

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**“Efecto del nivel de triptófano en la dieta sobre las respuestas al estrés crónico y agudo de juveniles de totoaba, *Totoaba macdonaldi*, bajo condiciones de cultivo en sistemas cerrados”**

**TESIS**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS PARA OBTENER  
EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y  
BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**MIGUEL ARTURO CABANILLAS GÁMEZ**

**ENSENADA BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, AGOSTO 2017**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DEL NIVEL DE TRIPTÓFANO EN LA DIETA SOBRE LAS RESPUESTAS  
AL ESTRÉS CRÓNICO Y AGUDO DE JUVENILES DE TOTOABA, *Totoaba  
macdonaldi*, BAJO CONDICIONES DE CULTIVO”**

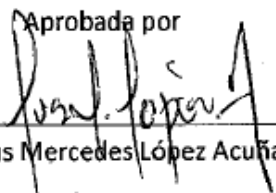
TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**MIGUEL ARTURO CABANILLAS GÁMEZ**

Aprobada por



Dra. Lus Mercedes López Acuña

Director



Dr. Ulises Pacheco Bardullas

Co-director



Dr. Mario A. Galaviz Espinoza

Sinodal



Dr. Conal David True

Sinodal

Dr. Sergio Rodríguez morales

Sinodal



Dr. Rafael Hernández Walls

Sinodal

Ensenada, Baja California, México Agosto 2017

## **Abstract**

Brain serotonin and cortisol play a central role in integrating the neuroendocrine response to stress. Previous studies in aquatic species show that dietary supplementation with the 5-HT precursor L-tryptophan amino acid is able to modulate this response. The aim of this study was to evaluate the effect of dietary tryptophan (Trp) on the serotonergic system and acute stress response in *Totoaba macdonaldi*. Four groups of fish were fed with one of four isonitrogenous and isolipidic diets formulated with different Trp content: 0.5% (CD0.5, Control Diet), 1.1% (D1.1), 1.7% (D1.7) and 2.3% (D2.3). After a feeding period of 21 days, groups were exposed to acute stress by handling with a net or hypoxia. Feeding with Trp enriched diets resulted in increased 5-HT content in telencephalon of undisturbed fish. Handling increased the 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) and serotonin turnover (5-HIAA/5-HT) in telencephalon of fish fed with CD0.5 and D1.1 but was not significant for the fish fed D1.7 and D2.3, and no significant increase was observed by hypoxia in both telencephalon and diencephalon in any of the diets. An inverted U-shaped response was observed in plasma cortisol increasing with D1.1 after both handling and hypoxia and decreasing with diets rich in Trp, D1.7 and D2.3. A higher increase was observed in hematocrit, plasma glucose and lactate in hypoxia than the handling groups. Our results indicate that Trp supplementation modulated cortisol response and mediated negative feedback of 5-HT system in telencephalon after acute stress.

**Keywords:** Totoaba, Handling, Hypoxia, Tryptophan, Serotonin turnover, Cortisol.

## Introducción

El estrés es un factor ubicuo de la vida de algunas especies, tanto en laboratorio como en la vida silvestre (Novack et al., 2013), originalmente definido como la respuesta no específica del cuerpo a alguna demanda hecha (Selye, 1936) y posteriormente Schreck et al. (2001) lo definieron como una cascada de eventos fisiológicos que ocurre cuando el organismo está intentando resistir a la muerte o restablecer las normas homeostáticas cuando enfrenta un insulto.

Los cambios fisiológicos que los organismos experimentan han sido definidos como “la respuesta al estrés” (Barcellos et al., 2006). Esta respuesta obedece a la acción coordinada del eje Hipotálamo-Hipófisis-Interrenal (HPI) en los peces, el cual es el homólogo del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) en mamíferos (Winberg et al., 1997). Una de las principales hormonas en la iniciación de la actividad de este eje es el factor de liberación de corticotropina hipotalámico (CRF), el cual se ha reportado que presenta picos de expresión a los 15 y 60 minutos post-estrés (Pavlidis et al., 2015), por lo cual, la respuesta de este eje podría presentar también picos de actividad en diferentes intervalos de tiempo.

La fase primaria de la respuesta al estrés se caracteriza por la liberación de catecolaminas y cortisol a la circulación sanguínea como se ha observado durante la exposición de los peces al manejo físico (Foss et al., 2012; Hossain et al., 2013). La acción de estas hormonas da lugar a la fase secundaria de la respuesta al estrés, que incluye una serie de cambios metabólicos y fisiológicos

como el aumento del nivel de glucosa (Hossai et al., 2013) y lactato (Foss et al., 2012). Otros autores han reportado respuestas de comportamiento y fatiga (Raicevich et al., 2014); sin embargo, el impacto fisiológico derivado de factores de estrés severos puede verse reflejado en la calidad de la carne (Martins et al., 2013), el estado inmunológico (Burnley et al., 2012; Barton e Iwama, 1991) y hasta en la sobrevivencia (Burnley et al., 2012; Akhtar *et al.*, 2013), los cuales son ejemplo de la fase terciaria de la respuesta al estrés, la cual ocurre cuando el organismo es incapaz de sobrellevar o adaptarse al estrés (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 1999; Barton, 2002; Fanouraki et al., 2011, Tort et al., 2011).

El cortisol, principal corticosteroide en los peces teleósteos juega un papel pivotal en la respuesta al estrés y es sintetizado en las células interrenales de la cabeza el riñón a partir del colesterol, precursor de todas las hormonas esteroideas (Liew et al., 2015).

El principal estimulante de la secreción de cortisol por las células esteroidegénicas interrenales es la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), liberada por la glándula pituitaria. La actividad de las células corticótropes de la pituitaria, las cuales sintetizan la ACTH, es regulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRF) y otros péptidos hipotalámicos como la arginina vasopresina (AVP) y neurotransmisores. Las neuronas que liberan los factores hipofisiotrópicos hipotalámicos terminan en la eminencia media, donde los capilares del plexo hipofisiario drenan en las venas portales de la hipófisis anterior (Dinan, 1996; Hontala et al., 1998; Gardner y Shoback, 2011).

Los cambios en el nivel de glucosa constituyen una de las respuestas secundarias al estrés, proveyendo de la energía necesaria para enfrentar el estrés. La hiperglucemia puede producirse por acción del cortisol a través de la estimulación de la glucólisis y gluconeogénesis a partir de fuentes lipídicas y proteicas (Wendelaar Bonga 1997). En los hepatocitos, las hormonas glucocorticoides facilitan el proceso de gluconeogénesis a través de la activación transcripcional de las enzimas gluconeogénicas, incluyendo la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la Tirosina aminotransferasa (TAT) (Zhang et al., 2015).

### **Suplementos**

Debido a la relevancia que ha tomado el estudio del estrés en especies acuícolas, han empezado a buscarse algunos nutrientes que ayuden a reducir los efectos adversos en los cultivos. Algunos de los suplementos utilizados han sido el aceite de linasa como fuente de ac. Linolénico para contrarrestar el estrés en juveniles de *Pelteobagrus vachelli* expuestos a amonio (Li et al., 2014), otros autores han investigado el efecto del ácido araquidónico sobre la respuesta al estrés por manejo y cambios de salinidad con resultados no muy alentadores (Koven et al., 2003), albúmina del suero de la leche para aumentar la disponibilidad del triptófano (Markus et al., 2000); incluso se ha propuesto la utilización de ingredientes ricos en triptófano como la proteína de soya, algas, harina de sésamo, de colza, de semilla de algodón, etc. (Ciji et al., 2015).

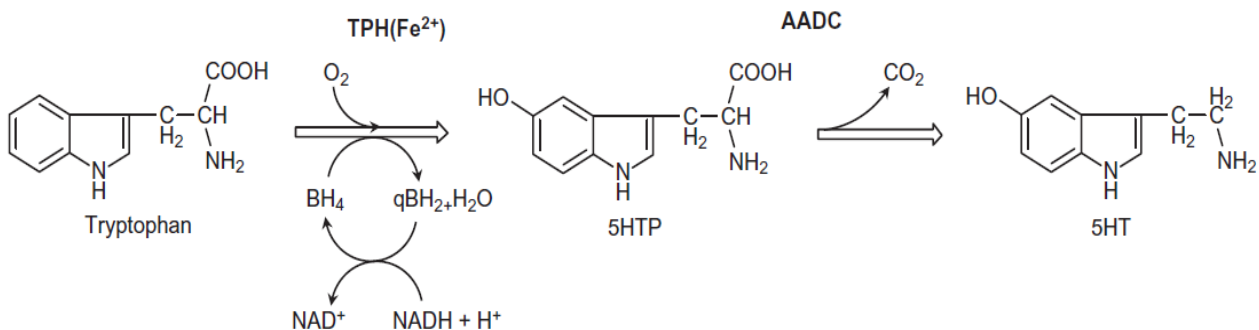
Las dietas suplementadas con triptófano en la acuicultura se han utilizado con el objetivo de incrementar la capacidad de respuesta al estrés desde un enfoque nutricional debido a que es un precursor de la serotonina (5-HT), un neurotransmisor indolamina vinculado a varios patrones de comportamiento, que incluyen agresión, respuesta al estrés, alimentación, dominancia social y comportamiento sexual (Laranja et al., 2010) debido a que actúa como modulador de la producción de hormonas pituitarias y adrenales (Lucki, 1998). Debido a ello, un amplio número de trabajos se han realizado en organismos alimentados con dietas suplementadas con triptófano enfocados en el principio general de que la serotonina limita la respuesta de los organismos a los estímulos del entorno y que en su ausencia, estas respuestas se potencializan.

Algunos de los beneficios reportados incluyen el aumento de la tolerancia térmica y disminución de la tasa de consumo de oxígeno (Tejpal et al., 2014), mejora del estado antioxidante (Wen et al., 2014), mayor crecimiento y disminución de la respuesta en cortisol, glucosa y enzimas antioxidantes ante el estrés por temperatura y salinidad (Akhtar et al., 2013), reducción de la respuesta en cortisol y glucosa, enzimas metabólicas y actividad de enzimas antioxidantes en organismos expuestos a un incremento de temperatura (Kumar et al., 2014), disminución del nivel de cortisol en organismos expuestos a la disminución del nivel del agua en el tanque (Basic et al., 2013), aumento de la sobrevivencia durante el aumento de la salinidad (Hoseini et al., 2010), y durante la exposición a sulfato de amonio (Hoseini et al., 2012).



## Serotonina

La serotonina es sintetizada por las enzimas triptófano hidroxilasa y aminoácido aromático descarboxilasa y es principalmente metabolizada por la enzima monoamina oxidasa (MAO), siendo su principal metabolito el ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA).



**Figura 1.** Biosíntesis de serotonina a partir del triptófano. La serotonina (5-HT-hidroxitriptamina) es sintetizada a partir del L-triptófano por una reacción enzimática de dos pasos. La TPH requiere de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como un cosubstrato. El producto de la reacción, 5-hidroxi-L-Triptófano (5-HTP) es convertido a serotonina por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) (Puglisi-Allegra y Andolina, 2015).

Una vez sintetizada, la serotonina, al igual que otros neurotransmisores se concentra y almacena en vesículas, las cuales liberan su contenido hacia la hendidura sináptica por exocitosis cuando la membrana sináptica se depolariza. Posteriormente, el efecto de los neurotransmisores termina cuando son absorbidos en las terminales nerviosas presinápticas. Después de su

absorción, los neurotransmisores son desaminados a sus correspondientes aldehídos por la monoamino oxidasa (MAO). Posteriormente, la ALDH convierte el hidroxindolacetoaldehído formado de la desaminación de la 5-HT a 5-HIAA (Winberg y Nillson, 1993).

## ***Sistema serotoninérgico***

### ***Mamíferos***

En los mamíferos, una gran mayoría de células serotoninérgicas se encuentran confinadas en el cerebro posterior o romboencéfalo. Estas neuronas serotoninérgicas forman distintos grupos de células, inicialmente descritos como grupos B1-B9. El número de los grupos de células serotoninérgicas comienza caudalmente (B1, B2, B3) en la médula y continúa rostralmente (B4-B9) en la protuberancia y en el cerebro medio. Los estudios de desarrollo y trazado anatómico muestran la existencia de dos grandes subdivisiones de los grupos de células del rafe que corresponden al rafe rostral (B6-B9) y rafe caudal (B1-B5), con proyecciones al cerebro anterior y cerebro posterior, respectivamente. Esquemáticamente, el núcleo rostral del rafe proyecta hacia el núcleo caudado, la zona media proyecta hacia la amígdala y el tercio caudal hacia las estructuras límbicas, tal como el hipocampo (Gasspar y Lillesaar et al., 2012).

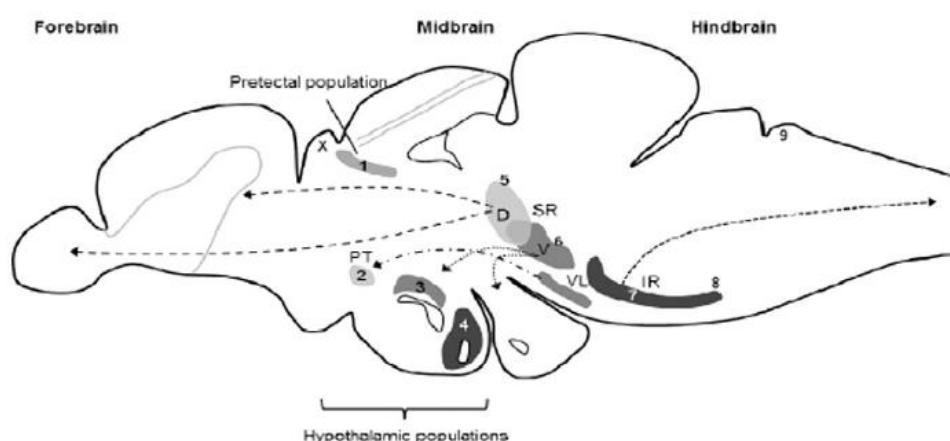
### ***Peces***

En los vertebrados no placentarios (por ejemplo: peces, anfibios, reptiles, aves y monotremas), la organización general de las células serotoninérgicas del rafé sigue un plan similar al de los mamíferos placentarios. Sin embargo, los no placentarios exhiben una distribución significativamente más amplia de las células inmunoreactivas a serotonina fuera de la región de rafé (Gasspar y Lillesaar et al., 2012). Una de las especies modelo de teleosteos es el el Zebrafish, del cual existen descripciones detalladas del sistema serotoninérgico (ver Panula, 2010; Lillesaar, 2011; Gasspar y Lillesaar et al., 2012; Herculano y Maximino, 2014).

En el zebrafish, además de las neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafé, se han identificado células que contienen serotonina en la retina, el pretectum, el hipotálamo/tubérculo posterior, el lóbulo vagal y el cordón espinal. Además, células serotoninérgicas dispersas se han encontrado también en la formación reticular y de manera transitoria en el área preóptica. Sin embargo, se asume que en los teleósteos, las poblaciones rostral y caudal del rafé inervan la mayoría de las áreas del cerebro y el cordón espinal en una manera similar a la que ha sido descrita en los mamíferos, asimismo, que estas regiones juegan un papel funcional equivalente (Gasspar y Lillesaar et al., 2012).

En el zebrafish, los núcleos de rafé proveen una rica inervación a la mayoría de las áreas del cerebro, excepto al tectum óptico y al cerebelo. Una población de células serotoninérgicas localizadas de manera dorsal en el rafé rostral proyecta primeramente al bulbo olfatorio y al telencéfalo y una segunda población, que contiene células más grandes localizadas ventralmente, flanquea el hipotálamo.

Una población que se localiza en posición ventrolateral del cerebro posterior provee una densa inervación del complejo preglomerular y, finalmente, la población del rafé caudal proyecta localmente en el cerebro posterior y en el cordón espinal, confirmando que en el zebrafish, las poblaciones rostral y dorsal del rafé son limitadas a las áreas anterior (cerebro anterior, cerebro medio) o posterior (cerebro posterior, cordón espinal), respectivamente. Lo anterior pone de manifiesto algunas similitudes, pero también diferencias anatómicas importantes con respecto al sistema serotoninérgico central entre el zebrafish y los mamíferos (Gasspar y Lillesaar et al., 2012).

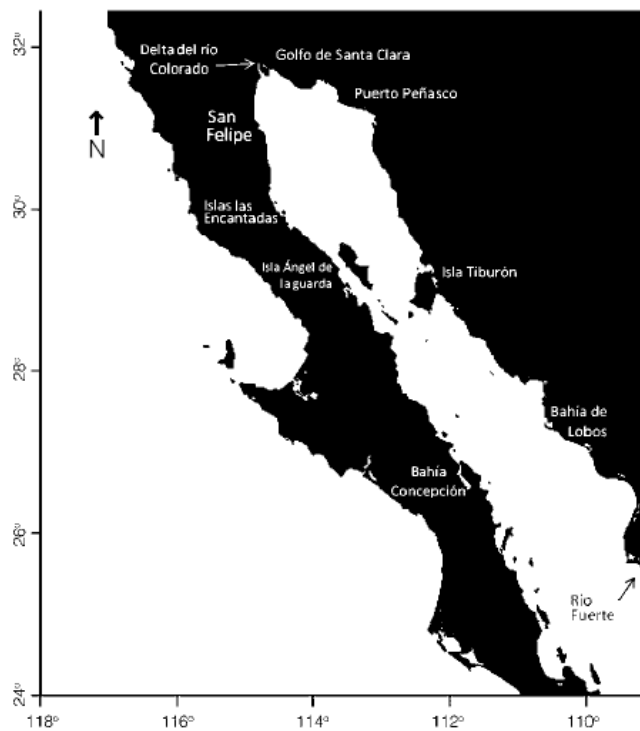


**Figura 2.** Principales núcleos y proyecciones serotoninérgicas en zebrafish. Generalmente se reconocen nueve núcleos serotoninérgicos separados en el zebrafish adulto. El complejo preteccal (grupo 1); los núcleos del órgano paraventricular anterior (2), medio (3) y posterior (4), los cuales comprenden el complejo paraventricular; los núcleos del rafé dorsal (5), medio (6) y ventrolateral (7) comprenden el complejo del rafé rostral; mientras que el rafé

inferior (8) y el área postrema (9), comprenden el complejo del rafé caudal (Herculano y Maximino, 2014).

### ***Especie de estudio***

*Totoaba macdonaldi* es un pez endémico de la región del Golfo de California y una de las especies más grandes de la familia Sciaenidae, llegando a medir 2m de largo y pesar más de 100 kg (Flanagan y Hendrikson, 1976). Su distribución original es considerada desde la desembocadura del río Colorado hasta Bahía Concepción en la costa oeste del Golfo y hasta la boca del río Fuerte en el este



(Fig 3).

**Figura 3.** Golfo de California, se muestra el área de distribución de *Totoaba macdonaldi* (Valenzuela-Quiñonez et al., 2011).

Sin embargo, actualmente se encuentra restringida a la zona del alto golfo de California según la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 2010). Totoaba presenta un patrón migratorio ontogénico, donde los adultos migran para la reproducción al delta del río Colorado en el Alto Golfo de California (AGC) durante invierno-primavera, por lo que esta área es conocida como el área de desove y crianza. Los juveniles se alimentan de anfípodos y otros crustáceos bentónicos, además de juveniles de peces como el chano, lisa y gruñón y peces adultos como góbidos, mientras que los adultos prefieren presas más grandes y pelágicas como sardinas, anchovetas y jaibas. Llega a vivir más de 20 años y presenta madurez sexual tardía entre 6 y 7 años (Cisneros-Mata et al., 1995).

La pesquería de totoaba constituyó la primera y más importante pesquería del Golfo de California a inicios del siglo pasado, con un volumen de captura récord en 1942 de 2261 toneladas y posteriormente disminuyó hasta alcanzar el mínimo de 59 toneladas en 1975. (Valenzuela-Quiñonez et al., 2011).

