

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN DIETAS FUNCIONALES PARA *Salmo salar*
(Pisces: Salmonidae, Linnaeus, 1758)**

**MAGISTER EN CIENCIAS
MENCIÓN RADICALES LIBRES EN BIOMEDICINA**

Amanda Libertad Carrasco Malio

2012

**Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos para
obtener el título profesional de Magíster en Ciencias Mención radicales
libres en Biomedicina**

COMISIÓN DE TÍTULO:

Dr(a): Ana María Sandino
Director

Universidad de Santiago de Chile
Facultad de Química y Biología

Dr. mauricio Landaeta
Co-director
Universidad de Valparaiso
Facultad de Ciencias del Mar
y de Recursos Naturales

Dr(a): Brenda Modak
Co-Director
Universidad de Santiago de Chile
Facultad de Química y Biología

INDICE

CAPITULO	PAGINA
I. RESUMEN	
II. SUMMARY	
III.INTRODUCCIÓN	
III.1. La salmonicultura en Chile.	
III.2. Salmónidos. <i>Salmo salar</i>	
III.3. Problemáticas asociadas a la salmonicultura. Estrés en peces.	
III.4. Estrés oxidativo	
III.5. Nutrición en acuicultura	
III.6. Componentes y efectos de las dietas para peces	
IV.HIPÓTESIS DE TRABAJO	
V. OBJETIVOS	
VI.METODOLOGÍA	
VI.1. Obtención de las muestras.	
VI.2. Diseño experimental	
VI.2.1. Dietas funcionales	
VI.2.2. Mantención de juveniles de <i>Salmo salar</i>	
VI.3. Determinación de estrés oxidativo	
VI.3.1. Determinación de lipoperoxidación	
VI.3.2. Determinación de la capacidad antioxidante	
VI.3.3. Determinación de oxidación de proteínas	
VI.3.4. Determinación de glutatión	
VI.4. Análisis estadístico	

V. RESULTADOS

V.1. Determinación de lipoperoxidación

V.2. Determinación de la capacidad antioxidante

V.3. Determinación de oxidación de proteínas

V.4. Determinación de glutatión

VI. DISCUSIÓN.

VII. CONCLUSIONES

VIII. LITERATURA CITADA

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PÁGINA
1. Diseño experimental para la mantención de juveniles de <i>Salmo salar</i> .	
2. Unidad experimental en el Hatchery donde eran mantenidos juveniles de <i>Salmo salar</i>	
3. Evaluación de lipoperoxidación en intestino de <i>Salmo salar</i> , sometido a condiciones de hacinamiento.	
4. Evaluación de lipoperoxidación en intestino de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometido a diferentes dietas.	
5. Evaluación de carbonilación de proteínas en músculo de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometidos a condiciones de hacinamiento.	
6. Evaluación de carbonilación de proteínas en músculo de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometido a diferentes dietas.	
7. Evaluación de la capacidad antioxidante en riñón de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometido a condiciones de hacinamiento.	
8. Evaluación de la capacidad antioxidante en riñón de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometido a diferentes dietas.	
9. Variación en el tiempo de la concentración de Glutati3n reducido en el h3gado de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometidos al consumo de las diferentes dietas.	
10. Evaluaci3n de la concentraci3n de Glutati3n oxidado en el h3gado de juveniles de <i>Salmo salar</i> , sometidos al consumo de las diferentes dieta	

11. Evaluación de la relación glutatión reducido/oxidado en el hígado de juveniles de *Salmo salar*, sometidos al consumo de las diferentes dieta

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
1. Formulación y composición de la dieta basal experimental para Juveniles de <i>Salmo salar</i> .	
2. Formulación de cada dieta funcional evaluadas en <i>Salmo salar</i>	
3. Tratamientos para cada grupo de experimentación, con sus respectivas réplicas	
4. Comparación múltiple de medias (Dunn's) para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas para la lipoperoxidación.	
5. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas para carbonilos.	
6. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas para la capacidad antioxidante.	
7. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas para glutatión reducido.	
8. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas para glutatión oxidado.	

RESUMEN

Los peces en cautiverio están sujetos a largos periodos de estrés debido al manejo, los cambios en la calidad del agua y el hacinamiento, este sistema productivo con alto énfasis en la intensificación, con una marcada diferencia en relación a como se encuentran los ejemplares en el medio natural, provoca daños a nivel celular, por el estrés oxidativo generado, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS); provocando con esto una disminución en la productividad industrial y calidad del producto final, debido a la aparición de enfermedades. Es por esto que la prevención, control de enfermedades infecciosas y la mortalidad en salmones mediante el uso de sustancias naturales ha sido identificado como un tema importante y con proyecciones.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el estrés oxidativo en juveniles de *Salmo salar* sometidos a una formulación dietaria funcional con una combinación de antioxidantes, para mejorar la capacidad antioxidante del pez.

Se alimentaron grupos de 70 peces en triplicado para 5 dietas diferentes con antioxidantes y/o inmunoestimulantes, además, de la dieta control. Desde el día 0 se alimentó con las dietas funcionales, en densidades óptimas de cultivo (12 Kg/m^3), provocando hacinamiento al día 30 (20 Kg/m^3), por disminución de la cantidad de agua. Se sacrificaron 9 ejemplares de cada dieta los días 0, 20, 30 y 40, donde se extrajo, intestino, riñón, hígado y músculo para determinar estrés oxidativo, mediante las siguientes técnicas: T-BARS, TRAP, Glutathion y Carbonilos, respectivamente.

Las dietas mostraron diferencias significativas respecto de su capacidad para evitar lipoperoxidación, oxidación de proteínas, aumentar la capacidad antioxidante y la relación glutathion reducido/oxidado para *Salmo salar*. Las dietas que contenía ácido araquidónico sólo o en combinación no generaron una disminución significativa del estrés oxidativo. Se observaron diferencias significativas en las dietas que contenían mix de flavonoides (dieta

3) y la dieta que contenía la levadura (dieta 5), en relación a un mayor efecto protector en las biomoléculas y la capacidad antioxidante con estas dietas. Sin embargo la dieta que generó una mayor diferencia significativa en cuanto a la disminución del estrés oxidativo por condiciones de hacinamiento fue la dieta que contenía sólo la levadura (dieta 5).

Palabras claves: hacinamiento, alimentos funcionales, antioxidantes, estrés oxidativo

SUMMARY

Captive fish are subjected to long periods of stress due to handling, changes in water quality and overcrowding, this production system with high emphasis on intensification, with a marked difference in relation to how the copies are in the natural environment causes damage at the cellular level, generated by oxidative stress due to the formation of reactive oxygen species (ROS), resulting in a decrease in this industrial productivity and product quality, due to the occurrence of diseases. That is why the prevention and control of infectious diseases in salmon mortality by using natural substances has been identified as an important issue and projections.

The aim of this study was to evaluate oxidative stress in *Salmo salar* juveniles undergo a functional dietary formulation with a combination of antioxidants, to improve the antioxidant capacity of the fish.

70 groups were fed fish in triplicate for 5 different diets with antioxidants and / or immunostimulatory also the control diet. From day 0 were fed diets functional at optimal culture density (12 kg/m³), causing overcrowding day 30 (20 kg/m³), by decreasing the amount of water. 9 specimens were sacrificed every diet on days 0, 20, 30 and 40 where extracted, intestine, kidney, liver, and muscle for determining oxidative stress, using the following techniques: T-bars, TRAP, glutathione and carbonyls respectively.

Diets showed significant differences in their ability to prevent lipid peroxidation, protein oxidation, increase the antioxidant capacity and the ratio reduced glutathione / oxidized *Salmo salar*. Diets containing arachidonic acid alone or in combination did not produce a significant reduction in oxidative stress. Significant differences in diets containing flavonoids mix (diet 3) and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (diet 5), generating a greater protective effect in biomolecules and antioxidant capacity with these

diets. However diet resulting in a higher significant difference in terms of oxidative stress reduction by overcrowding was the diet containing only yeast (diet 5).

Key words: overcrowding, functional foods, antioxidants, oxidative stress

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *La Salmonicultura en Chile*

El cultivo de salmónidos es la mayor actividad acuícola en Chile y es una de las más grandes del mundo. La acuicultura del salmón se constituyó mediante transferencia tecnológica desarrollada principalmente en Escocia y Noruega, y también con participación de Estados Unidos, Japón y Canadá (Parada, 2010).

El salmón es una especie endémica de los mares del Hemisferio Norte que fue introducida en el sur de Chile hacia finales del siglo XIX para su posible explotación comercial (Salmón Chile, 2010). Los estudios sobre la factibilidad de su cultivo datan de finales del siglo XIX durante el gobierno de José Manuel Balmaceda (1888-1891) con el propósito de diversificar la economía chilena, centrada en la producción de salitre (Gauer & Andrade, 2000).

Las condiciones hidrográficas y ambientales presentes en la X Región de Los Lagos, fueron determinantes para el perfeccionamiento de su cultivo. La morfología del borde costero, la temperatura, la pureza y la calidad de mares y lagos así como la ausencia de una actividad industrial previa, hacían del territorio un ambiente propicio para su desarrollo (Amtmann & Blanco, 2001). Tras su establecimiento en el medio local a inicios de los años 1980, la industria salmonera logra tres décadas de excepcional crecimiento. Ello permitió a Chile posicionarse como uno de los principales proveedores mundiales de salmón, en sus variadas formas de presentación (Gauer & Andrade., 2000; Katz *et al.*, 2011).

La acuicultura en Chile está mostrando un vigoroso crecimiento y su importancia económica ha sobrepasado en pocos años, la de la pesca tradicional de captura (Claude *et al.*, 2000), constituyéndose actualmente, en uno de los principales rubros de exportación después del cobre, el sector forestal y el sector frutícola. Según Parada (2010) en 30 años

Chile logró estar entre los diez mayores productores mundiales de la acuicultura, y llegó a la séptima posición en el año 2006, posicionándose como el mayor productor entre los países occidentales. La producción total de la acuicultura aumentó de 70.000 ton. en 1990 a casi 600.000 ton en el 2003., En términos de valor, su participación en el total de exportaciones de pescado y pescado procesado, ascendió de un 28% a un 56% (CEPAL, 2005), durante este período y alcanzó los 1.300 millones de dólares en el 2003.

Actualmente es muy común el cultivo de salmones fuera de su hábitat natural; según cifras de la Asociación de la Industria del Salmón de Chile A. G., SalmonChile, del total de la producción de salmón durante el 2004, el 64% correspondió a salmón cultivado. Este proceso consiste en la crianza de peces en centros de cultivo tanto en agua dulce como salada, durante un período de dos años aproximadamente. Los salmónidos más cultivados en Chile son el salmón Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nieto *et al.*, 2010) siendo el salmón del Atlántico, el de mayor producción y con mayores exportaciones. Aproximadamente el 75% de la producción nacional de salmones y truchas se destina a la exportación. El principal mercado para estos productos es Japón, que el 2001 representó un 52% del total de las exportaciones. El segundo destino es Estados Unidos, país que en el mismo año abarcó el 29% de los envíos al exterior (Gomá, 2009).

1.1.2. Salmónidos. *Salmo salar*

El ciclo biológico del salmón Atlántico, presenta distintas fases definidas por características fisiológicas, reflejando con esto su alto grado de anadromía (Cook *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2012), es decir, desova en cuerpos de agua dulce donde alcanzan su estado juvenil y, especialmente, logra un cambio fisiológico fundamental, la esmoltificación, para luego migrar hacia aguas marinas en las cuales crece y madura sexualmente (Nieto *et al.*, 2010), evidenciando con esto la influencia de las condiciones ambientales (fotoperiodo, temperatura, disponibilidad de alimento, entre otras)

y genéticas en su crecimiento del salmón atlántico (Marschall *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2002).

El desarrollo ontogenético ocurre a través de una sucesión de estados que conducen al nacimiento del alevín durante la eclosión. La eclosión es la etapa en la cual el embrión emerge desde la envoltura que rodea al huevo (corion) durante el desarrollo, para constituirse en alevín con saco, el cual iniciará su fase de vida libre, primero utilizando el vitelo remanente en el saco vitelino como nutriente, para más tarde iniciar su alimentación externa (Jaramillo *et al.*, 2009). Durante su desarrollo desde juvenil hacia la etapa de esmoltificación ocurren una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y de comportamiento, preparándolo para su vida futura en el océano (Hutchings & Jones, 1998; Martin *et al.*, 2012,). La esmoltificación o transformación parr-smolt corresponde a una adaptación previa de los salmones juveniles a la vida en el agua de mar, ya que es en agua dulce donde se desarrollan los mecanismos osmoreguladores que aseguran el mantenimiento del equilibrio hidromineral (Muona & Soivio, 1992).

El análisis de la fase juvenil del desarrollo es importante para los intereses de producción, dado que en el crecimiento juvenil reside, probablemente, una de las principales claves de todo el desarrollo posterior, con la posible influencia en la edad media y la talla de transformación en juveniles, la supervivencia global y la edad de maduración (Fernandez *et al.*, 2002). Durante la etapa juvenil, el alevín parr pierde las marcas fuertemente coloreadas de su piel y adquiere el aspecto plateado que se debería al depósito de purinas, guaninas e hipoxantina, además se torna más delgado y largo, también se observan en las branquias modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Esta etapa se encuentra ligada a una actividad interna en la cual están involucrados los sistemas nervioso, endocrino y es dependiente de factores del medio como temperatura y fotoperíodo (Stinckey, 1994).

Las diferencias en crecimiento están directamente relacionadas con las historias de vida como la esmoltificación y la maduración sexual y actividades reproductivas en actividades de cultivo. El crecimiento de los peces en general, está influenciado por la temperatura del agua, luz, salinidad y oxígeno disuelto como determinante ambiental abiótico y la radiación, tamaño, genética y la competencia como factor determinante biótico (Nakano *et al.*, 1991; Boughton *et al.*, 2007).

