalidad, como se hubiera esperado si los probióticos hubiesen sido efectivos. El motivo de la baja supervivencia puede estar relacionado al bajo contenido en HUFAs de las dietas. Esto es debido a que estos ácidos grasos son precursores de distintos compuestos altamente bioactivos llamados eicosanoides. Estas moléculas son compuestos similares a hormonas producidas por las células para actuar de inmediato y están involucradas en una variedad de actividades fisiológicas, incluidas las respuestas inmunes e inflamatorias, la actividad hematológica y cardiovascular, la reproducción y la función renal y neural (Tocher, 2003). También se ha comprobado en otros estudios que la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales aumenta la deposición de lípidos en la lámina propia intestinal anterior alterando la respuesta de la mucosa y modificando el perfil de la microbiota (Monge-Ortiz *et al.*, 2018), lo que puede causar efectos sobre el sistema inmune y la supervivencia de los peces. En especies de agua dulce como la trucha (Huang *et al.*, 2016) no se observó que la sustitución de lípidos afectará negativamente a los juveniles de *Oncorhynchus mykiss*, aunque la dieta con aceite de linaza obtuvo mayor supervivencia en comparación con la dieta control, la cual contenía aceite de pescado. Esto se debe a que los peces sintetizan *n*-3 HUFAs partir del ácido α -linolénico, aunque esto no es posible en peces marinos o se realiza a una velocidad inferior a la necesaria.

A pesar de las diferencias en supervivencia observadas en los diferentes tratamientos, no se han hallado diferencias relevantes en los parámetros de estrés oxidativo. Se ha demostrado en diversos estudios que sustituir el aceite de pescado en la dieta con aceite vegetal, como aceite de soja, aceite de colza y aceite de palma, puede afectar negativamente a la peroxidación de lípidos y estrés

oxidativo, lo que podría conducir a una función de membrana deteriorada y la inactivación de enzimas antioxidantes endógenas en el pescado (Mu *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2016). No obstante, en el presente experimento se puede apreciar que la actividad de las enzimas antioxidantes tiende a disminuir a medida que aumenta la sustitución de aceite de pescado. Dicha reducción de actividad enzimática antioxidante puede afectar a la hora de tener defensas contra el estrés, puesto que, dispone de una menor protección. Esto podría estar relacionado con la disminución de la supervivencia en las dietas sin aceite de pescado. Tan solo se mostraron diferencias significativas en lo que respecta a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en la que se puede observar como la glucosa es mayor en la dieta FO 100 que en la FO 0. También se puede observar cómo, aunque no hay diferencias con la FO 0+, numéricamente está más cercana a la FO 100, tanto en la glucosa como en la glutatión peroxidasa como en la catalasa. Esto puede ser debido a que los probióticos añadidos a la dieta hayan sido beneficiosos, aunque no haya pasado lo mismo con las otras enzimas. SOD, CAT y GPX se consideran importantes enzimas antioxidantes en el pez, y juegan un papel importante en la eliminación de radicales libres, peróxido de hidrógeno y superóxido producidos por el metabolismo en peces (Larbi Ayisi *et al.*, 2018). En otros estudios (Khezrian *et al.*, 2020) se observó que la actividad enzimática tanto de SOD como de CAT aumentó para ambas enzimas las actividades conforme aumentaba el niveles de sustitución de aceite de pescado, siendo mayores en la dieta con aceite de palma que la de aceite de pescado. En reproductores de *Oncorhynchus mykiss* (Chen *et al.*, 2020) observaron que la SOD y GPX aumentaban conforme se incrementaban los niveles de sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales. En este mismo estudio, respecto a la CAT, siguió una tendencia polinomial, la cual se incrementaba a niveles más altos de sustitución. Al contrario que en el presente experimento, en los trabajos realizados por Chen *et al.*, (2020), la sustitución del aceite de pescado en la dieta por aceite de soja aumentó la actividad GPX hepática y la expresión génica, así como el contenido de MDA, pero disminuyó la actividad CAT hepática y la expresión génica, lo que sugiere que el estrés oxidativo podría inducirse debido al grave desequilibrio entre la producción de especies reactivas y defensas antioxidantes. En todo caso, se muestra una mayor tendencia a haber una mayor respuesta antioxidante en los peces alimentados con los piensos FO 100 y FO 25 que en los FO 0, aunque la variabilidad de las muestras no ha permitido detectar diferencias significativas en tres tratamientos. Por ello, para experimentos futuros es mejor analizar un mayor número de muestras en tejidos diana como pueden ser branquias, intestino o hígado.