Posteriormente, la totoaba llegó a ser considerada una especie amenazada incluida en CITES desde 1976 para evitar su comercio internacional (Barrera Guevara, 1990). Sin embargo, un exitoso programa de reproducción y repoblamiento ha sido desarrollado por investigadores de la Universidad Autónoma de Baja California desde la década de los 90's (True et al., 1997), lo cual ha permitido la introducción de la especie en la acuicultura (DOF, 2009).

# **EXPERIMENTO 1**

**Effect of L-Tryptophan supplemented diets on serotonergic system and plasma cortisol in *Totoaba macdonaldi* juvenile exposed to acute stress by handling and hypoxia**

**Miguel Cabanillas-Gómez<sup>1</sup>, Lus M López<sup>1</sup>, Mario A Galaviz<sup>1</sup>, Conal D True<sup>1</sup>,  
Ulises Bardullas<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, 22860 Ensenada, B.C., México

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, 22860 Ensenada, B.C., México

**Running title:** Effect of tryptophan on stress response of *Totoaba macdonaldi*

\*Corresponding author: Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias, Ensenada, B.C., \*E-mail: [bardullas@uabc.edu.mx](mailto:bardullas@uabc.edu.mx) (Ulises Bardullas)

**Abstract**

Brain serotonin and cortisol play a central role in integrating the neuroendocrine response to stress. Previous studies in aquatic species show that dietary supplementation with the 5-HT precursor L-tryptophan amino acid is able to modulate this response. The aim of this study was to evaluate the effect of



dietary tryptophan (Trp) on the serotonergic system and acute stress response in *Totoaba macdonaldi*. Four groups of fish were fed with one of four isonitrogenous and isolipidic diets formulated with different Trp content: 0.5% (CD0.5, Control Diet), 1.1% (D1.1), 1.7% (D1.7) and 2.3% (D2.3). After a feeding period of 21 days, groups were exposed to acute stress by handling with a net or hypoxia. Feeding with Trp enriched diets resulted in increased 5-HT content in telencephalon of undisturbed fish. Handling increased the 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) and serotonin turnover (5-HIAA/5-HT) in telencephalon of fish fed with CD0.5 and D1.1 but was not significant for the fish fed D1.7 and D2.3, and no significant increase was observed by hypoxia in both telencephalon and diencephalon in any of the diets. An inverted U-shaped response was observed in plasma cortisol increasing with D1.1 after both handling and hypoxia and decreasing with diets rich in Trp, D1.7 and D2.3. A higher increase was observed in hematocrit, plasma glucose and lactate in hypoxia than the handling groups. Our results indicate that Trp supplementation modulated cortisol response and mediated negative feedback of 5-HT system in telencephalon after acute stress.

**Keywords:** Totoaba, Handling, Hypoxia, Tryptophan, Serotonin turnover, Cortisol.

## **Introduction**

Fish, as other organisms, cope with a variety of stressful factors that are ubiquitous either in the wild or captive life such as hypoxia (Cook, Brown, Lefevre, Domenici & Steffensen 2014), salinity (Hoseini & Hosseini 2010), physical handling (Foss, Grimsbø, Vikingstad, Nortvedt, Slinde & Roth 2012), chasing (Martins, Silva, Costa, Larsen, Santos, Conceição, Dias, Øverli, Höglund & Schrama 2013), temperature (Tejpal, Sumitha, Pal, Murthy, Sahu & Siddaiah 2014). These stressors bring changes in metabolism, osmoregulation and blood parameters, mediated by a cascade of metabolic and endocrine responses that proceed from exposure to the stimulus (Pavlidis, Theodoridi & Tsalafouta 2015; Pickering & Pottinger 1995). These changes have been defined as stress responses (Barcellos, Kreutz & Quevedo 2006).

The effects of various stressors could be synergistic (Raicevich, Minute, Finoia, Caranfa, Di Muro, Scapolan & Beltramini 2014) increasing the allostatic load with behavioral effects such as social subordination, depression, panic and aggression (Barton, Esler, Dawood, Lambert, Haikerwal, Brenchley, Socratous, Hastings, Guo, Wiesner, Kaye, Bayles, Schlaich & Lambert 2008; Tejpal, Pal, Sahu, Kumar, Muthappa, Vidya & Rajan 2009). The effects are related to high serotonin turnover and lead to economic losses derived from immunosuppression (Tort 2011), reduced growth (Hossain, Blumenthal & Mustafa 2013; Vindas, Johansen, Folkedal, Höglund, Gorissen, Flik, Kristiansen & Øverli 2016) or mortality (Li, Yu, Qin, Li, Du & Chen 2014).

The central nervous system (CNS) functions as an integration center that triggers stress responses that are commensurate to the nature and magnitude

of the stimulus (Ulrich-Lai & Herman 2009). The central serotonergic (5-HT) system plays a role in the adjustment of body homeostasis in response to internal and/or external environment changes (Lillesaar 2011), mediated by the action of pituitary and adrenal hormones (Lucki 1998). The 5-HT system plays a modulatory role that includes the stress response, anxiety, aggression, appetite, reproduction and circadian rhythm in both in fish and mammals (Lucki 1998). The Hypothalamus-Hypophysis-Interrenal (HHI) axis in fish is homologous to the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis in mammals (Winberg, Nilssona, Hyllandb, Söderstöm & Nilsson 1997) and is modulated by the brain serotonergic system (Lim, Porteus & Bernier 2013; Medeiros & McDonald 2013). Generally 5-HT is considered to stimulate the endocrine stress response (Chaouloff 1993; Feldman & Weidenfeld 1995). However, in coping with stress, the 5-HT system mediates not only the initiating adrenocortical stress responses which occur in the undisturbed condition, but also the terminating response (Lepage, Tottmar & Winberg 2002; Markus, Olivier, Panhuysen, Van der Gugten, Alles, Tuiten, Westenber, Fekkes, Koppeschaar & De Haan 2000) through projections to different brain structures. Previous studies suggest that the inhibitory effect is most obvious under stressful conditions, whereas during non-stressful conditions, the stimulatory effect may predominate (Höglund, Balm & Winberg 2002; Lepage, Larson, Mayer & Winberg 2005). It has been reported that high 5-HT function triggers neuroendocrine loops that activate negative feedback mechanisms (Bisesi, Sweet, Van den Hurk & Klaine 2016; Jacobs & Formal 1995) and mediate suppressive effects on HHI axis activity (Höglund *et al.* 2002; Lepage *et al.*

2002), which have been suggested as indicating that 5-HT could improve stress coping ability in fish (Markus *et al.* 2000). The 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor (Altieri, Garcia-Garcia, Leonardo & Andrews 2013) and some brain regions such as the hippocampus (Lepage *et al.* 2005), medial prefrontal cortex (Srejic, Wood, Zeqja, Hashemi & Hutchison 2016) and habenula (Xie, Zuo, Wu, Li, Wu, Bekker & Ye 2016) have been reported to play a role in mechanisms that break the 5-HT system. These data have opened a gateway for the use of chemicals that modify 5-HT activity in order to modulate stress response (Lillesaar 2011).

The essential amino acid tryptophan (Trp) is a serotonin (5-HT) precursor (Fernstrom 2013) that has been used with the objective of increasing brain 5-HT level, which usually strengthens fish capability to cope with stress using a nutritional approach (Laranja, Qunitio, Catacutan & Coloso 2010; Morandini, Ramallo, Moreira, Höcht, Somoza, Silva & Pandolf 2015). The main limiting factor of 5-HT synthesis, tryptophan hydroxylase (TPH) enzyme, works at medium saturation in physiological conditions; thus, higher Trp availability in the brain increases serotonin synthesis (Boadle-Biber 1993). Consequently, feeding with Trp enriched diets result in body and brain Trp increases, which then mediate the increase of 5-HT content and function as was shown in Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus 1758), (Höglund, Bakke, Øverli, Winberg & Nilsson 2005) and in pikeperch *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) post-larvae (Krol & Zakęs 2016). Moreover, in fish, Trp enriched diets decreased basal cortisol (Martins *et al.* 2013), improved the stress response due to thermal (Tejpal *et al.* 2014), osmotic (Akhtar, Pal, Sahu, Ciji, Meena & Das 2013;

Kumar, Saurabh, Pal, Sahu & Arasu 2014), chemical contaminant (Hoseini, Hosseini & Soudagar 2012) or crowding (Lepage *et al.* 2002) challenges.

*Totoaba macdonaldi* (Gilbert 1890) is an endemic Sciaenid from the Gulf of California region in Mexico, where migratory movements take place between reproduction, feeding and growth sites (Flanagan and Hendrickson 1976). *Totoaba* is an important species for commercial fisheries in Northwest Mexico; however, due to unregulated capture and habitat loss, this species has been classified since 1975 as critically endangered (Bobadilla, Alvarez-Borrego, Avila-Foucat, Lara-Valencia & Espejel 2011). The advance in the biotechnology for captive breeding and experimentation (True 2012; True, Silva & Castro 1997) and advances in nutritional requirements knowledge (López, Flores-Ibarra, Bañuelos-Vargas, Galaviz & True 2015) have opened new possibilities for investigation and allow consideration as a potential specie for aquaculture (DOF 2009).

In spite of the potential of totoaba for marine culture, no data exist concerning acute or chronic stress effects in this specie. In this paper, we report the effect of 3 weeks feeding with Trp enriched diets in order to evaluate if Trp supplementation may be useful to increase the brain 5-HT content and modulate stress response. Our first goal was to characterize the brain serotonergic function in diencephalon and telencephalon of totoaba. Secondly, we aimed to evaluate if chronic stimulation by feeding with Trp enriched diets on brain serotonergic function affected plasma cortisol level in totoaba juvenile acutely stressed. Our data revealed a positive relation between dietary Trp content and 5-HT content in telencephalon, but not in diencephalon.

Furthermore, negative feedback was shown on 5-HT function in telencephalon by higher Trp dietary content after acute stress.

## **Material and methods**

### *Ethical procedures*

All procedures of fish management were approved by the Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. Mexican Official Standard (NOM-062-ZOO 1999).

### *Fish and rearing conditions*

Juveniles of totoaba were provided by the marine finfish hatchery of the Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (México). A total of 288 totoaba juveniles (initial body weight of  $132.1 \pm 1.0$  g) were randomly selected and stocked into twelve 500-L tanks (24 fish/tank). The tanks were supplied with continuous recirculated seawater. During the trial, temperature was maintained at  $23.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , salinity averaged  $35 \pm 0.5$  gL<sup>-1</sup> and photoperiod was maintained on a 12/12 h light/dark cycle. Oxygen concentration was kept higher than 6 mg L<sup>-1</sup>, and nitrogenous compounds were maintained at levels within limits recommended for marine species. The acclimation period lasted two weeks and during this time all groups were fed by hand with a control diet (52.14% protein, 11.2% lipids) to apparent satiation, twice daily (8 am and 6 pm), 7 days a week. During the experiment, waste feed

and feces were removed by a drain connected to a tube placed in the bottom of the tanks to prevent stress among the organisms.

### *Experimental diets*

Four experimental diets were formulated to be isonitrogenous (52.0-52.5 g 100 g diet<sup>-1</sup>) and isoenergetic (21.2 kJ g<sup>-1</sup> diet). The composition of the fishmeal-based diet was formulated for totoaba (López *et al.* 2015) and is shown in Table 1. Three diets were elaborated with the same composition of control feed (CD0.5) plus a supplementation of Trp at levels of two (D1.1), three (D1.7) and four (D2.3) times the Trp content of CD0.5 (Table 1). Trp addition was made at the expense of gelatin. All dietary ingredients were finely ground, mixed well, and pelleted through a 3-mm die. Diets were dried at 65°C for 24 h, placed in plastic freezer bags, and the stock was maintained at 4°C during its use.

### *Experimental design*

After the acclimation period, triplicate groups were fed one of the three experimental and control diets to apparent satiation (Figure 1). On day 21, six fish from each tank (eighteen fish per treatment) were anesthetized and transferred to a container with filtered seawater with clove oil at a concentration of 50 µl L<sup>-1</sup>. After 90 seconds, blood samples were collected by heart puncture using insulin syringes containing 0.1 mL of EDTA anticoagulant solution (5 mg mL<sup>-1</sup> blood), according to the method described by (Blaxhall & Daisle 1973). Later, fish were euthanized by decapitation and liver and brain telencephalic (olfactory bulbs + telencephalon) and diencephalic (diencephalon + optic tectum

+ hindbrain) regions were excised and frozen at -80°C in order to evaluate liver antioxidant enzyme activity and brain serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) content.

From the remaining fish, two groups of six fish from each tank were exposed to one of two stress factors (handling or hypoxia) as described below.

**Handling.** Six fish were immediately transferred to a new tank and exposed to stress for intense persecution with a net for five minutes. After persecution, fishes remained undisturbed for 45 minutes.

**Hypoxia.** Six fish were immediately transferred to a new tank which had a lowered oxygen level by displacement with an air stone connected to a nitrogen tank. The oxygen level was monitored constantly with a portable meter YSI model 55 to reach the level of 1 mg L<sup>-1</sup>. Fish were maintained under hypoxic condition for 45 minutes with constant monitoring. After the 45´ minutes period, the protocols of sedation, blooded and euthanasia as described below were realized immediately in both handling and hypoxia groups.

#### *Hematological analysis*

After blood collection, samples were immediately analyzed for concentration of hemoglobin (HB) and hematocrit (Hct). The remaining blood samples were then centrifuged for 5 min at 12,000 rpm at 4°C (Atencio-García, Genes-López, Madariaga-Mendoza & Pardo-Carrasco 2007). From the plasma samples collected, one aliquot was immediately frozen and stored at -80°C (30 days) until cortisol and lactate determinations were performed. The other aliquot was immediately analyzed for total protein (TP), albumin (AL), and glucose (GLU) analyses.



Hct values were determined by the microhematocrit method according to the method proposed by (Blaxhall and Daisle, 1973). Blood HB and plasma TP, AL, and plasma GLU content were measured by a standardized procedure using Pointe Scientific (USA) kits. Cortisol levels ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) were measured with a commercially available ELISA kit EIA1887 of DRG®. Intra-assay coefficient of variation was 9.9% and the inter-assay CV was 9.07%. Lactate levels ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) were analyzed with a colorimetric commercially available L-Lactate Assay kit (ab65331) of abcam®. All the readings of absorbencies were performed with the microplate reader Multiskan™ GO, Thermo Scientific.

#### *Antioxidant enzymes SOD and CAT*

Enzymatic analysis was performed in three pools of three livers per diet. Pooled livers were homogenized in 4 vol. of ice-cold 100 mM Tris–HCl buffer containing 0.1 mM EDTA and 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.8. The procedure was performed on ice. Homogenates were centrifuged at 30,000 g for 30 min, at 4°C and the resultant supernatants were kept in aliquots and stored at -80°C (Pérez-Jimenez, Peres, Cruz-Rubio & Oliva-Teles 2012). All enzyme assays were carried out at 25°C and the changes in absorbance were monitored to determine the enzyme activity using microplate reader Multiskan™ GO, Thermo Scientific. The optimal substrate and protein concentrations for the measurement of maximal activity for each enzyme were established by preliminary assays. The enzymatic reactions were initiated by the addition of the tissue extract. The molar extinction coefficient used for  $\text{H}_2\text{O}_2$  was  $0.039 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured by the ferricytochrome c method using xanthine/xanthine oxidase as the source of superoxide radicals. The reaction was monitored at 550 nm according to McCord and Fridovich (1969). The reaction mixture consisted of 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM xanthine, 0.012 mM cytochrome c and 0.025 IU mL<sup>-1</sup> xanthine oxidase. Activity is reported in units of SOD per mg of protein. One unit of activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce a 50% inhibition of the ferricytochrome c reduction rate.

Catalase (EC 1.11.1.6) activity (CAT) was determined by measuring the decrease of hydrogen peroxide concentration at 240 nm according to Aebi (1984). The reaction mixture contained 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) and 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freshly prepared. Activity is reported in units of CAT per mg of protein.

#### *Determination of serotonin and their metabolites*

The dissected brain regions were placed in a polyethylene micro sample tube, weighed and diluted with 0.1 M perchloric acid. The tube was then inserted into crushed ice and the sample was sonicated for 3 sec (Branson Ultrasonics SLPe Digital Sonifier Cell Disruptors), centrifuged at 10,000 g for 40 min and the supernatants were frozen at -80°C (10 days) until quantification by HPLC with electrochemical detection (HPLCEC). Pellets were digested in 0.5 M NaOH and protein content determined using the Bradford technique (Bradford 1976).

5-HT and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid were measured as described elsewhere (Bardullas, Giordano & Rodríguez 2011; Bardullas, Limón-Pacheco, Giordano, Carrizales, Mendoza-Trejo & Rodríguez 2009). Briefly, a PerkinElmer pump series 200 (Waltham, MA, USA) was joined to a chromatographic column (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) packed with a catecholamine adsorbosphere (3- $\mu$ m particle size, 100 $\times$ 4.6 mm). An electrochemical detector Bioanalytical system, LC-4C (West Lafayette, IN, USA) was coupled to the system. The amperometric potential was set at 850 mV relative to the silver/ silver chloride electrode, and the sensitivity of the detector was set at 10  $\eta$ A. The mobile phase was an aqueous, isocratic, 0.1 M monobasic phosphate solution containing 1.4 mM sodium octyl sulfate, 0.03 mM EDTA, and 14% (vol/vol) methanol. The results were analyzed with the Total Chrom Navigator version 6.3.1.0504 (PerkinElmer) and are expressed in ng mg<sup>-1</sup> tissue protein. 5-HT turnover is expressed as the ratio of 5-HIAA to 5-HT, an index of 5-HT function (Stenfors & Ross 2002).

#### *Statistical analysis*

All data were analyzed for normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity of variance (Levene median test). Blood and plasma parameters, serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic acid content, serotonin turnover and antioxidant enzymes were analyzed by two-way ANOVA analysis with tryptophan level and stress as independent variables. Cortisol data were transformed by square root in order to achieve normality. When significant differences were obtained from the ANOVA, multiple comparisons were carried

out by performing the Tukey HSD mean comparison test. The level of significance used was  $P \leq 0.05$  for all statistical tests. All statistical analysis was performed using the computer package Sigma Stat 3.5.

## Results

### *Blood parameters*

Blood hematocrit (%), plasma lactate ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), hemoglobin ( $\text{g dL}^{-1}$ ) and plasma glucose ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) are shown in Table 2. Significant interaction ( $P < 0.001$ ) was shown between Trp and stress on the plasma glucose level. Glucose was raised by handling and hypoxia compared against undisturbed in those fish fed with all diets except in those fed with D1.7 (CD0.5:  $P < 0.001$ ; D1.1:  $P < 0.001$ ; D1.7:  $P = 0.657$ ; D2.3:  $P < 0.001$  after handling, and CD0.5:  $P = 0.030$ ; D1.1:  $P < 0.001$ ; D1.7:  $P = 0.275$ ; D2.3:  $P < 0.001$  after hypoxia). The percentage of hematocrit was raised after handling compared against undisturbed in fish fed with D1.1 ( $P = 0.013$ ), and was raised by hypoxia compared against undisturbed fish with all diets ( $P < 0.001$ ). Hemoglobin content was higher after handling in fish fed with the control diet compared against those fed with D1.1 and D1.7 ( $P = 0.031$  and  $0.038$ , respectively). After hypoxia, hemoglobin was higher with D1.7 compared against CD0.5 and D1.1 ( $P = 0.031$  and  $P = 0.015$ , respectively). Lactate was raised by both handling and hypoxia compared against undisturbed fish. No significant differences by Trp were observed in lactate after handling. In contrast, the Trp modulated lactate after hypoxia in curvilinear way, increasing it

with D1.1 and D1.7 ( $P=0.049$  and  $P=0.004$ , respectively) and decreasing it with D2.3 ( $P=0.003$ ), compared against the control diet.

