



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Alternaciones a nivel intestinal de lubinas alimentadas con bajos niveles de harina de pescado



TRABAJO FINAL DE GRADO

Localidad y fecha:	Valencia, Julio 2019
Curso académico:	2018-2019
Titulación:	Grado en Biotecnología
Autora:	Zaida Soler Luque
Tutora:	Ana Tomás Vidal
Cotutor:	David Sánchez Peñaranda
Tutora experimental:	Cristina Zomeño Segado

Autora: Zaida Soler Luque

Tutora: Ana Tomás Vidal

Cotutor: David Sánchez Peñaranda

Tutora experimental: Cristina Zomeño Segado

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2019

Título: Alteraciones a nivel intestinal de lubinas alimentadas con bajos niveles de harina de pescado

RESUMEN

La necesidad de una mayor producción de harina de pescado para satisfacer la actual demanda en el mercado, así como su elevado coste, ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar fuentes proteicas alternativas más sostenibles y con mayor disponibilidad. Entre ellas, las fuentes vegetales como la soja o el gluten de trigo han demostrado ser una opción viable.

En el presente estudio se abordó esta temática mediante la realización de un ensayo de sustitución a largo plazo (196 días) empleando ejemplares de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y tres dietas experimentales (FM30, FM15 y FM0) con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por proteínas vegetales. Con este fin, se estudió el crecimiento y la supervivencia y se evaluó el efecto de la eliminación de la harina de pescado sobre la respuesta inmune e inflamatoria a nivel intestinal, por tratarse de un órgano sensible a la dieta ya que se encuentra en contacto directo con el alimento ingerido. En este último caso, se empleó la técnica de RT-qPCR para analizar la expresión relativa de los genes Casp9, TCR β , IL-8, IL-10, TGF β , TNF α , Muc2, Fth y β act los cuales se encuentran involucrados a nivel estructural, inflamatorio e/o inmune.

Los resultados mostraron un menor crecimiento y supervivencia del grupo con una sustitución total de la harina de pescado (FM0) asociados a una deficiencia nutricional y un estado inmunodeprimido. Los resultados del nivel de expresión de los genes Muc2 y β act, sumado a la tendencia de TGF β e IL-8, confirmaron el estado de inmunodepresión presente en las lubinas alimentadas con la dieta FM0 y una respuesta inflamatoria en el grupo FM15 con respecto al control FM30.

Palabras clave: acuicultura, lubina, crecimiento, harina de pescado, materias primas vegetales, expresión génica, RT-qPCR, inflamación.

ABSTRACT

The increasing production of fish meal in order to satisfy the current demand as well as the high production cost has demonstrated the need of looking for more sustainable and available protein sources. Among them, plant sources such as soybean or gluten wheat seem to be a good option.

The current study has followed this line of discussion by the development of a long-term substitution assay (196 days) using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and three different experimental diets (FM30, FM15 and FM0) with variable levels of replacement of fish meal by vegetable proteins. To evaluate the effects of the diets, different procedures were used such as monitoring the growth performance and mortality of fish as well as assessment of the immune and inflammatory response, being the intestine the site of choice because of its sensitivity to diet due to it is in direct contact with the ingested meal. Regarding the last method, RT-qPCR technique was selected for analysing the relative gene expression of Casp9, TCR β , IL-8, IL-10, TGF β , TNF α , Muc2, Fth and β act which are involved at structural, immune or inflammatory level.

The results showed lower growth performance and survival in the FM0 group, the one with the highest level of fish meal replacement, which has been associated with a nutritional deficiency and an immunocompromised status. The expression profile of Muc2 and β act, together with tendency of TGF β e IL-8 reinforced this idea and manifest an immune response of the FM15 group in comparison with the control group FM30.

Key words: aquiculture, European sea bass, growth, fish meal, vegetable sources, gene expression, RT-qPCR, inflammation.

AGRADECIMIENTOS

Ahora que me encuentro escribiendo estas líneas, miro atrás y veo a aquella chica que hace unos meses se encontraba especialmente nerviosa por empezar su trabajo de final de grado. Si tuviese que describir con una palabra esta experiencia, diría que ha conformado una de las etapas más fructíferas de mi carrera profesional ya que he tenido la oportunidad de aplicar gran parte de mis conocimientos teóricos y prácticos, así como de aprender, por otro lado, técnicas y modos de trabajo que el grado no me ha podido proporcionar.

Como en todo trabajo de investigación, las dificultades han estado presentes, pero han sido indispensables para enseñarme que la paciencia, la confianza en uno mismo, el esfuerzo y la dedicación son cualidades esenciales en la vida investigadora. Así mismo, durante estos meses he tenido la gran suerte de formar parte de un equipo mucho más grande, el Grupo de Acuicultura y Biodiversidad y de colaborar con el Departamento de Ciencia Animal los cuales me han acogido con mucho cariño durante todos estos meses y me han demostrado que el trabajo en equipo, así como el ambiente de trabajo, constituyen un pilar fundamental que permite el buen funcionamiento de las instalaciones y una buena motivación de los investigadores.

Y es que mucha gente me ha acompañado y facilitado este viaje, siendo cada uno de ellos una pieza indispensable que han permitido hacer este proyecto realidad. A continuación, me gustaría agradecer especialmente a:

- Silvia y Ana por darme la oportunidad de conocer el mundo de la Acuicultura y de desarrollar mi proyecto final de carrera, además de solucionar todas mis dudas y facilitarme la información necesaria.
- Cristina por guiarme en el proceso de escritura, además de proporcionarme grandes consejos y aprender juntas.
- David Peñaranda por haberme enseñado mucho acerca del trabajo de laboratorio, además de tener una paciencia y dedicación sobrehumanas. Por hacer un hueco en su agenda a pesar de tener una manada de TFGs requiriendo su atención y por los consejos recibidos en la redacción.
- Andrés por cuidar con tanta dedicación las lubinas de mi experimento y enseñarme todo el esfuerzo que ello conlleva.
- David Soler por ser mi compañero de laboratorio y por darme los ánimos y el apoyo necesarios durante todo el proceso, sin excepción.
- Mi familia y especialmente a mis padres, los cuales han demostrado poseer una confianza absoluta en mis posibilidades y me han permitido llegar hasta aquí.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 <i>Dicentrarchus labrax</i>	1
1.1.1 Características generales	1
1.1.2 Historia e importancia económica	2
1.1.3 Piensos actuales, composición y necesidades nutricionales	3
1.1.4 Fuentes proteicas alternativas.....	4
1.1.5 Efectos producidos por el uso de fuentes de proteína alternativas	5
1.2 Intestino	5
1.2.1 Estructura y entorno	5
1.2.2 Microbiota	7
1.2.3 Inmunidad innata y adaptativa.....	8
1.3 Técnicas empleadas para el estudio de la salud intestinal en ensayos de sustitución.....	10
2. Justificación y objetivos	12
3. Materiales y métodos	13
3.1 Aspectos éticos.....	13
3.2 Diseño experimental.....	13
3.2.1 Peces, sistemas y condiciones experimentales	13
3.2.2 Dietas experimentales.....	14
3.2.3 Evaluación del crecimiento	15
3.2.4 Muestreo final y obtención de las muestras intestinales.....	16
3.3 Expresión génica	16
3.3.1 Extracción de tRNA y paso a cDNA.....	16
3.3.2 Puesta a punto del análisis de la expresión génica	17
3.4 Análisis estadístico	19
4. Resultados	20
4.1 Parámetros de crecimiento y supervivencia	20
4.2 Ensayos preliminares.....	21
4.2.1 Gen de referencia y genes diferenciales	21
4.2.2 Cuantificación relativa	23
4.3 Análisis de expresión.....	25
5. Discusión	26
6. Conclusión	29
7. Bibliografía	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Imagen de una lubina (FAO, 2016).	1
Figura 2 Distribución geográfica <i>D.labrax</i> . En color naranja se representan las zonas con presencia de lubina (FAO, 2005).	1
Figura 3 Producción de lubina mediante acuicultura y pesca entre 1950 y 2016 (adaptado de FAO 2016).....	2
Figura 4 Composición aproximada de las dietas correspondientes a diversas especies de peces. CHO hace referencia a carbohidratos mientras que Vit+Min a Vitaminas y Minerales, respectivamente (Oliva-Teles et al., 2015).....	3
Figura 5 Sistema digestivo lubina común (vista ventral). Los números indican las diferentes partes correspondiendo 1. Esófago 2. Estómago 3-4. Intestino anterior y posterior 5. Recto (Abelli et al., 1997).....	5
Figura 6 Capas intestinales (Estruch, 2018a).	6
Figura 7 Tipos celulares presentes en el epitelio intestinal (Estruch,2018a).....	6
Figura 8 Efecto de factores bióticos y abióticos en la microbiota y el huésped (Ghanbari et al., 2015).8	
Figura 9 Efectos de diferentes tipos de estrés en la inmunidad innata y adaptativa (Tort, 2011).	10
Figura 10 Representación esquematizada del ensayo experimental.....	16
Figura 11 Crecimiento de las lubinas durante el ensayo experimental.	21
Figura 12 Variabilidad en Ct de los genes β act y EF1 α empleando un diagrama de box and whiskers. Los cuadraditos indican valores atípicos.	22
Figura 13 Resultados de RT-qPCR para cada gen diferencial empleando pools de muestras.	23
Figura 14 Variación entre placas.....	24
Figura 15 Expresión relativa de los genes cuya expresión fue significativa considerando un $p < 0,05$. Las líneas verticales indican el error estándar.	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Necesidades de AA esenciales en distintas especies del Mar mediterráneo. Los datos se encuentran expresados en porcentaje de proteína de la dieta (adaptado de (Tibaldi & Kaushik, 2005)).	4
Tabla 2 Componentes de la inmunidad humoral (adaptado de Gómez & Balcázar, 2008; Gomez et al., 2013)).	8
Tabla 3 Valores medios correspondientes a los parámetros fisico-químicos del agua durante el período experimental.	13
Tabla 4 Ingredientes y composición aproximada de las dietas experimentales.	14
Tabla 5 Composición aminoacídica de las dietas experimentales representadas en g 100g ⁻¹ de materia seca.	15
Tabla 6 Secuencias de los primers correspondientes a los genes candidatos (de referencia y diferenciales) empleados en el análisis de RT-qPCR.	18
Tabla 7 Parámetros de crecimiento por piensos experimentales.	20
Tabla 8 Valores obtenidos a partir de las curvas estándar para los distintos genes.	24
Tabla 9 Expresión relativa de los genes analizados y valores de P value.	25