Se ha comprobado que existen aditivos que pueden mejorar reducir el estrés oxidativo en el hígado, lo que podría ser una alternativa a la hora de plantearse la formulación de dietas con altos con altos niveles de sustitución de aceite de pescado, como puede ser la L-carnitina, o la inclusión de ácidos grasos *n-3* (Chen *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2016).

Los niveles de MDA reflejaban directamente la gravedad del ataque de los radicales libres en el pescado e indirectamente reflejaban la capacidad antioxidante del pescado (X. Tan *et al.*, 2018). En el presente experimento, se puede observar cómo los niveles de peroxidación lipídica son más elevados en la dieta FO 100 en el hígado y músculo rojo. Esto es debido a que al contener mayor nivel de HUFAs esto conlleva a un mayor grado de oxidación de ácidos grasos. En cambio, en el intestino anterior el nivel de peroxidación lipídica es mayor en la dieta FO 0+. (Cruz Castellón, 2015).

Se ha observado que de los diferentes parámetros hematológicos analizados solo existen diferencias significativas en tres, los cuales son el colesterol, la glucemia y la lactato deshidrogenasa. Cambios metabólicos orientados a recuperar la homeostasis o el estado inicial produciéndose un aumento de la concentración de metabolitos en sangre (glucosa, lactato, proteínas, triglicéridos). El estrés origina cambios metabólicos importantes, sobre todo a nivel energético, ya que los individuos consumen sus reservas de energía para recuperar su estado inicial. Por tanto, otros indicadores relacionados con el también pueden ser las concentraciones

plasmáticas de glucosa y lactato (respuesta secundaria al estrés), que se movilizan para hacer frente a la situación estresante en lugar de crecer. En el presente experimento solo se observó diferencias significativas en la LDH de los peces alimentados con el pienso control, que contenía un 100% de aceite de pescado. Sin embargo, parece ser el LDH no es un buen indicador del estrés en situaciones crónicas. De hecho, se ha descrito que en situaciones de estrés crónico estos parámetros metabólicos no varían (Barton *et al.*, 2005), por lo que podría ser una situación de estrés puntual, debido al momento del muestreo, al igual que en caso del cortisol.

6 Conclusiones

Del presente estudio se podría concluir que:

La sustitución del 100% de aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales, disminuye la supervivencia en seriolas de 175g, mientras que con una inclusión del 25% de aceite de pescado no hay diferencias en la supervivencia de los peces.

La adicción de los probióticos *Lactobacilos brevis* y *L. buchneri* no mejoró la supervivencia en la dieta sin aceite de pescado.

La mejora de la dieta sin aceite de pescado con la adicción de los probióticos benefició en la actividad de enzimas antioxidantes como la glucosa, la glutatión peroxidasa y la catalasa.

La sustitución no afectó al estrés oxidativo de los peces, a pesar de las diferencias en la supervivencia en la supervivencia.

Por ello, se debería continuar investigando otro tipo de aditivos, probióticos, prebióticos u otros, que ayuden al sistema inmune de la seriola mediterránea, de manera que la sustitución total del aceite de pescado no perjudique la supervivencia de los peces, al igual que no lo hace con el crecimiento y los parámetros nutritivos.