1.2. Problemas asociadas a la Salmonicultura. Estrés en peces

El estrés es comúnmente definido como un estado o condición donde la homeostasis de los individuos es perturbada por acción de estímulos externos (Renzis & Bornancin, 1984). El estímulo que provoca el estrés es todo cambio del ambiente que tenga suficiente entidad para producir una alteración del funcionamiento del organismo por esto, se denominan agentes o estímulos estresantes. Estos agentes pueden ser naturales o generados por el hombre, ampliando enormemente su diversificación y posibilidades de generarlos en aquellos medios, como en el cultivo de peces, donde la incidencia de la actividad humana puede ser especialmente importante (Planas, 1993). En el caso concreto de los peces, fueron los primeros vertebrados en desarrollar una respuesta al estrés, que incluye, interrelaciones entre los ejes relacionados con el sistema nervioso y el sistema endocrino (Engelsma *et al.*, 2002; Flik *et al.*, 2006). En peces teleósteos se conoce el efecto neuro-endocrino en el sistema inmune (Weyts *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2000). Sin embargo se conoce poco acerca de las señales de las células inmunes hacia el sistema neuroendocrino en peces. Los elementos presentes en un sistema productivo acuícola que pueden determinar un efecto de estrés se pueden clasificar en químicos, físicos, biológicos y de procedimientos (Aururo & Ocampo, 1999). Muchos de estos elementos están dados por las condiciones propias del agua y de las condiciones geográficas y climáticas propias de cada región donde se encuentra el centro de cultivo. Otros son modificables o incluso

dependen exclusivamente de los procedimientos establecidos (Conte 2004; North *et al.*, 2006).

Según Aururo & Ocampo, 1999, entre los tipos de estrés causantes de lesiones en peces, se pueden considerar:

Estrés físico: Provocado por cambios en la temperatura, O₂ y pH. Según Claude *et al.*, (2000); Doren & Gabella (2001); Buschmann *et al.*, (2009), la alimentación de los peces contamina el entorno natural debido a que, el alimento que no es consumido por los animales de cultivo se dirige directamente al fondo marino, además de la materia fecal y desperdicios que en algunas ocasiones se acumulan en el fondo, bajo las balsas jaulas, convirtiéndose en sedimentos que pueden dañar a otras especies marinas presentes en el ecosistema, y si bien normalmente los ambientes acuáticos pueden metabolizar estos residuos orgánicos y reciclar nutrientes con un aumento proporcional de la productividad biológica (Claude *et al.*, 2000), como resultado se produce un agotamiento del oxígeno en el agua, un excesivo florecimiento de microalgas y una acumulación de sedimentos anóxicos y sulfurosos entre las balsas jaula o en el fondo de los estanques, los cuales son finalmente transportados a los ríos o mares que las contienen (Aururo & Ocampo, 1999). Se concluye que el depósito de materia orgánica en los sedimentos bajo las jaulas produce un efecto significativamente negativo sobre la biodiversidad (Buschmann & Fortt, 2005).

Estrés químico: Provocado por contaminación exógena o endógena. Las aguas de las regiones salmoneras de Chile se caracterizan por la descarga de residuos líquidos y sólidos al ambiente marino. En el 2001, según Doren & Gabella, sólo el 12% de los centros acuícolas trataba el agua de descarga, el resto dejaba que lo absorbiera el medio ambiente. Los xenobióticos por ejemplo, constituyen una amplia gama de contaminantes exógenos que se han estudiado exhaustivamente como causantes de estrés en peces (Aururo & Ocampo, 1999). El efecto de contaminantes endógenos como el amonio está muy bien documentado como tóxico para los peces, generando hiperplasia del epitelio branquial, así

como cambios degenerativos y hemorragia en hígado cuando se exponen a estrés crónico por amonio. Los agentes químicos que se utilizan en la construcción de jaulas, en la protección contra la corrosión y en la antifijación de organismos incrustantes son también elementos que generan importantes efectos ambientales (Buschmann *et al.*, 2009). También hay elementos químicos utilizados como pigmentos incorporados al alimento, desinfectantes y productos para el control de enfermedades, como antibióticos, fungicidas y compuestos antiparasitarios (Gomá, 1999).

Estrés traumático: Provocado principalmente por lesiones traumáticas debido a canibalismo o por elementos físicos peligrosos dentro del estanque o del acuario. Desde un enfoque etológico los peces sujetos a estrés pueden presentar conductas anormales, como un aumento en la agresividad; sobre todo en peces territorialistas, con las consecuentes mutilaciones y canibalismo (Aururo & Ocampo, 1999). La manipulación además puede producir estrés agudo afectando su fisiología, traduciéndose en ocasiones en una reducción del crecimiento de los mismos o en una inmunodepresión (Nomura *et al.*, 2009).

Estrés social (Hacinamiento): En el caso del cultivo de salmones, el uso intensivo de los lagos para la producción de esmolts ha contribuido a generar impactos ambientales negativos asociados al deterioro de la calidad del agua y sedimento en el área de influencia de balsas-jaulas del centro de cultivo (North *et al.*, 2006). Los peces en cautiverio están sujetos a largos periodos de estrés debido al manejo, los cambios en la calidad del agua y el hacinamiento (Aururo & Ocampo, 1999).

La salmonicultura es un sistema productivo con alto énfasis en la intensificación, con una marcada diferencia en relación a como se encuentran los ejemplares individuos en el medio natural (Merck, 2000). Al aumentar la densidad de cultivo muchas veces se agrupan peces de distintas cohortes, se ponen en los estanques de cultivo esmolts de menor calidad y con menor probabilidad de sobrevivencia, disminuyendo la oxigenación del agua (Conte, 2004). Los límites de carga admitidos por el recurso agua son difíciles de estimar a

priori y varían de un caso a otro en función de una diversidad de razones difíciles de especificar y cuantificar. Ello hace que el aumento de la densidad de cultivo aumente el riesgo y la incertidumbre que subyace bajo el proceso productivo, obligando a los empresarios a tomar decisiones con imperfecto conocimiento de las consecuencias que las mismas traerán aparejadas (Katz *et al.*, 2011).

Cuando los peces son cultivados en altas densidades y de forma intensiva, sufren estrés debido a la manipulación, lo que hace que se deprima su sistema inmunitario, volviéndose más vulnerables a sufrir problemas de salud. Debido a esto, para poder alcanzar los tamaños de cosecha con bajas tasas de mortalidad, son tratados con diversos productos antibióticos (Buschmann & Fortt, (2005); Nomura *et al.*, (2009); Claude (*et al.*, 2000). El cultivo del salmón, se realiza extremando los recursos con que cuentan las empresas productoras, utilizando diversas sustancias para controlar la proliferación de enfermedades que pueden desbistar su producción, depositándose en el fondo marino, afectando a las especies nativas de la zona (Doren & Gabella, 2001, Santiago *et al.*, 2009).

La industria de la salmonicultura debe utilizar antibióticos intensivamente, los cuales pueden ser de amplio espectro constituyendo un problema ya que la administración extensiva de estas sustancias llega tanto a peces sanos como a enfermos (Cabello, 2004). Además, los antibióticos y otros agentes químicos que se acumulan debajo de las balsas jaulas durante los tratamientos pueden cambiar la composición bacteriana de los sedimentos y alterar la degradación de los otros desperdicios (Doren & Gabella, 2001). En 1990 la industria salmonera utilizó alrededor de 13 ton de antibióticos (como droga pura total), cantidad que aumentó a 65 ton en 1995 y 100 ton en 1998 (Gomá, 2009). Una de las sustancias químicas empleadas en Chile –prohibida en Estados Unidos, Gran Bretaña y Noruega– es la verde malaquita, que es utilizada como fungicida para prevenir la propagación de hongos en la etapa de agua dulce en ovas y alevines (Gomá, 2009; Claude *et al.*,2000). En consecuencia se está creando resistencia a futuras enfermedades y

afectando la flora bacteriana del entorno natural situación que podría tener consecuencias biológicas difíciles de predecir (Angulo, 2000; Doren & Gabella, 2001).

Son múltiples los estudios que relacionan las condiciones de producción (densidad de cultivo, manejo de animales, alimentación, antibióticos) con cambios en el estado de inmunocompetencia. Considerando estas causas, es probable que las infecciones microgénicas o las parasitarias, así como una fracción de la mortalidad se puedan atribuir al estrés oxidativo generado por las condiciones de cultivo (Auro & Ocampo, 1999). La cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo sobre el organismo puede ser usada para evaluar efectos inducidos por diferentes tipos de estrés en peces (Storey 1996; Valavanidis *et al.*, 2006). Es por esto que, la prevención, control de enfermedades infecciosas y la mortalidad en salmones mediante el uso de sustancias naturales ha sido identificada por distintas entidades de investigación científica y de desarrollo tecnológico como un tema importante y con proyecciones.

1.3. Estrés oxidativo

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación llamada reducción (Halliwell, 1989). Esta oxidación es fundamental para la vida porque participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro (Elejalde, 2001).

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico (Halliwell, 1989; Thomas, 2000; Fang *et al.*, 2002). Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN (Atencio *et al.*, 2009; Winston & Di Giulio., 1991). No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de

defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes (Ritola *et al.*, 2002; Ozcan *et al.*, 2004).

El término estrés oxidativo hace referencia al desequilibrio entre la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa y sus efectos adversos (Halliwell, 1989; Kowaltowski *et al.*, 2009). La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal (Gao *et al.*, 2012). Entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años (Olsvik *et al.*, 2011).

La evaluación del estrés oxidativo y el nivel de antioxidantes es un aspecto importante, ya que aporta información útil para realizar un seguimiento a la evaluación de la salud y la adecuada formulación dietaria por ejemplo en el caso del cultivo de peces.

Existen diversos métodos para la evaluación del estrés oxidativo y el estado de los antioxidantes en el organismo. Dentro de las cuales se encuentran las evaluaciones de enzimas antioxidantes, donde estas enzimas regeneran sustratos o co-sustratos antioxidantes, pero su medición es compleja, debido a la labilidad de la actividad enzimática. Dentro de los métodos no enzimáticos de evaluación antioxidante, se podrían mencionar los siguientes:

Evaluación de la Capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante total de un alimento o una muestra biológica aporta información considerable sobre procesos de adición y sinergia que se producen como consecuencia de interacciones entre distintas moléculas bioactivas en la muestra analizada. Estos procesos dan lugar, por lo general, a una actividad antioxidante total mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de

los antioxidantes individuales que la componen, otorgando una aproximación más real al efecto potencial que podría ejercer in vivo un alimento con sustancias antioxidantes (Karakaya, 2001; Liu, 2003). Las técnicas desarrollada para medir la capacidad antioxidante total de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en el sistema de ensayo (Magalhaes *et al.*, 2008), por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador (Magalhaes *et al.*, 2008; Escorza *et al.*, 2009). Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Escorza *et al.*, 2009).

Evaluación de daño oxidativo a lípidos (Lipoperoxidación): La peroxidación lipídica es un proceso complejo que genera un gran número de productos finales de oxidación (e.j. aldehídos, peróxidos lipídicos) en cantidades variables (halliwell, 1994; Valavanidis *et al.*, 2006). Se puede medir de diversas maneras. El método más rápido y sencillo es la determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica mide un cromógeno formado por el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación lipídica. (Esterbauer *et al.*, 1990). Actualmente es frecuente el empleo de una modificación de este método en la cual el cromóforo TBA-MDA se separa por HPLC. De este modo se reducen las interferencias de otras sustancias reactivas con el TBA, aumentando la sensibilidad y especificidad de la determinación (Fulbert & Cals, 1992).

Evaluación de daño oxidativo a proteínas: El proceso de oxidación proteica frecuentemente introduce nuevos grupos funcionales, como hidroxilos y carbonilos, que contribuyen a la alteración de la función de la proteína y a su posterior catabolismo (Levin

et al., 1990). La introducción de grupos carbonilo en los residuos aminoácidos de las proteínas es un indicador de modificación oxidativa. La reacción de estos grupos con agentes carbonilados proporciona un método para detectar y cuantificar la oxidación de proteínas catalizada por metales. El método más comúnmente utilizado es el basado en su reacción con 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4 - dinitrofenilhidrazona. Este método se basa en que el DNPH es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo formando una base de Schiff para dar lugar a hidrazonas estables. El grupo dinitrofenilo (DNP) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm (Levin *et al.*, 1990 & Levine *et al.*, 1994). También la detección de grupos carbonilo se puede realizar mediante western blot, dot blot, inmunohistoquímica o ELISA (Escorza *et al.*, 2009).

Evaluación de antioxidantes no enzimáticos (Glutación): Glutación Es probablemente la más abundante de las moléculas encargadas de secuestrar las especies reactivas y tiene por lo tanto un papel muy importante en mantener el estado redox de las células. Es un tripéptido (glutamina-cisteína-glicina) donde la cisteína se encuentra en su forma reducida (-SH) (Olsvik *et al.*, 2011). Recientemente se han publicado revisiones exhaustivas y actualizadas de los diferentes métodos, pero aún no se puede definir una metodología de referencia. Un método utilizado es la cromatografía HPLC asociada a distintos sistemas de detección, las limitaciones son el alto costo y los largos tiempos de análisis (Lenton *et al.*, 1999). También existen métodos por electroforesis capilar, los cuales permiten determinar ambas formas de glutación simultáneamente (Carru *et al.*, 1994). Así mismo existe un método colorimétrico propuesto por Griffith (1980), donde el glutación total es evaluado por reciclaje enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de glutación reductasa.

Las especies reactivas de oxígeno, se producen continuamente en el organismo como parte del metabolismo, por lo que existe un sistema complejo de defensa que permite un balance entre la producción de las mismas y la activación de la función de los antioxidantes, como las vitaminas E y A (Halliwell, 1994), que son capaces de sacrificar su propia integridad molecular para evitar alteraciones de lípidos, proteínas, ADN, etc.- funcionalmente vitales o más importantes.

Nutrición en Acuicultura

Los sistemas empleados actualmente en las piscifactorías, pueden afectar factores como: el aumento de la competición por la alimentación (Thorpe *et al.*, 1995; North *et al.*, 2006), limitando la ración, reduciendo el índice de la alimentación, aumentando la jerarquización, con un crecimiento de los peces dominantes a expensas de los subordinados, aumentando los daños en las aletas y generando interacciones agresivas (Conte, 2004; North *et al.*, 2006).