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos

Casp3: *Caspase 3*

Casp9: *Caspase 9*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

COX2: *Ciclooxigenase 2*

Ct: Umbral de ciclo; intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral

D.labrax: *Dicentrarchus labrax*

DC: Células dendríticas

EF1 α : *Elongation factor 1 α*

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FM: Harina de pescado

FO: Aceite de pescado (*fish oil*)

Fth: Ferritina

GADPH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino

ICA: Índice de conversión del alimento

Ig: Inmunoglobulina

IL-10: *Interleukin 10*

IL-1 β : *Interleukin 1 β*

IL-6: *Interleukin 6*

IL-8: *Interleukin 8*

IP: Intestino posterior

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

NK: Células Natural Killer

N_R: Ratio normalizado

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

SD: Desviación estándar

TAD: Tasa de alimentación diaria

TCI: Tasa de crecimiento instantáneo

TCR β : Receptor de células T, subunidad β

TGF β : *Transforming growth factor beta*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

Trf: Transferrina

tRNA: Ácido ribonucleico total

UE: Unión Europea

UPV: Universitat Politècnica de València

β act: *Beta acti*

1. Introducción

1.1 *Dicentrarchus labrax*

1.1.1 Características generales

La lubina europea o común (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758), es una especie perteneciente a la familia *Moronidae*, englobada en el orden de los *Perciformes* e incluida en la subclase *Neopterygii* (Figura 1) (Volckaert et al., 2008). Comúnmente, la edad comercial contempla especímenes comprendidos entre 0,25-1,5 kg, llegándose a reportar tamaños máximos de 12 kg y 1,03 m en libertad (Apromar, 2017; Vandeputte et al., 2019; Volckaert et al., 2008).

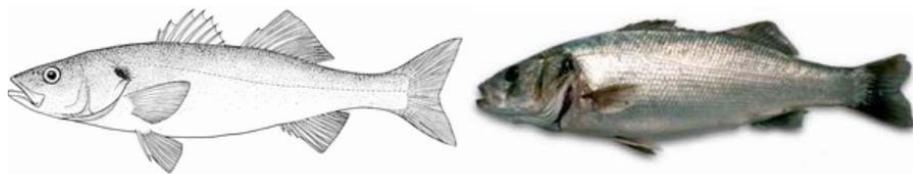


Figura 1 Imagen de una lubina (FAO, 2016).

D.labrax constituye una especie euriterma capaz de sobrevivir en un amplio rango de temperaturas (2-32 °C) así como de concentraciones salinas (eurihalina, 3‰ – 35‰). En estado salvaje, su dieta se basa principalmente en pequeños peces, crustáceos o moluscos (Kousoulaki et al., 2015; Vandeputte et al., 2019; Volckaert et al., 2008), frecuentando zonas costeras, lagunas y estuarios durante el período estival con una posterior migración hacia aguas más frías y profundas durante el período invernal. En cuanto a la distribución geográfica, se localiza principalmente en aguas del mar Mediterráneo, Mar Negro y Océano Atlántico, desde el sur de Noruega hasta finalizar en la parte occidental del Sahara (Figura 2). Además, se ha introducido en los Emiratos Árabes y en Israel mediante granjas (Haffray et al., 2000; Kousoulaki et al., 2015; Vandeputte et al., 2019).



Figura 2 Distribución geográfica *D.labrax*. En color naranja se representan las zonas con presencia de lubina (FAO, 2005).

1.1.2 Historia e importancia económica

Referencias citando a la lubina puede ser halladas ya en los textos clásicos, sin embargo, no fue hasta 1970 cuando empezaron a tener lugar los primeros intentos de acuicultura intensiva empleando ejemplares salvajes jóvenes. Se consiguió su reproducción en cautividad a partir de 1980-1990 mediante programas de hibridación, haciendo posible la domesticación en términos genéticos. En 2016, se estimó que el 50% de las lubinas procedentes de la acuicultura procedían de programas de hibridación selectivos. Comparaciones entre estos grupos iniciales y los ejemplares domesticados muestran que los segundos presentan mayor tolerancia al estrés sin producir diferencias significativas en el crecimiento o la velocidad de nado (Janssen et al., 2017; Vandeputte et al., 2019; Volckaert et al., 2008).

En términos económicos, la lubina tiene un gran interés comercial, produciéndose tanto mediante acuicultura como pesca extractiva, siendo su producción en acuicultura la dominante en los últimos 25 años. En 2016, la producción de lubina en acuicultura fue de 191003 toneladas (t) a diferencia de lo producido mediante pesca extractiva que alcanzó un valor de 5752 t, lo cual supone un 97% de la oferta en el mercado (Figura 3) (Haffray et al., 2000; Volckaert et al., 2008).

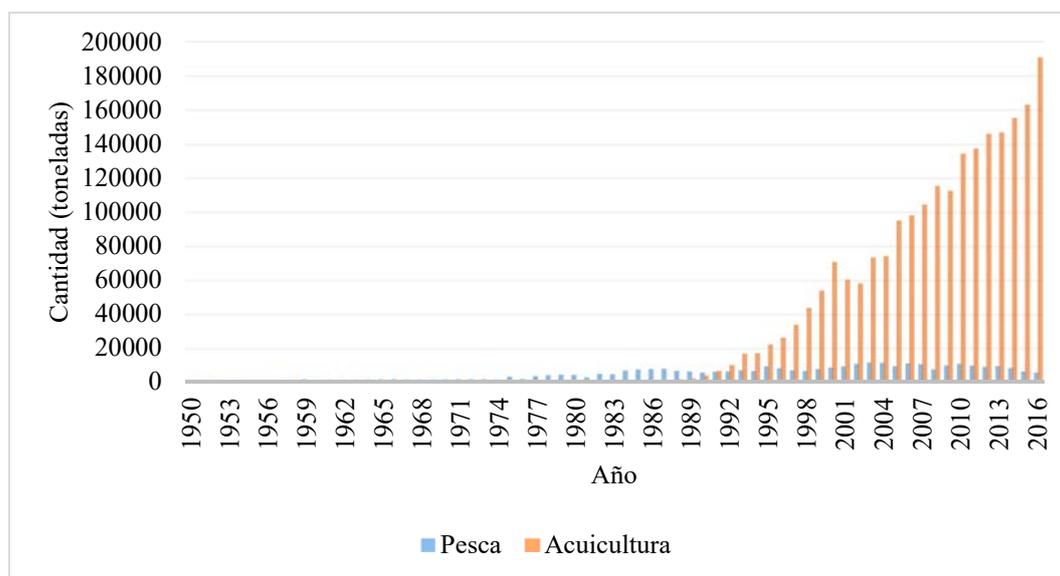


Figura 3 Producción de lubina mediante acuicultura y pesca entre 1950 y 2016 (adaptado de FAO 2016).