7 Bibliografía

- Abele, D., & Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 138, Issue 4, pp. 405–415). Elsevier Inc.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. In *Fish and Shellfish Immunology* (Vol. 45, Issue 2, pp. 733–741). Academic Press.
- Alvarez, M. J., Lopez-Bote, C. J., Diez, A., Corraze, G., Arzel, J., Dias, J., Kaushik, S. J., & Bautista, J. M. (1998). Dietary fish oil and digestible protein modify susceptibility to lipid peroxidation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition*, 80(3), 281–289.
- Alvarez, M. J., López-Bote, C. J., Diez, A., Corraze, G., Arzel, J., Dias, J., Kaushik, S. J., & Bautista, J. M. (1999). The partial substitution of digestible protein with gelatinized starch as an energy source reduces susceptibility to lipid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. *Journal of Animal Science*, 77(12), 3322.
- Aly, S. M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., & Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1–2), 128–136.
- AOAC., (1990). Official Methods of Analysis, 15th end. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1298 pp.
- Avci, A., Kaçmaz, M., & Durak, I. (2005). Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 101–105.
- Badalamenti, F., D'Anna, G., Lopiano, L., Scilipoti, D., & Mazzola, A. (1995). Feeding habits of young-of-the-year greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810) along the N/W Sicilian coast. *Scientia Marina* 59 (3-4): 317-323.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L. M., Pérez-Jiménez, A., & Peres, H. (2014). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 170(1), 18–25.
- 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(2), 172–179.
- Basha, P. S., & Rani, A. U. (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 218–221.
- Bayir, A., Sirkecioglu, A. N., Bayir, M., Haliloglu, H. I., Kocaman, E. M., & Aras, N. M. (2011). Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4), 191–196.
- Bayraktar, K., & Bayir, A. (2012). The Effect of the Replacement of Fish oil with Animal Fats on the Growth Performance, Survival and Fatty Acid Profile of Rainbow Trout Juveniles, *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(3), 661–666.

- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, *131*(5), 1535–1543.
- Bell, J. G., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2003). Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): Changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out.” *Aquaculture*, *218*(1–4), 515–528.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, *267*(1–4), 199–212.
- Berntssen, M. H. G., Aatland, A., & Handy, R. D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, *65*(1), 55–72.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G., & Simontacchi, C. (2010). Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*, *41*(8), 1261–1267.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Richard, J., Pascoli, F., Simontacchi, C., & Radaelli, G. (2011). Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *General and Comparative Endocrinology*, *174*(1), 44–50.
- Beutler, E. (1969). Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Investigation*, *48*(10), 1957–1966.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., & Stone, D. A. J. (2012). Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture*, *356–357*, 211–222.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*(C), 302–310.
- Cadenas, E. (1995). Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochemical Pharmacology*, *49*(2), 127–140.
- Carmagnol, F., Sinet, P. M., & Jerome, H. (1983). Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *BBA - General Subjects*, *759*(1–2), 49–57.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., & Oliva-Teles, A. (2012). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *163*(3–4), 372–378.
- Castro, Carolina, Pérez-jiménez, A., Coutinho, F., Díaz-rosales, P., Alexandra, C., Panserat, S., Corraze, G., Peres, H., & Oliva-teles, A. (2015). *Dietary carbohydrate and lipid sources affect differently the oxidative status of European sea bass (Dicentrarchus labrax) juveniles*. 1584–1593.
- Chagas, E. C., & Val, A. L. (2006). Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the Amazon fish tambaqui. *Journal of Fish Biology*, *69*(2), 608–612.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, *49*(3), 481–493.
- Chen, C., Sun, B., Guan, W., Bi, Y., Li, P., Ma, J., Chen, F., Pan, Q., & Xie, Q. (2016). N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of linolenic acid on non-specific immunity and anti-inflammatory responses in juvenile fish. *Aquaculture*, *450*, 250–257.

- Chen, Y., Sun, Z., Liang, Z., Xie, Y., Su, J., Luo, Q., Zhu, J., Liu, Q., Han, T., & Wang, A. (2020). Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil and L-carnitine supplementation on growth performance, fatty acid composition, lipid metabolism and liver health of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 516(October 2019), 734596.
- Cohen, G. y Hochstein, P. (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochem. J.*, 1420-1428.
- Corraze, G. (2004). Nutrición lipídica. En: Nutrición y alimentación de peces y crustáceos.
- Cruz Castellón, C. A. (2015). Sustitución del aceite de pescado en piensos para *Seriola dumerili* (Pisces: *Carangidae*): Efectos en el crecimiento, parámetros nutritivos, composición corporal y calidad del filete.
- Dabrowski, K., Lee, K. J., Guz, L., Verlhac, V., & Gabaudan, J. (2004). Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233(1-4), 383-392.
- Daniel, V. (1993). Glutathione s-transferases: Gene structure and regulation of expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(3), 173-207.
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In *Biochemical Society symposium* (Vol. 61, pp. 1-31). Portland Press.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. 1998. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Rand, G. (Ed.), Taylor and Francis, Vol. II, London, pp. 523-561.
- Du, J., Xu, H., Li, S., Cai, Z., Mai, K., & Ai, Q. (2017). Effects of dietary chenodeoxycholic acid on growth performance, body composition and related gene expression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed diets with high replacement of fish oil with soybean oil. *Aquaculture*, 479, 584-590.
- Faig, M., Bianchet, M. A., Winski, S., Hargreaves, R., Moody, C. J., Hudnott, A. R., Ross, D., & Amzel, L. M. (2001). Structure-based development of anticancer drugs: Complexes of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 with chemotherapeutic quinones. *Structure*, 9(8), 659-667.
- Felton, G.W. (1995). Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Ahmad, S. (Ed.) Chapman and Hall, New York, pp. 356-434.
- Fernandes C., F., (2017). Potential benefits of functional amino acids in fish nutrition. Tesis Doctoral. Universidad de Porto.
- Filho, D. W., & Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish-II. Elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(2), 415-418.
- Filho, D. W., Giulivi, C., & Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(2), 409-413.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105(C), 114-120.
- 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(1-2), 161-166.
- García, S. (2012). Investigaciones aplicables al desarrollo de la producción intensiva de corvina (*Argyrosomus regius*). Tesis Doctoral. Universidad de Granda.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Ren, T., Komilus, C. F., & Han, Y. (2012). Effects of dietary palm oil supplements with oxidized and non-oxidized fish oil on growth performances and fatty acid compositions of juvenile Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 324-325, 97-103.
- George, S., Wright, J., Bell, G., Geffen, A., & Taylor, S. (2000). Dietary effects on xenobiotic-induced oxidative damage in "O" group plaice. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 80-81.