#### *Antioxidant enzymes SOD and CAT*

The activity of antioxidant enzymes SOD and CAT were analyzed and are presented in Table 2. Stress showed a significant effect on SOD enzyme activity ( $P=0.013$ ). Post-hoc analyses showed decreased SOD activity by handling and hypoxia ( $P=0.018$  and  $0.034$  for handling and hypoxia respectively). A significant interaction was shown between Trp and stress on CAT activity ( $P=0.029$ ). Further analyses revealed that the activity of CAT was raised ( $P=0.035$ ) by hypoxia compared against undisturbed in fish fed with D2.3. Furthermore, CAT activity decreased with D2.3 compared against D1.7 ( $P=0.049$ ) within undisturbed and was raised by D2.3 compared against D1.1 ( $P=0.048$ ) after hypoxia.

#### *Plasmatic cortisol levels*

The plasma cortisol levels are shown in Figure 2 and reveal a curvilinear relationship. Trp enriched diets and stress showed a significant interaction on plasmatic cortisol ( $P=0.009$ ). Further analyses showed that plasmatic cortisol rose in those fish fed with D1.1 compared against fish fed with the control diet after exposure to both handling (D1.1:  $P<0.001$ ) and hypoxia (D1.1:  $P=0.010$ ) stressors. In those fish fed with higher Trp enriched diets, plasma cortisol was not different by handling (D1.7:  $P=0.383$ ; D2.3:  $P=0.312$ ) or hypoxia (D1.7:  $P=0.120$ ; D2.3:  $P=0.129$ ) compared against undisturbed.

*Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and serotonin turnover (5-HIAA/5-HT).*

We determined the concentration of 5-HT and their metabolite in telencephalon and diencephalon in order to correlate the effect of Trp enriched diets with neurochemical changes (Figure 3).

### *Telencephalon*

Significant interaction was observed between Trp enriched diets and stress on 5-HT concentration and serotonin turnover in the telencephalon brain region ( $P=0.008$  and  $0.019$  respectively). Post hoc analyses revealed a lineal increase of 5-HT content with Trp enrichment compared to the control diet in undisturbed groups ( $P=0.475$ ,  $0.002$  and  $<0.001$  for D1.1 to D2.3, respectively).

Lower 5-HT content was observed in fish fed with D1.7 and D2.3 ( $P=0.024$  and  $0.025$ , respectively) after handling and in fish fed with D2.3 ( $P=0.012$ ) after hypoxia compared against undisturbed fish, but these differences were not observed in fish fed with CD0.5 and D1.1. Likewise, a smaller increase of 5-HT turnover was shown in fish fed with D1.7 and D2.3 after handling ( $P=0.491$  and  $0.039$ , respectively) compared against control diet. Handling increased 5-HIAA content compared against undisturbed in those fish fed with CD0.5 and D1.1 ( $P<0.001$  in both diets), but not in fish fed with D1.7 and D2.3.

After hypoxia, no statistical significance was observed in 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratio either by Trp enriched diets or by stress.

### ***Diencephalon***

No statistically significant effect was shown either by Trp enriched diets or stress on 5-HT in diencephalon. However, significant effect was shown by both Trp enriched diets ( $P=0.005$ ) and stress ( $P<0.001$ ) on 5-HIAA. Further, stress, but not Trp enriched diets, showed a significant effect on serotonin turnover ratio ( $P<0.001$  and  $P=0.333$ , respectively).

Post hoc analysis revealed that only handling but not hypoxia increased 5-HIAA content within all diets ( $P=0.018$  to  $0.002$ ) and serotonin turnover in fish fed with CD0.5, D1.1 and D1.7 ( $P=0.004$ ,  $P<0.001$  and  $P=0.030$ , respectively) but not in fish fed with D2.3, compared to undisturbed.

## Discussion

We investigated the effect of four levels of dietary Trp on plasma cortisol and serotonin in diencephalon and telencephalon of *Totoaba macdonaldi* in two different stress conditions (handling and hypoxia) and compared them to an undisturbed condition. Trp enriched diets at 1.69 and 2.29% increased serotonin level in telencephalon but not in diencephalon. After handling, the serotonin level decreased compared against undisturbed fish fed with the same diets. In contrast, the 5-HIAA concentration and 5-HT turnover were not increased by Trp in either of the two regions, telencephalon and diencephalon, of undisturbed fish. Hypoxia did not induce significant changes in serotonergic activity, while handling mediated the increase of both 5-HIAA content and 5-HT turnover, which likely were prevented by the higher dietary Trp.

Our data revealed an increase of 5-HT content in the telencephalon of undisturbed totoaba juvenile in line with the increase of dietary Trp content. The main limiting of 5-HT synthesis, TPH enzyme, works at medium saturation in physiological conditions; thus, higher brain Trp availability increases serotonin synthesis (Boadle-Biber 1993). Plasma tryptophan is transported across the blood brain barrier to CNS by means of a transporting carrier, which is not specific, that also transports other large neutral amino acids (LNAA); thus, brain Trp availability is dependent on Trp levels in the plasma, but also on plasma levels of other LNAA competing for the same carrier (Fernstrom 2013; Grimmett & Sillence 2005). These data together suggest that Trp enriched diets could mediate an increase of 5-HT synthesis through the increase of brain Trp availability in undisturbed totoaba juvenile. The increase of body 5-HT proportional to dietary Trp has been reported in pikeperch, *Sander lucioperca* (Krol & Zakęs 2016). Furthermore, brain



Trp increased in line with body Trp increases in juveniles of *Gadus morhua* fed with a Trp enriched diet (Höglund *et al.* 2005); thus, elevated dietary intake of Trp appears to elevate brain Trp availability for 5-HT biosynthesis in teleost.

We found notable differences between 5-HT content in diencephalon and telencephalon. Similarly, others authors reported that 5-HT is mainly synthesized in diencephalon in teleost (Gaspar & Lillesaar 2012; Panula, Chen, Priyadarshini, Kudo, Semenova, Sundvik & Sallinen 2010), which agrees with the most abundant serotonergic nucleus localized within diencephalon in fish as well as amphibians, reptiles, birds, and non-eutherians mammals (Lillesaar 2011). In mammals, the Trp concentrations and the rate of Trp uptake and serotonin synthesis, indicated by TPH activity, are higher in diencephalon than in other regions (Shannon, Gunnet & Moore 1986). Furthermore, 5-HT synthesis could be about 20-fold higher in the cell soma than in the regions where nervous terminals are localized (Boadle-Biber, 1993). However, an increase of 5-HT content was shown in telencephalon after feeding with Trp enriched diets. This could indicate that the 5-HT is synthesized in diencephalon and then projected and kept in storing vesicles at liberation regions flanked by serotonergic neurons (Siegel, Albers, Brady & Price 2006). A strong serotonergic projection from diencephalon to telencephalon has been reported in teleost (Lillesaar 2011). Further, 5-HT turnover was higher in telencephalon than in the diencephalon, which agrees with the major activity in telencephalic rather than in diencephalic micro regions (Basic, Krogdahl, Schjolden, Winberg, Vindas, Hillestad, Mayer, Skjerve & Höglund 2013), suggesting that although the 5-HT content observed in telencephalon was lower than diencephalon in totoaba, telencephalon could play an important role in the function of this system in fish. In addition, although statistical significance was not reached, 5-HIAA concentration

showed a trend to rise in telencephalon of undisturbed fish in the same direction of 5-HT increase, suggesting a moderate increase of 5-HT metabolism in a positive relation with 5-HT synthesis increase. Thus, our data suggest that 5-HT function could be increased by feeding with Trp enriched diets even during the basal metabolism, an effect that has not yet been investigated in these species.

The 5-HT function was raised after acute handling, as indicated by the increase of 5-HIAA content and 5-HT turnover in telencephalon of totoaba fed with CD0.5 and D1.1 diets, while diets with higher Trp content (D1.7 and D2.3) reduced the increase of 5-HT function. The increase of brain serotonergic system activity during stress exposition has been reported in fish (Höglund *et al.* 2005; Schjolden, Pulman, Pottinger, Tottmar & Winberg 2006) and could be related to impaired behavior in rodents (Waselus, Nazzaro, Valentino & Van Bockstaele 2009) and humans (Barton *et al.* 2008), while its inhibition could have a beneficial effect in behavior (Valentino, Lucki & Van Bockstaele 2010). Furthermore, situations that mediate a sustained increase of 5-HT function could lead to a reduction in 5-HT content and induce mood disorders in fish (Winberg & Nilsson 1993), while the reduction in central serotonergic function could mediate impulsivity and disinhibited behavior (Comai, Bertazzo, Vachon, Daigle, Toupin, Côté, Turecki & Gobbi 2016). Moreover, subordinated behavior is related to high serotonergic function and high cortisol response, while low serotonergic function and cortisol response is related to dominant behavior in fish (Lepage *et al.* 2005; Winberg, Nilsson, Spruijt & Höglund 1993). This data together suggest that higher dietary Trp content could improve the ability of totoaba juveniles to cope with acute stress by decreasing the serotonergic system activation.

Our data revealed that 5-HT function did not increase in either diencephalon or telencephalon after acute hypoxia; furthermore, telencephalic 5-HT and 5-HIAA concentrations were lowered by hypoxia compared against undisturbed in fish fed with D2.3. Short-term hypoxia reduced TPH activity and 5-HT content in the hypothalamus (Thomas, Rahman, Khan & Kummer 2007) and a significantly declined TPH1 was reported in Atlantic croaker *Micropogonias undulates* (Linnaeus, 1766) (Rahman & Thomas 2009). Thomas *et al.* (2007) reported that other stressors such as capture by netting and exposure to air raised hypothalamic 5-HT content and suggested that the decline of hypothalamic TPH activity and serotonin content is a specific response to hypoxia stress. In mammals, the serotonergic system is not stimulated by relatively strong stressors (Jacobs & Formal 1995). Thus, hypoxia seems to be a moderate stressor for totoaba in the short term, which agrees with reports that indicate that many teleost, especially those that live part of their lives in estuaries, have adapted to periodic hypoxia (Thomas *et al.* 2007).

We analyzed the activity of antioxidant enzymes in liver because it is an organ that presents high metabolic activity, and is likely the organ that best represents the antioxidant activity of an organism (Trenzado, Hidalgo, García-Gallego, Morales, Furné, Domezain, Domezain & Sanz 2006). Free radicals and reactive species from oxygen (ROS) can be produced naturally during cell metabolism (Pérez-Jimenez *et al.* 2012); however, under stressful situations, the balance between production and scavenging of ROS can be disturbed, causing oxidative stress (Liu, Mai, Xu, Zhang, Zhou & Ai 2015).

The results of enzymatic activity showed that a trend of both SOD and CAT decreasing after both handling and hypoxia stress with CD0.5 and D1.1 diets, while higher Trp returned the activity to the level observed in undisturbed fish fed with CD0.5. Higher

activity and mRNA expression of antioxidant enzymes was related with higher antioxidant capacity in young grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes 1844) after supplementation with Trp (Wen, Feng, Jiang, Liu, Jiang, Li, Tang, Zhang, Kuang & Zhou 2014). Our data suggest that Trp supplementation could improve the activity of CAT under both hypoxia and handling stressors and SOD under hypoxia. The trend of decreasing SOD activity that appeared after handling in fish fed with Trp enriched diets could be related to an increase of amino acids metabolism under this acutely stressful condition. Other authors suggest that antioxidant enzyme activity could be decreased by indoleamine dioxygenase (IDO) activity and Trp metabolites; IDO removes superoxide radicals using it as cofactors during Trp metabolism, and Trp metabolites may function as free radical scavengers (Floc'h & Seve 2007). Furthermore, cortisol could stimulate enzymes of Trp metabolism (Basic, Schjolden, Krogh, Von Krogh, Hillestad, Winberg, Mayer, Skjerve & Höglund 2013b).

Other physiological responses are mediated by an endocrine stress response to increase the capacity of oxygen to transport, which is evident with the increase of Hg and Hct (Pickering & Pottinger 1995). Higher Hct was observed after handling only in fish fed with D1.1, while higher levels were observed with all diets in hypoxia exposed fish. Similarly, plasmatic levels of GLU and LAC are related to metabolic rate and stress in fish (Baker, Wood, Litvak & Kieffer 2005; Barton & Iwama 1991). Both handling and hypoxia stressors increased plasma GLU and LAC levels, although the effect was higher with hypoxia. GLU and LAC levels are generally related because GLU represents the substrate for plasmatic glycolysis, and LAC indicates the use of anaerobic paths of energy production when aerobic paths are insufficient (Raicevich *et al.* 2014). These results reflect the energetic insult that the fish confront under stressful conditions,

especially when oxygen is depleted in culture systems. Little effects were observed with Trp on some blood and plasma parameters in totoaba, perhaps because some neuroendocrine regulators such as catecholamines play an important role in acute stress response. While in tests of longer stress periods such as high density culture (Tejpal *et al.* 2009), salinity (Akhtar *et al.* 2013) or temperature (Kumar *et al.* 2014) exposure, a reduction of stress response has been reported with Trp supplementation. This data suggests that Trp effects could be context and specie dependent.

The final product of HHI axis, cortisol, is considered a standard (Barcellos *et al.* 2006) and principal indicator of stress in fish (Bejo, Serra & Criscuolo 2015). Interestingly, neither handling nor hypoxia mediated a significant cortisol response in totoaba juveniles fed with the control diet (0.5% Trp). This seems to indicate that totoaba is capable of supporting acute stress by handling and hypoxia in the short term, possibly due to the biology of the species. Therefore, although the protein content in all diets was high (based on totoaba requirements), the control diet could play a role in the low cortisol response, possibly mediated by the soy protein meal and wheat flour content plus Trp content (0.5%). Reduced stress response was observed in Atlantic salmon, *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), after being fed substitute fish meal and fish oil by vegetable sources (Oxley, Jolly, Eide, Jordal, Svardal & Olsen 2009). Cortisol level in undisturbed totoaba was similar to the levels reported in the Sciaenid meager *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) fed with both a control diet based on fish meal and fish oil and with diets in which fish meal, fish oil or both were substituted by plant sources (Ribeiro, Moura, Santos, Colen, Rodrigues, Bandarra, Soares, Ramalho, Barata, Moura, Pousão-Ferreira & Dias 2015). Thus, the low cortisol response that was

found in totoaba juveniles with the control diet could be related to vegetable sources, or totoaba could be a species with low cortisol response to acute stress.

Notably, after feeding with Trp, enriched plasma cortisol data showed an inverted U-shaped dose response, both, before and after the stress, with the highest response in fish fed with D1.1, then the response began to fall with Trp content beyond this level. A moderate Trp supplemented diet (final concentration of 0.78%) increased basal cortisol level and did not prevent an increase after acute stress in Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) (Hoseini, Mirghaed, Mazandarani & Zoheiri 2016); likewise, dietary Trp from 0.8 and 1.14% increased the serotonergic activity after confinement while 1.65% of Trp reduced it in Atlantic Salmon, *Salmo salar* (Basic *et al.* 2013a). Hypersensitivity of HHI due to chronic Trp supplementation has been suggested by Markus *et al.* (2000) and could be mediated by a moderate increase of serotonin in synaptic cleft through presynaptic facilitation (Martini 2004), acting as a moderate stressor sustained for a long time, which could change from an inhibited the serotonergic system to an activated one (Wood, Zhang, Reyes, Lee, Van Bockstaele & Valentino 2013). Together these data suggest that both the serotonergic system and HHI axis become hyperactive with moderate supplementation of dietary Trp and become attenuated with higher supplementation of dietary Trp. The correlation between brain serotonergic activity and circulating glucocorticoids is generally positive (Basic *et al.* 2013b) because 5-HT has a stimulatory effect on HHI axis (Lepage *et al.* 2002).

In conclusion, brain 5-HT, 5-HIAA and serotonin turnover as well as plasma physiological parameters and the acute stress response are presented for first time in totoaba juveniles. Our results demonstrate that feeding totoaba with Trp enriched diets

increased brain serotonin content in telencephalon of undisturbed juveniles and decreased the activation of serotonergic function under acute stress. We found that both serotonergic activity and plasma cortisol increased when stressed in fish fed with lower dietary Trp and were restored in fish fed with higher dietary Trp content. Our data showed that the use of Trp enriched diets constitute a promising strategy to help totoaba juveniles to cope with acute stress in long term culture, but the effects of extended durations of Trp supplementation require more investigation. Further, research may show that there are positive effects of Trp enriched diets for other bread fish.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding this research article.

### **Acknowledgments**

This work was partially supported by the Universidad Autónoma de Baja California (UABC), México, and the National Council for Science and Technology (CONACYT) of Mexico (PROINNOVA-2015 no. 220455), and the scholarship number 197039 (Miguel A. Cabanillas-Gómez). The authors are grateful to Dr. Verónica Mireya Rodríguez Córdova from Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, for the assistance with determinations of serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid. Mention of a trademark or proprietary product does not constitute an endorsement of the product by Universidad Autónoma de Baja California and does not imply its approval to the exclusion of other products that may also be suitable.

### **References**

- Akhtar M.S., Pal A.K., Sahu N.P., Ciji A., Meena D.K. & Das P. (2013) Physiological responses of dietary tryptophan fed *Labeo rohita* to temperature and salinity stress. *Journal of animal Physiology and Animal Nutrition* **97**, 1075–1083.
- Altieri S.C., Garcia-Garcia A.L., Leonardo E.D. & Andrews A.M. (2013) Rethinking 5-HT<sub>1A</sub> Receptors: Emerging Modes of Inhibitory Feedback of Relevance to Emotion-Related Behavior. *Acs Chemical Neuroscience* **4**, 72–83.
- Atencio-García V., Genes-López F., Madariaga-Mendoza D. & Pardo-Carrasco S. (2007) Hematología y química sanguínea de juveniles de rubio (*Salminus affinis* PISCES: CHARACIDAE) del río Sinú. *Acta Biológica Colombiana* **12**, 27-40.
- Baker D.W., Wood A.M., Litvak M.K. & Kieffer J.D. (2005) Haematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest and following forced activity. *Journal of Fish Biology* **66**, 208–221.
- Barcellos L.J.G., Kreutz L.C. & Quevedo R.M. (2006) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* **253**, 317–321.
- Bardullas U., Giordano M. & Rodríguez V.M. (2011) Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology and Teratology* **33**, 263–272.
- Bardullas U., Limón-Pacheco J.H., Giordano M., Carrizales L., Mendoza-Trejo M.S. & Rodríguez V.M. (2009) Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239**, 169–177.



- Barton B.A. & Iwama G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 3-26.
- Barton D.A., Esler M.D., Dawood T., Lambert E.A., Haikerwal D., Brenchley C., Socratous F., Hastings J., Guo L., Wiesner G., Kaye D.M., Bayles R., Schlaich M.P. & Lambert G.W. (2008) Elevated Brain Serotonin Turnover in Patients With Depression: Effect of Genotype and Therapy. *Archives of General Psychiatry* **65**, 38-46.
- Basic D., Kroghdahl Å., Schjolden J., Winberg S., Vindas M.A., Hillestad M., Mayer I., Skjerve E. & Höglund E. (2013a) Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **388–391**, 8–13.
- Basic D., Schjolden J., Kroghdahl Å., Von Krogh K., Hillestad M., Winberg S., Mayer I., Skjerve E. & Höglund E. (2013b) Changes in regional brain monoaminergic activity and temporary down-regulation in stress response from dietary supplementation with L-tryptophan in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *British Journal of Nutrition* **109**, 2166–2174.
- Bejo C.P., Serra M. & Criscuolo E. (2015) Social challenge increases cortisol and hypothalamic monoamine levels in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41**, 1501–1508.
- Bisesi J.H., Sweet L.E., Van den Hurk P. & Klaine S.J. (2016) Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**, 938–945.