Así pues, el consumo de esta especie se encuentra estrechamente ligado a la acuicultura, siendo la quinta mayor producción en la UE, la cual aportó unos beneficios de 365 millones de euros durante el año 2015 (Apromar, 2017). En la producción de lubina se pueden distinguir dos fases: la primera consiste en el empleo de tanques donde las hembras van a tener la capacidad de desovar, una posterior recolección y mantenimiento de los huevos seguido de una segunda fase de cría. Es común que esta segunda fase tenga lugar en jaulas marinas, con densidades de entre 10 y 20 kg/m³ (sistema intensivo). De forma menos frecuente, se emplean sistemas cerrados o sistemas extensivos en países como Portugal, Grecia o Egipto (Jerbi et al., 2012; Haffray et al., 2000; Nehr et al., 1996).

Como sistema de producción, la acuicultura en general tiene la peculiaridad de depender de su entorno ya que emplea en primera instancia recursos naturales como agua, tierra o nutrientes y los efluentes producidos son liberados directamente al medio natural, pudiendo llegar a producir

contaminaciones o cambios en la biodiversidad. Debido a la gran importancia que ha adquirido la acuicultura en los últimos años, es necesario llegar a un equilibrio entre ésta y el entorno (Jerbi et al., 2012). Adicionalmente, la demanda de las materias primas (harina de pescado y aceite de pescado) empleadas en la formulación de las dietas comerciales se ha incrementado, lo que se relaciona con un aumento de su coste, pudiendo derivar a largo plazo en una sobreexplotación de los recursos naturales (Turchini et al., 2019).

Como consecuencia de éste y otros factores, la acuicultura debe afrontar diversos retos que pueden llegar a producir una disminución de la eficiencia de producción, alimentación y un aumento de la mortalidad. Diversos estudios han sido capaces de demostrar un incremento de la productividad gracias a una mejora en la calidad de los piensos así como cambios en su formulación (Jerbi et al., 2012).

1.1.3 Piensos actuales, composición y necesidades nutricionales

La alimentación comercial de la lubina, al igual que en el resto de las especies carnívoras producidas en acuicultura, suele estar basada en productos obtenidos mediante extrusión con una composición nutricional variable en función de sus necesidades. Únicamente en España, se emplearon 121000 t de pienso en 2016, de las cuales un 83,1% fue destinado exclusivamente a la alimentación de peces marinos en acuicultura (lubina, dorada, trucha etc.)(Apromar, 2017).

Las necesidades nutricionales de la lubina son las siguientes (Figura 4): (1) niveles elevados de proteína (45-50% de la dieta), poniendo de manifiesto su naturaleza carnívora (Oliva-Teles, 2000), (2) aminoácidos (AA) esenciales los cuales se encuentran representados en la Tabla 1, (3) niveles lipídicos que oscilan entre el 15-18%, con unos mínimos de ácidos grasos altamente poliinsaturados y finalmente (4) una porción que corresponde a vitaminas y minerales (Kousoulaki et al., 2015; Oliva-Teles, 2000).

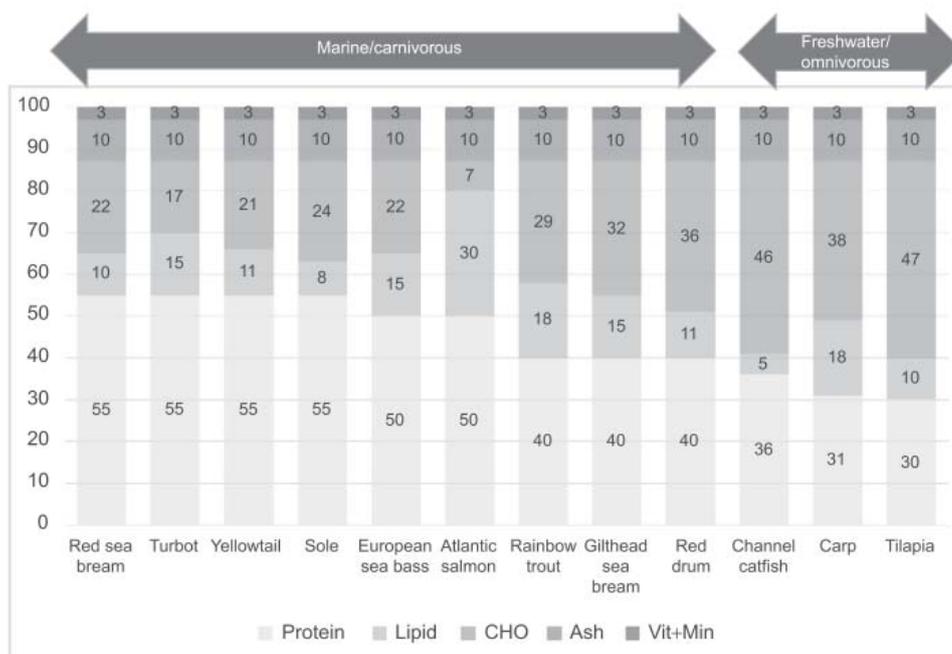


Figura 4 Composición aproximada de las dietas correspondientes a diversas especies de peces. CHO hace referencia a carbohidratos mientras que Vit+Min a Vitaminas y Minerales, respectivamente (Oliva-Teles et al., 2015).

Tabla 1 Necesidades de AA esenciales en distintas especies del Mar mediterráneo. Los datos se encuentran expresados en porcentaje de proteína de la dieta (adaptado de (Tibaldi & Kaushik, 2005)).

	<i>Sparus aurata</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Pargus major</i>	<i>Lateolabrax japonicus</i>	<i>Sciaenops ocellatus</i>	<i>Seriola lalandi</i>
Arginina	< 4,7	3,9-4,6	4,4		5,0	3,4
Lisina	5,0	4,8			4,4	4,1
Met + Cis ¹	4,0	4,0		2,9	3,0	3,3
Treonina		2,6			2,3	
Triptófano	0,6	0,5-0,7				

¹Met y Cis corresponden a los AA Metionina y Cisteína respectivamente

Considerando el hecho de que los peces carnívoros poseen unos requerimientos nutricionales específicos, ya que necesitan una gran ingesta de proteínas a través de la dieta (40 -55% del total) y unas necesidades muy específicas de AA y ácidos grasos esenciales, que mayormente son proporcionadas gracias a las harinas y aceites de pescado (FM y FO respectivamente)(Cao et al., 2015; Oliva-Teles et al., 2015), se llega a la conclusión siguiente: la cantidad de harina y aceite de pescado disponible actualmente en el mercado internacional es limitada y no supone una vía sostenible, poniéndose de manifiesto la necesidad de investigar nuevas fuentes alternativas capaces de suplir las necesidades básicas nombradas anteriormente (Geay et al., 2011; Kaushik et al., 2004; Oliva-Teles, 2000).

1.1.4 Fuentes proteicas alternativas

El desarrollo de nuevos piensos sostenibles que contengan mezclas de ingredientes vegetales y animales (sobre todo en el caso de los subproductos), tiene un gran interés en la alimentación acuícola. La investigación en fuentes alternativas está permitiendo incrementar la alimentación con aceites y harinas vegetales, sin embargo, la completa sustitución de fuentes de pescado en el pienso a largo plazo suele conllevar respuestas patológicas y empeoramiento de los índices de crecimiento (Borey et al., 2018). Por ello, el objetivo actual en acuicultura es una alimentación con ingredientes alternativos que no empeore la salud de los peces ni la calidad de la carne.

Las fuentes proteicas vegetales han sido estudiadas en numerosas ocasiones por consistir en fuentes más baratas y cuya accesibilidad es mayor, sin embargo, su empleo presenta algunas limitaciones que deben ser consideradas como la carencia de algunos AA esenciales o la presencia de factores antinutricionales, lo que puede llevar a una disminución en la ingesta. Para ello, el uso de atrayentes o probióticos puede producir una mejora en el consumo y en el proceso digestivo (Geay et al., 2011; Kousoulaki et al., 2015). Entre los potenciales sustituyentes se ha estudiado el gluten de trigo, por poseer una gran digestibilidad y un alto nivel proteico, a pesar de su precio (Tibaldi et al., 2003), soja, patata (Lanari et al., 2005) o maíz (Kaushik et al., 2004). Y no solo fuentes vegetales, ya que hay estudios que se centran en microalgas de la industria de la refinería (Valente et al., 2019), levaduras (Torrecillas et al., 2015), sangre u otras harinas de fuente animal (Torrecillas et al., 2017) demostrando la gran variabilidad existente actualmente.

1.1.5 Efectos producidos por el uso de fuentes de proteína alternativas

La mayoría de los estudios realizados afirman que una sustitución parcial de la harina de pescado por fuentes alternativas no provoca cambios negativos significativos en el comportamiento y crecimiento de los peces, pero sí en caso de producirse una sustitución total, la cual se relaciona con un menor crecimiento, eficiencia en la alimentación y mayor susceptibilidad a infecciones (Geay et al., 2011; Lanari et al., 2005; Oliva-Teles, 2000; Tibaldi et al., 2003; Torrecillas et al., 2017). Con el objetivo de entender mejor los efectos que estas sustituciones provocan en lubina diversos tejidos han sido estudiados, incluyendo hígado, músculo y médula espinal (Mourete & Bell, 2006; Silva-Brito et al., 2019). Sin embargo, el órgano estudiado por excelencia ha sido el intestino por tratarse de un órgano en contacto con el alimento ingerido, además de encontrarse relacionado de forma directa con la digestión y absorción. El impacto que una dieta provoca en un individuo puede ser inferida a través del estudio de la homeostasis de éste, por encontrarse estrechamente relacionado con el estado inmunológico, salud, procesos digestivos etc. (Oliva-Teles et al., 2015; Valente et al., 2019).