- Giménez, P.I. (2017). Efectos de la sustitución del aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales en el perfil de ácidos grasos del filete de la *Seriola dumerili*. Tesis de Máster. Universitat Politècnica de València.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., & Dutil, J. D. (2003). Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 135(2), 347–356.
- Halliwell, B., Chirico, S., Crawford, M. A., Bjerve, K. S., & Gey, K. F. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5 SUPPL.), 715S-725S.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? In *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (Vol. 119, Issue 6, pp. 598–620). Elsevier.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2000). Free radicals in biology and medicine. Vol. III Oxford University Press, Oxford, pp. 936.
- Huang, S.S.Y., Fu, C.H.L., Higgs, D.A., Balfry S.K., Schulte P.M., & Brauner C.J. (2008). Effects of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ionregulatory development of spring chinook salmon parr, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture* 274: 109–117.
- Huang, Y., Wen, X., Li, S., Li, W., & Zhu, D. (2016). Effects of Dietary Fish Oil Replacement with Palm Oil on the Growth, Feed Utilization, Biochemical Composition, and Antioxidant Status of Juvenile Chu's Croaker, *Nibea coibor*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(6), 786–797.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., & Anderson, D. P. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154(1), 1–15.
- Jover, M., García-Gómez, A., Tomás, A., de La Gándara, F., & Pérez, L. (1999). Growth of mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*) fed extruded diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture*, 179(1–4), 25–33.
- Khezrian, S., Salati, A. P., Agh, N., & Pasha-Zanoosi, H. (2020). Effect of replacement of fish oil with different plant oils in *Oncorhynchus mykiss* broodstocks diets on egg and larval antioxidant defense development. *Veterinary Research Forum*, 11(1), 83–88.
- Kiron, V., Thawonsuwan, J., A., P., Scharsack, J. P., & Satoh, S. (2011). Antioxidant and immune defences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 130–140.
- Kjær, M. A., Aursnes, I. A., Berge, G. M., Sørensen, M., Marchenko, Y., Gjølven, T., & Ruyter, B. (2014). The influence of different dietary oil qualities on growth rate, feed utilization and oxidative stress in Atlantic cod. *Aquaculture Nutrition*, 20(2), 192–204.
- Kumar, N., Jadhao, S. B., Chandan, N. K., Kumar, K., Jha, A. K., Bhushan, S., Kumar, S., & Rana, R. S. (2012). Dietary choline, betaine and lecithin mitigates endosulfan-induced stress in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4), 989–1000.
- Kutluyer, F., Sirkecioğlu, A. N., Aksakal, E., Aksakal, F. I., Tunç, A., & Günaydin, E. (2017). Effect of dietary fish oil replacement with plant oils on growth performance and gene expression in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annals of Animal Science*, 17(4), 1135–1153.
- Larbi Ayisi, C., Zhao, J., & Wu, J.-W. (2018). Replacement of fish oil with palm oil: Effects on growth performance, innate immune response, antioxidant capacity and disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLOS ONE*, 13(4), e0196100.
- Lin, Y.-H., & Shiau, S.-Y. (2007). Effects of dietary blend of fish oil with corn oil on growth and non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 137–144.
- López-Bote, C. J., Diez, A., Corraze, G., Arzel, J., Alvarez, M., Dias, J., Kaushik, S. J., & Bautista, J. M. (2001). Dietary protein source affects the susceptibility to lipid peroxidation of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. *Animal Science*, 73(3), 443–449.
- Marchena L., E.D. (2017). Evaluación de las condiciones de cultivo durante la cría de acedía (*Dicologlossa cuneata*) y estudio integrado de su fisiología y comportamiento en cautividad. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (Vol. 15, Issues 1–2, pp. 75–88). Springer.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22):6049-55.
- Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Ginés, R., Lopez-Bote, C. J., & Bautista, J. M. (2004). Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *British Journal of Nutrition*, 92(1), 41–52.
- Milián-Sorribes, M. C., Martínez-Llorens, S., Cruz-Castellón, C., Jover-Cerdá, M., & Tomás-Vidal, A. (2020). Effect of fish oil replacement and probiotic addition on growth, body composition and histological parameters of yellowtail (*Seriola dumerili*). In *Aquaculture Nutrition*. Blackwell Publishing Ltd.
- Monaghan, P. (2010). Telomeres and life histories: The long and the short of it. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1206, Issue 1, pp. 130–142). Blackwell Publishing Inc.
- Monge-Ortiz, R., Tomás-Vidal, A., Rodríguez-Barreto, D., Martínez-Llorens, S., Pérez, J. A., Jover-Cerdá, M., & Lorenzo, A. (2018). Replacement of fish oil with vegetable oil blends in feeds for greater amberjack (*Seriola dumerili*) juveniles: Effect on growth performance, feed efficiency, tissue fatty acid composition and flesh nutritional value. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 605–615.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects on fish health. *Aquaculture*, 225(1–4), 353–370.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L., & Vergara, J. M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(4), 399–407.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M., & Izquierdo, M. S. (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(6), 473–490.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 95(1), 87–93.
- Morales, Amalia E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., & Cardenete, G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 139(1–3), 153–161.
- Mourente, G., Good, J. E., Thompson, K. D., & Bell, J. G. (2007). Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *British Journal of Nutrition*, 98(4), 770–779.
- Mu, H., Shen, H., Liu, J., Xie, F., Zhang, W., & Mai, K. (2018). High level of dietary soybean oil depresses the growth and anti-oxidative capacity and induces inflammatory response in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 77, 465–473.
- Muraccioli, P., de LA GANDARA, F., & GARCIA-GOMEZ, A. (2000). Intensive farming potential of *Seriola dumerili* (Risso 1810) in Corsica. *Cah. Options Mediterr.*, 47(Risso 1810), 267–273.