- Blaxhall P.C. & Daisle P.W. (1973) Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* **5**, 771-781.
- Boadle-Biber M.C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **60**, 1-15.
- Bobadilla M., Alvarez-Borrego S., Avila-Foucat S., Lara-Valencia F. & Espejel I. (2011) Evolution of environmental policy instruments implemented for the protection of totoaba and the vaquita porpoise in the Upper Gulf of California. *Environmental science & policy* **14**, 998-1007.
- Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Comai S., Bertazzo A., Vachon J., Daigle M., Toupin J., Côté G., Turecki G. & Gobbi G. (2016) Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers for aggression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **70**, 8–16.
- Cook D.G., Brown E.J., Lefevre S., Domenici P. & Steffensen J.F. (2014) The response of striped surfperch *Embiotoca lateralis* to progressive hypoxia: Swimming activity, shoal structure, and estimated metabolic expenditure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **460**, 162–169.
- Chaouloff F. (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews* **18**, 1-32.
- DOF (2009) AVISO por el que se informa al público en general que la Comisión Nacional de Areas Naturales Protegidas ha concluido la elaboración del Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta

del Río Colorado, ubicada en aguas del Golfo de California y en los municipios de Mexicali, Estado de Baja California, y de Puerto Peñasco y de San Luis Río Colorado, Estado de Sonora., 113.

Feldman S. & Weidenfeld J. (1995) Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroscience and Biobehavioral Review* **45**, 129-141.

Fernstrom J.D. (2013) Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* **45**, 419–430.

Flanagan C.A. & Hendrickson J.R. (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern gulf of California. *Fish Bulletin* **74**(3), 531-544.

Floc'h N.L. & Seve B. (2007) Biological roles of tryptophan and its metabolism: Potential implications for pig feeding. *Livestock Science* **112**, 23–32.

Foss A., Grimsbø E., Vikingstad E., Nortvedt R., Slinde E. & Roth B. (2012) Live chilling of Atlantic salmon: physiological response to handling and temperature decrease on welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 565–571.

Gaspar P. & Lillesaar C. (2012) Probing the diversity of serotonin neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 2382–2394.

Grimmett A. & Sillence M.N. (2005) Calmatives for the excitable horse: A review of L-tryptophan. *The Veterinary Journal* **170**, 24–32.

Höglund E., Bakke M.J., Øverli Ø., Winberg S. & Nilsson G.E. (2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation. *Aquaculture* **249**, 525–531.

- Höglund E., Balm P.H.M. & Winberg S. (2002) Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neuroscience Letters* **324**, 193–196.
- Hoseini S.M. & Hosseini S.A. (2010) Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 1061–1067.
- Hoseini S.M., Hosseini S.A. & Soudagar M. (2012) Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 1419–1426.
- Hoseini S.M., Mirghaed A.T., Mazandarani M. & Zoheiri F. (2016) Serum cortisol, glucose, thyroid hormones' and non-specific immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* to exogenous tryptophan and acute stress. *Aquaculture* **462**, 17–23.
- Hossain M.R., Blumenthal E. & Mustafa A. (2013) Effects of puerarin on the reduction of glucose and promotion of overall health in acutely stressed Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Actinopterygii: Salmonidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **43**, 85–93.
- Jacobs B.L. & Formal C.A. (1995) Activation of 5HT neuronal activity during motor behavior. *Seminars in the neurosciences* **7**, 401-408.
- Krol J. & Zakęs Z. (2016) Effect of dietary L-tryptophan on cannibalism, survival and growth in pikeperch *Sander lucioperca* (L.) post-larvae. *Aquaculture International* **24**, 441–451.

- Kumar P., Saurabh S., Pal A.K., Sahu N.P. & Arasu A.R.T. (2014) Stress mitigating and growth enhancing effect of dietary tryptophan in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) fingerling. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 1325–1338.
- Laranja J.L.Q., Quinitio E.T., Catacutan M.R. & Coloso R.M. (2010) Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture* **310**, 84–90.
- Lepage O., Larson E.T., Mayer I. & Winberg S. (2005) Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant–subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Hormones and Behavior* **48**, 233 – 242.
- Lepage O., Tottmar O. & Winberg S. (2002) Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **205**, 3679–3687.
- Li M., Yu N., Qin J.G., Li E., Du Z. & Chen L. (2014) Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and Edwardsiella ictaluri challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. *Fish & Shellfish Immunology* **38**, 158-165.
- Lillesaar C. (2011) The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **41**, 294–308.
- Lim J.E., Porteus C.S. & Bernier N.J. (2013) Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **192**, 246–255.
- Liu J., Mai K., Xu W., Zhang Y., Zhou H. & Ai Q. (2015) Effects of dietary glutamine on survival, growth performance, activities of digestive enzyme, antioxidant status and hypoxia stress resistance of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) post larvae. *Aquaculture* **446**, 48–56.

- López L.M., Flores-Ibarra M., Bañuelos-Vargas I., Galaviz M.A. & True C.D. (2015) Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41**, 921-936.
- Lucki I. (1998) The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Society of Biological Psychiatry* **44**, 151–162.
- Markus C.R., Olivier B., Panhuysen G.E., Van der Gugten J., Alles M.S., Tuiten A., Westenber H.G., Fekkes D., Koppeschaar H.F. & De Haan E.E. (2000) The bovine protein  $\alpha$ -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 1536–1544.
- Martini F.H. (2004) *Fundamentals of Anatomy & Physiology, Sixth Edition* ed. Prentice Hall Staff, San Francisco, CA, United States of America, 1132 p.
- Martins C.I.M., Silva P.I.M., Costas B., Larsen B.K., Santos G.A., Conceição L.E.C., Dias J., Øverli Ø., Höglund E. & Schrama J.W. (2013) The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **400–401**, 129–134.
- Medeiros L.R. & McDonald M.D. (2013) Cortisol-mediated downregulation of the serotonin 1A receptor subtype in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **164**, 612–621.

- Morandini L., Ramallo M.R., Moreira R.G., Höcht C., Somoza G.M., Silva A. & Pandolf M. (2015) Serotonergic outcome, stress and sexual steroid hormones, and growth in a South American cichlid fish fed with an L-tryptophan enriched diet. *General and Comparative Endocrinology* **223**, 27–37.
- NOM-062-ZOO N.O.M. (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Oxley A., Jolly C., Eide T., Jordal A.E.O., Svardal A. & Olsen R.E. (2009) The combined impact of plant-derived dietary ingredients and acute stress on the intestinal arachidonic acid cascade in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition* **16**, 1-12.
- Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M. & Sallinen V. (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease* **40**, 46–57.
- Pavlidis M., Theodoridi A. & Tsalafouta A. (2015) Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **60**, 121–131.
- Pérez-Jimenez A., Peres H., Cruz-Rubio V. & Oliva-Teles A. (2012) The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* **108**, 1202–1209.
- Pickering A.D. & Pottinger T.G. (1995) Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes* **5**, 349-379.
- Rahman M.S. & Thomas P. (2009) Molecular cloning, characterization and expression of two tryptophan hydroxylase (TPH-1 and TPH-2) genes in the hypothalamus of

atlantic croaker: Down-regulation after chronic exposure to hypoxia. *Neuroscience* **158**, 751–765.

Raicevich S., Minute F., Finoia M.G., Caranfa F., Di Muro P., Scapolan L. & Beltramini M. (2014) Synergistic and Antagonistic Effects of Thermal Shock, Air Exposure, and Fishing Capture on the Physiological Stress of *Squilla mantis* (Stomatopoda). *Plos one* **9**, 1-12.

Ribeiro L., Moura J., Santos M., Colen R., Rodrigues V., Bandarra N., Soares F., Ramalho P., Barata M., Moura P., Pousão-Ferreira P. & Dias J. (2015) Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* **447**, 116–128.

Schjolden J., Pulman K.G.T., Pottinger T.G., Tottmar O. & Winberg S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiology & Behavior* **87**, 938–947.

Shannon N.J., Gunnet J.W. & Moore K.E. (1986) A Comparison of Biochemical Indices of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Activity Following Electrical Stimulation of the Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neurochemistry* **47**, 958-965.

Siegel G., Albers R.W., Brady S. & Price D. (2006) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. American Society for Neurochemistry, USA.

Srejic L.R., Wood K.M., Zeqja A., Hashemi P. & Hutchison W.D. (2016) Modulation of serotonin dynamics in the dorsal raphe nucleus via high frequency medial prefrontal cortex stimulation. *Neurobiology of Disease* **94**, 129–138.



- Stenfors C. & Ross S.B. (2002) Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo. *Journal of Neural Transmission* **109**, 1353–1363.
- Tejpal C.S., Pal A.K., Sahu N.P., Kumar J.A., Muthappa N.A., Vidya S. & Rajan M.G. (2009) Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerling. *Aquaculture* **293**, 272–277.
- Tejpal C.S., Sumitha E.B., Pal A.K., Murthy H.S., Sahu N.P. & Siddaiah G.M. (2014) Effect of dietary supplementation of L-tryptophan on thermal tolerance and oxygen consumption rate in *Cirrhinus mrigala* fingerlings under varied stocking density. *Journal of Thermal Biology* **41**, 59–64.
- Thomas P., Rahman M.S., Khan I.A. & Kummer J.A. (2007) Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia. *Proceedings of the Royal Society, B: Biological Sciences* **274**, 2693–2701.
- Tort L. (2011) Stress and immune modulation in fis. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1366–1375.
- Trenzado C., Hidalgo M.C., García-Gallego M., Morales A.E., Furné M., Domezain A., Domezain J. & Sanz A. (2006) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* **254**, 758–767.
- True C.D. (2012) Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California.

- True C.D., Silva A. & Castro N. (1997) Acquisition of Broodstock of *Totaba macdonaldi*: Field Handling, Decompression, and Prophylaxis of an Endangered Species. *The Progressive Fish Culturist* **59**, 246-248.
- Ulrich-Lai Y.M. & Herman J.P. (2009) Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 397–409.
- Valentino R.J., Lucki I. & Van Bockstaele E.J. (2010) Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction. *Brain Research* **1314**, 29-37.
- Vindas M.A., Johansen I.B., Folkedal O., Höglund E., Gorissen M., Flik G., Kristiansen T.S. & Øverli Ø. (2016) Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. *Royal Society Open Science* **3**, 1-8.
- Waselus M., Nazzaro C., Valentino R.J. & Van Bockstaele E.J. (2009) Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biological Psychiatry* **66**, 76-83.
- Wen H., Feng L., Jiang W., Liu J., Jiang J., Li S., Tang T., Zhang Y., Kuang S. & Zhou X. (2014) Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology* **40**, 275-287.
- Winberg S. & Nilsson G.E. (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonist behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* **160**, 597-614.

- Winberg S., Nilsson G.E., Spruijt B.M. & Höglund U. (1993) Spontaneous locomotor activity in arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. *Journal of Experimental Biology* **179**, 213–232.
- Winberg S., Nilsson A., Hylland P., Söderström V. & Nilsson G.E. (1997) Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters* **230**, 113–116.
- Wood S.K., Zhang X., Reyes B.A.S., Lee C.S., Van Bockstaele E.J. & Valentino R.J. (2013) Cellular Adaptations of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Associated with the Development of Active Coping in Response to Social Stress. *Biological Psychiatry* **73**, 1087-1094.
- Xie G., Zuo W., Wu L., Li W., Wu W., Bekker A. & Ye J.H. (2016) Serotonin modulates glutamatergic transmission to neurons in the lateral habenula. *Scientific Reports* **6**, 1-12.

## Figure Legends

**Figure 1.** Experimental design, each diet (CD0.5=0.5%, D1.1=1.10%, D1.7=1.7% and D2.3=2.3% Trp) was fed per triplicate during 21 days. After the feeding period, each tank was divided in three groups and each group was exposed to one of the next experimental conditions: Control (undisturbed); handling (persecution and capture with a net for 5 minutes followed by 45 minutes undisturbed) or hypoxia (1 mg mL<sup>-1</sup> for 45 minutes). Then, fish were anaesthetized and blood and tissue samples were taken.

**Figure 2.** Plasma cortisol of *Totoaba macdonaldi* juveniles fed with CD0.5 (0.50% Trp) and Trp enriched diets (D1.1=1.10%, D1.7=1.65% and D2.3=2.9% Trp) and exposed to acute stress by handling (persecution with a net for 5 minutes + 45 minutes undisturbed), hypoxia (1 mg L<sup>-1</sup> x 45 minutes), or sustained undisturbed. Two-way ANOVA, Tukey's post-hoc test (P<0.05). Letters indicate significant differences against the control diet within the same stress conditions. \*Significant differences compared against undisturbed within the same diet (P<0.05). Data are presented as means, with standard errors represented by vertical bars.

**Figure 3.** Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) content (expressed in ng mg<sup>-1</sup> protein) and serotonergic activity evaluated by serotonin turnover (5-HIAA/5-HT) in telencephalon (a, b and c) and diencephalon (d, e and f) of *Totoaba macdonaldi* juveniles fed with CD0.5 (0.50% Trp) and Trp enriched diets (D1.1=1.10%, D1.7=1.65% and D2.3=2.9%) exposed to acute stress by handling (persecution with a net for 5 minutes + 45 minutes undisturbed), hypoxia (1 mg L<sup>-1</sup> x 45 minutes), or sustained

undisturbed. Two-way ANOVA, Tukey's post-hoc test, was used. Different letters indicate significant differences by diets within the same stress conditions. \*Significant differences compared against undisturbed within the same diet ( $P < 0.05$ ). Data are presented as means, with standard errors represented by vertical bar.

## **EXPERIMENTO 2**

## **Effect of tryptophan on diet on the response to chronic stress by increasing seed density in juveniles of *totoaba macdonaldi*.**

### **Introducción**

La totoaba, *Totoaba macdonaldi*, es un Sciaenido endémico de la región del Golfo de California (Ruiz-Durá, 1985) que debido a una fuerte pesquería, además de la falta de protección ambiental y regulaciones pesqueras adecuadas llegó a ser considerada una especie amenazada incluida en CITES desde 1976 para evitar su comercio internacional (Barrera Guevara, 1990). No obstante, un exitoso programa de reproducción y repoblamiento ha sido desarrollado por investigadores de la Universidad Autónoma de Baja California desde la década de los 90's (True et al., 1997), lo cual ha permitido la consideración de la especie para la acuicultura (DOF, 2009).

En acuicultura, los organismos son expuestos a diversos factores que pueden llegar a romper su homeostasis, tales factores son considerados potenciales fuentes de estrés (Rotllant et al. 1997; Barcellos et al. 2006). De manera que el estrés es el término utilizado para describir el estado fisiológico asociado con cambios específicos inducidos por los estímulos que enfrentan los organismos (Selye, 1936).

Durante la respuesta al estrés de los organismos suele presentarse una cascada de cambios metabólicos y endócrinos, generalmente dividida en tres fases: fase de respuestas primarias, que incluye la liberación de catecolaminas y cortisol a la circulación sanguínea, fase secundaria, que incluye una serie de cambios metabólicos y fisiológicos y fase terciaria, donde se reflejan cambios a nivel organismo (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002; Fanouraki *et al.*, 2011, Tort *et al.*, 2011).

El estrés crónico ocurre cuando el organismo experimenta factores de estrés con tal frecuencia o intensidad que el sistema nervioso autónomo no tiene la oportunidad de activar los mecanismos de retroalimentación negativa para frenar la respuesta, de manera que se mantiene la activación fisiológica constante, (Kpundeh et al., 2013). El alto gasto energético realizado de manera permanente puede tener un impacto en la tasa de crecimiento (Akhtar et al. 2013; Ciji et al., 2015), disminuir la resistencia inmunológica (Baldwin, 2010) e incluso podría inducir mortalidades en juveniles de peces (costas et al., 2008).

Debido a ello han surgido una serie de investigaciones enfocadas en los efectos del estrés crónico tales como el manejo constante (Barcellos et al. 1999; 2006), la exposición crónica a niveles subletales de químicos (Ciji et al., 2015) o la densidad de siembra (Abdo-de la Parra et al., 2010; Herrera et al., 2014). La capacidad de los peces de ser cultivados a densidades relativamente altas permite maximizar el uso del área de cultivo (Merino et al., 2007). Sin embargo, los peces cultivados bajo estas condiciones pueden experimentar algún tipo de estrés crónico debido a la disminución de la calidad del agua, hacinamiento e interacciones sociales adversas (Mohsen et al., 2012). Incluso, algunos autores han considerado que la inadecuada densidad de siembra es por mucho, la fuente de estrés más común (Rotllant et al., 1997; Tejpal et al., 2009) que puede inducir respuestas fisiológicas con resultados desadaptativos (Iguchi et al., 2003), alterando los niveles hormonales, índices hematológicos y la actividad de enzimas ya sea metabólicas o de estrés oxidativo (Kpundeh et al., 2013) y que usualmente se correlaciona de manera negativa con el crecimiento, la ingesta de alimento y la eficiencia alimenticia (Sánchez et al., 2010; Mohsen, 2012; Kpundeh et al., 2013) y de manera positiva con el aumento de la susceptibilidad a enfermedades



(Iguchi et al. 2003; Costas et al., 2008), las cuales pueden ser consideradas respuestas terciarias al estrés (Schram et al., 2006).

Por lo cual, es necesario encontrar un balance entre el buen rendimiento del cultivo de peces marinos y la mínima incidencia de desórdenes fisiológicos (Herrera et al., 2012) con el objetivo de disminuir el impacto del estrés y pérdidas económicas subsecuentes (Barton, 2002).

Las dietas suplementadas con triptófano en la acuicultura se han utilizado con el objetivo de incrementar la capacidad de respuesta al estrés desde un enfoque nutricional debido a que es un precursor de la serotonina (5-HT), un neurotransmisor indolamina vinculado a varios patrones de comportamiento, que incluyen agresión, respuesta al estrés, alimentación, dominancia social y comportamiento sexual (Laranja et al., 2010). La 5-HT estimula la actividad del eje HHI activando la producción de la hormona liberadora de corticotropina desde el hipotálamo (Best et al., 2010; Medeiros et al., 2010) Sin embargo, bajo condiciones de estrés, el sistema serotoninérgico modula no solo el inicio de la respuesta adrenocorticotrópica como ocurre en los peces no estresados, sino también participa en la finalización de la respuesta (Lepage et al., 2002; Markus et al., 2000).

Usualmente, las densidades de siembra adecuadas son elegidas en base a las observaciones macro del desempeño de los organismos; sin embargo, la información científica existente acerca de sus efectos en la fisiología es escasa.

Es por ello que nos propusimos evaluar el efecto de la densidad de siembra sobre la fisiología de la totoaba; así mismo, en un trabajo anterior nosotros reportamos que las dietas ricas en Trp ayudan a reducir la respuesta al estrés agudo por manejo físico e hipoxia en juveniles de totoaba, reduciendo la activación del sistema serotoninérgico y

modulando el nivel de cortisol plasmático (Cabanillas et al., 2017); por lo tanto, un segundo objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de las dietas ricas en Trp sobre la respuesta al estrés crónico por el incremento de la densidad de siembra en los juveniles de totoaba.

## **Materials and methods**

### ***Ethical procedures***

All procedures of fish management were approved by the Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. Mexican Official Standard (NOM-062-ZOO 1999).

### ***Fish and rearing conditions***

Juveniles of totoaba were provided by the marine finfish hatchery of the Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (México) and were maintained in one tank of 5000 L with aeration and constant water flow and were fed with a commercial diet until the beginning of the experiment.