1.2 Intestino

El tracto digestivo se divide en cuatro regiones topográficas (Figura 5). La primera está formada por la faringe y la boca que son responsables de la adquisición de los alimentos y su procesamiento de forma mecánica. A esto le sigue una segunda región que incluye el esófago y el estómago, donde tiene lugar el comienzo de la digestión mediante procesos químicos. La continuación de la digestión y el proceso de absorción tienen lugar en el intestino (tercera región) y finalmente la cuarta compuesta por recto (Wilson & Castro, 2011).

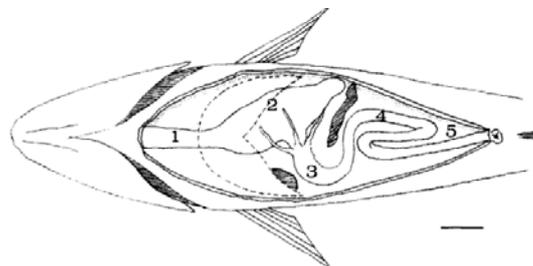


Figura 5 Sistema digestivo lubina común (vista ventral). Los números indican las diferentes partes correspondiendo 1. Esófago 2. Estómago 3-4. Intestino anterior y posterior 5. Recto (Abelli et al., 1997).

1.2.1 Estructura y entorno

Radialmente el intestino se encuentra formado por cuatro capas concéntricas. (1) *Tunica mucosa*: se trata de la capa más interna formada por epitelio mucoso y envuelto por lamina propia y tejido vascularizado. (2) Submucosa: forma una capa de tejido conectivo. (3) *Tunica muscularis*: capas internas circulares y capas externas longitudinales bien de músculo estriado o liso. (4) *Tunica serosa*: presente en las regiones intraperitoneales del tracto gastrointestinal (aquellas partes que se encuentran suspendidas por el peritoneo) (Figura 6) (Khojasteh, 2012; Wilson & Castro, 2011).

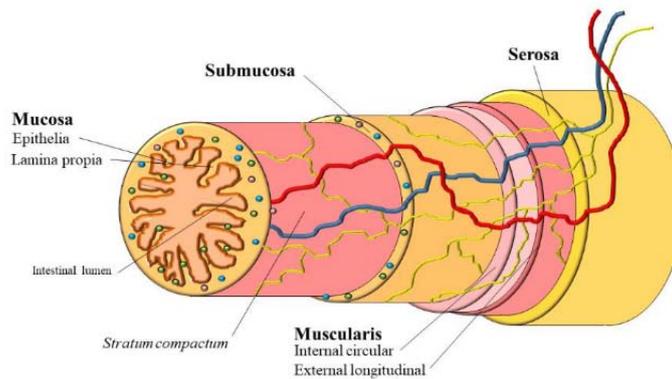


Figura 6 Capas intestinales (Estruch, 2018a).

A las células epiteliales del intestino se les conoce como enterocitos (*enterocyte*; Figura 7), cuyas funciones son la absorción de diversos nutrientes, el transporte de agua y electrolitos al interior del organismo, además de la secreción de proteína a la luz intestinal. Presentan una estructura alargada y estrecha con un núcleo central. La superficie apical de estas células presenta un borde de cepillo constituido por microvellosidades y un glicocáliz, lo que supone aproximadamente el 90% del área intestinal, encargada de la digestión/absorción gracias a la presencia de enzimas digestivos y numerosos transportadores. Adicionalmente, el glicocáliz presenta una función protectora pues evita la entrada de microorganismos y cuerpos extraños. Interpuestas entre las células anteriores se encuentran las células caliciformes (*goblet cells* en la Figura 7), las células más abundantes en el intestino de los peces y caracterizadas por su forma de copa. Sintetizan mucinas ácidas, neutras y sulfatadas, componente esencial del moco intestinal. Adicionalmente, se ha sugerido que el entorno guarda relación con la calidad del moco, lo que afectaría directamente a la función del tracto digestivo. Otras células presentes son las enteroendocrinas (*enteroendocrine cell*; Figura 7) relacionadas con la secreción de hormonas y otros péptidos, y finalmente células embrionarias intestinales, esenciales en el mantenimiento del epitelio ya que este necesita ser renovado con frecuencia (Khojasteh, 2012; Løkka & Koppang, 2016; Ferrufino et al., 1996).

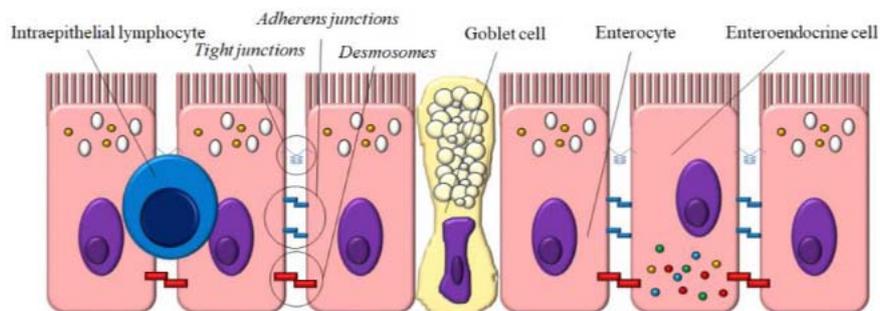


Figura 7 Tipos celulares presentes en el epitelio intestinal (Estruch, 2018a).

El moco gastrointestinal se encuentra constituido principalmente por glicoproteínas, formando un sistema muy complejo con las células epiteliales, así como inmunes y la microbiota endógena. Juega un papel fundamental como primera línea física de defensa, evitando la colonización por parte de agentes externos (Gómez & Balcázar, 2008) gracias a su contenido rico en citocinas, péptidos, lisozimas, lectinas, proteasas, anticuerpos, lipoproteínas, sistema complemento y mucinas (Torrecillas et al., 2013). Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas que constituyen la gran parte del moco. Entre ellas se pueden considerar dos grupos, en primer lugar, las mucinas transmembrana, Muc1, Muc3, Muc12 y Muc17, localizadas en las microvellosidades de los enterocitos como parte del glicocalix y las mucinas presentes en forma de geles, principalmente Muc2, que forman polímeros

encargados de la protección y lubricación de tracto gastrointestinal (Johansson et al., 2013). Fluctuaciones en la composición de la mucina además de la cantidad han sido documentadas después de que los peces fuesen alimentados empleando fuentes proteicas alternativas (Løkka & Koppang, 2016) o como consecuencia de enfermedades (Johansson et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2013) lo que puede influir considerablemente en el moco secretado.

1.2.2 Microbiota

La búsqueda la microbiota presente en el intestino de los peces empezó a mediados del siglo XX, la cual ha adquirido una gran importancia recientemente como consecuencia de la expansión de la acuicultura, demostrando que cambios en la dieta producen una alteración la microbiota. La colonización bacteriana tiene lugar durante la etapa larvaria por las bacterias presentes en los huevos, el agua y la alimentación sugiriendo que las especies dominantes corresponden a *Cytophaga*, *Flavobacterium*, y *Pseudomonas* (Carda-Dieguez et al., 2014). La flora intestinal se clasifica en dos grupos principales, autóctonos si se encuentran asociados con las microvellosidades o bien han sido capaces de colonizar el tejido, y transitorios cuando se pueden encontrar en el lumen o en la dieta (Ringø et al., 2016).

La microbiota de los peces es muy variable, pudiendo estar presentes bacterias, arqueas, virus, hongos, levaduras y protistas, siendo las bacterias las más frecuentes (Egerton et al., 2018). Una secuenciación 454 reveló la presencia de bacterias de la familia *Porphyromonadaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bradhyrhizobiaceae* y *Streptococcaceae* como principales colonizadoras del intestino en lubinas de criadero (Carda-Dieguez et al., 2014). La microbiota intestinal se encuentra estrechamente relacionado con la digestión (obtención de energía gracias a regulación en la expresión de genes digestivos específicos o presencia de enzimas), producción de AA esenciales, así como de factores antimicrobianos que van a evitar la colonización por parte de patógenos, además de competición mediante el uso de mecanismos excluyentes. Adicionalmente, interviene en la modulación del sistema inmune (desarrollo y maduración), y por tanto, en el bienestar de los peces (Ghanbari et al., 2015; Gómez & Balcázar, 2008).