Debido a estas razones actualmente se trabaja en acuicultura, en el desarrollo de nuevos productos alimenticios, los cuales son catalogados como alimentos funcionales. Según Silvieira *et al* (2003) estos alimentos tendrían la capacidad de ejercer su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico, comportándose como potenciadores del desarrollo y la diferenciación, moduladores del metabolismo de nutrientes, la expresión génica y del balance redox

El desarrollo de nuevos productos para enriquecer y suplementar las dietas acuícolas ha promovido el ensayo con productos que en un principio fueron elaborados para otras especies, como las aves de corral, los cerdos y el ganado vacuno, demostrándose que mejoran la función intestinal incrementando el tamaño de las microvellosidades intestinales, así como, su uniformidad e integridad. Potenciando con ello el crecimiento y la salud (Olsvik, *et al.* 2011).

Existen evidencias de que algunas dietas mejoran la resistencia de algunos animales a esas condiciones. Tales dietas son enriquecidas con vitaminas como la C y E, inositol, ácidos grasos insaturados y fosfolípidos (Hemre & Sandens, 2008). También la incorporación de inmunoestimulantes que aumenten la respuesta inmune innata y adaptativa son considerados como un complemento prometedor para la vacunación y la reproducción selectiva. Convirtiéndose en las principales estrategias para la prevención de enfermedades (Ritola *et al.*, 2002; Winston & Di Gulio., 1991).

En peces se ha observado la relación entre la deficiencia de ácido ascórbico y la aparición de graves problemas en el crecimiento y respuesta inmune, así como también favorecería el aumento de malformaciones e incidencia de parásitos. Por ejemplo, al suplementar la dieta de *Lateolabrax japonicus* con vitamina C, la respuesta inmune fue mejor, al tiempo que los individuos tratados tuvieron mayor ganancia de peso y sobrevivencia (Aiq, 2004).

1.4.1. Componentes y efectos de la dietas para peces

El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1994; Karakaya *et al.*, 2001; Aiq *et al.*, 2004;). Los antioxidantes no enzimáticos obtenidos por ejemplo a través de la dieta, se unen a los especies reactivas y los transfieren de sitios donde no pueden provocar daños, como de la membrana hacia el citoplasma, o los transforman en radicales menos agresivos (Halliwell, 1994). Entre los antioxidantes más estudiados, se puede encontrar los flavonoides.

Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes (Heim *et al.*, 2002; Maqsood & Benjakul, 2010). Pertenecen a un grupo de

compuestos de origen natural, con un amplio número de actividades biológicas, tales como antibacterianos, anti-mutagénicos, citotóxicos y anticancerígenos (López *et al.*, 2006 & Modak *et al.*, 2005; Procházková *et al.*, 2011). Además tienen la capacidad de eliminar las especies reactivas y por lo tanto eliminar especies reactivas de oxígeno (Modak *et al.*, 2005). Comparten un esqueleto común compuesto por dos anillos bencénicos (A y B), ligados a través de una unidad de tres carbonos que constituye un anillo heterocíclico (C). Los átomos de carbono en los anillos C y A, se enumeran del 1 al 18, y los anillos B desde el 1' al 6' (Bravo, 1994). Muchas plantas sintetizan y acumulan flavonoides inducidas por factores de estrés abióticos y bióticos, por ejemplo, la radiación ultravioleta, falta de agua y daño por patógenos (Modak *et al.*, 2005).

La capacidad antioxidante de muchos flavonoides es mucho más alta que algunas vitaminas como E y C. Según Procházková *et al.*, 2011, los flavonoides pueden prevenir de daños causados por los radicales libres a través de los siguientes mecanismos: Captura de especies reactivas de oxígeno, reducción de radicales de α -tocoferol, activación de enzimas antioxidantes, mitigación de estrés oxidativo causado por óxido nítrico, quelantes de metales traza, incremento de los niveles de ácido úrico e incremento en propiedades antioxidantes de bajo peso molecular.

Según Procházková *et al.*, 2011, las principales características estructurales, necesarias de los flavonoides para captar radicales libres eficientemente podían ser:

- Una estructura orto-dihidroxifenólica (Catecol) en el anillo B, para deslocalización de electrones.
- Dobles enlaces entre los carbono 2 y 3 adyacentes en conjugación con una función 4-oxo en el anillo C, proporcionan deslocalización electrónica del anillo B, potenciando el efecto antioxidante.
- Grupos hidroxilo en las posiciones C₃ y C₅, proporcionan hidrógenos unidos al grupos oxo, maximizando la capacidad atrapadora de radicales libres.

La máxima efectividad del antioxidante requiere la presencia de todas las funciones antes citadas, produciéndose cambios en su actividad por ausencia de alguna de ellas.

Terpenos

Son Moléculas lineales formadas de unidades poliméricas de isopreno, con propiedades antioxidantes que protegen a lípidos y componentes celulares del ataque de agentes oxidantes como radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidroxilo reactivos. Los más conocidos son los carotenoides y el escualeno (Olsen *et al.*, 2005).

Carotenoides

Los carotenoides son sustancias hidrofóbicas y lipofílicas virtualmente insolubles en agua (Bhosale, P. & Bernstein., 2007; Grune *et al.*, 2010). Pertenecen a la clase de los polienos es decir, están formados por largas cadenas con dobles ligaduras conjugadas, cuya abundancia explica el color intenso de éstos y están contruidos en base a unidades de isopreno (Jen hu *et al.*, 2005). Aquellos que están basados en hidrocarburos son colectivamente llamados carotenos, mientras que aquellos que contienen átomos de oxígeno con grupos funcionales como hidroxilo, -metoxi, oxo, epoxi, carboxi, aldehído, etc, son comúnmente llamados xantófilas (Siemsa, 2005). Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo, los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina. El caroteno más comúnmente encontrado es el β -caroteno, y normalmente constituye entre el 25-30 % del contenido total de carotenoides en las plantas. La luteína es la xantófila más abundante (40-45 %), pero siempre se encuentra en menor proporción que el β -caroteno (Baker *et al.*, 2002; Siemsa *et al.*, 2005).

Astaxantinas

La astaxantina es un pigmento carotenoides presente en animales marinos tales como los salmones y los crustáceos, ya que estos animales no pueden sintetizar astaxantina por sí solos la toman en sus alimentos naturales la cual es adicionada a la alimentación de

los salmones, truchas y camarones cultivados para intensificar su color (Birkelanda & Bjerkengb, 2004). Se ha demostrado que los salmónidos tienen incapacidad para sintetizar astaxantina de novo, porque carecen de la capacidad para oxidar 3,3 dihidroxicarotenoides y para absorber β -caroteno dietario (Siemsa *et al.*, 2005). La astaxantina posee una actividad antioxidante más alta que el β -caroteno y el α -tocoferol. Las primeras investigaciones sobre la astaxantina dietética en acuicultura se dirigieron hacia la pigmentación muscular con comparativamente poca información detallada sobre las actividades biológicas que afectan las funciones metabólicas (Grune *et al.*, 2010).

La capacidad para convertir los carotenoides dietarios en astaxantina por los organismos marinos cae dentro de tres categorías generales (Meyers & Latscha; 1997).

1) Aquellos que no pueden oxidar el anillo β -iononae y deben ingerir derivados oxigenados específicos como astaxantina para su depósito (salmón, trucha, besugo, pagrus mayor) son llamados salmónidos o del tipo “sea bream”.

2) Aquellos que pueden oxidar las posiciones 4 y 4' del anillo β -iononae y pueden convertir la zeaxantina de la dieta a astaxantina, depositando la mayoría de los carotenoides dietarios inalterados (goldfish, carpa roja, fancy red carp, golden-yellow carp) son llamados del tipo carpa.

3) Aquellos que pueden oxidar las posiciones 3 y 3' y 4 y 4' del anillo β -iononae del β -caroteno y pueden convertir β -caroteno, zeaxantina o intermedios a astaxantina (la mayoría de los crustáceos) son llamados del tipo crustáceos.

La ingestión de vitamina A dietaria afecta aspectos de inmunidad humoral o mediada por células en el salmón del Atlántico. Dado que los peces, como todos los animales, carecen de la capacidad de síntesis de novo de vitamina A, todo el requerimiento de vitamina A debe ser suministrado en la dieta (White *et al.*, 2002). Esto puede ocurrir directamente por la adición de vitamina A a la dieta o indirectamente a través del metabolismo de carotenoides precursores tal como la astaxantina.

La presente investigación pretende determinar si una dieta formulada con una combinación de distintos antioxidantes favorecería el desarrollo de juveniles de *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), expuesto a altas densidades poblacionales.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que el factor de hacinamiento en los cultivos de peces genera estrés oxidativo, juveniles de *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) sometidos a una combinación de antioxidantes naturales agregados a su dieta basal, presentarán una reducción del estrés oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar parámetros de estrés oxidativo en alevines de *Salmo salar* sometidos a una formulación dietaria funcional con una combinación de antioxidantes, para mejorar la capacidad antioxidante del pez.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el grado de lipoperoxidación, mediante la detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en alevines de *Salmo salar* sometidos a distintas dietas funcionales.
- Determinar el daño oxidativo de proteínas, por la cuantificación de grupos carbonilos en alevines de *Salmo salar* sometidos a distintas dietas funcionales.
- Establecer la capacidad antioxidante total no enzimática, mediante la evaluación de los tiempos de inducción por atrapamiento total radicalario a través de antioxidante en alevines de *Salmo salar* sometidos a distintas dietas funcionales.
- Determinar la relación entre la concentración de glutatión reducido y glutatión oxidado en alevines de *Salmo salar* sometidos a distintas dietas funcionales.

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención de las muestras.

Juveniles de *Salmo salar* fueron obtenidos de la piscicultura Bajo Perquín, ubicada en la comuna de San Clemente, Provincia de Talca, Región del Maule. Se procuró que el peso total de todos los ejemplares obtenidos fuera de 3,5g y se descartaron las familias de peces que no presentaran un estado sanitario compatible con el ensayo *in vivo*.

4.2. Diseño experimental

4.2.1. Dietas funcionales

Se confeccionaron distintas dietas, para determinar su efecto sobre el estrés oxidativo generado por condiciones de hacinamiento. Las dietas que se utilizaron fueron creadas en la Universidad Católica de Temuco mediante distintas combinaciones de antioxidantes añadidas al alimento basal.

Para la elaboración del alimento basal, todos los ingredientes fueron preparados adecuadamente para permitir un eficiente proceso de extrusión de los pellets en los calibres seleccionados (1, 2 y 3 mm). Para esto fueron cuidadosamente molidos en un molino ultracentrifugo (Retsch ZM200. Haan, Alemania), hasta obtener una granulometría final de 150-300 μm . La mezcla homogenizada de ingredientes fue extruida en una extrusora doble tornillo (Clextral BC21, Firminy, France) y los pellets fueron secados a una temperatura constante de 60°C en un secador vertical (COMIND. Santiago, Chile). El aceitado de los pellets se realizó en un aceitador al vacío (Dinnissen VC10. Horsterweg, Holanda) y los aditivos a evaluar se añadieron durante este proceso al momento de iniciar

el ensayo de alimentación. La formulación y composición proximal proyectada de la dieta basal experimental se describe detalladamente en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación y composición de la dieta basal experimental para alevines de *Salmo salar*

Ingredientes (%)	Dieta referencia	Estimación proximal (%)	
Harina de pescado ^a	61,99	Proteína total	55
Harina de pluma ^b	4,0	Extracto etéreo	18
Gluten de maíz ^b	4,0	Proteína total	12
Harina de trigo ^c	15,00	Extracto etéreo	15
Aceite de pescado ^a	13,00	Cenizas totales	20
Premix de vitaminas ^d	1,00	Extracto no nitrogenado	1,5
Premix de minerales ^d	1,00	Energía Bruta (MJ/Kg)	1,5
Marcador inerte (Y ₂ O ₃) ^e	0,01	Fósforo total	1,5
TOTAL	100		

^a Pesquera Itata S.A., Talcahuano, Chile.

^b Biomar Chile, Pto Montt, Chile

^c Molinos Gorbea, Gorbea, Chile.

^d VETERQUIMICA, Puerto Montt, Chile

^e SIGMA, Saint Louis MO, USA

*Resultados expresados en base seca

Las distintas dietas se confeccionaron mediante la mezcla de un determinado antioxidante añadido a la dieta basal, así para la dieta que contiene ácido araquidónico, su concentración fue de 11,4 g por 10 Kg de alimento basal, para la dieta basada en el mix de polifenoles como antioxidantes se utilizó 6 g por 10 Kg de alimento basal y finalmente para la dieta que contenía la levadura se utilizó 5g por 10 Kg de alimento basal como productora de promotores de crecimiento y productora de β-caroteno, como aporte de antioxidantes. De este modo, se obtuvieron dietas con las combinaciones óptimas de compuestos requeridos para mejorar el estado sanitario y disminuir el estrés oxidativo en alevines de *S.salar*. (Tabla 2).

Tabla 2. Formulación de cada dieta funcional evaluadas en *Salmo salar*.

Dieta	Tratamiento
Control	Alimento básico
1	Alimento básico + ácido araquidónico
2	Alimento básico + Mix de antioxidantes + ácido araquidónico
3	Alimento básico + Mix de antioxidantes
4	Alimento básico + levadura + ácido araquidónico
5	Alimento básico + levadura

4.2.2. *Mantenimiento de juveniles*

Previo al comienzo del experimento todos los ejemplares fueron sometidos durante 7 días a un proceso de aclimatación, procurando que conductas anormales como no recibir el alimento, nado errático o nado lateral no se observaran. Fueron todos los tratamientos alimentados *ad libitum* en forma manual, entregando raciones tres veces al día hasta completar la ración del día, según las tablas de alimentación, mediante un alimento comercial llamado Golden Optimo, preparado en la Universidad Católica de Temuco.

Se extrajeron 3 ejemplares de cada unidad experimental (Fig. 1), obteniendo 9 ejemplares en total por cada tipo de dieta (Tabla 3), al tiempo 0, 20, 30 y 40 días. La alimentación comenzó el día 1 y terminó en el día 40, donde finalizó el bioensayo. Los peces fueron sometidos a estrés por hacinamiento desde el día 31 hasta el día 40.

Tabla 3. Tratamientos para cada grupo de experimentación, con sus respectivas réplicas.