At the beginning of the experiment, Totoaba juveniles (initial body weight of  $90 \pm 5.0$  g) were selected and distributed in 24 tanks of 110 L in a Guelph type system. Half of the tanks (12 tanks) were stocked with 15 fish ( $13.5 \text{ kg m}^{-3}$ ) and were called low density tanks (LD), while the other 12 tanks were stocked with 30 fish ( $27.0 \text{ kg m}^{-3}$ ) and were called high density tanks (HD). Population density was chosen based on densities actually used in commercial fish stocks (Costas *et al.* 2008). All tanks were supplied with continuous recirculated seawater. During the trial, temperature was maintained at  $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , salinity averaged  $35 \pm 0.5$  ‰ and photoperiod was maintained on a 12/12 h

light/dark cycle. Oxygen concentration was kept higher than 6 mg L<sup>-1</sup>, and nitrogenous compounds were maintained at levels within limits recommended for marine species. The acclimation period was for two weeks during this time all groups were fed by hand with a commercial diet to apparent satiation, twice daily (8 am and 6 pm), 7 days a week.

### ***Elaboration of experimental diets***

One fishmeal-based diet and three Trp enriched diets were formulated to be isonitrogenous (48.2-49.3 g 100 g diet<sup>-1</sup>) and isoenergetic (19.1 kJ g<sup>-1</sup> diet) similar to Trp enriched diets previously used in Totoaba (Cabanillas et al, Article in review). The fishmeal-based diets are shown in Table I. The three Trp supplemented diets were elaborated with the same composition of control feed (CD0.5) plus a supplementation of Trp at level of two (D1.1), three (D1.7) and forth (D2.3) times the Trp content of CD. The Trp incorporation was made at the expenses of gelatin and cellulose. All dietary ingredients were finely ground, well mixed, and pelleted through a 3-mm die. Diets were dried at 65°C for 24 h, placed in plastic freezer bags, and stored at 4°C during its use.

Table I. Experimental diet composition (g.100 g<sup>-1</sup> dry diet) and simultaneous supplementation with tryptophan for *Totoaba macdonaldi*.

<b>Ingredient</b>	<b>CD0.5</b>	<b>D1.1</b>	<b>D1.7</b>	<b>D2.3</b>
Fish meal <sup>a</sup>	47.8	47.8	47.8	47.8
Soy protein meal <sup>b</sup>	11.4	11.4	11.4	11.4
Nutrikelp agglutinant <sup>c</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5
Wheat flour	18.0	18.0	18.0	18.0
Gelatin	4.8	4.1	3.5	2.9
Cellulose	3.3	3.2	3.0	2.9
Fish oil	3.1	3.1	3.1	3.1
Mineral mix <sup>d</sup>	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamin mix <sup>e</sup>	2.0	2.0	2.0	2.0
Attractant <sup>f</sup>	2.0	2.0	2.0	2.0
Choline chloride	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamin C	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin E	0.1	0.1	0.1	0.1
<b>Tryptophan</b>	<b>0.0</b>	<b>0.8</b>	<b>1.6</b>	<b>2.4</b>
Taurine	1.4	1.4	1.4	1.4
Lysine	0.8	0.8	0.8	0.8
Methionine	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Chemical analysis g 100 g diet<sup>1</sup></i>				
Moisture	3.8	3.3	3.2	2.8
Protein	52.4	52.5	52.1	52.0
Lipids	11.2	10.6	10.7	10.8
NFE	23.1	23.5	22.9	23.4
Ash	9.6	10.1	11.1	10.9
<b>Tryptophan</b>	<b>0.50</b>	<b>1.1</b>	<b>1.7</b>	<b>2.3</b>

<sup>a</sup>Fishmeal from HighPro, USA (crude protein: 69 %; crude lipid: 15 %; ash: 16 %); <sup>b</sup>Soy protein meal Silver Cup (crude protein: 59.5 %; crude lipid: 4.7 %; ash: 4 %); <sup>c</sup>Nutrikelp Agglutinant from Algas y Bioderivados Marinos, S.A. de C.V in México; <sup>d</sup>Mineral mixture (g kg<sup>-1</sup> diet): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 320; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 200; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>, 35; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>, 25; NaCl, 10; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.53; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.62; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.31; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01, <sup>e</sup>Vitamin mixture (mg kg<sup>-1</sup> diet): inositol, 256.39; niacin, 51.28; riboflavin; q-amino benzoic acid, 25.53; pantothenic acid, 17.92; b-carotene, 9.39; menadione, 6.11; thiamine, 3.85; pyridoxine, 3.06; folic acid, 0.96; biotin, 0.39; cholecalciferol, 25793 IU; cyanocobalamin, 5.59; <sup>f</sup>attractant provided SOPROPÊCHE, in France; <sup>g</sup>Amino acids from Pharmaceutical Co., Ltd., USA.

### ***Calculations and analytical methods***

The main growth performance variables were calculated as follows: survival rate (%) = (number of final fish/number of initial fish) x 100; average body weight ABW = (initial body weight (IBW) + final body weight (FBW))/2; daily growth index (DGI)= ((FBW<sup>1/3</sup> – IBW<sup>1/3</sup>)/time in days) x 100; daily feed intake (DFI, g kg ABW<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>)= [(daily food intake per fish per day x 1000)/(final weight + initial weight)/2]/days; feed efficiency (FE) = wet weight gain/dry feed consumed; protein efficiency ratio (PER) = wet weight gain/dry protein consumed.

### ***Sampling***

After a period of one week of acclimation, three experimental groups were fed with one of the three experimental and control diets to apparent satiation. On day 63, eight fish from each tank (twenty four fish per treatment) were anesthetized transferred to a container with filtered seawater with clove oil at a concentration of 50 µl L<sup>-1</sup> (Tejpal *et al.*, 2009). After 90 seconds, blood samples were collected by heart puncture using insulin syringes containing 0.1 mL of EDTA anticoagulant solution (5 mg mL<sup>-1</sup> blood), according to the method described by (Blaxhall and Daisle, 1973). After, fishes were euthanized by decapitation and livers (4 for tank) and brains (3 for tank) were excised and frozen at -80°C in order to evaluate the activity of liver antioxidant enzymes and brain serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) content.

### ***Blood and plasma parameters***

After blood collection, samples were immediately analyzed for percentage of hematocrit (Hct) (Goldenfarb et al., 1971) and concentration of hemoglobin (Hb) by the method of cyanometahemoglobin (Eirles, 1967) using the kit of Pointe Scientific Inc. Then 20  $\mu$ l of blood were taken which were fixed in Dacie's solution for cell counting. Wintrobe's erythrocyte indices included mean corpuscular volume ( $MCV = HT \times 10^7 / RBC$ ), mean corpuscular haemoglobin ( $MCH = HB \times 10^7 / RBC$ ) and mean corpuscular haemoglobin concentration ( $MCHC = HB \times 100 / HT$ ). The remaining blood samples were then centrifuged for 5 min at 12,000 rpm at 4°C (Atencio-García et al., 2007).

Plasma TP, AL ( $g\ dL^{-1}$ ), and GLU content ( $mg\ dL^{-1}$ ) were measured by a standardized procedure using Pointe Scientific (USA) kits. Cortisol levels ( $ng\ mL^{-1}$ ) were measured with a commercially available ELISA kit EIA1887 of DRG® previously validated to use in Totoaba (Cabanillas et al. Article in review). Lactate levels ( $mg\ dL^{-1}$ ) were analyzed with a colorimetric commercially available L-Lactate Assay kit (ab65331) of abcam®. All the readings of absorbencies were realized with the lector of micro plates Multiskan™ GO, Thermo Scientific.

### ***Antioxidant enzymes SOD and CAT activity***

Enzymatic analysis was performed in three pools of three livers per diet. Pooled livers were homogenized in 4 vol. of ice-cold 100 mM Tris–HCl buffer containing 0.1 mM EDTA and 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.8. The procedure was performed on ice. Homogenates were centrifuged at 30,000 g for 30 min, at 4 °C and the resultant supernatants were kept in aliquots and stored at –80 °C (Pérez-Jimenez *et al.* 2012). All

enzyme assays were carried out at 25 °C and the changes in absorbance were monitored to determine the enzyme activity using a microplate reader (Multiskan™ GO, Thermo Scientific). The optimal substrate and protein concentrations for the measurement of maximal activity for each enzyme were established by preliminary assays. The enzymatic reactions were initiated by the addition of the tissue extract. The molar extinction coefficients used for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 0.039 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured by the ferricytochrome c method using xanthine/xanthine oxidase as the source of superoxide radicals. The reaction was monitored at 550 nm according to McCord and Fridovich (1969). Reaction mixture consisted of 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM xanthine, 0.012 mM cytochrome c and 0.025 IU mL<sup>-1</sup> xanthine oxidase. Activity is reported in units of SOD per mg of protein. One unit of activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce a 50% inhibition of the ferricytochrome c reduction rate.

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring the decrease of hydrogen peroxide concentration at 240 nm according to Aebi (1984). Reaction mixture contained 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0) and 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freshly prepared. Activity is reported in units of CAT per mg of protein.

### ***Determination of 5-HT and their metabolite***

Total brains dissected were placed individually in a polyethylene micro sample tube, weighed and diluted with 0.1 M perchloric acid, then, the tube was inserted into crushed ice and the sample was sonicated for 3 sec (Branson Ultrasonics SLPe Digital Sonifier

Cell Disruptors), centrifuged at 10,000 g for 40 min and the supernatants were frozen at -80°C (10 days). The pellets were digested in 0.5 M NaOH and protein content determined using the Bradford technique (Bradford, 1976). 5-HT and 5-HIAA were quantified by HPLC with electrochemical detection as described by Bardullas et al. (2013)

The results were analyzed with the Total Chrom Navigator version 6.3.1.0504 (PerkinElmer) and are expressed in ng mg<sup>-1</sup> tissue protein. 5-HT turnover was expressed as the ratio of 5-HIAA to 5-HT, an index of 5-HT function (Stenfors and Ross, 2002).

### ***Statistical analysis***

All data were analyzed for normality (Kolmogorov-Smirnov) and homoscedasticity of variance (Levene median test). Blood and plasma parameters, serotonin and 5-Hydroxyindoleaceticacid content, serotonin turnover and antioxidant enzymes were analyzed by two-way ANOVA analysis with tryptophan level and densities as independent variables. Survival data were transformed by squared in order to achieve the normality. When significant differences were obtained from the ANOVA, multiple comparisons were carried out performing Tukey HSD mean comparison test. The level of significance used was  $P \leq 0.05$  for all statistical tests. All statistical analysis was performed using the computer package Sigma Stat 3.5.



## **Results**

### ***Growth performance***

La alta densidad de siembra redujo de manera significativa la sobrevivencia en los grupos alimentados con las dietas CD0.5, D1.1 y D2.3 comparados con los de baja densidad ( $P=0.028-0.049$ ) (Tabla II). El DGI y WG mostraron una disminución significativa en los grupos con alta densidad alimentados con la CD0.5 comparados con el grupo de baja densidad ( $P=0.047$  y  $0.042$ , respectivamente). El DFI fue menor en las dietas suplementadas con Trp durante el cultivo en alta densidad con respecto al de baja densidad ( $P=0.014-0.037$ ). No se observaron diferencias significativas en FE, EPR o FCA por la dieta ni por la densidad de siembra.

### ***Análisis hematológico***

Se observó un aumento significativo en todos los parámetros hematológicos y en los índices Wintrobe, con excepción del MCH ( $P<0.001$  en ambos parámetros) de los juveniles alimentados con la dieta CD0.5 cultivados en alta densidad respecto al grupo de baja densidad alimentados con la misma dieta (Tabla III). De manera notable, los juveniles alimentados con la dietas suplementadas con Trp en cultivos de alta densidad disminuyeron sus valores de hematológicos e índices de Wintrobe con respecto a la dieta control.

### ***Parámetros plasmáticos***

No se observaron efectos significativos en los niveles de cortisol en plasma de los peces juveniles suplementados con Trp cultivado en baja densidad respecto a la dieta

CD0.5; sin embargo la suplementación con las dietas con Trp D1.1 y D1.7 en cultivos de alta densidad incremento los niveles de cortisol en plasma ( $P < 0.001$  y  $P = 0.018$ , respectivamente) con respecto a la baja densidad, notablemente en la dieta con mayor suplementación de Trp D2.3 los valores de cortisol no demostraron diferencias entre los grupos de alta y baja densidad de siembra.

El nivel de GLU aumentó de manera significativa por la alta densidad en los peces alimentados con la CD0.5 comparado a la misma dieta en baja densidad ( $P < 0.001$ ).

El nivel de LAC en el plasma aumentó de manera significativa en los peces alimentados con la D1.1 ( $P = 0.043$ ) y D2.3 ( $P = 0.015$ ) comparados con la CD0.5 durante el cultivo en baja densidad. La alta densidad aumentó el nivel de LAC en los peces alimentados con la CD0.5 ( $P = 0.004$ ), mientras que las dietas con mayor nivel de Trp redujeron de manera significativa el nivel de LAC ( $P = 0.015$  y  $0.037$  para la D1.7 y D2.3) en alta densidad comparadas con la CD0.5.

No se observaron cambios significativos en el nivel de ALB en el plasma por la densidad de siembra; sin embargo, se observó una disminución en el nivel de ALB en los peces alimentados con la D1.1 comparada con la CD0.5 en ambas densidades ( $P < 0.001$  y  $P = 0.001$  en baja y alta densidad, respectivamente).

### ***Enzimas antioxidantes SOD y CAT***

No se observaron diferencias significativas por la dieta o por la densidad de siembra en la actividad de la SOD. La actividad de la CAT disminuyó de manera significativa con las dietas enriquecidas con Trp en los peces cultivados en baja ( $P = 0.013-0.041$ ) y alta ( $P = 0.003$ ) densidad Tabla (IV).

*Serotonina (5-HT), Acido 5-Hydroxiindolacetico (5-HIAA) y tasa de recambio de serotonina (5-HIAA/5-HT).*

En orden de evaluar el efecto de la suplementación con Trp en juveniles criados en cultivos de alta y baja densidad sobre los niveles de serotonina en el cerebro completo. Nuestros resultados muestran (figura 2) que las dietas suplementas con Trp aumentan los niveles de 5-HT tanto en los cultivos de baja como de alta densidad ( $P=0.001$  a  $P<0.001$ ). Notablemente, los juveniles criados en alta densidad tienen menores niveles de 5-HT cuando la dieta no es suplementada con Trp ( $P=0.009$ ).

Por otro lado, la tasa de recambio de serotonina (5-HIAA/5-HT) disminuyó de manera significativa en el cultivo en alta densidad suplementados con Trp ( $P=0.003$ ) comparado con los cultivos de baja densidad; en donde no se observaron cambios en la tasa de recambio.

Tabla II. Parámetros biológicos: Supervivencia (%), DGI, WG, DFI, FE, EPR y FCA de juveniles de totoaba alimentados con dietas con diferente nivel de Trp (CD0.5, D1.1, D1.7 y D2.3) en el cultivo en alta (27 kg m<sup>3</sup>) y baja (13.5 kg m<sup>3</sup>) densidad. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey. \*Diferencias significativas por densidad de siembra dentro de una misma dieta. Los datos son presentados como la media con el error estándar representado por las barras verticales.

	<b>Diet</b>	<b>Survival</b>	<b>DGI</b>	<b>WG</b>	<b>DFI</b>	<b>FE</b>	<b>EPR</b>	<b>FCA</b>
<b>Low Density</b>	<b>CD0.5</b>	97.8±2.2	2.5±0.02	13.4±0.09	8.9±0.11	1.5±0.02	2.8±0.05	0.69±0.02
	<b>D1.1</b>	97.8±2.2	2.3±0.11	12.6±0.42	9.1±0.32	1.4±0.11	2.6±0.2	0.76±0.07
	<b>D1.7</b>	97.8±2.2	2.3±0.13	12.6±0.53	9.2±0.18	1.3±0.08	2.6±0.15	0.79±0.03
	<b>D2.3</b>	100±0.0	2.2±0.04	12.1±0.18	9.5±0.59	1.3±0.06	2.5±0.12	0.78±0.04
<b>High Density</b>	<b>CD0.5</b>	88.3±1.7*	2.2±0.09*	12.3±0.38*	8.2±0.36	1.4±0.02	2.7±0.04	0.78±0.01
	<b>D1.1</b>	88.7±2.3*	2.3±0.04	12.5±0.16	8.1±0.24*	1.4±0.02	2.6±0.04	0.79±0.05
	<b>D1.7</b>	90±5.1	2.2±0.11	12.3±0.53	8.0±0.24*	1.4±0.04	2.6±0.08	0.82±0.06
	<b>D2.3</b>	92.2±2.2*	2.0±0.04	11.1±0.21	8.3±0.08*	1.3±0.03	2.4±0.06	0.85±0.02
<b>P Value</b>	<b>Diet</b>	0.663	0.261	0.026	0.789	0.085	0.112	0.261
	<b>Density</b>	<0.001	0.082	0.018	<0.001	0.713	0.713	0.082
	<b>Diet x Density</b>	<0.984	0.861	0.515	0.822	0.885	0.884	0.861

Tabla III. Parámetros hematológicos. Glóbulos rojos ( $10^6 \text{ cel.mm}^3$ ), porcentaje de hematocrito, hemoglobina ( $\text{g.dL}^{-1}$ ); Índices Wintrobe: MCV (fl), MCH ( $\text{pg.cel}^{-1}$ ) y MCHC ( $\text{g.dL}^{-1}$ ) y parámetros del plasma sanguíneo: TP, ALB ( $\text{g.dL}^{-1}$ ) y LACT ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) de juveniles de totoaba alimentados con dietas con diferente nivel de Trp (CD0.5, D1.1, D1.7 y D2.3) en el cultivo en alta ( $27 \text{ kg m}^3$ ) y baja ( $13.5 \text{ kg m}^3$ ) densidad. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas por la dieta dentro de la misma densidad de siembra. \*Diferencias significativas por densidad de siembra dentro de una misma dieta ( $P < 0.05$ ). Los datos son presentados como la media con el error estándar representado por las barras verticales.