Diversos factores pueden influenciar el origen y la composición de la microbiota intestinal en peces como por ejemplo el estrés, factores ambientales, genética, anatomía, estado de salud, estación del año, región (Figura 8) etc. (Gatesoupe et al., 2016; Ringø et al., 2016). Es necesario destacar que los cambios en la dieta también son responsables de dichas alteraciones, tal y como se ha demostrado en numerosos estudios (Gatesoupe et al., 2016; Ghanbari et al., 2015; Ringø et al., 2016; Romero et al., 2014). Entre ellos, la sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas alternativas suele ser bastante frecuente (Estruch, 2018a). Las posibles consecuencias hacen referencia a cambios en la diversidad de la población además de fluctuaciones en el número total de células viables, lo que podría facilitar la colonización de microorganismos patogénicos y cambios en la defensa inmunitaria al producir un incremento de los AA presentes de forma sistémica (Egerton et al., 2018; Romero et al., 2014).

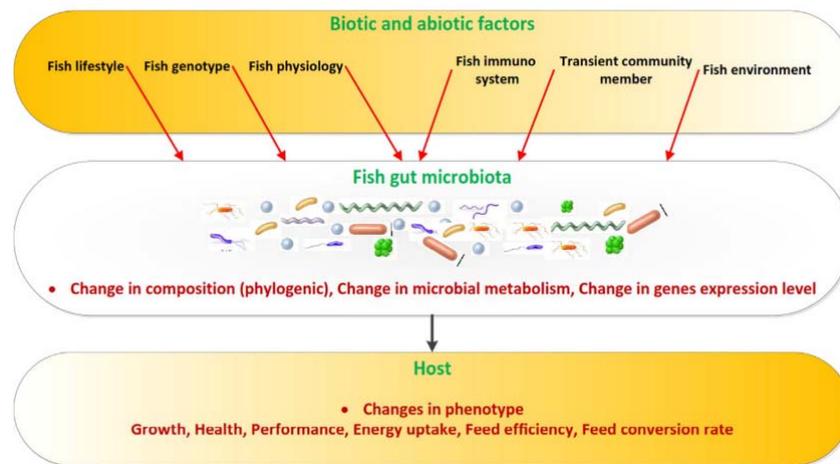


Figura 8 Efecto de factores bióticos y abióticos en la microbiota y el huésped (Ghanbari et al., 2015).

1.2.3 Inmunidad innata y adaptativa

Los teleosteos poseen un sistema inmune similar a otros vertebrados. Su organización anatómica abarca el timo, bazo y riñón, así como el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), entre los que se encuentra el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), cuya función recae en mantener la tolerancia a la microbiota a la vez que reacciona frente a organismos o sustancias externas (Ringø et al., 2016; Scapigliati et al., 2002). Dos elementos deben ser considerados en el siguiente apartado: por un lado, la inmunidad innata y por otro la inmunidad adaptativa, considerando en ambos tanto elementos humorales como celulares.

Inmunidad innata

Hace referencia a una respuesta inespecífica pero rápida. La primera línea de defensa frente a sustancias externas corresponde a las barreras epiteliales formadas por dermis, moco, epidermis, además la microbiota presente en estos tejidos, los cuales contienen componentes activos (anticuerpos, lisozimas y lectinas entre otros). Si estas barreras son superadas y se produce una entrada en el hospedador tiene lugar un proceso de inflamación, ya que la herida debe ser reparada y la homeostasis recuperada. Como consecuencia, se van a activar un conjunto de mecanismos tanto celulares como humorales (Tabla 2) (Machado et al., 2018; Ringø et al., 2016).

Tabla 2 Componentes de la inmunidad humoral (adaptado de Gómez & Balcázar, 2008; Gomez et al., 2013)).

Elemento	Función
Péptidos antimicrobianos	Antimicrobianas, antifúngicas y antivirales
Lisozima	Hidrolisis de los peptidoglicanos presentes en la pared bacteriana
Complemento	Producción de mediadores mediante una cascada que derivan en lisis celular u activación de mediadores inflamatorios
Transferrina	Eliminación del hierro del tejido dañado durante la inflamación
Interferones	Activación de NK, aumento de moléculas MHC clase I ¹
Lectinas	Activación del Complemento
Anticuerpos naturales	Reconocimiento de antígenos

¹NK hace referencia a células Natural Killer mientras que MHC abrevia el Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Por otro lado, los principales responsables de la inmunidad celular son: las células Natural Killer (NK), mastocitos, eosinófilos, basófilos y células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (DC)) presentes de forma relevante en la mucosa, además de los enterocitos, los cuales interactúan de forma directa con la microbiota mediante receptores toll-like, nod-like o lectinas (Gomez et al., 2013).

Una comunicación efectiva entre el sistema inmune innato y adaptativo tiene lugar mediante la producción de mensajeros, adhesión de moléculas y contacto celular. Las moléculas encargadas de que estos procesos tengan lugar reciben el nombre de citocinas (Gómez & Balcázar, 2007). Estas se subdividen en tres categorías diferentes (1) citocinas reguladoras de la respuesta inmune innata siendo las más comunes IL-1 β , IL-18 y TNF α (citocinas pro-inflamatorias) (2) citocinas reguladoras de la inmunidad adaptativa donde localizamos IL-2, IL-10 o TGF β cuya función es reguladora (El Aamri et al., 2015; Rimoldi et al., 2016; Ringø et al., 2016) y finalmente (3) citocinas relacionadas con la regulación de la hematopoyesis (El Aamri et al., 2015).

Inmunidad adaptativa

Los elementos más relevantes de la inmunidad adaptativa humoral son las inmunoglobulinas (Igs) contabilizándose en teleosteos solamente tres clases, IgM, IgD y IgT. Por otro lado, la inmunidad adaptativa celular engloba las células B, encargadas del reconocimiento de antígenos y la producción de Ig y las células T relacionadas con la tolerancia y la inmunidad. Se consideran diferentes subpoblaciones de células T (citotóxicas, Th1, Th2, T reguladoras y Th17), cada cual con una función específica (Gomez et al., 2013; Scapigliati et al., 2002).

El uso de niveles elevados de fuentes proteicas vegetales puede inducir una situación de estrés, desencadenando una respuesta inflamatoria o inmunitaria en el organismo (Figura 9) así como una mayor susceptibilidad a infecciones, debido a cambios en la microbiota, daño celular o del moco entre otros (Ringø et al., 2016). Una mayor sustitución de la dieta por fuentes vegetales se relaciona con un aumento de la cantidad de carbohidratos, los cuales no son capaces de ser metabolizados correctamente por la lubina, al tratarse de una especie carnívora (Machado et al., 2019; Clements & Raubenheimer, 2006). Además, normalmente presentan el inconveniente de carecer de AA esenciales, lo que implica que se deben añadir de forma sintética (Rimoldi et al., 2016). El impacto que estos factores estresantes producen en el sistema inmune va a depender del nivel de sustitución y la duración. Situaciones de estrés prolongado o crónico se han relacionado con un mayor agotamiento energético y por ende, una inmunodepresión (Figura 9) (Tort, 2011). Diferentes investigaciones se han realizado en este campo con el objetivo de conocer con más detalles cómo la sustitución con fuentes vegetales y la adición de AA sintéticos afecta a la salud de estos peces (Geay et al., 2011; Machado et al., 2015; 2018; 2019; Rimoldi et al., 2016; Torrecillas et al., 2015).

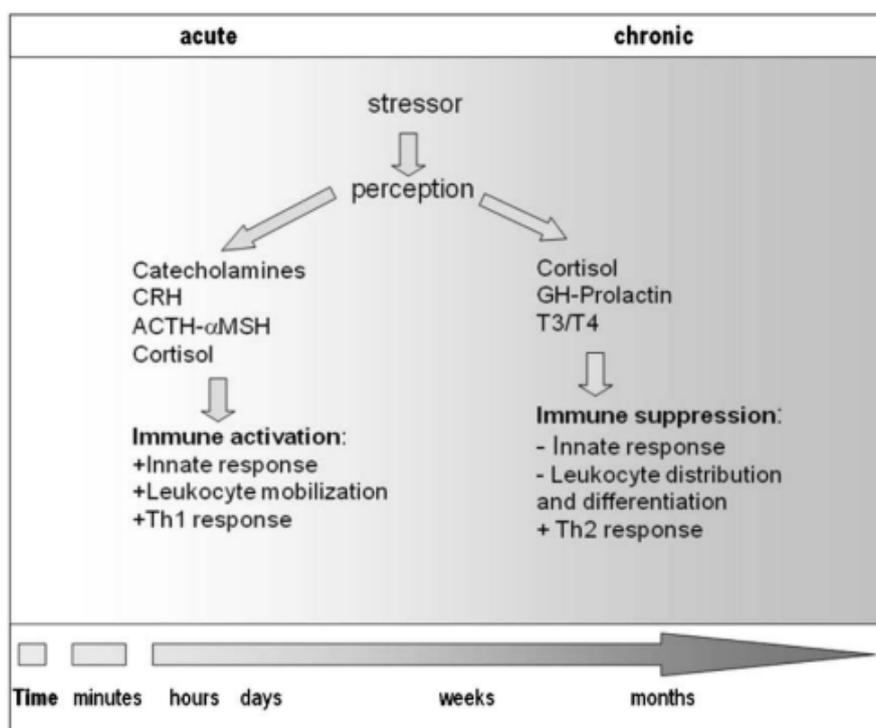


Figura 9 Efectos de diferentes tipos de estrés en la inmunidad innata y adaptativa (Tort, 2011).