Dietas	Tratamiento	Réplica 1 (n° de individuos)	Réplica 2 (n° de individuos)	Réplica 3 (n° de individuos)	TOTAL
C	Dieta control	70	70	70	210
1	Dieta control + Acido araquidónico	70	70	70	210
2	Dieta antioxidante 1 + ácido araquidónico	70	70	70	210
3	Dieta antioxidante 1	70	70	70	210
4	Dieta antioxidante 2 + ácido araquidónico	70	70	70	210
5	Dieta antioxidante 2	70	70	70	210

La temperatura se registró cada 15 min. mediante un data logger durante todo el período de experimentación, manteniéndose en 12°C, coincidiendo con la temperatura de la piscicultura de origen de los ejemplares. El fotoperíodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad y el oxígeno disuelto se mantuvo entre 85% y 100% de saturación durante todo el experimento, registrándose 3 veces al día.

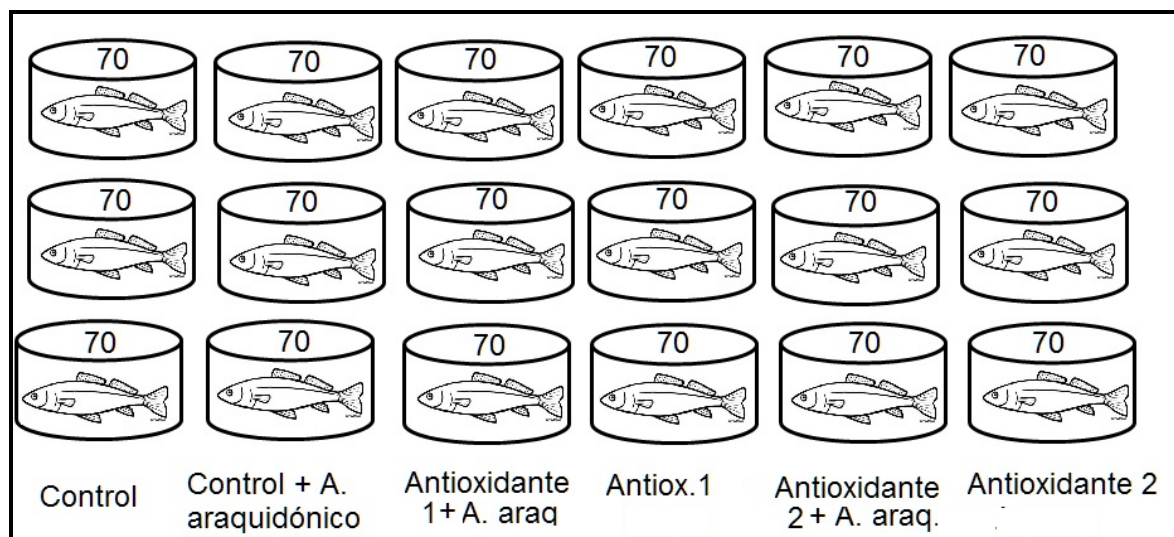


Figura 1: Diseño experimental para la mantención de las especies juveniles de *Salmo salar*.

Los peces fueron mantenidos en unidades experimentales de 300 L con columna de decantación modificados a partir del método “Guelph”, con un flujo continuo de agua y una tasa de recambio de 1. (Fig. 2)



Figura 2. Unidad experimental en el Hatchery donde eran mantenidas las especies juveniles de *Salmo salar*

De cada individuo se extrajeron los siguientes órganos: Intestino (primera mitad partiendo desde el estómago), músculo (considerando aproximadamente 1 cm² de superficie de músculo) hígado y riñón. Cada muestra se introdujo por separado en un criotubo de 2 mL vacío y previamente rotulado, para luego ser congeladas en un Freezer a -80°C.

4.3. Determinación de estrés oxidativo

Para determinar si las distintas dietas entregadas a alevines de *Salmo salar*, disminuyeron o aumentaron el nivel de estrés oxidativo en el organismo, se realizaron las siguientes pruebas: Lipoperoxidación (T-bars), carbonilación de proteínas, capacidad antioxidante (TRAP) y Concentración glutatión reducido/oxidado.

4.3.1. Lipoperoxidación

Para determinar el grado de lipoperoxidación, se realizó la prueba T-BARS (detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), que consiste en hacer reaccionar

la muestra con ácido tiobarbitúrico, las sustancias reactivas provienen de la peroxidación lipídica, basándose en el método propuesto por Estebauer *et al* (1982). Para realizar el ensayo se realizó un macerado de intestino de juveniles de *Salmo salar*, agregando 300µl de buffer PBS pH=7,4. Luego 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para luego centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. y el sobrenadante se colocó en tubos de incubación junto con 600 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% , y se lleva a incubar por aproximadamente 1 h. a una temperatura de 90°C, una vez frío se leyó la muestra a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro Infinitive 200Pro TECAN.

4.3.2. Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante total (TRAP) que consiste en la determinación de defensas antioxidantes no enzimáticas, que actúan atrapando radicales catiónicos ABTS producidos *in vitro* de la reacción entre el 2,2'-azobis (2-amidino propano (ABAP) y 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido (ABTS) (Romay *et al.*, 1996). Para este análisis se seleccionó riñón de *S. salar*. Se maceró con 1 mL Buffer PBS pH=7,4, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante obtenido de la centrifugación se extrajo 10 µL, que se depositan directamente en una celda de vidrio para espectrofotometría , a esta se le agregará 1 mL de solución de los reactivos ABTS y ABAP (1:1). Se registran los valores de absorbancia a 0, 10, 30 y 50 segundos (absorbancia= 0, 55; $\lambda=734$ nm). Los resultados se estandarizan mediante la confección de una curva de calibración con el antioxidante Trolox.

4.3.3. Determinación de carbonilos

La determinación de grupos carbonilos se realizó por el método de Levine *et al* (1990), el cual es conocido actualmente como el método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Martinez, 2007). Se detremino en musculo

Este método permite la cuantificación de las proteínas alteradas mediante el reconocimiento de la modificación de la cadena lateral de éstas, producidas por la oxidación en presencia de especies reactivas de oxígeno. La elevación del contenido o del número del grupo carbonilo en tejidos se asocia a un mayor grado de desorden o alteración en los organismos tratados.

Se maceró cada muestra con PBS=7,4, se agregó 300 μ L a un tubo Eppendorf, mezclando con 300 μ L de ácido tricloroacético al 50% p/v. Se agitó la muestra y se mantuvo en hielo por 5 min., eliminando finalmente el sobrenadante y conservando cuidadosamente el pellet formado.

Se agregó al pellet que queda en el tubo Eppendorf: 1 mL de dinitrofenilhidrazina 0,3% en HCL 2N y 1 mL de HCL 2 N, sin dinitrofenilhidrazina.

Luego se lavó el pellet 3 veces con la mezcla orgánica agitando vigorosamente durante 10 minutos. El pellet lavado se incubó a 37°C para evaporar el residuo orgánico hasta la sequedad. Se agregó sobre el pellet seco 2 mL de urea (6M).

El contenido de carbonilo fue medido por espectrofotometría a 370 nm, estableciéndose finalmente la presencia de carbonilos por diferencia de lectura entre el tubo con y sin dinitrofenilhidrazina, expresándose los resultados como nanomol de carbonilos / mg de proteína (Palamanda & Kehrer, 1992).

4.3.4.4. Determinación de proteínas (Método de Bradford)

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra, se utilizó el método de Bradford (1975), en el cual se requiere la preparación de una curva de calibración empleando una proteína patrón, que en este caso fue la seroalbúmina bovina.

Preparación del reactivo de proteínas

Se utilizó azul brillante de Coomassie G-250 (100 mg), que es disuelto en 50 mL al 95% de etanol. Luego se agregó a esta solución 100 mL 85% (w/v) de ácido fosfórico. La solución resultante fue diluida a un volumen final de 1 L., La concentración final de los

reactivos fue de 0,01% w/v, Azul brillante de Coomassie G-25, 47% w/v de etanol y 8,5% w/v de ácido fosfórico. Se mezclaron en el orden indicado y finalmente se disolvió con agitación, para finalmente filtrar.

Ensayo de proteínas (Método estándar)

Se realizaron disoluciones con la muestra problema hasta un volumen final de 20 μ L y finalmente se agregó 180 μ L de reactivo Bradford, se agitó la muestra y a continuación se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm .

Finalmente para obtener la concentración de proteína en las respectivas disoluciones, se interpolaron las absorbancias obtenidas sobre la recta representada para saber la cantidad de proteínas presentes en cada una de ellas. Alternativamente, se puede también hacer el cálculo mediante la pendiente de la recta. Teniendo en cuenta los volúmenes de muestra usados en cada caso y teniendo en cuenta la dilución realizada, se calculó la concentración de proteínas en la muestra analizada. El resultado se entrega como gramos de proteína por 100 mL de muestra

4.3.4. Medición Glutación

El glutatión reducido representa el más abundante antioxidante endógeno involucrado en numerosas funciones vitales de la célula, protege a la célula contra cualquier lesión oxidante permanente. Para realizar este ensayo se utilizó el método propuesto por Ratkevicius *et al.*, (2003).

Glutatión reducido y oxidado fueron determinados utilizando el hígado de *S. salar*. Cada muestra se maceró con 1000 μ L de PBS (PH= 8,0) y se agregaron 1000 μ L de ácido sulfosalicílico (5%) y se homogenizó. Luego el homogenizado fue centrifugado por 15 min. a 7400 RPM.

Glutatión total se determinó por la adición de 200 μ L de un neutralizado homogeneizado, el cual contenía: 100mM buffer fosfato (pH=7,0); NADPH, 0,15 nM, 60 mM DTNB y 0,66 U glutatión reductasa (Sigma) hasta un volumen final de 1mL. A cada

muestra se agregaron 200 μ L del homogeneizado y se incubaron por 1 h. a 37°C, luego la absorbancia se determinó a 412nm.

Glutación reducido se detectó con el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero a la muestra con el homogeneizado, se le agregó 20 μ L de 2-vinilpiridina 1 M, dejando incubar a temperatura ambiente, por 1 h.

La curva de calibración fue preparada usando 2-40 nmoles de GSH junto con la misma mezcla del homogeneizado.

4.3.5. Análisis de datos

Para comparar la efectividad de cada dieta funcional, cada una de estas se comparó con la respectiva dieta control mediante la prueba no paramétrica de U-Mann Whitney ($p < 0,005$), previa confirmación los supuestos de normalidad (Prueba Kolmogorov-smirnov) y homocedasticidad de varianzas (Prueba de levene), Luego se realizó un análisis de varianza con la prueba no paramétrica de Friedman, siendo los factores tiempo y dietas ($p < 0,005$) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias (Prueba de Dunns). Además en algunos casos se recurrió también a la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis ($p < 0,005$), previa confirmación de supuestos con las mismas pruebas mencionadas anteriormente, con el propósito de establecer diferencias significativas entre grupos de dietas. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron mediante el programa Graphpad 5,0.

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de Lipoperoxidación

La lipoperoxidación en intestino de juveniles de *S.salar*, al finalizar los 20 días de experimentación, exhibió diferencias significativas respecto de los juveniles tratados con la dieta control hacia una disminución de los niveles de MDA con la utilización de la dieta 5, la cual contenía levadura, como contenido de carotenoides ($U=64,0$; $p=0,0401$). Para el resto de las dietas no se observaron diferencias significativas (Figura 3a).

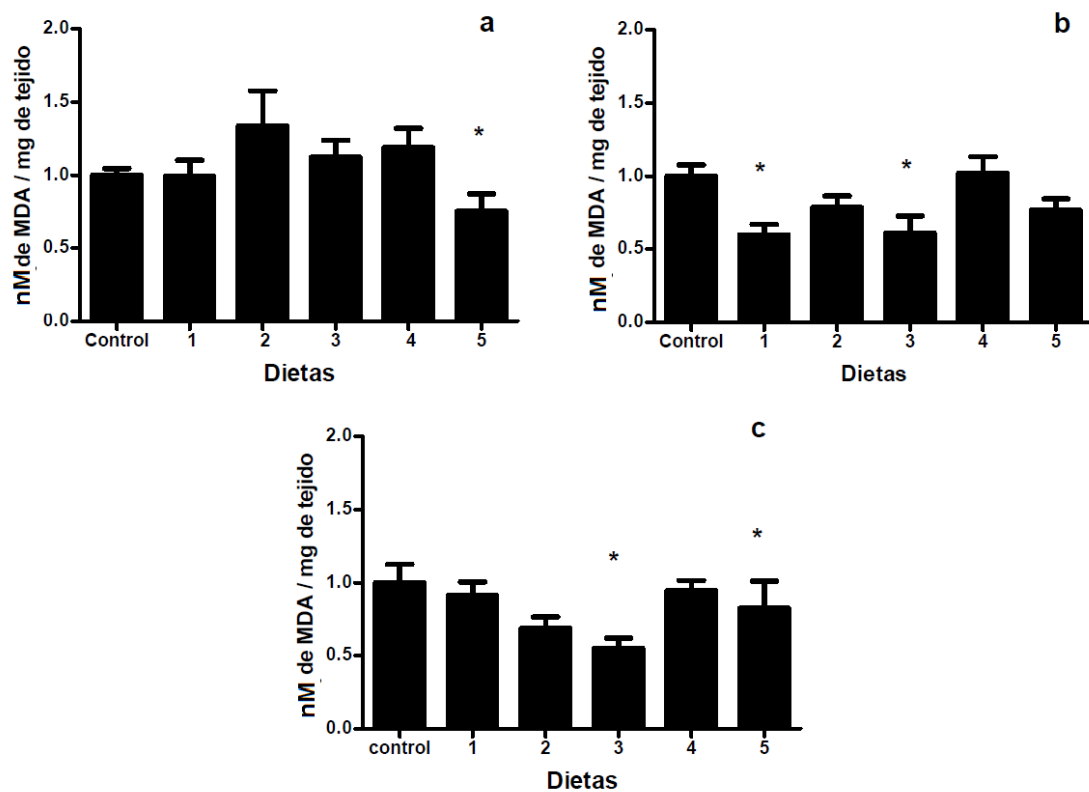


Figura 3. Nanomoles de MDA/mg de intestino de *S.salar*, sometido a condiciones de hacinamiento. Lipoperoxidación de intestino, donde a) Al finalizar día 20; b) Al finalizar día 30; c) Al finalizar día 40. $*p = <0,005$.