	Hematological parameters				Wintrobe Indexes			Plasma parameters		
	Diet	RBC	Hct	Hg	MCV	MCH	MCHC	TP	ALB	LACT
<b>Low Density</b>	<b>CD0.5</b>	2.48±0.08	25.8±0.51	6.5±0.16	101.1±0.82	23.3±0.69	24.8±0.33	2.5±0.05	1.1±0.05 <sup>a</sup>	1.0±0.05 <sup>b</sup>
	<b>D1.1</b>	2.60±0.05	24.2±0.47	6.2±0.15	93.9±1.77	23.5±0.77	24.6±0.55	2.5±0.06	0.8±0.03 <sup>b</sup>	1.3±0.09 <sup>a</sup>
	<b>D1.7</b>	2.43±0.06	23.4±0.52	6.7±0.16	97.2±3.28	28.3±0.75 <sup>a</sup>	25.4±0.72	2.5±0.05	1.0±0.02 <sup>a</sup>	1.1±0.02
	<b>D2.3</b>	2.58±0.05	24.5±0.47	6.8±0.19	91.1±1.88	27.2±0.98 <sup>a</sup>	27.2±0.36 <sup>a</sup>	2.5±0.07	1.0±0.04 <sup>a</sup>	1.4±0.12 <sup>a</sup>
<b>High Density</b>	<b>CD0.5</b>	2.88±0.06*	37.4±1.66 <sup>a*</sup>	7.0±0.16 <sup>a</sup>	130.8±3.78 <sup>a*</sup>	24.5±0.84	27.8±0.46 <sup>a*</sup>	2.4±0.04	1.0±0.03 <sup>a</sup>	1.4±0.02 <sup>a</sup>
	<b>D1.1</b>	2.69±0.09	24.0±0.49	6.2±0.17 <sup>b</sup>	90.2±1.49	23.1±0.88	26.0±0.67*	2.5±0.06	0.8±0.04 <sup>b</sup>	1.2±0.06
	<b>D1.7</b>	2.69±0.05	26.9±0.59	6.8±0.13 <sup>a</sup>	96.2±3.05	25.3±0.70	24.7±0.58	2.3±0.06	0.9±0.03	1.0±0.02 <sup>b</sup>
	<b>D2.3</b>	2.73±0.06	26.0±0.59	6.9±0.11 <sup>a</sup>	100.2±2.57	26.0±0.88	25.3±0.35*	2.5±0.08	1.0±0.04 <sup>a</sup>	1.1±0.10 <sup>b</sup>
<b>P Value</b>	<b>Diet</b>	0.358	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.051	0.238	<0.001	0.084
	<b>Density</b>	<0.001	<0.001	0.168	<0.001	0.166	0.225	0.076	0.206	0.306
	<b>Diet x Density</b>	0.144	<0.001	0.574	<0.001	0.121	<0.001	0.222	0.505	0.002

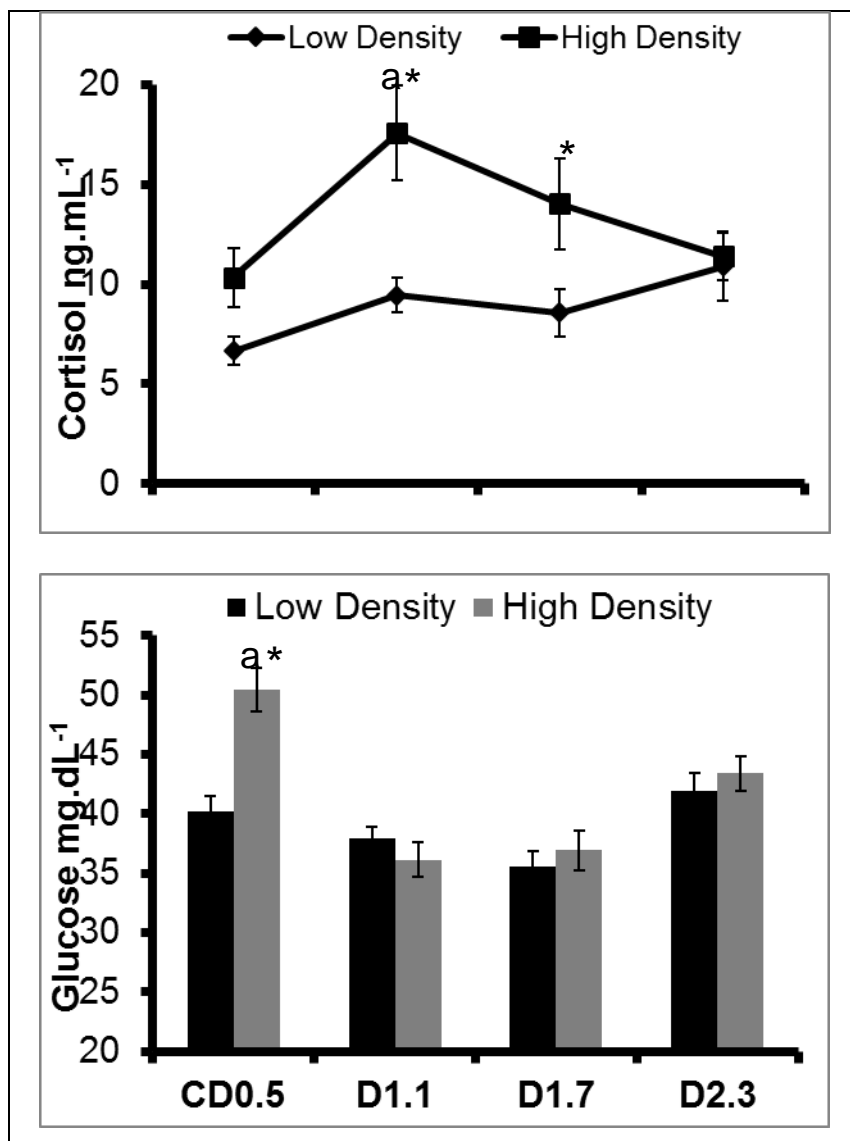


Figura 1 Contenido de cortisol (ng mL<sup>-1</sup>) y glucosa (mg mL<sup>-1</sup>) en el plasma de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con CD (0.55% Trp) y tres dietas enriquecidas con Trp (1.1, 1.65 y 2.2%) durante el cultivo en baja y alta densidad de siembra (13.5 y 27.0 kg m<sup>-3</sup> respectivamente). ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas por la dieta dentro de la misma densidad de siembra. \*Diferencias significativas por densidad de siembra dentro de una misma dieta (P<0.05). Los datos son presentados como la media con el error estándar representado por las barras verticales.

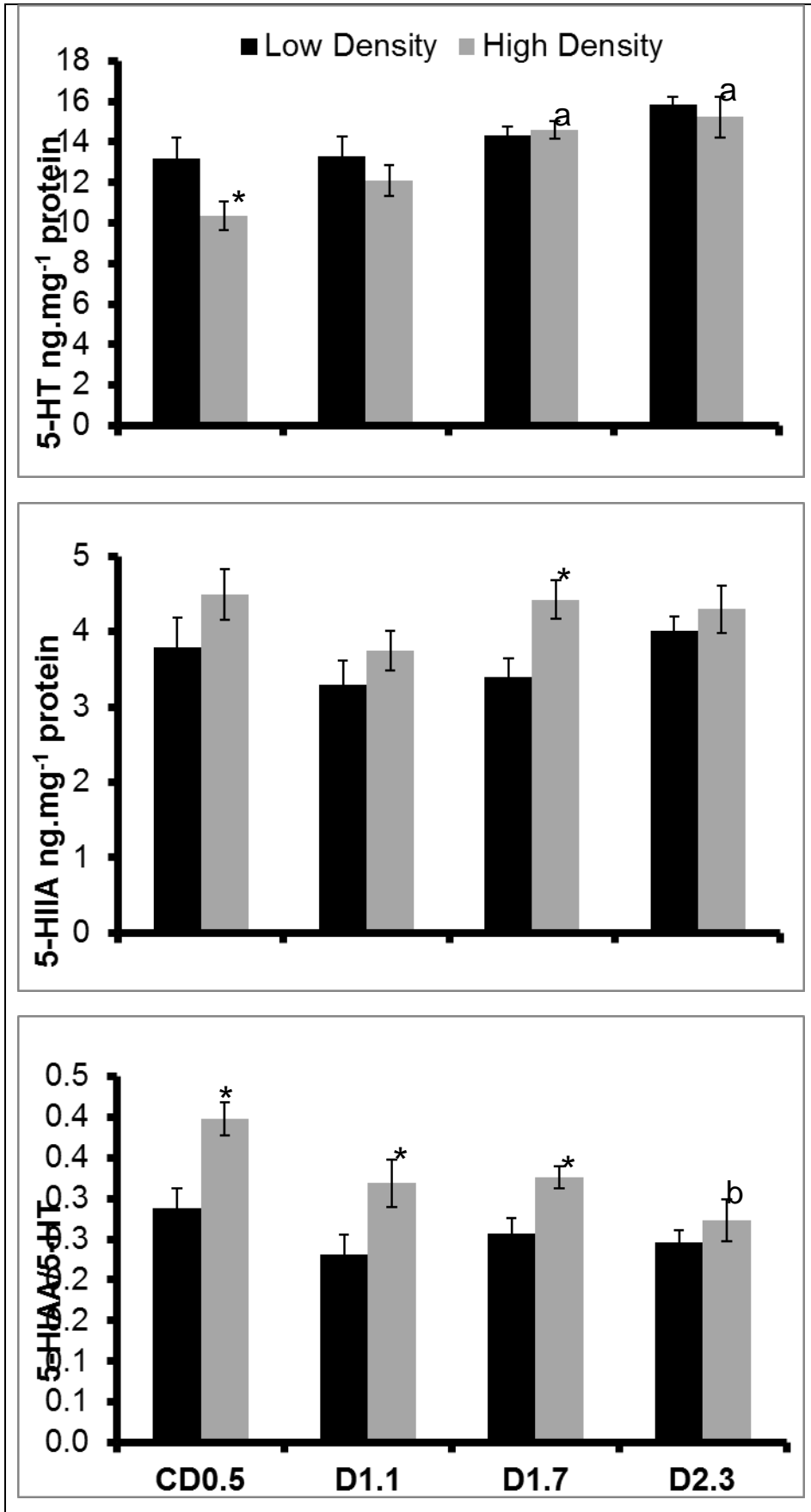


Fig 2. Contenido de serotonina (5-HT), ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) (expresado en  $\text{ng mg}^{-1}$  proteína) y actividad serotoninérgica evaluada por la tasa de recambio de serotonina (5-HIAA/5-HT) en cerebros de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con CD (0.55% Trp) y tres dietas enriquecidas con Trp (D1=1.1%, D2=1.65% y D3=2.2%) durante el cultivo en baja y alta densidad de siembra ( $13.5$  y  $27.0 \text{ kg m}^{-3}$  respectivamente). ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas por la dieta dentro de la misma densidad de siembra. \*Diferencias significativas por densidad de siembra dentro de una misma dieta ( $P < 0.05$ ). Los datos son presentados como la media con el error estándar representado por las barras verticales.



Tabla IV. Actividad de las enzimas de estrés oxidativo SOD y CAT (unidades por mg de proteína) en hígado de juveniles de totoaba alimentados con dietas con diferente nivel de Trp (CD0.5, D1.1, D1.7 y D2.3) en el cultivo en alta (27 kg m<sup>3</sup>) y baja (13.5 kg m<sup>3</sup>) densidad. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas por la dieta dentro de la misma densidad de siembra. Los datos son presentados como la media con el error estándar representado por las barras verticales.

		<b>Oxidative stress enzymes</b>	
	<b>Diet</b>	<b>SOD</b>	<b>CAT</b>
<b>Low Density</b>	<b>D0.5</b>	330.3±27.7	230.0±24.6 <sup>a</sup>
	<b>D1.1</b>	369.3±7.5	174±3.8 <sup>b</sup>
	<b>D1.7</b>	351.7±17.3	159.7±7.8 <sup>b</sup>
	<b>D2.3</b>	368.8±9.0	169.2±11.9 <sup>b</sup>
<b>High Density</b>	<b>D0.5</b>	373.3±3.5	248.1±7.4 <sup>a</sup>
	<b>D1.1</b>	337.1±25.0	211.8±0.9
	<b>D1.7</b>	367.7±20.8	158.5±13.0 <sup>b</sup>
	<b>D2.3</b>	350.3±9.4	155.7±8.8 <sup>b</sup>
<b>P Value</b>	<b>Diet</b>	0.948	<0.001
	<b>Density</b>	0.867	0.253
	<b>Diet x Density</b>	0.198	0.224

## **Discusiones**

El cultivo de las especies acuícolas en altas densidades implica la reducción de espacios disponibles para el desarrollo de los organismos, lo cual lleva a una mayor competencia por los recursos, llegando a constituir un factor de estrés a largo plazo (Farm Animal Welfare Council 1996). Previamente se reportó la

disminución de la respuesta al estrés agudo mediada por la adición de Trp en las dietas de Totoaba (Cabanillas Gámez et al. 2017). En el presente estudio, la suplementación con Trp disminuyó los parámetros relacionados con las respuestas al estrés, en juveniles sometidos al estrés crónico por alta densidad de siembra

Los valores hematológicos revelaron un aumento significativo en el porcentaje de hematocrito, RBC y MCV en los organismos alimentados con la CD0.5 durante el cultivo en alta densidad comparado con los de baja densidad. El incremento de estos parámetros ocurre durante el proceso de hemoconcentración como parte de la respuesta celular para aumentar el transporte de oxígeno en la sangre durante periodos de alta demanda de energía (Montero et al. 1999).

Estudios previos demostraron, que el aumento de la densidad de siembra induce un aumento en RBC en la dorada, *Sparus Aurata* (Montero et al. 1999) y en la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (Mohsen, 2012). Estos datos contrastan con los de Kpundeh et al. (2013), quienes reportaron la disminución de RBC, Hg y Hct con el aumento de la densidad de siembra en juveniles *Oreochromis niloticus*, atribuido a una disminución de la ingesta de alimento.

La dieta que fue suplementada al nivel más bajo de Trp (D1.1) redujo el contenido de Hg y de ALB en ambas densidades. Nuestros datos revelaron que el nivel de Trp contenido en la D1.1 parece estimular la actividad del eje HHI, con el subsecuente incremento en el nivel de cortisol, por lo que la disminución de Hg y ALB podría representar un mayor desgaste energético en los peces alimentados con esta dieta. Por otro lado, la alta demanda de energía puede aumentar el

catabolismo de las proteínas con la subsecuente acumulación de NH<sub>3</sub>, el cual, Kpundeh et al. (2013) sugieren que podría afectar el consumo de O<sub>2</sub> y llevar a la disminución de los niveles de Hg. En totoaba, el nivel de albúmina fue restaurado en los organismos alimentados con las dietas con mayor nivel de triptófano. En juveniles de *Labeo rohita*, la exposición a niveles subletales de nitritos disminuyó significativamente los niveles de las proteínas plasmáticas albúmina y globulinas, mientras que la adición de 0.75 y 1.5% de Trp restauró el valor de estas proteínas. Nuestros resultados sugieren que el mayor nivel de triptófano en la dieta restauró el nivel de los parámetros sanguíneos de los juveniles de totoaba a niveles similares a los observados en baja densidad. Un resultado similar fue reportado en *Dicentrarchus labrax*, en los cuales las dietas suplementadas con 0.5% de Trp, disminuyó el MCHC (Machado et al. 2015).

Nuestros datos mostraron que el incremento de Trp en la dieta aumentó el nivel de lactato, MCH y MCHC en el cultivo en baja densidad, mientras que en alta densidad el lactato y MCHC aumentaron en los peces alimentados con la CD0.5, y disminuyeron al aumentar el Trp en la dieta.

El aumento de MCH y MCHC observado en baja densidad con la D1.7 y D2.3 podría representar mayor capacidad de transporte de oxígeno, simulando un estímulo, mientras que en alta densidad, las dietas con mayor nivel de Trp disminuyeron la respuesta de estos parámetros, sugiriendo una menor sensibilidad a este tipo de estrés. De acuerdo a nuestros resultados, otros autores han reportado un estímulo en la respuesta por la adición de Trp en organismos no

estresados; sin embargo, el Trp disminuye la respuesta cuando el estrés está presente (Lepage et al. 2002).

La glucosa constituye una importante fuente de energía durante el metabolismo aerobio (Pickering y Pottinger, 1995), lo mismo que el lactato durante el metabolismo anaerobio (Raicevich et al. 2014). Nuestros resultados muestran que el cultivo en alta densidad aumentó los niveles de glucosa y lactato respecto al grupo de baja densidad en los peces alimentados con la dieta CD0.5, estos datos van de acorde con los cambios reportados en el nivel de glucosa en el plasma por el aumento de la densidad de siembra (De las Eras et al. 2015). En juveniles de Senegalese sole, *Solea senegalensis*, se observó mayor nivel de glucosa en el cultivo en alta y media densidad, comparados con los peces cultivados en baja densidad (Costas et al. 2008). Herrera et al. (2012) reportaron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de glucosa y lactato por el aumento de la densidad de siembra en rodaballo (*Scophthalmus rhombus*). De igual manera, el aumento de la densidad de siembra aumentó los niveles de glucosa y disminuyó las proteínas totales (TP) en juveniles de *Oreochromis niloticus* (Kpundeh et al. 2013) Tomados juntos, los diferentes parámetros sanguíneos sugieren que los juveniles de totoaba experimentaron estrés de tipo crónico mientras permanecieron en el cultivo en alta densidad alimentados con la CD0.5; asimismo, las dietas suplementadas con triptofano parecen disminuir el efecto del estrés crónico por la alta densidad.

El aumento de la densidad de disminuyó la sobrevivencia de los juveniles de totoaba en los grupos alimentados con todas las dietas, aunque con la D1.7 la

diferencia no fue significativa. Los factores de estrés pueden afectar la sobrevivencia en otras especies (Burnley et al., 2012; Akhtar *et al.*, 2013).

Sin embargo, la sobrevivencia mostró una tendencia a incrementarse en línea con el aumento de Trp en la dieta durante el cultivo en alta densidad; aunque las diferencias no fueron significativas, una tendencia similar fue observada en un trabajo previo en nuestro laboratorio, en el cual los grupos alimentados con mayor nivel de Trp en la dieta tendieron a mostrar mayor sobrevivencia (datos no reportados).

En otros estudios, la adición de la dieta con 5% de Trp aumentó significativamente la sobrevivencia de la carpa común al estrés salino (Hoseinei et al. 2010) y a la exposición al sulfato de cobre (Hoseini et al. 2012).

La alta densidad afectó el DGI y el WG en los juveniles alimentados con la CD0.5. De igual manera, Herrera et al. (2012) reportaron la disminución de los parámetros de crecimiento (SGR y FW) aunque la ingestión de alimento (FI) no se vio afectada por el aumento de la densidad de siembra, sugiriendo que la eficiencia del alimento podría ser menor en cultivos en alta densidad, debido a que el estrés aumenta la demanda de energía en el organismo, (Wendelaar Bonga 1997). Sin embargo, la suplementación con Trp restauró los niveles de DGI y WG en los juveniles de totoaba durante el cultivo en alta densidad, por lo que el Trp parece haber reducido el efecto del estrés crónico, restaurando los parámetros de crecimiento, posiblemente mediante la reducción del gasto energético derivado de la respuesta al estrés.

En un estudio con juveniles de *Labeo rohita* la inclusión de 0.75 y 1.5% de Trp en la dieta incrementó el peso ganado (PGW) y la tasa específica de crecimiento (SGR) y disminuyó el FCA y el índice hepatosomático (HSI) de los peces, disminuyendo el efecto nocivo de la exposición a niveles sub-letales de nitritos (Ciji et al. 2015). Así mismo, la adición de Trp en la dieta aumentó el crecimiento en juveniles de *Labeo rohita* expuestos a estrés por salinidad y temperatura (Akhtar et al. 2013).

Otras especies en las que la densidad de siembra ha mostrado efectos negativos sobre los parámetros de crecimiento son *Oreochromis niloticus*, donde disminuyó la eficiencia alimenticia (FE) y la tasa específica de crecimiento (SGR), incluso disminuyó la sobrevivencia (Kpundeh et al. 2013), en otro trabajo se reportó la disminución del peso final, la SGR, la ingesta de alimento y aumento del FCR (Mohsen, 2012). En el bagre africano *Heterobranchus longifilis*, disminuyó la sobrevivencia y el peso promedio ganado al día (Mdwg) (Coulibaly et al., 2007) y disminuyó el crecimiento en la liza, *Chelon labrosus* (De las Eras et al. 2015).

Las enzimas antioxidantes CAT y SOD participan en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno producidas durante el metabolismo, con lo cual, ayudan a prevenir la oxidación de biomoléculas (Andrade et al. 2015). Por ello la actividad de estas enzimas podría incrementarse cuando ocurre un incremento en la producción de EROs (De Block y Stoks, 2015). Nuestros resultados muestran que la actividad de la catalasa disminuyó de manera significativa con las dietas con mayor contenido de Trp en ambas densidades. Algunos autores han reportado la reducción en la actividad de estas enzimas en organismos alimentados con dietas

enriquecidas con Trp bajo condiciones de estrés. Ciji et al. (2015) reportaron que la exposición a nitritos aumentó significativamente la actividad de la CAT y la SOD en el hígado de juveniles de *Labeo rohita*, mientras que las dietas suplementadas con Trp redujeron significativamente el efecto de la exposición a nitritos sobre la actividad de ambas enzimas. En esta misma especie la actividad de la CAT y de la SOD en el hígado aumentó de manera significativa en el sentido de la exposición al estrés salino, estrés térmico, así como ambos; sin embargo, la actividad de ambas enzimas disminuyó con el incremento de Trp en la dieta (Akhtar et al. 2013) Dado que la actividad de las enzimas antioxidantes ha sido relacionada a la tasa metabólica de los organismos durante el estrés, la menor actividad de estas enzimas observada en los organismos alimentados con las dietas suplementadas con Trp podría representar un menor impacto del estrés en la fisiología de estos grupos.