1.3 Técnicas empleadas para el estudio de la salud intestinal en ensayos de sustitución

Inicialmente, la evaluación del efecto de las sustituciones de la harina de pescado era establecida mediante parámetros como el crecimiento, la digestibilidad, tasa de alimentación o eficiencia de retención de aminoácidos (Kaushik et al., 2004; Mourente & Bell, 2006; Tibaldi et al., 2003). En el estudio del intestino, la histología ha sido considerada un indicador de la salud nutricional, por ser el intestino, como ya se ha comentado, un órgano fundamental en el proceso de digestión (Raskovic et al., 2011). Sin embargo, el crecimiento y la salud intestinal asociadas a estas sustituciones constituye un proceso complejo que necesita ser abordado desde un punto de vista multidisciplinar, con el objetivo de entender con más detalle cómo se relacionan todos estos factores (Rodrigues et al., 2012). Con este planteamiento han sido llevados a cabo estudios desde un punto de vista inmunológico, la microbiota, enzimas proteolíticos, resistencia a niveles de estrés o medición de diversos parámetros en plasma (Geay et al., 2011; Machado et al., 2019; Valente et al., 2019; Torrecillas et al., 2017).

Para ello, la RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real) ha sido elegida con bastante frecuencia debido a su capacidad de amplificación y cuantificación a tiempo real. El proceso tiene lugar en un termociclador capaz de medir fluorescencia, la cual va a ser detectada durante la fase exponencial de cada ciclo de PCR (VanGuilder et al., 2008). Se trata de un tipo de análisis muy sensible y preciso que puede ser utilizado cuando la cantidad de muestra es pequeña. Además tiene la ventaja de no necesitar ningún análisis posterior, evitando la posible contaminación cruzada que pueda tener lugar (Giulietti et al., 2001; Klein, 2002).

Recientemente, las tecnologías –ómicas han adquirido una importancia considerable permitiéndonos secuenciar el genoma de interés en un tiempo corto y con un coste considerable. En este grupo se incluyen la proteómica (estudio de proteínas), metabolómica (estudio de los metabolitos), metagenómica (estudio del genoma de los microorganismos), nutrigenómica (interacción entre la genética y la nutrición) y transcriptómica (estudio del RNA). Todas ellas permiten una evaluación a nivel global en un punto concreto de la regulación celular (Lokman & Symonds, 2014; Munguia-Fragozo et al., 2015; Rodrigues et al., 2012). En relación al empleo de este tipo de técnicas para estudiar diferentes niveles sustitutivos, según la bibliografía encontrada, la más empleada corresponde a la transcripómica (Carnevali et al., 2006; Hakim et al., 2009; Machado et al., 2019; Torrecillas et al., 2015; Tovar-Ramírez et al., 2010) y en menor medida, la proteómica también ha sido empleada con este fin (Geay et al., 2011; Morais et al., 2012).

2. Justificación y objetivos

La lubina constituye una especie carnívora cuya producción en acuicultura está dejando de ser sostenible y viable económicamente como consecuencia del gran volumen de harina y aceite de pescado empleados para su alimentación. Como consecuencia, la industria acuícola opta por el estudio de nuevas fuentes proteicas alternativas económicas, accesibles y sostenibles. Entre las múltiples alternativas, se ha sugerido que las fuentes proteicas vegetales (soja, maíz, guisante, girasol) satisfacen gran parte de los requerimientos, como se ha demostrado en diversos trabajos nombrados anteriormente, los cuales se basan principalmente en sustituciones parciales. Sin embargo, una sustitución excesiva se relaciona con un menor crecimiento, menor apetito y una deficiencia en el estado inmunitario.

Una de las vías más eficaces para estudiar los efectos de estas dietas sobre el crecimiento y la salud de los peces se centra en el análisis a nivel intestinal, por constituir uno de los principales órganos en contacto directo con el medio y la alimentación a la vez que se encuentra involucrado en la inmunidad, digestibilidad y absorción por parte del animal.

Así pues, el objetivo global de este trabajo consiste en caracterizar, mediante un estudio a largo plazo, los efectos producidos a nivel intestinal en lubinas alimentadas con piensos con altos niveles de sustitución de harina de pescado por proteínas vegetales.

Por otro lado, los objetivos específicos del estudio se basan en:

- Estudiar el efecto de la dieta sobre genes involucrados en la respuesta inflamatoria, inmune e integridad celular.
- Caracterizar el impacto, a nivel de expresión génica, que provocan una sustitución total y parcial de harina de pescado.
- Determinar la salud intestinal de las lubinas basándose en los datos de expresión correspondientes a los genes nombrados previamente.
- Establecer la relación existente entre los parámetros de crecimiento y supervivencia, los niveles de expresión y la dieta empleada.

3. Materiales y métodos

3.1 Aspectos éticos

El protocolo experimental utilizado fue revisado y aceptado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV) y sigue las normas recogidas en el Real Decreto 53/2013 así como en la Directiva Europea 2010/63 / UE sobre la protección de los animales utilizados para la investigación científica a fin de intentar minimizar el sufrimiento producido en estos.

3.2 Diseño experimental

3.2.1 Peces, sistemas y condiciones experimentales

El presente experimento fue llevado a cabo en las instalaciones de acuicultura del Departamento de Ciencia Animal en la UPV. Estas instalaciones presentan un sistema de recirculación de agua marina (75 m³ de capacidad). En total se emplearon 9 tanques cilíndricos con una capacidad individual de 1750 L. Las condiciones de temperatura y oxígeno disuelto se controlaron diariamente (oxímetro portátil o sonda OxyGuard Handy Polaris), mientras que dos veces por semana se midieron la salinidad (refractómetro, Hanna Instruments), el pH (tiras de papel tornasol) y los compuestos nitrogenados procedentes del metabolismo proteico, amonio, nitritos y nitratos (test colorímetro MERCK). Los valores medios registrados durante el experimento se indican en la Tabla 3. El fotoperiodo fue natural y todos los tanques presentaban condiciones similares de iluminación.

Tabla 3 Valores medios correspondientes a los parámetros físico-químicos del agua durante el período experimental.

Temperatura (°C)	21,53
Oxígeno (mg/L)	7,62
pH	7,02
Salinidad (‰)	16,15
Amonio (mg/L)	0,18
Nitritos (mg/L)	0,25
Nitratos (mg/L)	92,32

Se emplearon 450 ejemplares de *Dicentrarchus labrax* con origen en la piscifactoría de Sonrionansa (Cantabria) y con un peso medio inicial de 40 g. Antes de iniciar el experimento, los peces fueron aclimatados a las nuevas condiciones durante dos semanas, alimentándose durante este periodo con un pienso comercial. Las lubinas fueron distribuidas aleatoriamente en 9 tanques (50 individuos/tanque) y fueron alimentadas con 3 dietas experimentales con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado (3 tanques/dieta). El pienso se administraba de manera manual hasta la saciedad repartido en dos tomas al día (9:00 h y 14:00h), seis días a la semana. El experimento tuvo una duración total de 196 días (mayo 2018 – diciembre 2018) y finalizó cuando las lubinas alcanzaron un peso comercial de aproximadamente 350 g.

3.2.2 Dietas experimentales

Las dietas experimentales empleadas en el estudio se elaboraron en la fábrica de piensos del Departamento de Ciencia Animal mediante un proceso de cocción-extrusión con un extruder semi-industrial (Clextral BC-45, Firminy, St Etienne, France). Las condiciones del proceso fueron las siguientes: 100 revoluciones/ minuto correspondiente a la velocidad angular, 40-50 atmosferas y 100-110 °C.

Se formularon tres piensos isoprotéicos (45% proteína bruta) e isolipídicos (18% grasa bruta) con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado: FM30 o pienso control (30% de harina de pescado que corresponde a un nivel similar al empleado de forma comercial), FM15 (15% de harina de pescado) y FM0 (sin harina de pescado) (Tabla 4). La proteína de la harina de pescado no incorporada a la dieta fue sustituida por fuentes proteicas vegetales, formadas por una mezcla de trigo, gluten de trigo y turtó de soja. El volumen de aceite de pescado se incrementó a medida que decrecía la cantidad de FM y se adicionaron AA esenciales con el objetivo de cubrir las necesidades básicas de la especie (Tibaldi & Kaushik, 2005) (Tabla 4) (Tabla 5)

Tabla 4 Ingredientes y composición aproximada de las dietas experimentales.