Al término del día 30 de experimentación (Fig. 3b), juveniles de *S. salar* exhibieron diferencias significativas en cuanto a una disminución de la lipoperoxidación,

en las dietas 1 y 3, en relación a la dieta control ($U=52,0$; $p=0,0016$ & $U=56,0$; $p=0,0008$), respectivamente.

Al término del día 40, luego de haber sido sometidos a 10 días de estrés, las dietas que presentaron diferencias significativas, en cuanto a lipoperoxidación, respecto de la dieta control (Fig. 3c) fueron las dietas 3 y 5 ($U=52,0$; $p=0,0016$ & $U=44,0$; $p=0,0289$), respectivamente). Observándose una tendencia a disminuir en las otras dietas.(solo sugerencia)

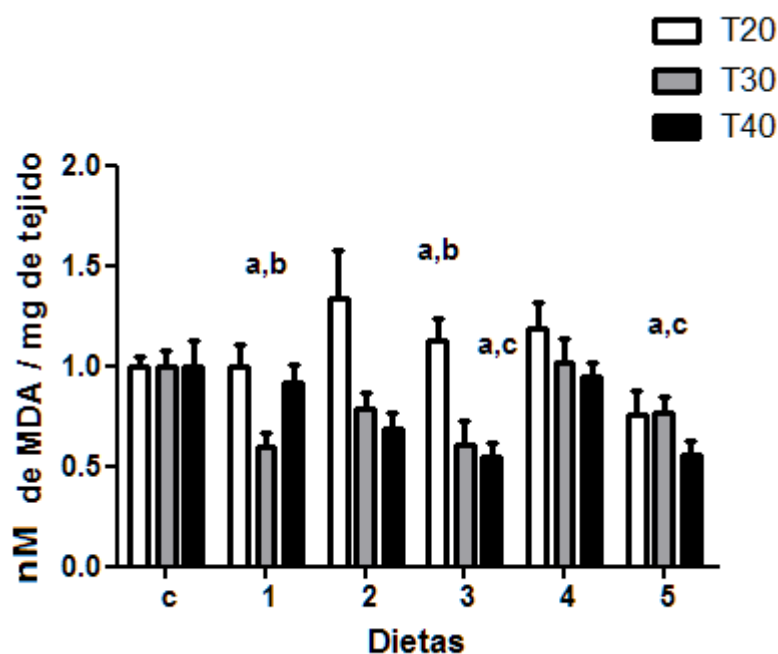


Figura 4. Variación en el tiempo de la lipoperoxidación de intestino de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p = <0,005$). Donde: a=Tiempo 20, b=Tiempo 30, c= Tiempo 40.

Para el análisis de Friedman (tiempo y dietas), se observó que ambos factores generan una variación en la lipoperoxidación (Fig.4), para juveniles de *S.salar* ($F=13,05$; $p=0,003$ & $F=3,267$; $p=0,002$, respectivamente).

Tabla 4. Comparación múltiple de medias (Dunn's) para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas.

Dieta	Tiempo (20-30)	Tiempo (20-40)	Tiempo (30-40)
Control	0,000	0,008	0,007
1	3,986*	1,890	1,453
2	4,097	1,008	2,097
3	1,809*	2,018	4,970
4	2,896	6,780	2,907
5	0,907	5,089*	1,560

* = <0,005.

El post test Dunn's (Tabla 4) confirma que, la dieta 5 es la responsable de disminuir el nivel de lipoperoxidación con el transcurso del tiempo en el intestino de *S.salar*. También la dieta 1 y 3, generan un efecto similar, pero a diferencia de la dieta 5, esta disminución de la lipoperoxidación no es mantenida durante el transcurso del experimento.

5.2. Determinación de grupos carbonilos

La presencia de grupos carbonilos en el músculo de *S.salar*, sometido a diferentes dietas, al finalizar los 20 días de experimentación, no exhibió diferencias significativas respecto de la dieta control (Fig. 5a), pero al día 30 esta situación cambió, donde las dietas 3 y 5, ($U=7,00$; $p=0,0293$ & $U=9,00$; $p=0,0289$, respectivamente), si mostraron diferencias significativas respecto del control (Fig. 5b).

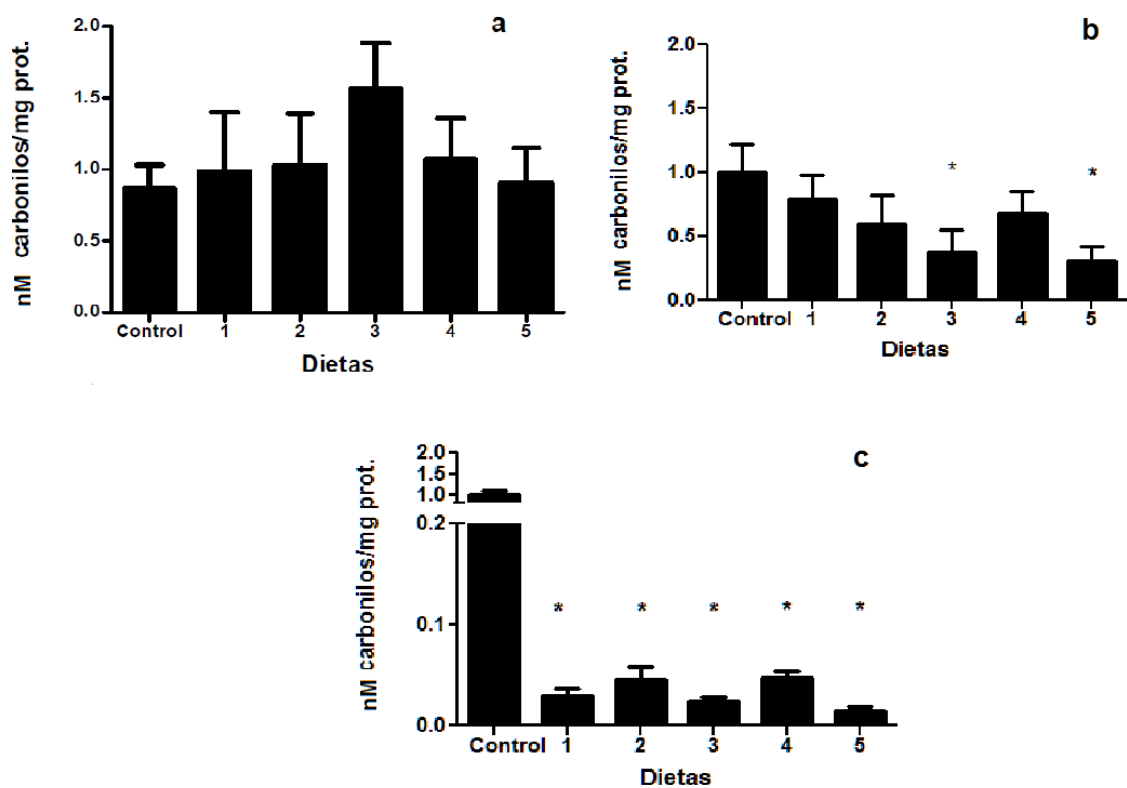


Figura 5. Nanomoles de Carbonilos/mg proteína de *S.salar*, sometido a condiciones de hacinamiento. Presencia de grupos carbonilos: a) Al final del día 20 ; b) Al final del día 30; c) Al final del día 40. * $p = <0,005$.

Al término del día 40, todas las dietas presentaron diferencias significativas, respecto de la dieta control (Fig. 5c). La variación entre dietas (2 y 5) presentó diferencias significativas presentando una menor cantidad de grupos carbonilos la dieta 5. La misma situación se generó al comparar las dietas 4 y 5, donde se observó una menor concentración de grupos carbonilos en la dieta 5 ($K=13,71$; $p=0,0083$). Se determinó que la dieta número 5 exhibe un considerable menor nivel de carbonilación en alevines es de *S.salar*.

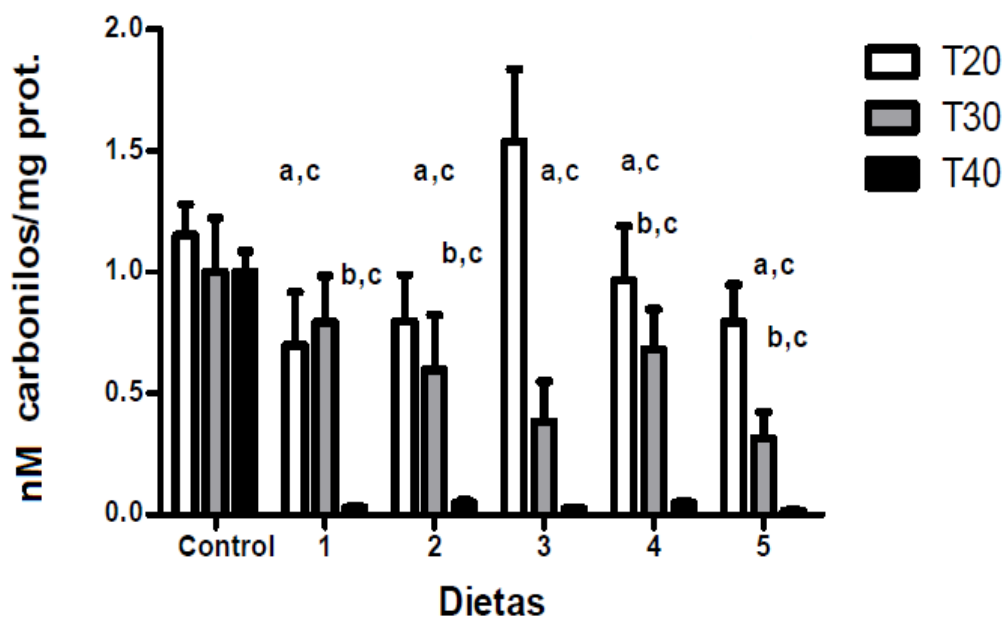


Figura 6. Variación en el tiempo de la presencia de grupos carbonilo en músculo de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p = <0,005$). Donde: a=Tiempo 20 días, b=Tiempo 30 días, c=Tiempo 40 días.

Para el análisis de Friedman (tiempo y dietas), se observó que ambos factores generan una variación (Fig.6), en la formación de carbonilos en el músculo en alevines de *S.salar* ($F=4,006$; $p=0,001$ & $F=5,895$; $p=0,000$, respectivamente).

Tabla 5. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos (en días) de muestreo y las dietas.

Dieta	Tiempo (20-30)	Tiempo (20-40)	Tiempo (30-40)
Control	0,321	0,301	0,354
1	0,567	0,546*	1,978*
2	0,740	0,246*	1,976*
3	0,473	0,573*	2,975*
4	0,594	0,378*	2,896*
5	0,547	0,857*	2,975*

* = <0,005.

Con la aplicación del test de Dunn's (Tabla 5), se puede observar el efecto del factor tiempo de aplicación de las dietas, en la disminución de la presencia de grupos carbonilos. Hacia el término del tiempo 40 días de experimentación, todas las dietas presentaron diferencias significativas hacia una disminución. Con Kruskal-Wallis se comprobó que en el tiempo 40 días, las dietas que si presentaron diferencias significativas entre ellas fueron la dieta (2 y 5) y (4 y 5), exhibiendo en ambas comparaciones un menor nivel de carbonilación la dieta 5 al tiempo 40 días, a diferencia de lo que sucede en el tiempo 30 días donde no se observaron diferencias significativas entre las dietas (K=9,492; $p=0,092$).

5.3. Determinación de la Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en el riñón de *S.salar*, al finalizar los 20 días de experimentación, exhibió diferencias significativas respecto de la dieta control (Figura 7a), para las dietas 1 y 5 ($U=52,0$; $p=0,0005$ & $U=92,00$; $p=0,0278$).

Al término del tiempo 30 días (Fig. 7b) alevines de *S. salar* exhibieron diferencias significativas respecto de la dieta control, en las dietas 1, 2 y 5 ($U=8,00$; $p=0,0001$; $U=5,32$; $p=0,0001$ & $U=32,00$; $p=0,0009$ respectivamente).

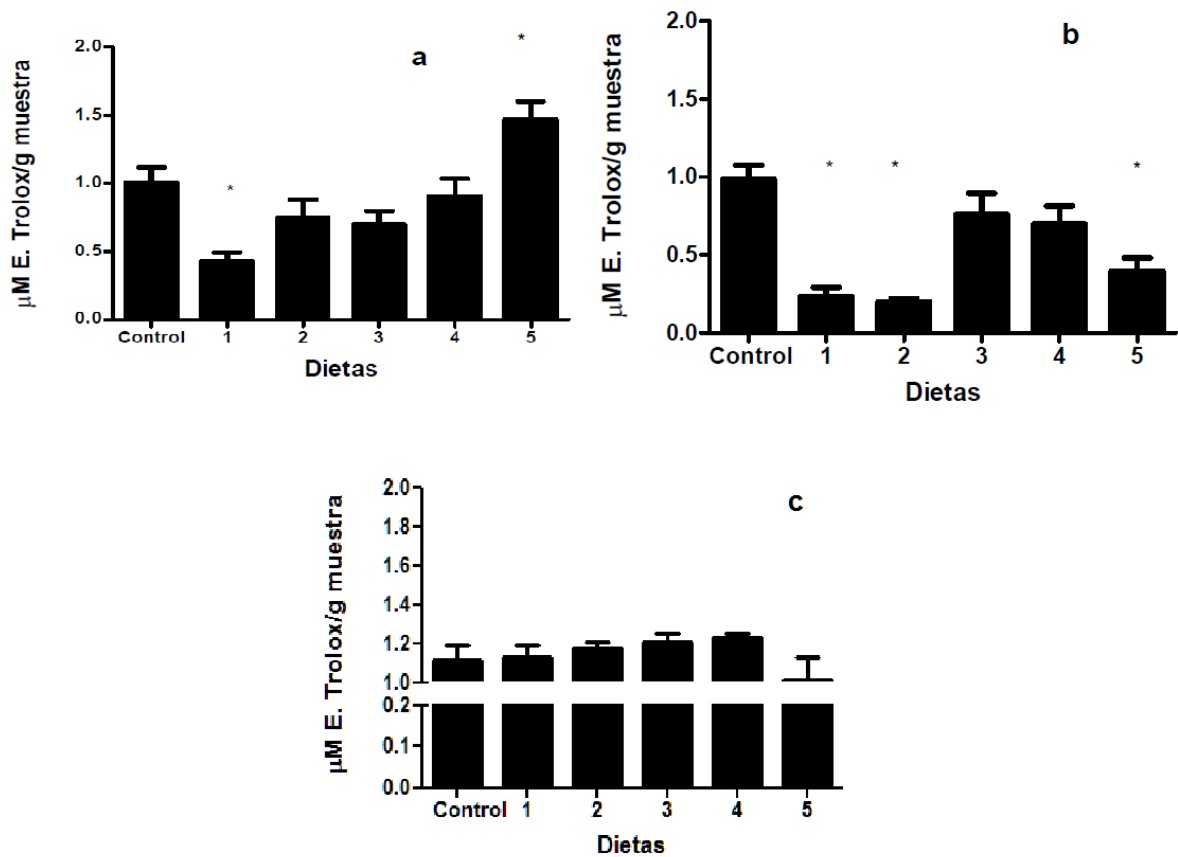


Figura 7. µME. Trolox/g muestra de riñón de *S.salar*, sometido a condiciones de hacinamiento. Donde a) Al finalizar 20 días de experimentación; b) Al finalizar 30 días de experimentación; c) Al finalizar 40 días de experimentación. * $p = <0,005$.