Durante el cultivo en alta densidad, los grupos alimentados con las dietas con menor nivel de Trp (DC0.5-D1.7) mostraron mayor nivel de cortisol en el plasma comparados con los grupos alimentados con las mismas dietas y mantenidos en baja densidad; no obstante, no se observaron diferencias en los niveles de cortisol de los grupos alimentados con la D2.3 cultivados en alta y baja densidad. El aumento del nivel de cortisol en el plasma ha sido el indicador de estrés más ampliamente utilizado en peces (Barton e Iwama 1991; Montero et al. 1999). Una clara tendencia de incremento se observa en el nivel de cortisol de los grupos cultivados en baja densidad con el aumento de Trp en la dieta; mientras que en alta densidad, el mayor nivel de Trp en la D2.3 disminuyó el aumento de cortisol

observado con la D1.1; otros autores han reportado que el triptofano estimula la producción de cortisol en condiciones de bajo estrés, mientras que la inhibe cuando el estrés aumenta (Lepage et al., 2002). Estos apoyan la presencia de una mayor respuesta al estrés durante el cultivo en alta densidad, así como el rol del Trp en la disminución de la respuesta al estrés.

Otros autores han reportado el incremento del nivel de cortisol por el aumento de la densidad de siembra en juveniles de *Sparus aurata* (Montero et al. 1999), en juveniles de ayu, *Plecoglossus altivelis* (Iguchi et al. 2003) asimismo, en juveniles de *Solea senegalensis* (Costas et al. 2008), *Oreochromis niloticus* (L.) (Mohsen, 2012) y *Sparus aurata* (Montero et al. 1999). Otros factores de estrés crónico como el manejo diario también aumentaron el nivel de cortisol en alevines de *Rhamdia quelen* (Barcellos et al. 2006),.

En totoaba, el mayor nivel de cortisol observado en alta densidad respecto a la baja densidad al final del experimento en los grupos alimentados con las dietas de menor contenido de triptófano (CD0.5-D1.7) sugiere que el aumento se sostuvo durante todo el cultivo, por lo cual, los grupos alimentados con menor nivel de Trp podrían haber sido incapaces de adaptarse a las condiciones del cultivo durante el periodo que duró el experimento (63 días). Por otro lado, la disminución de la respuesta en cortisol ante el estrés crónico podría indicar la adaptación del organismo al factor de estrés (Hontela et al. 1998). Por lo cual, los peces alimentados con la D2.3 parecen haber sido más capaces de adaptarse a la situación de estrés por el cultivo en alta densidad.



De acuerdo a nuestros resultados, Akhtar et al. (2013) observaron un mayor incremento en el cortisol en el plasma de juveniles de *Labeo rohita* alimentados con una dieta sin adición de Trp, respecto a los que fueron alimentados con dietas suplementadas con 0.7 y 1.4% de triptófano.

Notablemente, en totoaba se observó una disminución del contenido de 5-HT en el cerebro de los peces cultivados en alta densidad y alimentados con la CD0.5. Así mismo, estos grupos mostraron un aumento en la tasa de recambio de la serotonina durante el cultivo en alta densidad, lo cual podría haber conducido a la disminución de la serotonina y agotamiento del triptófano. Otros autores han sugerido que el estrés crónico podría conducir al agotamiento del eje HHI, reduciendo el nivel de cortisol (Hontela et al. 1998). Notablemente, los peces alimentados con la CD0.5 mostraron menor nivel de cortisol que los alimentados con las dietas suplementadas con Trp durante el cultivo en alta densidad; por lo cual, el bajo nivel de Trp en estos grupos podría ser responsable de la menor actividad del eje, debido a que la 5-HT, sintetizada a partir del Trp, estimula el eje HHI (Morandini et al. 2015). Por otro lado, el estrés derivado del aumento en la densidad de siembra podría estimular el catabolismo del Trp en peces marinos (Costas et al. 2008), el cual podría influir en la disminución de la síntesis de serotonina. Estos datos en conjunto sugieren mayor susceptibilidad al estrés en los organismos alimentados con la CD0.5, debido a que también la mayor reactividad al estrés ha sido relacionada a la disminución de 5-HT en cerebro (Winberg y Nillson, 1993).

De manera notable, las dietas suplementadas con Trp ayudaron a restaurar el nivel de 5-HT en los peces cultivados en alta densidad. Lo que replica los datos que nosotros reportamos previamente (Cabanillas et al. Artículo en revisión).

De igual manera, nuestros datos revelaron la disminución de la tasa de recambio de 5-HT conforme al aumento de Trp en la dieta durante el cultivo en alta densidad.

Los datos obtenidos en la sangre y química sanguínea, así como en 5-HT en cerebro indican que la alta densidad de siembra utilizada en el presente trabajo ( $27 \text{ kg m}^{-3}$ ) podría representar un factor de estrés en el largo plazo para la especie *Totoaba macdonadi*. El impacto en la fisiología afectó el DGI y el WG, así como el nivel de 5-HT en los organismos alimentados con la CD0.5, los cuales pueden considerarse parte de la fase terciaria de la respuesta al estrés.

La alimentación sostenida con las dietas suplementadas con Trp tuvo un efecto significativo en la reducción de la respuesta al estrés sobre los parámetros fisiológicos, (DGI, WG, 5-HT). La disminución de la respuesta al estrés crónico parece en *totoaba macdonaldi*, parece estar relacionada al aumento del contenido de 5-HT y disminución de la tasa de recambio, tal como ocurrió durante la exposición al estrés agudo de esta misma especie. Por lo cual, mecanismos similares podrían estar involucrados en la regulación de la respuesta endócrina al estrés tanto crónico como agudo en los peces marinos.

Nuestros datos podrían ayudar a la formulación de dietas con el objetivo de reducir los efectos del estrés durante el cultivo de especies marinas.

## Bibliography

- Akhtar, M.S., et al. (2013). Physiological responses of dietary tryptophan fed *Labeo rohita* to temperature and salinity stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 97, 1075–1083.
- Atencio-García, V., et al. (2007). Hematología y química sanguínea de juveniles de rubio (*Salminus affinis* PISCES: CHARACIDAE) del río Sinú. *Acta Biológica Colombiana*. 12, 27-40.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M. (2006). Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture*. 253, 317–321.
- Bardullas, U., et al. (2009). Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 239, 169–177.
- Bardullas U., Giordano M. & Rodríguez V.M. (2011) Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 263–272.
- Barrera Guevara, J.C. (1990). The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces: Sciaenidae), in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Fish Biology*. 37, 201-202.

- Barton, B.A., Iwama, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. of Fish Diseases*. 3-26.
- Barton, B.A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 517–525.
- Best J., H.F. Nijhout, M. Reed. (2010). Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 7 (34): 1-26.
- Blaxhall, P.C., Daisle, P.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*. 5, 771-781.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*.
- Burnley, T., Stryhn, H., Hammell, K.L. (2012). Post-handling mortality during controlled field trials with marine grow-out Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. 368–369, 55-60.
- Costas B., C. Arangão, J.M. Mancera, M.T. Dinis, L.E.C. Conceição (2008). High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research*. 39: 1-9.
- Costas B., Arangão C., Soengas J.L., Míguez J.M., Rema P., Dias J., Afonso A., Conceição. (2012). Effects of dietary amino acids and repeated handling on

stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 161: 18-26.

Federación, D.O.d.I. (2009). AVISO por el que se informa al público en general que la Comisión Nacional de Areas Naturales Protegidas ha concluido la elaboración del Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado, ubicada en aguas del Golfo de California y en los municipios de Mexicali, Estado de Baja California, y de Puerto Peñasco y de San Luis Río Colorado, Estado de Sonora., Vol., ed.^eds., pp. 113.

Herrera M., Ruiz-Jarabo I., Hachero I., Vargas Chacoff L., Amo A., Mancera J.M. (2012). Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquacult int.* 20: 1041-1052.

Hoseini, S.M., Hosseini, S.A. (2010). Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiol Biochem.* 36, 1061–1067.

Hoseini, S.M., Hosseini, S.A., Soudagar, M. (2012). Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. *Fish Physiol Biochem.* 38, 1419–1426.

Iguchi K., Ogawa K., Nagae M., Ito F. (2003). The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220: 515–523

- Kpundeh M.D., Xu P., Yang H., Qiang J., He Jie. (2013). Stocking densities and chronic zero culture water exchange stress effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *J Aquac Res Development*. 1-5.
- Laranja, J.L.Q., et al. (2010). Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*. 310 84–90.
- Lepage, O., Tottmar, O., Winberg, S. (2002). Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*. 205, 3679–3687.
- Markus, C.R., et al. (2000). The bovine protein lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1536–44.
- Medeiros L.R., Mager E.M., Grosell M., McDonald M.D. (2010). The serotonin subtype 1A receptor regulates cortisol secretion in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *General and Comparative Endocrinology*. 168: 377-387.
- Merino G.E., Piedrahita R.H., Conklin D.E. (2007). The effect of fish density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture*. 265: 176-186.

- Mohsen A-T. (2012). Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). International Aquatic Research. 1-13.
- Morandini, L., et al. (2015). Serotonergic outcome, stress and sexual steroid hormones, and growth in a South American cichlid fish fed with an L-tryptophan enriched diet. *General and Comparative Endocrinology* 223, 27–37.
- NOM-062-ZOO N.O.M. (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G. (1995). Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 5, 349-379.
- Raicevich, S., et al. (2014). Synergistic and Antagonistic Effects of Thermal Shock, Air Exposure, and Fishing Capture on the Physiological Stress of *Squilla mantis* (Stomatopoda). *Plos one*. 9, 1-12.
- Sánchez P., Ambrosio P.P., Flos R. (2010). Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 300: 93-101.
- Stenfors C. & Ross S.B. (2002) Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo. *Journal of Neural Transmission* 109, 1353–1363.
- Tejpal, C.S., et al. (2009). Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerling. *Aquaculture*. 293, 272–277.

- True, C.D., Silva, A., Castro, N. (1997). Acquisition of Broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field Handling, Decompression, and Prophylaxis of an Endangered Species. *The Progressive Fish Culturist*. 59, 246-248.
- Wendelaar Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Review*. 77, 591-625.
- Winberg, S., Nilsson, G.E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonist behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 160C, 597-614.





## **DISCUSIÓN GENERAL**

La respuesta al estrés es un proceso demandante de energía, por lo cual, durante la exposición al estrés, los peces presentan varias respuestas fisiológicas por efecto de la liberación de hormonas catecolaminas, encaminadas a mantener ó incluso aumentar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre durante el estrés. Entre ellas está la liberación de eritrocitos del vaso, protección de pH intracelular de los eritrocitos mediante la liberación de protones, así como la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a las células, causando un incremento osmótico de los eritrocitos, los cuales al final reducen su concentración de fosfatos orgánicos, aumentando de nuevo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Estos cambios pueden ser evidentes de manera inmediata por el incremento de hemoglobina total y hematocrito en la sangre, con una disminución de la concentración media de hemoglobina celular (MCHC) en los peces estresados como resultado de la hinchazón osmótica y la entrada de eritrocitos inmaduros (Pickering y Pottinger, 1995).

Nuestros datos muestran un claro aumento en los parámetros hematológicos e índices wintrobe durante el cultivo en alta densidad en organismos alimentados con la CD0.5, los cuales fueron restaurados con la suplementación con Trp en la dieta, demostrando el efecto del factor de estrés "densidad" sobre las variables fisiológicas "hematológicas" relacionadas a la capacidad de transporte de oxígeno, así mismo, el papel que juega el triptófano como precursor de la serotonina en la disminución de la respuesta al estrés, lo cual podría tener un efecto beneficioso durante el estrés a largo plazo que enfrentan los peces como totoaba durante el cultivo.

Sin embargo, durante la exposición al estrés agudo fue más evidente la movilización de sustratos energéticos como la glucosa, con la consecuente acumulación de lactato en el plasma, los cuales se incrementaron en la mayoría de los grupos expuestos a estrés agudo. Estos parámetros parecen estar relacionados directamente con la producción de energía para satisfacer las demandas metabólicas. El nivel de la glucosa en el plasma ha sido uno de los indicadores de estrés más utilizado en peces. Generalmente observándose un incremento dentro de los primeros minutos en casos de estrés agudo, lo cual puede deberse a una disminución en su utilización o bien estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis (Pickering y Pottinger, 1995).

Así mismo, el metabolismo aeróbico, en el cual el oxígeno actúa como receptor de electrones es por mucho el mecanismo más eficiente para la producción de ATP, por lo tanto, resulta ventajoso para los peces mantener rutas oxidativas mientras les sea posible; sin embargo, utilizan rutas anaeróbicas para la energía de procesos metabólicos esenciales cuando las rutas aeróbicas son insuficientes o no pueden ser mantenidas, la consecuencia inmediata es la producción de ácido láctico, por lo que ha sido considerado como indicador de la respuesta al estrés (Pickering y Pottinger, 1995).

El efecto del triptófano fue mas evidente sobre las respuestas hematológicas durante el estrés crónico que sobre las respuestas de glucosa y lactato plasmáticos durante el estrés agudo. La respuesta al estrés a largo plazo ha sido relacionada con el nivel de cortisol en el plasma, el cual es el producto final del eje HHI, y este a su vez es regulado por la 5-HT; mientras que el aumento de glucosa

y lactato podrían estar fuertemente influenciados por las hormonas catecolaminas durante el estrés agudo.

Las proteínas plasmáticas y en especial la ALB y GLB muestran una importante relación con el estado inmunológico de los organismos (Kumar et al., 2007; Ciji et al., 2015); aceptándose generalmente que los organismos acuáticos con mayores niveles de PT, ALB y GLB en el plasma podrían exhibir una respuesta inmunológica innata más fuerte (Wiegertjes et al., 1996) y que la disminución de las globulinas puede entenderse como un estado de inmunosupresión (Kumer et al., 2007).

La dieta D1.1 disminuyó el nivel de las proteínas plasmáticas, y algunos parámetros hematológicos, los cuales fueron restaurados por las dietas con la D1.7 y D2.3; por lo cual, el efecto de la D1.1 podría ser mediado por la mayor actividad del eje HHI, con la subsecuente mayor liberación de cortisol, por lo cual, el aumento sostenido de esta hormona podría haber resultado en mayor desgaste energético.

Las lipoproteínas del plasma son la fuente principal de colesterol adrenal, aunque también puede ocurrir la síntesis a partir de acetato, de manera que cuando se presenta un estímulo, ocurre un incremento en la captación de lipoproteínas plasmáticas para la producción de colesterol (precursor del cortisol y hormonas esteroideas) dentro de la glándula adrenal (Gardner y Shoback, 2011). Igualmente, los aminoácidos libres son fuente de energía para la ruta gluconeogénica,

Pickering y Pottinger (1995), de manera que las proteínas plasmáticas podrían ser utilizadas para la síntesis de mayores cantidades de hormonas esteroideas o de compuestos energéticos durante la respuesta al estrés, la cual podría haber sido simulada por la D1.1.

El incremento en el nivel de cortisol en el plasma ha sido el indicador de estrés más ampliamente utilizado (Wendelaar Bonga 1997; Kings y Berlinsky, 2006; Barcellos et al., 2006).

La disminución en el nivel de cortisol en el plasma bajo situaciones de estrés crónico podría deberse al aumento de su incorporación en el hígado, donde es metabolizado y posteriormente liberado a través de la bilis (Vijayan et al., 1990).

Sin embargo, los peces alimentados con la D1.1 mostraron un aumento en el nivel de cortisol en todo los casos, mientras que las dietas con mayor nivel de Trp ayudaron a reducir el aumento de esta hormona en todos los casos. Lo que parece indicar que la disminución de la actividad serotoninérgica observada en los organismos alimentados con las dietas con mayor contenido de triptófano podría jugar un papel mayor en la disminución del nivel de cortisol en el plasma que el aumento del catabolismo del cortisol.

Por lo cual, nuestros resultados sugieren que la disminución de los niveles plasmáticos de cortisol fue mediada por la retroalimentación negativa en la actividad del eje HHI, mediada por la actividad serotoninérgica en cerebro.

Otros autores han relacionado la disminución en el nivel de cortisol incremento de la serotonina en peces alimentados con dietas suplementadas con Trp (Hoseini et al., 2010,2012).

Nuestros datos son relevantes debido a que la exposición prolongada a un exceso de glucocorticoides puede mediar una variedad de anomalías psicológicas como la irritabilidad, inestabilidad emocional y depresión (Gardner y Shoback, 2011).

En mamíferos, el TRP induce un incremento en el nivel de cortisol en el plasma (Winber et al., 1997; Floc'h y Seve, 2007). Este incremento en el nivel de cortisol en el plasma mediado por la actividad de la serotonina ha sido también evidenciado en teleósteos como la trucha arcoíris, en el la cual la inyección de 8-OH-DPAT, agonista de uno de los principales receptores de serotonina (5-HT<sub>1A</sub>), indujo un rápido incremento en el nivel de cortisol de manera dependiente de la dosis (Winberg et al., 1997). Sin embargo, Lepage et al (2005) indican que el tratamiento a largo plazo con un elevado nivel de triptófano en la dieta o antidepresivos como el citalopram (que inhibe la recaptación de serotonina) disminuyeron el nivel de cortisol en el plasma de la trucha café *Oncorhynchus mykiss*. Por lo cual, el efecto del Trp sobre la respuesta al estrés podría ser dependiente de la dosis administrada, como fue evidenciado en el presente trabajo, así como del tiempo de administración.

Cuando los organismos incrementan su tasa metabólica, se incrementa también el consumo de oxígeno, por ello la tasa de consumo de oxígeno ha sido utilizado

como un indicador de la actividad metabólica (Kutty y Peer Mohamed, 1975), la cual puede ser influenciada por la actividad del organismo (Tejpal et al., 2014) y está asociada a la formación de ERO's (De Block y Stoks, 2008). Estos autores observaron una disminución en la actividad de las enzimas SOD y CAT en larvas sujetas a un periodo de ayuno, mientras que posterior a este periodo, la actividad de estas enzimas mostró un drástico incremento, lo cual los autores relacionaron con la disminución del metabolismo durante el ayuno (menor tasa respiratoria) y aumento en la respiración al inicio del periodo de alimentación. De manera que el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes indican de manera indirecta la formación de EROs (Mei Wu et al., 2015).

En nuestro trabajo se observó un incremento en la actividad de la catalasa con la adición de TRP en la D1.09 y D1.69, y por los factores de estrés manejo e hipoxia aunque las diferencias no siempre fueron significativas; no obstante, esto podría estar relacionado a un aumento en la actividad metabólica por la adición de triptófano, lo cual podría apoyarse por el aumento en el nivel de cortisol en la D1.09 y D1.69; así mismo por ambos factores de estrés.

Akhtar et al. (2014) observaron un incremento en la actividad de las enzimas de estrés oxidativo CAT, SOD, ATPasa en peces sujetos a estrés por salinidad y temperatura por 30 días, lo cual relacionaron con mayor estrés, este fue reducido con la adición de triptófano en la dieta.

Algunos autores sugieren que el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes sugiere una mayor capacidad antioxidante de los organismos



cuando son alimentados con la cantidad adecuada de triptófano en la dieta (Wen et al., 2014), lo cual resulta cierto para organismos que no se encuentran en condiciones de estrés; sin embargo, cuando los organismos son sujetos a estrés, incrementan rápidamente su tasa metabólica aumentando también su tasa de consumo de oxígeno (Tejpal et al., 2014), la cual se encuentra asociada a la producción de ERO's (De Block y Stoks, 2008), por lo cual, tanto mayor es el reto enfrentado, mayor es la tasa de consumo de oxígeno y mayor será el requerimiento de actividad antioxidante para contrarrestar las ERO's producidas. De manera que el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes podría interpretarse como mayor estrés percibido por el organismo y viceversa.