Dietas experimentales			
Materias primas (g kg⁻¹)	FM 30	FM 15	FM 0
Harina de pescado	300	150	0
Mezcla vegetal			
Trigo	179	154	127
Gluten de trigo	122	213	303
Soja	218	248	277
Aceite de soja	72	72	72
Aceite de pescado	71	84	97
Fosfato de Calcio	20	41	62
Taurina	5	10	20
Metionina	3	6	8
Lisina	0	7	14
Arginina	0	5	10
Vitaminas y minerales ¹	10	10	10
Composición proximal (% en peso húmedo)			
Materia seca	91,83	92,26	92,98
Proteína bruta	47,24	48,17	46,77
Grasa bruta	17,45	17,17	17,67
Cenizas	9,09	8,36	7,87

¹ Contiene: colina, 10 g; DL-a-tocoferol, 5 g; ácido ascórbico, 5 g; (PO4)2Ca3, 5 g; y una pre-mezcla, 25 g g. Esta premezcla contiene por kg: acetato de retinol, 1000000 UI; calciferol, 500 UI; DL-a-tocoferol, 10 g; menadiona sodio bisulfito, 0,8 g; hidroclorehidrato de tiamina, 2,3 g; riboflavina, 2,3 g; clorhidrato de piridoxina, 15 g; cianocobalamina, 25 mg; nicotinamida, 15 g; ácido pantoténico, 6 g; ácido fólico, 0,65 g; biotina, 0,07 g; ácido ascórbico, 75 g; inositol, 15 g; betaina, 100 g; polipéptidos 12 g.

Tabla 5 Composición aminoacídica de las dietas experimentales representadas en g 100g⁻¹ de materia seca.

Dietas experimentales			
	FM 30	FM 15	FM 0
AAE (g 100g⁻¹)¹			
Arginina	3,39	3,86	3,58
Histidina	1	0,81	0,81
Isoleucina	1,47	1,24	1,08
Leucina	3,24	3,11	2,45
Lisina	3,68	2,78	2,38
Metionina	1,16	1,06	1,05
Fenilalanina	1,8	1,78	1,76
Treonina	1,98	1,5	1,28
Valina	2,01	1,6	1,32
AAANE (g 100g⁻¹)²			
Alanina	2,74	2,14	1,66
Aspartato	4,29	3,68	3,09
Cisteína	0,61	0,62	0,67
Glutamina	7,64	9,66	10,86
Glicina	2,44	2,28	2,09
Prolina	2,3	2,72	3,49
Serina	2,11	1,96	1,87
Tirosina	1,5	1,02	1,02

¹ AAE: Aminoácidos esenciales; ² AAANE: Aminoácidos no esenciales

3.2.3 Evaluación del crecimiento

Mensualmente se registró el peso de los peces de forma grupal (2-6 peces)(Figura 10). Sin embargo, al inicio y al final del experimento el peso se registró de forma individual. Siguiendo los criterios establecidos para el bienestar animal, se empleó una solución de aceite de clavo con un 87% de eugenol (Guinama ®, España) a modo de anestesia (150 mg/L de agua). Una vez realizado el pesaje, los peces eran devueltos a sus respectivos tanques.

Adicionalmente, durante todo el experimento, los gramos de comida ingerida fueron controlados de forma diaria, además las bajas diarias eran eliminadas del tanque y su peso anotado en el estadillo de ingestas.

Con toda esta información se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento y eficiencia nutritiva, a partir de las siguientes ecuaciones:

Tasa de crecimiento instantáneo (TCI) (% /día)

$$TCI = \frac{100 \cdot \ln (\text{Peso medio final}/\text{Peso medio inicial})}{\text{Tiempo (días)}}$$

Tasa de alimentación diaria (TAD) (g/ 100g de pez y día)

$$TAD = \frac{100 \cdot \text{Ingesta total (g)}}{\text{Biomasa media (g)} \cdot \text{Tiempo (días)}}$$

Índice de conversión del alimento (ICA)

$$ICA = \frac{\text{Ingesta total (g)}}{\Delta \text{Biomasa (g)}}$$

3.2.4 Muestreo final y obtención de las muestras intestinales

Al finalizar el experimento, los peces fueron anestesiados mediante una disolución de aceite de clavo y agua (1mg/100mL de agua) y posteriormente decapitados. A continuación, con el objetivo de determinar la expresión génica en el tracto intestinal, se tomaron muestras de un total de 27 peces (3 peces/tanque; 9 peces por tratamiento). Concretamente, se tomó una sección del intestino posterior (IP) por cada pez que fue introducida inmediatamente en una solución de RNAlater (Qiagen, España) (Figura 10). Dichas muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C durante 24h y posteriormente a -20 °C hasta su procesamiento para el análisis de expresión génica.

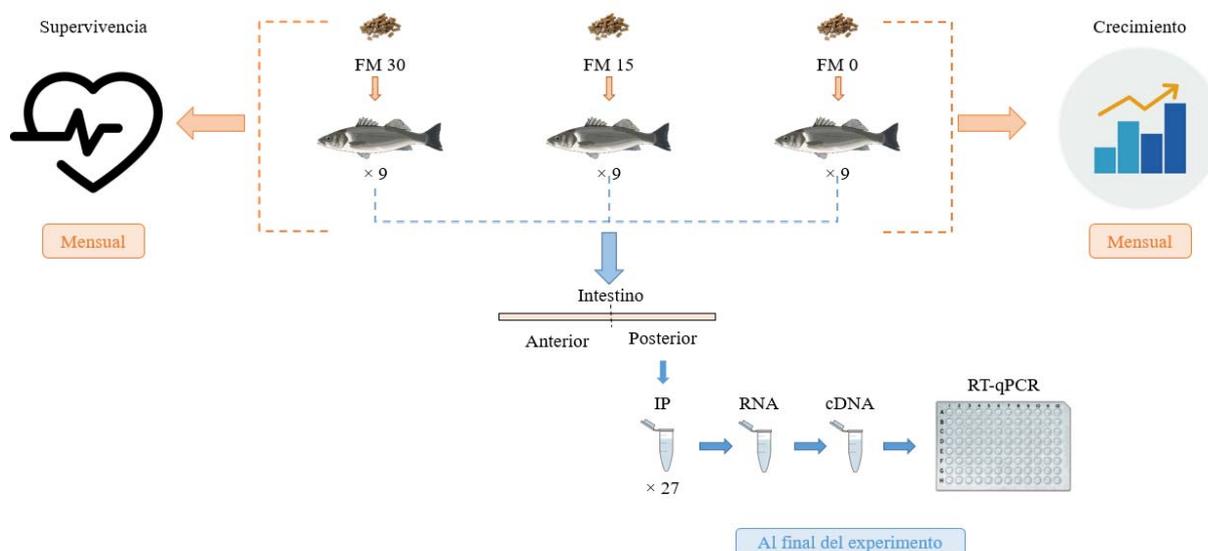


Figura 10 Representación esquematizada del ensayo experimental.

3.3 Expresión génica

3.3.1 Extracción de tRNA y paso a cDNA

Se extrajo el ácido ribonucleico total (tRNA) de los tejidos de la sección posterior del intestino mediante extracción tradicional de fenol/cloroformo, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, España), y luego se trató con Dnase I usando el kit DNase I recombinant, RNase-free (Roche, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración, calidad e integridad del RNA total se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Fisher Scientific SL, España). Sólo las muestras que obtuvieron un ratio de absorbancia A260/280 entre 1,8 - 2 y A260/230 mayor de

2, fueron incluidos en el análisis. Las muestras de tRNA se almacenaron a -80 °C hasta la etapa de síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), para evitar la degradación del tRNA.

Posteriormente, se sintetizó el cDNA (Figura 10) a partir de 1 µg de tRNA usando el kit qScript Flex cDNA (Quanta BioScience), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, utilizando el termociclador Applied Biosystems 2720. Las condiciones del termociclador fueron de 22 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min y 85 °C durante 5 min. Una vez obtenido el cDNA se almacenó a -20 °C hasta que se analizó la expresión génica.

3.3.2 Puesta a punto del análisis de la expresión génica

Selección de los genes de referencia y diferenciales

Basándose en estudios anteriores (Mitter et al., 2009; Torrecillas et al., 2015), se seleccionaron tres genes como candidatos a genes de referencia (Tabla 6): *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GADPH), *Elongation factor 1α* (EF1α) y *Beta actin* (βact). La estabilidad de expresión en los diferentes grupos experimentales para la selección del gen de referencia se realizó mediante el programa BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Valores con una desviación estándar menor de 1, se consideran genes lo suficientemente estables para ser utilizados como genes de referencia.