Al finalizar el tiempo 40 días, luego de haber incrementado en 10 días más el estrés (Fig. 7c), no se presentaron diferencias significativas en ninguna dieta ($U=58,08$; $p=0,8321$).

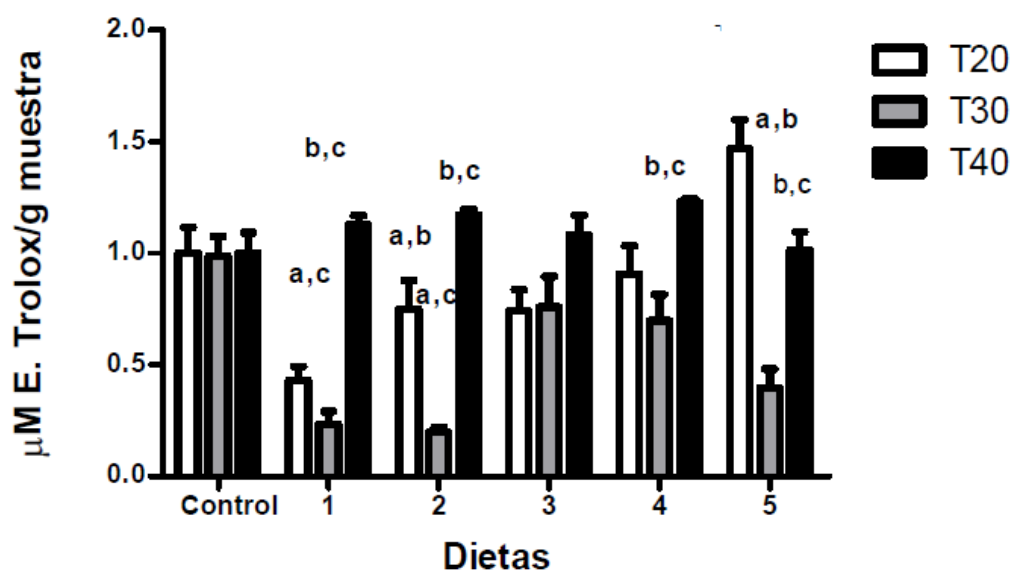


Figura 8. Variación en el tiempo de la capacidad antioxidante en riñón de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p = <0,005$). Donde: a=Tiempo 20 días, b=Tiempo 30 días, c=Tiempo 40 días.

Para el análisis de Friedman (tiempo y dietas), se observó que ambos factores generan una variación en la capacidad antioxidante del riñón (Figura 8) para alevines de *S.salar* ($F=43,86$; $p=0,002$ & $F=4,987$; $p=0,000$, respectivamente).

Tabla 6. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas.

Dieta	Tiempo (20-30) días	Tiempo (20-40) días	Tiempo (30-40) días
Control	0,134	0,1678	0,156
1	1,895	2,897*	3,908*
2	1,897	2,980*	3,087*
3	1,789	3,890	2,907
4	1,567	2,960	2,089*
5	2,980*	2,756	3,678*

* = <0,005.

Mediante la aplicación del post test Dunn's (Tabla 6), se puede observar un aumento de la capacidad antioxidante desde el día 30 al 40, principalmente para las dietas 1, 2, 4 y 5. Tiempo en el cual se aplicó el estrés por hacinamiento.

5.4. Determinación de Glutación

5.4.1. Glutación reducido

La determinación de glutación reducido en el hígado de *S.sala. Muestra* al término del día 20 (Fig. 9), sólo la dieta 5, presentó diferencias significativas respecto de la dieta control (U=111,0, $p=0,0273$), observándose una disminución de glutación reducido con esta dieta. En el día de experimentación 30 ninguna dieta presentó diferencias significativas respecto de su control. Lo mismo se observó, al finalizar el día 40, ninguna dieta presentó diferencias significativas respecto de su control.

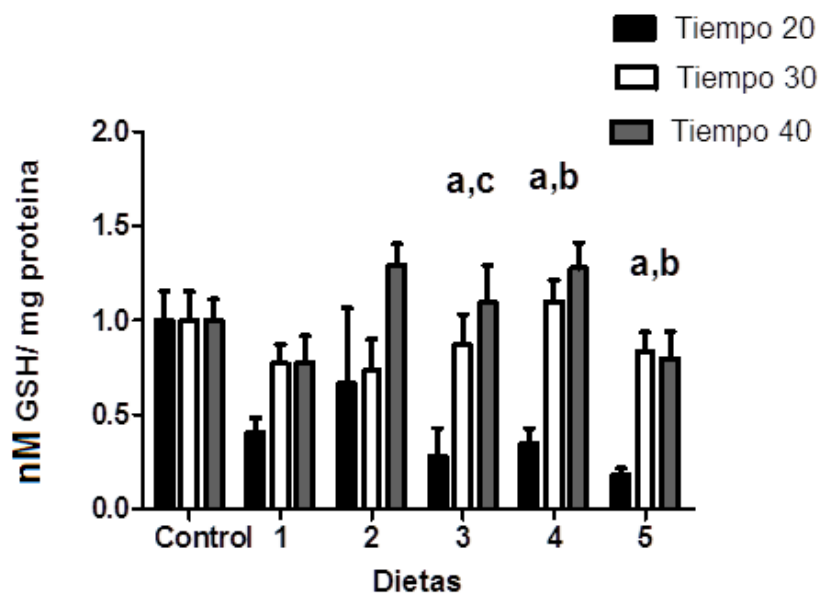


Figura 9. Variación en el tiempo de la concentración de Glutación reducido en el hígado de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p < 0,005$). Donde: a=Tiempo 20, b=Tiempo 30, c= Tiempo 40.

Para el análisis de Friedman (tiempo y dietas), se observó que ambos factores generan una variación en la concentración de glutatión reducido para juveniles de *S.salar* (F=4,860 $p=0,002$ & F=3, 674; $p=0,000$, respectivamente).

Tabla 7. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas.

Dieta	Tiempo (20-30) días	Tiempo (20-40) días	Tiempo (30-40) Días
Control	0,765	0,5674	0,654
1	2,987	1,876	1,674
2	1,9987	1,765	2,087
3	1,876	2,865*	1,986
4	1,987*	2,897*	1,986
5	1,978*	2,065	1,976

* = <0.005.

La prueba de Dunn's permitió demostrar que glutatión reducido presentó un aumento de su concentración en relación al tiempo con las dietas 4 y 5, mientras que la dieta 3 demuestra un aumento sostenido en el tiempo de glutatión reducido (Tabla 7).

5.4.2. Glutación oxidado

La concentración de glutatión oxidado en el hígado de *S.salar* al finalizar el día 20, no mostró diferencias significativas respecto de la dieta control. En el día 30, la dieta 1 exhibió diferencias significativas respecto de la dieta control ($U=61,0$; $p=0,0341$), con un incremento hacia la concentración de glutatión oxidado. En el tiempo 40 tampoco se presentaron diferencias significativas respecto del control para ninguna dieta (Fig. 10).

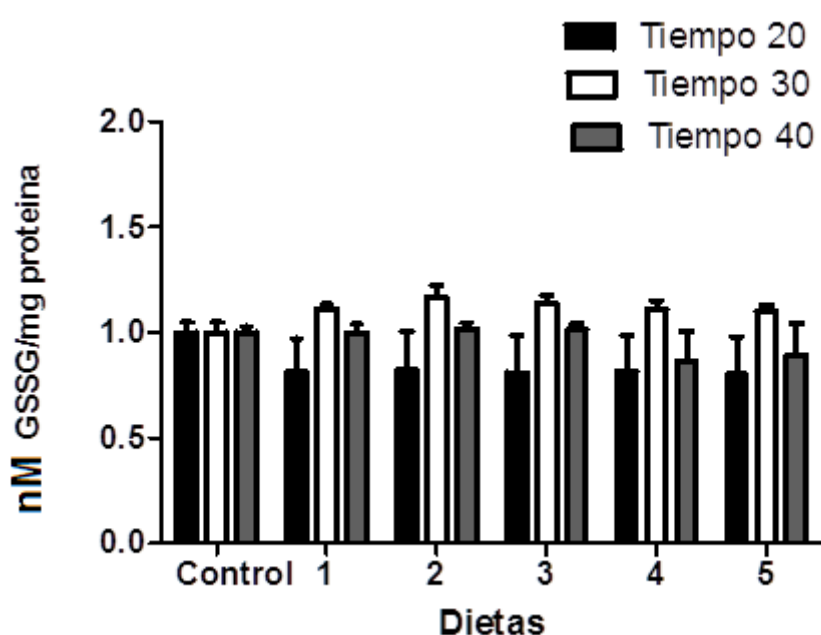


Figura 10. Variación en el tiempo de la concentración de Glutatión oxidado en el hígado de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p = <0.005$). Donde: a=Tiempo 20, b=Tiempo 30, c=Tiempo 40.

Para el análisis de Friedman (tiempo y dietas), se observó que solo el tiempo generó una variación en la concentración de glutatión oxidado para alevines de *S.salar* ($F=3,876$; $p=0.001$ & $F=2,886$; $p=0.7$, respectivamente).

Tabla 8. Comparación múltiple de medias (Dunn's), para la interacción entre los respectivos tiempos de muestreo y las dietas.

Dieta	Tiempo (20-30) días	Tiempo (20-40) días	Tiempo (30-40) Días
Control	1,896	1,786	1,780
1	1,086	1,134	0,965
2	2,086	1,908	2,086
3	2,087	1,907	3,907
4	3,987*	2,907	3,086*
5	3,908*	2,906	3,089*

* = <0.005.

Mediante Dunn's (Tabla 8), se observó un aumento significativo de glutatión oxidado para las dietas 4 y 5, el cual disminuye significativamente, mediante la aplicación del estrés por hacinamiento hacia el día 40, para las mismas dietas.

La relación glutatión de glutatión reducido v/s glutatión oxidado presentó diferencias significativas hacia una disminución del estrés oxidativo, excepto para la dieta 1 ($F=7,857$; $p=0.2$), aumentando con esto la capacidad antioxidante del organismo (Fig. 11). El resto de las dietas todas generaron un aumento de la relación glutatión reducido /oxidado con el aumento del tiempo.

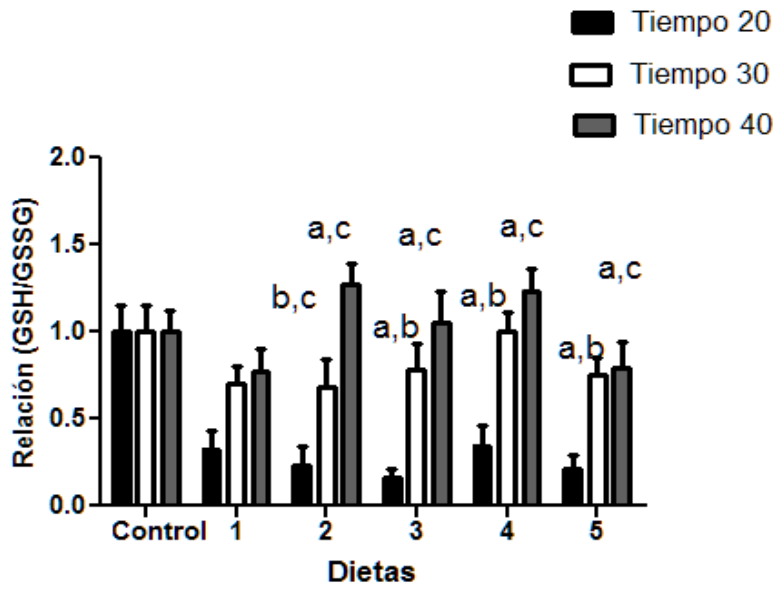


Figura 11. Variación en el tiempo de la relación glutatión reducido/oxidado en el hígado de juveniles de *S.salar*, debido al consumo de las diferentes dietas. Las letras corresponden a las diferencias significativas ($p = <0,005$). Donde: a=Tiempo 20 días, b=Tiempo 30 días, c= 40 días.

6. DISCUSIÓN

Los tejidos de los salmónidos se caracterizan por su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, volviéndose susceptibles a un daño inducido por ROS, generado por condiciones de estrés oxidativo. Intermediarios inestables en la peroxidación de los lípidos, y las especies reactivas de oxígeno pueden conducir a daño de muchas funciones biológicas.

Los requerimientos de ácido araquidónico en dietas para peces se encuentran bajo fuertes controversias. Por un lado, se ha propuesto que un exceso de ácido araquidónico puede ser perjudicial, mientras que por el otro, se ha reportado que éste ácido graso en particular cumple con un papel importante en la respuesta al estrés, crecimiento, supervivencia y desove en peces (Baker & Davis, 1996).