- Nakada, M. (2000). Yellowtail and related species culture. In: Encyclopedia of Aquaculture (Stickney, R.R. Ed). pp. 1007-1036. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Nakano, T., Sato, M., & Takeuchi, M. (1992). Glutathione peroxidase of fish. *J. Food Sci.* 57, 1116-1119.
- Nasopoulou, C., & Zabetakis, I. (2012). Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 47, Issue 2, pp. 217–224). Academic Press.
- Ng, W. K., Chong, C. Y., Wang, Y., & Romano, N. (2013). Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture*, 372–375, 97–110.
- Novo, E., & Parola, M. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. In *Fibrogenesis and Tissue Repair* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–58). BioMed Central.
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. In *Journal of Fish Diseases* (Vol. 35, Issue 2, pp. 83–108). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 14(2), 145–156.
- Ostbye, T.-K., Kjaer, M. A., Rora, A. M. B., Torstensen, B., & Ruyter, B. (2011). High n-3 HUFA levels in the diet of Atlantic salmon affect muscle and mitochondrial membrane lipids and their susceptibility to oxidative stress. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), 177–190.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Kiessling, A., Pottinger, T. G., & Gjøen, H. M. (2006). Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture*, 261(2), 776–781.
- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., & Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, 145(2), 191–199.
- Peng, S., Chen, L., Qin, J. G., Hou, J., Yu, N., Long, Z., Ye, J., & Sun, X. (2008). Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture*, 276(1–4), 154–161.
- Peng, X., Li, F., Lin, S., & Chen, Y. (2016). Effects of total replacement of fish oil on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture International*, 24(1), 145–156.
- Peña de la, A.P. (1997). Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Rev. Clin, Esp.* 197, 434-446.
- Pérez Jiménez, A. (2008). *Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (Dentex dentex) bajo diferentes condiciones nutricionales* [Granada: Universidad de Granada].
- Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Arizcun, M., Abellán, E., & Cardenete, G. (2009). Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 150(4), 537–545.
- Piedecausa, M. A., Mazón, M. J., García García, B., & Hernández, M. D. (2007). Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, 263(1–4), 211–219.
- Pottinger, T. G., Rand-Weaver, M., & Sumpter, J. P. (2003). Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: Plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 136(3), 403–417.
- Rabie, F., Magid, A. M. A., Guma'a, K. A., & Karrar, O. (1972). Evolution of catalase in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 43(4), 1053–1055.