Tejpal et al. (2014) reportaron que la adición de triptófano en la dieta disminuyó la tasa de consumo de oxígeno en *Cirrhinus mrigala*, y aumentó de la tolerancia térmica, por lo cual, el triptófano podría disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes mediante la disminución del consumo de oxígeno, lo cual podría interpretarse como menor percepción de estrés por el organismo.

En línea con estas observaciones, 30 días de exposición al estrés por salinidad y temperatura aumentaron la actividad de la SOD y la CAT en peces, mientras que la adición de triptófano en la dieta redujo la actividad de estas enzimas, sugiriendo disminución del estrés por el triptófano (Akhtar et al., 2014). En *Labeo rohita* la actividad de la SOD disminuyó por el aumento de la temperatura y por el aumento en la inclusión de triptófano, mientras que en las branquias, la actividad fue mayor en alta temperatura y menor a temperatura ambiente y con la inclusión de

triptófano. La actividad de la CAT aumentó con la temperatura y disminuyó con el aumento del triptófano, indicando disminución del estrés oxidativo por la adición del triptófano (Kumar et al., 2014).

Otra hipótesis es que la relación del triptófano con la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes puede deberse a la activación de la enzima IDO (catabolismo del triptófano), la cual remueve los radicales superóxido utilizándolos como cofactores. Además, la acción indirecta de la IDO debido a la producción de metabolitos (ac. 3-hidroxiantranílico y 3-hidroxikinurenina) podrían funcionar como captadores de radicales libres y de antioxidantes (Floc'h y Seve, 2007).

En suma, estos trabajos parecen apoyar la hipótesis de que bajo condiciones de estrés, el triptófano reduce la actividad de las enzimas antioxidantes de manera indirecta disminuyendo la cantidad de ERO's, ya sea disminuyendo la tasa metabólica y consumo de oxígeno, o mediante la producción de metabolitos que ayudan a la eliminación de ERO's.

Nuestros resultados mostraron que la suplementación de triptófano en la dieta puede aumentar la tasa de síntesis de serotonina tanto en condiciones de no estrés como se observó durante el experimento de estrés agudo, como en condiciones de estrés crónico, como se observó en los organismos alimentados en alta densidad. Así mismo, las dietas suplementadas con mayor nivel de Trp disminuyeron la actividad serotoninérgica tanto ante el estrés agudo como ante el estrés crónico, lo cual podría relacionarse de manera positiva con la disminución de cortisol observada en estos grupos de peces.

Por lo cual la suplementación de Triptófano en la dieta podría ayudar a reducir los efectos del estrés tanto agudo como crónico en juveniles de *Oreochromis macdonaldi*, restaurando los parámetros hematológicos, actividad de enzimas antioxidantes y disminuyendo la actividad del sistema serotoninérgico

## ***Bibliography***

- Akhtar M.S., Pal A.K., Sahu N.P., Ciji A., Meena D.K. & Das P. (2013) Physiological responses of dietary tryptophan fed *Labeo rohita* to temperature and salinity stress. *Journal of animal Physiology and Animal Nutrition* **97**, 1075–1083.
- Altieri S.C., Garcia-Garcia A.L., Leonardo E.D. & Andrews A.M. (2013) Rethinking 5-HT<sub>1A</sub> Receptors: Emerging Modes of Inhibitory Feedback of Relevance to Emotion-Related Behavior. *Acs Chemical Neuroscience* **4**, 72–83.
- Atencio-García V., Genes-López F., Madariaga-Mendoza D. & Pardo-Carrasco S. (2007) Hematología y química sanguínea de juveniles de rubio (*Salminus affinis* PISCES: CHARACIDAE) del río Sinú. *Acta Biológica Colombiana* **12**, 27-40.
- Baker D.W., Wood A.M., Litvak M.K. & Kieffer J.D. (2005) Haematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest and following forced activity. *Journal of Fish Biology* **66**, 208–221.
- Barcellos L.J.G., Kreutz L.C. & Quevedo R.M. (2006) Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* **253**, 317–321.
- Bardullas U., Giordano M. & Rodríguez V.M. (2011) Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague–Dawley rat. *Neurotoxicology and Teratology* **33**, 263–272.

- Bardullas U., Limón-Pacheco J.H., Giordano M., Carrizales L., Mendoza-Trejo M.S. & Rodríguez V.M. (2009) Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **239**, 169–177.
- Barrera Guevara, J.C., 1990. The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces: Sciaenidae), in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Fish Biology*. 37, 201-202.
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42, 517–525.
- Barton B.A. & Iwama G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 3-26.
- Barton D.A., Esler M.D., Dawood T., Lambert E.A., Haikerwal D., Brenchley C., Socratous F., Hastings J., Guo L., Wiesner G., Kaye D.M., Bayles R., Schlaich M.P. & Lambert G.W. (2008) Elevated Brain Serotonin Turnover in Patients With Depression: Effect of Genotype and Therapy. *Archives of General Psychiatry* **65**, 38-46.
- Basic D., Kroghdahl Å., Schjolden J., Winberg S., Vindas M.A., Hillestad M., Mayer I., Skjerve E. & Höglund E. (2013a) Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **388–391**, 8–13.

- Basic D., Schjolden J., Krogdahl Å., Von Krogh K., Hillestad M., Winberg S., Mayer I., Skjerve E. & Höglund E. (2013b) Changes in regional brain monoaminergic activity and temporary down-regulation in stress response from dietary supplementation with L-tryptophan in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *British Journal of Nutrition* **109**, 2166–2174.
- Bejo C.P., Serra M. & Criscuolo E. (2015) Social challenge increases cortisol and hypothalamic monoamine levels in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41**, 1501–1508.
- Best J., H.F. Nijhout, M. Reed. 2010. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 7 (34): 1-26.
- Bisesi J.H., Sweet L.E., Van den Hurk P. & Klaine S.J. (2016) Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**, 938–945.
- Blaxhall P.C. & Daisle P.W. (1973) Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* **5**, 771-781.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*.
- Boadle-Biber M.C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **60**, 1-15.
- Bobadilla M., Alvarez-Borrego S., Avila-Foucat S., Lara-Valencia F. & Espejel I. (2011) Evolution of environmental policy instruments implemented for the

- protection of totoaba and the vaquita porpoise in the Upper Gulf of California. *Environmental science & policy* **14**, 998-1007.
- Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Buentello JA, Reyes-Becerril M, Romero-Geraldo Mde J, Ascencio-Valle Fde J (2007) Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of *channel catfish*. *J Aquat Anim Health* 19:195–203.
- Burnley, T., Stryhn, H., Hammell, K.L., 2012. Post-handling mortality during controlled field trials with marine grow-out Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. 368–369, 55-60.
- Comai S., Bertazzo A., Vachon J., Daigle M., Toupin J., Côté G., Turecki G. & Gobbi G. (2016) Tryptophan via serotonin/kynurenine pathways abnormalities in a large cohort of aggressive inmates: markers for aggression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **70**, 8–16.
- Conceição L E. C., Aragão C., Dias J., Costas B. • Terova G. • Martins C., Tort L (2012). Dietary nitrogen and fish welfare. *Fish Physiol Biochem*. 38:119–141.
- Cook D.G., Brown E.J., Lefevre S., Domenici P. & Steffensen J.F. (2014) The response of striped surfperch *Embiotoca lateralis* to progressive hypoxia: Swimming activity, shoal structure, and estimated metabolic expenditure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **460**, 162–169.

- Costas B, Aragão C, Mancera JM, Dinis MT, Conceição LEC (2008) High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquacult Res* 39:1–9
- Costas B, Aragão C, Soengas JL, Mi'guez JM, Rema P, Dias J, Afonso A, Conceição LEC (2011a) Effects of dietary amino acids and repeated handling on stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles. *Comp Biochem Physiol A*. doi:10.1016/j.cbpa.2011.08.014
- Chaoulhoff F. (1993) Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews* **18**, 1-32.
- DOF (2009) AVISO por el que se informa al público en general que la Comisión Nacional de Areas Naturales Protegidas ha concluido la elaboración del Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado, ubicada en aguas del Golfo de California y en los municipios de Mexicali, Estado de Baja California, y de Puerto Peñasco y de San Luis Río Colorado, Estado de Sonora., 113.
- Feldman S. & Weidenfeld J. (1995) Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroscience and Biobehavioral Review* **45**, 129-141.
- Fernstrom J.D. (2013) Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* **45**, 419–430.



- Flanagan C.A. & Hendrickson J.R. (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern gulf of California. *Fish Bulletin* **74**(3), 531-544.
- Floc'h N.L. & Seve B. (2007) Biological roles of tryptophan and its metabolism: Potential implications for pig feeding. *Livestock Science* **112**, 23–32.
- Foss A., Grimsbø E., Vikingstad E., Nortvedt R., Slinde E. & Roth B. (2012) Live chilling of Atlantic salmon: physiological response to handling and temperature decrease on welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 565–571.
- Herrera M., Ruiz-Jarabo I., Hachero I., Vargas Chacoff L., Amo A., Mancera J.M. 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquacult int.* 20: 1041-1052.
- Hoseini, S.M., Hosseini, S.A., 2010. Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiol Biochem.* 36, 1061–1067.
- Hoseini, S.M., Hosseini, S.A., Soudagar, M., 2012. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. *Fish Physiol Biochem.* 38, 1419–1426.
- Gaspar P. & Lillesaar C. (2012) Probing the diversity of serotonin neurons. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 2382–2394.

- Grimmett A. & Sillence M.N. (2005) Calmatives for the excitable horse: A review of L-tryptophan. *The Veterinary Journal* **170**, 24–32.
- Höglund E., Bakke M.J., Øverli Ø., Winberg S. & Nilsson G.E. (2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture* **249**, 525–531.
- Höglund E., Balm P.H.M. & Winberg S. (2002) Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neuroscience Letters* **324**, 193–196.
- Hoseini S.M. & Hosseini S.A. (2010) Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 1061–1067.
- Hoseini S.M., Hosseini S.A. & Soudagar M. (2012) Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 1419–1426.
- Hoseini S.M., Mirghaed A.T., Mazandarani M. & Zoheiri F. (2016) Serum cortisol, glucose, thyroid hormones' and non-specific immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* to exogenous tryptophan and acute stress. *Aquaculture* **462**, 17–23.
- Hossain M.R., Blumenthal E. & Mustafa A. (2013) Effects of puerarin on the reduction o glucose and promotion of overall health in acutely stressed

- Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Actinopterygii: Salmonidae).  
*Acta Ichthyologica et piscatoria* **43**, 85–93.
- Iguchi K., Ogawa K., Nagae M., Ito F. 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*).  
*Aquaculture* 220: 515–523
- Jacobs B.L. & Formal C.A. (1995) Activation of 5HT neuronal activity during motor behavior. *Seminars in the neurosciences* **7**, 401-408.
- Krol J. & Zakęś Z. (2016) Effect of dietary L-tryptophan on cannibalism, survival and growth in pikeperch *Sander lucioperca* (L.) post-larvae. *Aquaculture International* **24**, 441–451.
- Kpundeh M.D., Xu P., Yang H., Qiang J., He Jie. 2013. Stocking densities and chronic zero culture water exchange stress effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *J Aquac Res Development*. 1-5.
- Kumar P., Saurabh S., Pal A.K., Sahu N.P. & Arasu A.R.T. (2014) Stress mitigating and growth enhancing effect of dietary tryptophan in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) fingerling. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 1325–1338.
- Laranja J.L.Q., Quintio E.T., Catacutan M.R. & Coloso R.M. (2010) Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture* **310**, 84–90.

- Lepage O., Larson E.T., Mayer I. & Winberg S. (2005) Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant–subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Hormones and Behavior* **48**, 233 – 242.
- Lepage O., Tottmar O. & Winberg S. (2002) Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **205**, 3679–3687.
- Li M., Yu N., Qin J.G., Li E., Du Z. & Chen L. (2014) Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. *Fish & Shellfish Immunology* **38**, 158-165.
- Lillesaar C. (2011) The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **41**, 294–308.
- Lim J.E., Porteus C.S. & Bernier N.J. (2013) Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *General and Comparative Endocrinology* **192**, 246–255.
- Liu J., Mai K., Xu W., Zhang Y., Zhou H. & Ai Q. (2015) Effects of dietary glutamine on survival, growth performance, activities of digestive enzyme, antioxidant status and hypoxia stress resistance of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) post larvae. *Aquaculture* **446**, 48–56.
- López L.M., Flores-Ibarra M., Bañuelos-Vargas I., Galaviz M.A. & True C.D. (2015) Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry* **41**, 921-936.

- Lucki I. (1998) The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Society of Biological Psychiatry* **44**, 151–162.
- Markus C.R., Olivier B., Panhuysen G.E., Van der Gugten J., Alles M.S., Tuiten A., Westenber H.G., Fekkes D., Koppeschaar H.F. & De Haan E.E. (2000) The bovine protein  $\alpha$ -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 1536–1544.
- Martini F.H. (2004) *Fundamentals of Anatomy & Physiology*, Sixth Edition ed. Prentice Hall Staff, San Francisco, CA, United States of America, 1132 p.
- Martins C.I.M., Silva P.I.M., Costas B., Larsen B.K., Santos G.A., Conceição L.E.C., Dias J., Øverli Ø., Höglund E. & Schrama J.W. (2013) The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **400–401**, 129–134.
- Medeiros L.R., Mager E.M., Grosell M., McDonald M.D. 2010. The serotonin subtype 1A receptor regulates cortisol secretion in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *General and Comparative Endocrinology*. 168: 377-387.
- Medeiros L.R. & McDonald M.D. (2013) Cortisol-mediated downregulation of the serotonin 1A receptor subtype in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **164**, 612–621.

- Merino G.E., Piedrahita R.H., Conklin D.E. 2007. The effect of fish density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture*. 265: 176-186.
- Mohsen A-T. 2012. Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *International Aquatic Research*. 1-13.
- Morandini L., Ramallo M.R., Moreira R.G., Höcht C., Somoza G.M., Silva A. & Pandolf M. (2015) Serotonergic outcome, stress and sexual steroid hormones, and growth in a South American cichlid fish fed with an L-tryptophan enriched diet. *General and Comparative Endocrinology* **223**, 27–37.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9:211–268.
- NOM-062-ZOO N.O.M. (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Oxley A., Jolly C., Eide T., Jordal A.E.O., Svoldal A. & Olsen R.E. (2009) The combined impact of plant-derived dietary ingredients and acute stress on the intestinal arachidonic acid cascade in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *British Journal of Nutrition* **16**, 1-12.
- Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M. & Sallinen V. (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of

- zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease* **40**, 46–57.
- Pavlidis M., Theodoridi A. & Tsalafouta A. (2015) Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **60**, 121–131.
- Pérez-Jimenez A., Peres H., Cruz-Rubio V. & Oliva-Teles A. (2012) The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* **108**, 1202–1209.
- Pickering A.D. & Pottinger T.G. (1995) Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes* **5**, 349-379.
- Pottinger TG, Winberg S (2003) Timecourse of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol* **206**:3589–3599.
- Rahman M.S. & Thomas P. (2009) Molecular cloning, characterization and expression of two tryptophan hydroxylase (TPH-1 and TPH-2) genes in the hypothalamus of atlantic croaker: Down-regulation after chronic exposure to hypoxia. *Neuroscience* **158**, 751–765.
- Raicevich S., Minute F., Finoia M.G., Caranfa F., Di Muro P., Scapolan L. & Beltramini M. (2014) Synergistic and Antagonistic Effects of Thermal Shock, Air Exposure, and Fishing Capture on the Physiological Stress of *Squilla mantis* (Stomatopoda). *Plos one* **9**, 1-12.
- Ribeiro L., Moura J., Santos M., Colen R., Rodrigues V., Bandarra N., Soares F., Ramalho P., Barata M., Moura P., Pousão-Ferreira P. & Dias J. (2015)

- Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* **447**, 116–128.
- Sánchez P., Ambrosio P.P., Flos R. 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **300**: 93-101.
- Schjolden J., Pulman K.G.T., Pottinger T.G., Tottmar O. & Winberg S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiology & Behavior* **87**, 938–947.
- Shannon N.J., Gunnet J.W. & Moore K.E. (1986) A Comparison of Biochemical Indices of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Activity Following Electrical Stimulation of the Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neurochemistry* **47**, 958-965.
- Siegel G., Albers R.W., Brady S. & Price D. (2006) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. American Society for Neurochemistry, USA.
- Srejic L.R., Wood K.M., Zeqja A., Hashemi P. & Hutchison W.D. (2016) Modulation of serotonin dynamics in the dorsal raphe nucleus via high frequency medial prefrontal cortex stimulation. *Neurobiology of Disease* **94**, 129–138.
- Stenfors C. & Ross S.B. (2002) Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo. *Journal of Neural Transmission* **109**, 1353–1363.



- Tejpal C.S., Pal A.K., Sahu N.P., Kumar J.A., Muthappa N.A., Vidya S. & Rajan M.G. (2009) Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerling. *Aquaculture* **293**, 272–277.
- Tejpal C.S., Sumitha E.B., Pal A.K., Murthy H.S., Sahu N.P. & Siddaiah G.M. (2014) Effect of dietary supplementation of L-tryptophan on thermal tolerance and oxygen consumption rate in *Cirrhinus mrigala* fingerlings under varied stocking density. *Journal of Thermal Biology* **41**, 59–64.
- Thomas P., Rahman M.S., Khan I.A. & Kummer J.A. (2007) Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia. *Proceedings of the Royal Society, B: Biological Sciences* **274**, 2693–2701.
- Tort L. (2011) Stress and immune modulation in fis. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1366–1375.
- Trenzado C., Hidalgo M.C., García-Gallego M., Morales A.E., Furné M., Domezain A., Domezain J. & Sanz A. (2006) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* **254**, 758–767.
- True C.D. (2012) Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California.
- True C.D., Silva A. & Castro N. (1997) Acquisition of Broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field Handling, Decompression, and Prophylaxis of an Endangered Species. *The Progressive Fish Culturist* **59**, 246-248.

- Ulrich-Lai Y.M. & Herman J.P. (2009) Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 397–409.
- Valentino R.J., Lucki I. & Van Bockstaele E.J. (2010) Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction. *Brain Research* **1314**, 29-37.
- Vindas M.A., Johansen I.B., Folkedal O., Höglund E., Gorissen M., Flik G., Kristiansen T.S. & Øverli Ø. (2016) Brain serotonergic activation in growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. *Royal Society Open Science* **3**, 1-8.
- Waselus M., Nazzaro C., Valentino R.J. & Van Bockstaele E.J. (2009) Stress-induced redistribution of corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the dorsal raphe nucleus. *Biological Psychiatry* **66**, 76-83.
- Wen H., Feng L., Jiang W., Liu J., Jiang J., Li S., Tang T., Zhang Y., Kuang S. & Zhou X. (2014) Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology* **40**, 275-287.
- Wendelaar Bonga, S., 1997. The stress response in fish. *Physiological Review*. **77**, 591-625.
- Winberg S. & Nilsson G.E. (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonist behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* **160**, 597-614.

- Winberg S., Nilsson G.E., Spruijt B.M. & Höglund U. (1993) Spontaneous locomotor activity in arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. *Journal of Experimental Biology* **179**, 213–232.
- Winberg S., Nilsson A., Hylland P., Söderström V. & Nilsson G.E. (1997) Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters* **230**, 113–116.
- Wood S.K., Zhang X., Reyes B.A.S., Lee C.S., Van Bockstaele E.J. & Valentino R.J. (2013) Cellular Adaptations of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Associated with the Development of Active Coping in Response to Social Stress. *Biological Psychiatry* **73**, 1087-1094.
- Wu G, Bazer FW, Davis TA, Jaeger LA, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Meininger CJ, Spencer TE, Yin YL (2007). Important roles of the arginine family amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112:8–22
- Xie G., Zuo W., Wu L., Li W., Wu W., Bekker A. & Ye J.H. (2016) Serotonin modulates glutamatergic transmission to neurons in the lateral habenula. *Scientific Reports* **6**, 1-12.