Bell *et al.*, 1986; Tacon 1992 & Sargent *et al.*, 2002, mencionan que los peces, como la trucha arcoíris y el salmón del Atlántico, tienen la habilidad de elongar y desaturar ácidos grasos de cadena corta hacia ácidos grasos de cadena larga en la fase de agua dulce, y sus requerimientos podrían ser satisfechos por ácidos grasos como el ácido linoléico y el ácido linolénico. Pero no está claro si estos mismos ácidos grasos son suficientes para mantener una adecuada condición fisiológica de los peces, por lo cual la suplementación con ácidos grasos altamente insaturados, como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico son altamente utilizados en acuicultura. Aunque según Bell *et al.*, 2000, los peces podrían presentar bajas concentraciones de ácido araquidónico, debido a que durante el cultivo, estarían sometidos a condiciones estresantes y éste ácido graso se utilizaría como precursor de prostaglandinas para regular la función inmune celular.

El ácido araquidónico en juveniles de *Salmo salar* puede ingresar directamente a través de la dieta o según Bell *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2002, resultar de la metabolización de dos ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono, el ácido linoleico y el ácido α -

linolénico. Los peces presentarían suficiente actividad de elongasas y desaturasas para bioconvertir los ácidos linoléico y linolénico en ácido araquidónico (Buettner, 1993; Berglung *et al.*, 1993), contribuyendo con esto a la formación de ácidos grasos insaturados o poliinsaturados en la membrana celular. Sumado a esto según Abele & Puntarulo, 2004, la naturaleza poiquiloterma de los peces, contribuye a que sus lípidos sean más altamente insaturado que los de los homeotermos, predisponiéndolos a la peroxidación de lípidos y favoreciendo la generación de estrés oxidativo bajo condiciones de cultivo no óptimas, como por ejemplo el hacinamiento.

Las dietas entregadas a juveniles de *Salmo salar*, que contenían ácido araquidónico combinado y no combinado con otro antioxidante, no favorecieron la disminución del estrés oxidativo generado por condiciones de hacinamiento, debido a que según Mourente *et al.*, 2000, en respuesta a estímulos el ácido araquidónico que se encuentra formando parte de los glicerofosfolípidos de membrana se libera y por sus características moleculares, en particular la presencia de cuatro dobles enlaces en posición *cis* lo hacen susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno (Mourente *et al.*, 2000; Baker & Davis, 1996). Esto podría ocurrir de manera no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos, o a través de la acción de tres tipos de oxigenasas: las ciclooxigenasa (COX) que dan lugar a compuestos como las prostagandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs), la lipooxigenasas (LO) que dan lugar a los ácidos hidroxieicosatetraenólicos (HETEs) y a los leucotrienos (LTs) y a las epoxigenasas o citocromos P450 que originan ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs) e isómeros de los HETEs (Baker & Davis, 1997).

En general en todas las dietas donde se utiliza ácido araquidónico, su aplicación para obtener buenos resultados se mezcla con otro antioxidante, como por ejemplo un antioxidante muy estudiado para adicionarlo junto con el ácido araquidónico es la vitamina E (Hamre & Lie, 1995), la cual junto con los ácidos grasos poliinsaturados

aumenta el efecto protector de la oxidación fisiológica (Hamre & Lie, 1995; Hosseini *et al.*, 2010). La vitamina E reduce la excreción de isoprostanos, formados por el metabolismo del ácido araquidónico. Una correlación entre el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados dietéticos y los requerimientos de tocoferol, se encontraron en la tilapia azul, turbot, carpa y salmón del atlántico (Bessonart *et al.*, 1999). Cuando los peces fueron alimentados con dietas deficientes en tocoferol, se produce una rápida pérdida de tocoferol en el hígado y luego en el músculo. Bell *et al.*, 2000 en un estudio en salmón del atlántico, se observó que la alimentación con una dieta deficiente en tocoferol durante un período de 22 semanas resultó en una disminución de los niveles de tocoferol hepáticos cayendo a un 3% de su valor original y un aumento de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

Estos resultados sugieren una conservación selectiva del tocoferol en tejidos con un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados. En un estudio realizado por Tocher *et al.* (2002), se indica que concentraciones bajas de α -tocoferol en las dietas para peces, puede llegar a afectar la condición del hígado, el cual puede incluso mostrarse de una forma más alargada, posiblemente por efecto de la peroxidación de los lípidos, dado que concentraciones bajas de α -tocoferol no sería suficiente para ejercer su efecto antioxidante.

En la suplementación con flavonoides sin combinación con otro antioxidante (dieta 3), solo se demostró una disminución de la presencia de grupos carbonilos luego de 40 días de suplementación y un aumento de la capacidad antioxidante hasta el tiempo 20 días. Esta acción directa en cuanto a la protección de proteínas se debe a que los flavonoides poseen una elevada afinidad para unirse a proteínas y otras macromoléculas biológicas (hormonas, ácidos nucleicos) (Martínez-Florez *et al.*, 2002), Además los flavonoides pueden adherirse a iones metálicos, actuando directamente en la protección de estas biomoléculas, por lo tanto presentan una gran capacidad para catalizar el transporte de electrones y captar radicales libres & Kalt *et al.*, 2001 & Martínez-Florez *et al.*, 2002. Según Hanasaki *et al.*, 1994, diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de

peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas. Se ha observado que pueden inhibir la peroxidación lipídica producida por el hierro y aumenta la concentración de glutatión en la mucosa intestinal de ratas alimentadas durante tres días con flavonoide (Formica & regelson, 1995). Los flavonoides son importantes para el control de las concentraciones intracelulares de glutatión. Actuando a nivel del gen de regulación, son capaces de aumentar el nivel en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades. También tienen acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa, así como por su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de matriz (Hodnick *et al.*, 1988).

Los otros marcadores de estrés oxidativo con la suplementación de la dieta 3, no evidenciaron una disminución significativas del estrés. Esto se puede deber a que en investigaciones realizadas con flavonoides, se ha observado que las mismas propiedades que caracterizan la actividad antioxidante de los flavonoides determinan que puedan presentar efectos prooxidantes (Procházková *et al.*, 2011). Los mecanismos moleculares implicados se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide-hierro redox lábil. En el primer caso por ejemplo, la autooxidación del radical aroxilo genera un anión superóxido (O_2^-) que da lugar a su vez al dañino radical hidroxilo (OH^\cdot). Estos mecanismos pueden constituir la base de las acciones mutagénicas y citotóxicas descritas para algunos flavonoides (Hodnick *et al.*, 1988; Cirico & Omaye, 2006). Estos estarían por tanto asociadas de forma insoluble a sus efectos antioxidantes, de forma que nunca puede descartarse su aparición, es por esto que la suplementación de flavonoides debería ser acompañada de otro antioxidante, especialmente cuando las dosis de flavonoides utilizadas son muy altas.

Los flavonoides tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles. Por esta característica, a diferencia de otros antioxidantes son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres (Formica & regelson, 1995; Hodnick *et al.*, 1988).

La dieta que logró alcanzar una disminución del estrés oxidativo significativo considerable, fue la dieta 5, compuesta por la levadura lisada y liofilizada. Esta dieta al contener esta levadura tiene la capacidad de generar una gran diversidad de carotenoides, como aporte de antioxidantes, a través de la ruta del isoprenoide. Además de contener en sus paredes inmunoestimulantes (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004).

Los carotenoides tienen importantes funciones biológicas en animales como precursores de vitamina A, como estimulantes de la respuesta inmune (Lessin *et al.*, 1997), participan en diversas funciones en los animales y en el hombre, incluyendo su conversión a vitamina A, además de estimular la respuesta inmune al promover la proliferación de los linfocitos T y B, aumentando la actividad de los macrófagos y neutrófilos (Krinsky, 1987). En contraste con las plantas, la distribución cuantitativa y cualitativa de carotenoides en animales acuáticos es principalmente el resultado de los hábitos dietéticos especie específicos, características de absorción, y de las actividades metabólicas de transformación (Maugle *et al.*, 1980).

La actividad antioxidante del carotenoide astaxantina ha recibido considerable atención, especialmente su correlación con la presencia de vitamina E (Katayama *et al.*, 1992). El alfa-tocoferol ha sido largamente reconocido como un importante antioxidante lipido-soluble. El b-caroteno es extremadamente eficiente secuestrador de oxígeno singlete y es clasificado como un antioxidante preventivo (Burton, 1989; Christiansen *et al.*, 1995).

Los estudios en Noruega sobre la primera alimentación del salmón del Atlántico indicaron que la presencia de astaxantina fue el factor principal que afectó el crecimiento,

sobrevivencia, y concentración de vitamina A de los alevines (Christiansen & Torrissen, 1996). Los peces alimentados con una dieta a base de caseína sin suplemento de astaxantina (15 mg/Kg) mostraron 18% de sobrevivencia comparado con una mayor sobrevivencia del 90% de los peces alimentados con dietas con astaxantina (Christiansen, 1995; Christiansen & Torrissen, 1996). Se encontró que la astaxantina tiene un efecto sobre la concentración de la vitamina A de este carotenoide en gametos de salmónidos indicando un mayor potencial de función de provitamina A comparado con b-caroteno durante el período de primera alimentación (Folling *et al.*, 1997). Bajas tasas de crecimiento y baja sobrevivencia fueron observadas en grupos alimentados con dietas sin astaxantina, incluyendo al grupo alimentado con una dieta con suficiente vitamina A. Se concluyó que la astaxantina fue esencial para los alevines de salmón durante el primer período de alimentación (Folling *et al.*, 1997; Bjerkeng, 1992).

Las investigaciones realizadas en Noruega muestran la significancia de la astaxantina sobre el sistema inmune y resistencia a enfermedades del salmón del Atlántico durante la primera alimentación. La Astaxantina en dietas para reproductores de peces juega un papel en la subsecuente sobrevivencia de los alevines de salmónidos.

7. CONCLUSIONES

La suplementación con antioxidantes debe ser analizada cuidadosamente antes de su aplicación, debido a que las necesidades nutricionales del organismo y factores ambientales sobre éste, inciden en la concentración del antioxidante a utilizar como en su mecanismo de acción: antioxidantes o prooxidantes.

La dieta que presentó el menor efecto protector en cuanto al estrés oxidativo generado por condiciones de hacinamiento, fue la dieta que contenía ácido araquidónico en combinación o sin combinación con otro antioxidante. Probablemente, debido a su gran potencialidad de actuar como agente oxidante al generar una gran diversidad de productos de lipoperoxidación durante su metabolización.

La dieta que contenía el mix de antioxidantes, generó un efecto significativo en la disminución de la concentración de grupos carbonilos y productos de lipoperoxidación como el MDA, debido a la presencia de grupos fenólicos en la suplementación. Además se favoreció la concentración de glutatión reducido con un aumento de la capacidad antioxidante.

Actualmente una estrategia con gran potencial, es el enriquecimiento de las dietas con productos antioxidantes e inmunoestimulantes, tales como las levaduras, para mejorar el estado sanitario y nutricional de los peces en cultivo, lo cual fue ratificado en esta tesis. Al utilizar la dieta que contenía levaduras lisadas y liofilizadas, se obtuvieron los mejores resultados en cuando a la disminución del estrés oxidativo, probablemente debido a la capacidad antioxidante e inmunoestimulante que posee este microorganismo.

8. LITERATURA CITADA

- Abele D & Puntarulo S. 1994. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 138(4):405-15.
- Angulo, F. 2000. Agentes antimicrobianos en acuicultura: impacto potencial en la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*; 20(6).
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan Q., Tan, B. & Liufu, Z. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*; 2004; 242:489-500.
- Alderman, D. J. 1994. Control de Oomycete pathogens in aquaculture, In: *G. J. Mueller, ed, Salmon Saprolegniasis*. Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, Portland,OR. pp 111-130.
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Prieto, A., Moyano, R., Blanco, A. & Caméan, A. 2009. Effects of dietary selenium on the oxidative estress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water Bloom. *Toxicon*; 53: 269-282.
- Atmann, C.A. & Blanco, G.W. 2001. Efectos de la Salmonicultura en las Economías Campesinas de la Región de Los Lagos, Chile. *Revista Austral de Ciencias Sociales*; 5:93-106.
- Aururo, A. & Ocampo, L. 1999. Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*; 30(4).
- Baker, R.T.M. and Davies, S.J. 1996b. Increased production of docosahexaenoic acid (22:6 n-3, DHA) in catfish nutritionally stressed by the feeding of oxidized oils and the modulatory effect of dietary α -tocopheryl acetate. *Journal Fish Biology*; 49: 748-752.
- Baker, R.T.M. and Davies, S.J. 1997a. Muscle and hepatic fatty acid profiles and α -tocopherol status in African catfish (*Clarius gariepinus*) given diets varying in oxidative state and vitamin E inclusion. *Animal Science*; 64: 187-195.
- Baker, R., Pfeiffer, A., Schöner, F. & Smith-Lemmon, L. 2002. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology*; 99: 97-106.
- Bhosale, P. & Bernstein, P. 2007. Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 458: 121-127.

- Bell, M., Henderson, R., Pirie, B & Sargent, J. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 83(B): 711-719.
- Bell, M., McEvoy, A., Tocher, D. & J. Sargent. 2000. Depletion of α -tocopherol and astaxantin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects autoxidative defence and fatty acid. *metabolism journal of Nutrition*; 130:1800-1808.
- Bell, M., Henderson, R., Tocher, F., McGhee, R., Dick, A., Porter, R., Smullen & Sargent, J. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of nutrition*; 132: 222-230.
- Berglund, A., Nilsson, R., Liljenberg C.1999. Permeability of large unilamellar digalactosyldiacylglycerol vesicles for protons and glucose—influence of α -tocopherol, β -carotene, zeaxanthin and cholesterol. *Plant Physiology and Biochemistry*; 37: 179–186.
- Bessonart, M., Izquierdo, M., Salhí, M., Hernández-Cruz, C., Gonzalez, M & Fernández-Palacios, M. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*; 179: 265-275.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T & Liaaen-Jensen, S. 1992. Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation'. *Aquaculture*; 108: 333-346.
- Birkelanda, S. & Bjerkeng, B. 2004. Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by brine concentration and pH. *Food Chemistry*; 85: 559–568.
- Boeuf, G., Kristensen, E.R., Haese, R. & Kostka, J.E. 1993. Seawater adaptation strategies in salmonids. pp: 61-80 In: *Coastal and estuarine studies*. American Geophysical Union. Washington, DC, USA.
- Borja, A. 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*; 18 (1-4):41-49.
- Boughton, D., Gibson, M., Yedor, R. & Kelley, E. 2007. Stream temperature and the potential growth and survival of juvenile *Oncorhynchus mykiss* in a southern California creek. *Freshwater Biology*; 52:1353-1364.
- Buettner, G.1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 300: 535–543.