- Radi, A. A. R., Hai, D. Q., Matkovic, B., & Gabrielak, T. (1985). Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 81(2), 395–399.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., & Kaushik, S. J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217(1–4), 465–482.
- Roberts, M. H., Sved, D. W., & Felton, S. P. (1987). Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted sub-estuary. *Marine Environmental Research*, 23(2), 89–101.
- Ross, S. W., Dalton, D. A., Kramer, S., & Christensen, B. L. (2001). Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130(3), 289–303.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L. E. C., Dias, J., de Coen, W., Gomes, E., Rees, J. F., Soares, F., Dinis, M. T., & Sorgeloos, P. (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231(1–4), 417–433.
- Sales, J., & Glencross, B. (2011). A meta-analysis of the effects of dietary marine oil replacement with vegetable oils on growth, feed conversion and muscle fatty acid composition of fish species. *Aquaculture Nutrition*, 17(2), e271–e287.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., & Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1–4), 191–199.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. In *Angewandte Chemie International Edition in English* (Vol. 25, Issue 12, pp. 1058–1071). John Wiley & Sons, Ltd.
- Smith, A. C. (1976). Catalase in fish red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 54(3), 331–332.
- Staal, G. E. J., Helleman, P. W., de Wael, J., & Veeger, C. (1969). Purification and properties of an abnormal glutathione reductase from human erythrocytes. *BBA - Enzymology*, 185(1), 63–69.
- Takeuchi, T., Shiina, Y., Watanabe, T., Sekiya, S., & Imaizumi, K. (1992). Suitable Levels of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acid in Diet for Fingerlings of Yellowtail. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 58(7), 1341–1346.
- Tan, P., Li, X., Xiang, X., Dong, X., Li, S., Mai, K., & Ai, Q. (2019). Adipose tissue contributes to hepatic pro-inflammatory response when dietary fish oil is replaced by vegetable oil in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*): An ex vivo study. *Fish and Shellfish Immunology*, 84, 955–961.
- Tan, X., Sun, Z., Zhou, C., Huang, Z., Tan, L., Xun, P., Huang, Q., Lin, H., Ye, C., & Wang, A. (2018). Effects of dietary dandelion extract on intestinal morphology, antioxidant status, immune function and physical barrier function of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 73, 197–206.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. In *Reviews in Fisheries Science* (Vol. 11, Issue 2, pp. 107–184). Taylor & Francis Group.
- Torstensen, B. E., Frøyland, L., & Lie. (2004). Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil - Effects on Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. *Aquaculture Nutrition*, 10(3), 175–192.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 1, Issue 1, pp. 10–57). Wiley-Blackwell.
- van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W. M., Nixon, O., & Wendelaar Bonga, S. E. (2004). Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata L.* *Journal of Experimental Biology*, 207(19), 3419–3430.
- Vidal, A. T., de la Gándara García, F., Gómez, A. G., & Cerdá, M. J. (2008). Effect of the protein/energy ratio on the growth of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquaculture Research*, 39(11), 1141–1148.

- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 27, Issue 7, pp. 339–344). Elsevier Current Trends.
- Wang, L. N., Liu, W. bin, Lu, K. le, Xu, W. N., Cai, D. sen, Zhang, C. N., & Qian, Y. (2014). Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on non-specific immune responses, oxidative status and liver histology of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 426–427, 41–48.
- Zeng, L., Wang, Y. H., Ai, C. X., Zheng, J. L., Wu, C. W., & Cai, R. (2016). Effects of β -glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(5), 1395–1405.