- Burton, G. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutrition* 119: 109-111. Castillo, R. and G. Negre-Sadargues. 1991. Effect of eyestalk ablation on the metabolism of carotenoid pigments of the hermit crab *Clibanarius erythropus* Latreille (1818) (Crustacea Decapoda Anoroura) *Comparative Biochemistry and Physiology*; 99B: 187-192.
- Buschmann, A. & Fortt, A. 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*; 21(3):58-64.
- Buschmann, A.H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. & Henríquez, L. 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management*; 52:243-249.
- Cabello, F. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. *Revista Médica de Chile*; 132:1001-1006.
- Cabello, F. 2005. Enfermedades originadas en el mar: ¿síntomas del deterioro de la biodiversidad marina en la Décima Región?. *Revista Ambiente y Desarrollo*; 20(3):80-87.
- Canadian Food Inspection Agency. 2006. Malachite Green
- Carru, C., Deiana, L., Sotgia, S., Pes, G. & Zinellu, M. 2004. Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis. *Electrophoresis*; 25: 882-889.
- CEPAL. 2005. Evaluaciones de Desempeño Ambiental. Organización de Cooperación y desarrollo económicos. *Comisión económica para América latina y el Caribe*.
- Cirico, T. & Omaye, S. 2006. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chemical Toxicology* ;44:510-6.
- Claude, M., Oporto, J., Ibañez, C., Brieva, L., Espinoza, C. & Arqueros, M. 2000. La ineficiencia de la salmonicultura en Chile: *Aspectos sociales, económicos y ambientales*.
- Collette, B. 2006. USFDA, *Industry Efforts Reduce Use of Unapproved Drugs*. *Global Aquaculture Advocate*. July/August. p.38-39.
- Conte, F.S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*; 86: 205-223.
- Cook, J.T., McNiven, M.A., Richardson, G.F. & Sutterlin, A.M. 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*; 188:15-32.
- Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O. & Waagbø, R. 1995a. Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and

- without astaxanthin supplementation. *J. Fish Diseases* 18: 317-328. Craig, J.C.A. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*; 47: 61-88.
- Christiansen, R., Lie, O. & Tonissen, O. 1995b. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin: First-feeding fry. *Aquaculture Nutrition*; 1: 189-198.
- Christiansen, R. & Torrissen, O. 1996. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed different dietary levels of astaxanthin. Juveniles: *Aquaculture Nutrition*; 2: 55-62.
- Doren & Gabella. 2001. *Salmonicultura en Chile: Desarrollo, Proyecciones e Impacto. Terram publicaciones.*
- Duran, G. & Kremmerman, M. 2008. Informe industria salmonera. *Informe preparado para el Departamento de Estudios de la Dirección del Trabajo de Chile.*
- Elejalde G. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina Interna*: 18 (6); 326-335.
- Engelsma, M.Y., Huisling, M.O., Van Muiswinkel, W.B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H.F.J. & Verburg-van Kemenade, B.M. 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.87; 467-479.
- Escorza, Q., Angélica, M., Salinas, C. & Victor, J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 28(3); 89-101.
- Fang, Y., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18(10); 872-9.
- Fernández, A., Blanco, G., Vázquez, E., McCarthy, I. & Prado, S. 2002. Estrategias de crecimiento de una población de Salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758 en condiciones ambientales diferentes. *Boletín instituto Español Oceanografía*: 18(1-4); 363-369.
- Folling, S., Lagocki, T., Storebakken, J., Olli, J. & Alsted, N. 1997. Bioavailability of all E-astaxanthin and z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*; 159: 63-82.
- Formica, J. & Regelson, W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*; 33:1061-80.
- Fulbert, J.C., Cals, M.J. 1992. Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathologie Biologie*; 1992(40): 66-77.

- Flik, G., Klaren, P.H.M., Van den Burg, E.H., Metz, J.R. & Huissing, M.O. 2006. CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*; 146: 36-44.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Ren, T., Fay, C. & 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*; 97-103.
- Gauer, K. & Andrade, C. 2000. Uso y Abuso de Nuestros Recursos Pesqueros: *Ambiente y Desarrollo*; 1: 79-83.
- Gomá, O. 2009. Aguas arriba: la transformación socioeconómica del ecosistema Llanquihue-Chiloé, Chile, durante los años 90. *Consejo Latinoamericano de Ciencias Sociales (CLACSO)*.
- Grune, T., Lietz, G., Palou, P., Ross, C., Stahl, W., Tang, W., Thurnham, D., Yin, S. & Biesalski, H. 2010. β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *The Journal of Nutrition*. 2268S- 2268S.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989 Free radicals in biology and medicine (2^a ed). *Oxford: Oxford Clarendon Press*.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Review*; 52: 253-265.
- Hamre, K. & Lie, O. 1995. Alpha-tocopherol levels in different organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - effect of smoltification, dietary levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E. *Comp. Biochemical Physiology*; 111A: 547-554.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. & Fukui, S. 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radicals Biomedical Medicine*; 16: 845-850.
- Hayes, S.A., Bond, M.H., Hanson, C.V., Freund, E.V. 2008. Steelhead Growth in a Small Central California Watershed: Upstream and Estuarine Rearing Patterns. *Transactions of the American Fisheries Society*; 137: 114-128.
- Harris, J. & Bird, D.J. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 77: 163-176.
- Heim, K., Tagliaferro, A. & Bobilya, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 572-584
- Hemre, G. & Sandnes, K. 2008. Seasonal adjusted diets to Atlantic salmon (*Salmo salar*): Evaluations of a novel feed based on heat-coagulated fish mince, fed throughout 1 year in sea: Feed utilization, retention of nutrients and health parameters. *Aquaculture*; 166-174.
- Hodnick, W., Kalyanaraman, B., Pritsos, C. & Pardini, R. 1989. The production of hydroxyl and semiquinone free radicals during the autoxidation of redox active

flavonoids. In: SimicMG, Taylor KA, Ward JF, von Sonntag C, editors. Oxygen radicals in biology and medicine. New York: Plenum; 149–52.

- Hosseini, S., Abedian-Kenari, A., Rezaei, M., Mohammad Nazari, R., Feás, X. & Rabbani, M. 2010. Influence of the in vivo addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. *Food Chemical*; 118: 341- 348.
- Hutchings, J.A. & Jones, M.E.B. 1998. Life history variation and growth rate thresholds for maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 55: 22-47.
- Jaramillo, R., Goicoechea, O. Garrido, O. & Molinari, E. 2009. *Salmo salar*: morfología ultraestructural de la pared del corion en ovas normales y con problemas de eclosión. *Archivos de Medicina Veterinaria*; 41: 67-71.
- Jen Hu, C., Chen, S., Chih-Hung, P. & Chen-Huei Huang. 2006. Effects of dietary vitamin A or β -carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*; 253: 602–607.
- Kalt, W., Ryan, D., Duy, J., Prior, R., Ehlenfeldt, M. & Vander, K. 2001. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49:4761–7.
- Karakaya, S., El, S.N. & Tas, A.A. (2001). Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences Nutrition*; 52:501-508.
- Katz, J., Lizuka, M. & Muñoz, S. 2011. Creciendo en base a los recursos naturales, “tragedias de los comunes” y el futuro de la industria salmonera chilena. *CEPAL-serie Desarrollo productivo N°191*.
- Katayama, T., Katama, T. & Chichester, C. 1972. The biosynthesis of astaxanthin in the prawn, *Penaeus japonicus*. *The international Journal of Biochemistry*; 3: 363-368
- Koteswara, R., Madamanchi, G., Fang, S. & Tzeng, Y. 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 1770–1776
- Kowaltowski A, N. Souza-Pinto, R. Castilho & A. Vercesi. 2009. Mitochondria and Reactive oxygen species. *Free Radicals Biology & Medicine*; 47: 333-343.
- Krinsky, J. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure Applied Chemistry*; 66: 1003-1010.

- Maqsood, S. & Benjakul, S. 2010. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*; 119: 123–132
- Manual Merck de veterinaria 2000 (5a ed.). Editorial Océano. Barcelona, España.
- Marschall, E.A., Quinn, T.P., Roff, D.A., Hutchings, J.A., Metcalfe, N.B., Bakke, T.A., Saunders, R.L. & Poff, L. 1998. A framework for understanding Atlantic salmon (*Salmo salar*) life history. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 55: 48-58.
- Martin, P., Rancon, J., Segura, G., Laffont, J. Boeuf, G. & Dufour, S. 2012. Experimental study of the influence of photoperiod and temperatura on the swimming behaviour of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. *Aquaculture*. Article in press.
- Martínez-Flórez, S., Martínez-Flórez, J., González-Gallego, J., Culebras, M. & Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria XVII* (6) 271-278 ISSN 0212-1611.
- Maugle, P., Kamata, T., McLem, S., Simpson, K. & Katayama, T. 1980. The influence of eyestalk ablation on the carotenoid composition of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*; 46: 901-904.
- Meyers, S.P. and T. Latscha. 1997. Carotenoids in crustacean nutrition. In *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture*, Vol. 6. (D. Abramo, D. Conklin and D. Ageuyama, eds.) World Aquaculture Society; 164-193, Baton Rouge, Louisiana.
- Montero, C. 2004. Formación y desarrollo de un cluster globalizado: el caso de la industria del salmón en Chile. *CEPAL-SERIE Desarrollo productivo*.
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Bell, J.G. and Tocher, D.R. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*, *Osteichthyes*, *Sparidae*) fed dietary oxidised oil: Attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*; 214: 343-361.
- Muona, M. & Soivio, A. 1992. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and sea trout, (*Salmo trutta L.*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*; 106: 75-87.
- Nakano, S., Kachi, T. & Nagoshi, M. 1991. Individual Growth Variation of Red-spotted Masu Salmon, *Oncorhynchus masou rhodurus*, in a Mountain Stream. *Japanese Journal of Ichthyology*. 38(3).
- Nieto, D., Norambuena, R., González, E., González, L. & Brett, D. 2010. Sistemas de producción de smolts en Chile. Análisis de alternativas desde la perspectiva ambiental, sanitaria y económica. Valdivia, Chile. *WWF*.

- Nomura, M., Sloman, K.A., Von Keyserlingk, M.A.G. & Farrell, A.P. 2009. Physiology and behavior of Atlantic salmon *Salmo salar*) smolts during commercial land and sea transport. *Physiology & Behaviour*; 96: 233-243.
- North, B.P., Turnbull, J.F., Ellis, T., Porter, M.J., Migaud, H., Bron, J. & Bromage, N.R. 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*; 255: 466-479.
- Lenton, K., Therriault, H. & Wagner, R. 1999. Analysis of glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*; (274): 125-130.
- Lessin, W., Catignani, G. & Schwartz, S. 1997. Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 45(10): 3728-3732.
- Levin, R., Garland, D. & Oliver, C. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*; 186; 464-78.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 78: 517S- 520S.
- Olsen, R., Kiessling, K., Milley, J., Ross, N. & Lall, S. 2005. Effect of lipid source and bile salts in diet of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., on astaxanthin blood levels. *Aquaculture*; 250; 804– 812.
- Olsvik, P., Torstensen, G., Hemre, G., Sanden, M & Waagbo, R. 2011. Hepatic oxidative stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred from a diet based on marine feed ingredients to a diet based on plant ingredients. *Aquaculture Nutrition*. 17; e424-e436).
- Ozcan, E., Sevgiler, Y. & Uner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*; 137:43-51.
- Parada, G. 2010. Tendencias de la acuicultura mundial y las necesidades de innovación de la acuicultura chilena. *Informe para el Concejo nacional de Innovación para la Competitividad*.
- Planas, M. 1993. El estrés en los peces, In: *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Editorial: *universidad de Barcelona*. 735pp.
- Renzis, G. & Bornancin, M. 1984. Ion transport and gill ATPases. pp: 65- 104 In: W.S. Hoar and D.J. Randall. (Ed) *Fish Physiology*. Academic Press. Vancouver, Canada.

- Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Lindstrom-Seppa, P., 2002. Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture*; 210:1–19.
- Santiago, H., Espinosa, M.L., Bermúdez, A. & Del Carmen, M. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3).
- Sargent, J., Tocher, D. & Bell, J. 2002. The lipids, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edition. Academic Press, San Diego; pp.181–257.
- Siemsa, W., Wiswedel I., Salernoc, I., Crifo, C., Augustinb, W., Schildb, L., Langhans, L. & Sommerburg, O. 2005. β -Carotene breakdown products may impair mitochondrial functions— potential side effects of high-dose h-carotene supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 16: 385–397.
- Stinckney, R.R. 1994. Principles of aquaculture. John Wiley & Sons. Inc. Washington, USA.
- Storey KB. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 29: 1715-1733.
- Tacon, A. 1992. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fish Technical *Nutritional fish pathology*; 330 Rome. 75 p.
- Thomas, M.. 2000. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*. 16(7); 716-718.
- Thorpe, J., Cho, C. 1995. Minimizing waste through bioenergetically and behaviorally based feeding strategies. *Water Science and Technology*; 31: 29-40.
- Tocher, D., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J., Diaz, E., Bell, J., Geurden, P., Lavens & Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) and sea bream (*Sparus aurata L.*). *Aquaculture Nutrition*; 8: 195-207.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez, J. R., Lésel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*; 204: 113-23.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*; 234: 415-27.

- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. 2006 Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006; 64: 178-189.
- Weyts, F.A., Cohen, N., Flik, G. & Kemenade, V.B.M. 1999. Interactions between the immune systems and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology*; 9: 1-20.
- White, D.R., Ornsrud, R. & Davies, S. 2002. Determination of carotenoid and vitamin A concentrations in everted salmonid intestine following exposure to solutions of carotenoid in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 136; 683–692.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*; 19: 137–161.
- Williams, C., Hoffman, R., Kronfeld, D., Hess, T., Saber, K. & Harris, P. 2002. Lipoic acid as an antioxidant in mature Thoroughbred geldings: A preliminary study. *Journal of Nutrition*; 132: 1628-1631.