Adicionalmente, 16 genes diferenciales (Tabla 6) fueron analizados mediante RT-qPCR teniendo en cuenta su relevancia biológica en los procesos de inflamación y respuesta inmune. En primer lugar, *interleukin 1β* (IL-1β), *interleukin 8* (IL-8), *interleukin 6* (IL-6) e *interleukin 10* (IL-10) son citocinas que desempeñan funciones clave en la inflamación y regulan la respuesta inmune (Couper et al., 2008; Oliveira et al., 2013; Zou & Secombes, 2016). El *transforming growth factor* (TGF β), *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) y *ciclooxigenase 2* (COX2) actúan también como moléculas pro-inflamatorias, relevantes como marcadores de inflamación (Zou & Secombes, 2016). Los genes *caspase 3* (Casp3) y *caspase 9* (Casp9) se seleccionaron debido a su papel en procesos de apoptosis en situaciones de estrés (Reis et al., 2007; Takle & Andersen, 2007). La mucina 2 (Muc2) es una proteína estructural que forma parte del moco y cuya función se basa en la protección del epitelio intestinal (Dharmani et al., 2009). Formando parte de la inmunidad adaptativa se consideraron el receptor de células T (TCR β) y los co-receptores de células T (CD4 y CD8α) así como la inmunoglobulina (Ig) la cual actúa como anticuerpo (Miceli & Parnes, 1993). Finalmente, la ferritina (Fth) y la transferrina (Trf) encargadas del almacenamiento y transporte de hierro respectivamente, presentan una posible relación con la respuesta inmune (Neves et al., 2009).

Con el fin de realizar una selección de los genes más afectados por las condiciones experimentales, se realizó un test de expresión genética preliminar empleando los mismos *pools* que para los genes de referencia. Basándose en parámetros tales como su función y potenciales diferencias de umbral de ciclo (Ct) entre dieta y niveles de expresión se seleccionaron los genes candidatos que se emplearon posteriormente en los análisis de expresión individualizados.

Tabla 6 Secuencias de los primers correspondientes a los genes candidatos (de referencia y diferenciales) empleados en el análisis de RT-qPCR.

Gen	GenBank ID	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Referencia
Genes diferenciales				
Casp3	DQ345773	CTGATTTGGATCCAGGCATT	CGGTCGTAGTGTTCCCTCCAT	Torreillas et al., 2015
Casp9	DQ345775	GGCAGGACTCGACGAGATAG	CTCGCTCTGAGGAGCAAACCT	Torreillas et al., 2015
CD4	AM491135	GTGATAACGCTGAAGATCGAGCC	GAGGTGTGTCATCTTCCGTTG	Boschi et al., 2011
CD8α	AJ846849	CCACTGCATGCGCCGGTGAGG	GTGGACGTCGACTTAAACGTG	Boschi et al., 2011
COX2	AJ630649	CATTCTTTGCCAGCACTTCACC	AGCTTGCCATCCTTGAAGAGTC	Torreillas et al., 2015
Fth	FJ197144	AACCATGAGTTCTCAGGTGAG	TTAGCTGCTCTCTTTGCCAG	Neves et al., 2009
Ig	AJ400233	GAGCTGCAGGAGGACAGTG	TCAGACTGGCCTCACAGCT	Torreillas et al., 2015
IL-10	AM268529	ACCCCGTTTCGCTTGCCA	CATCTGGTGACATCACTC	Buonocore et al., 2007 Torreillas et al., 2015
IL-1β	AJ537421	ATTACCCACCACCCACTGAC	TCTCTTCCACTATGCTCTCCAG	Torreillas et al., 2015
IL-6	AM490062	ACTTCCAAAACATGCCCTGA	CCGCTGGTCAGTCTAAGGAG	Torreillas et al., 2015
IL-8	AM490063	GTCTGAGAAGCCTGGGAGTG	GCAATGGGAGTTAGCAGGAA	Torreillas et al., 2015
Muc2	Fasta	TCCATTTCCACCTACAACACAG	CATACTACAACGCAGGCGTA	Terova et al., 2016
TCR β	AJ493441	GACGGACGAAGCTGCCCA	TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA	Torreillas et al., 2015
TGF β	AM421619	GACCTGGGATGGAAGTGG	CAGCTGCTCCACCTTGTG	Torreillas et al., 2015
TNF α	DQ200910	ACAGCGGATATGGACGGTG	GCCAAGCAAACAGCAGGAC	Torreillas et al., 2015
Trf	FJ197145	CAACAGTATGGGTGCTGACG	ACTGGCAGAGCACTTGGACT	Neves et al., 2009
Genes de referencia				
EF1α	AJ866727	GCTTCGAGGAAATCACCAAG	CAACCTCCATCCCTGAAAC	Tovar-Ramírez et al., 2010
GADPH	AY863148	GTGCCAGCCAGAATCATCAT	TGTCGTCATATTTGGCGGGTTTC	Mitter et al., 2009
βact	AJ269472	ATGTGGATCAGCAAGCAGG	AGAAATGTGTGGTGTGGTTCG	Torreillas et al., 2015

Condiciones del ensayo RT-qPCR

Todos los ensayos se llevaron a cabo mediante el equipo LightCycler® 96 Instrument (Roche, España) y con el reactivo LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche, Alemania). El volumen final introducido en cada pocillo era de 10 μ L incluyendo 3 μ L de cDNA (dilución 1:20), 1 μ L de *primer forward* y *reverse* (5 μ M) y 5 μ L de 2x LightCycler® 480 SYBR® Green I Master. La expresión génica se analizó en placas de 96 pocillos (Figura 10), y cada reacción de PCR se realizó por duplicado. Finalmente, como calibrador se empleó un *pool* de muestras empleando las tres dietas (dilución 1:20).

Se establecieron las siguientes condiciones para la RT-qPCR: un paso inicial dónde tiene lugar la activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de PCR (95°C durante 1s y 60°C durante 30s). Estas condiciones fueron empleadas en todos los genes excepto para Muc2 y Fth donde los 40 ciclos constaron de un paso adicional (95°C durante 2s, 60°C durante 30s y 72°C por 45s). Con el objetivo de evaluar posibles amplificaciones secundarias, se realizó una curva de *melting* una vez finalizado el ensayo de PCR. Para ello, se incrementó lentamente la temperatura, a razón de 1°C/min, con inicio en 65°C y finalización en 97°C. Durante el proceso se produjo un registro continuo de los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por cada pocillo.

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa relacionada con la expresión de los genes diferenciales se estableció en base al gen de referencia EF1 α y el empleo de calibradores en las distintas placas, lo que permitió minimizar posibles diferencias relacionadas con el rendimiento entre placas. El análisis de los resultados tuvo lugar mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) el cual contempla la fórmula siguiente:

$$\text{Ratio normalizado } (N_R) = E_T^{CtT(C)-CtT(S)} \times E_R^{CtR(S)-CtR(C)}$$

Dónde:

E_T: Eficiencia del gen diferencial

C: Calibrador

S: Muestra del gen de interés

E_R: Eficiencia del gen de referencia

CtT: Número de ciclos en los cuales se detecta el umbral en el gen diferencial

CtR: Número de ciclos en los cuales se detecta el umbral en el gen de referencia

Las eficiencias se obtuvieron mediante la realización de curvas estándar, que consiste en la realización de diluciones seriadas (Svec et al., 2015). Las eficiencias se calcularon tanto para los genes de referencia como los genes en estudio.

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa estadístico SAS9,4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para ello se realizó un análisis de la varianza considerando el efecto dieta como el factor principal. Las variables que presentaban una distribución normal fueron analizadas con el procedimiento GLM y aquellas con una distribución no normal (expresión relativa de Muc2 y Fth) con el procedimiento GLIMMIX. En este último caso se asumió una distribución de Poisson.

Se utilizó el test de Tukey para comparar las medias ajustadas entre los diferentes grupos experimentales estudiados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados fueron expresados como la media \pm su error estándar.

4. Resultados

4.1 Parámetros de crecimiento y supervivencia

El peso de las lubinas al inicio del experimento fue similar para los tres tratamientos estudiados (Tabla 7). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el peso final a los 196 días de experimento, siendo superior en los grupos FM30 y FM15 (con valores medios de 347 y 341g, respectivamente). El TCI también mostró diferencias significativas (Tabla 7), indicando un crecimiento diario superior en los grupos FM30 y FM15 (1,09%/día para ambos casos), respecto FM0 (0,99%/día). En contraste, los parámetros de TAD e ICA fueron similares para los tres tratamientos empleados por lo que no hubo diferencias significativas respecto a los factores nutritivos (Tabla 7). Por tanto, las diferencias encontradas en el TCI no se debieron a una menor o mayor ingesta. Finalmente, el porcentaje de supervivencia presentó una ligera variación entre grupos, los peces pertenecientes a los grupos FM30 y FM15 mostraron una supervivencia superior (93,33% y 92,67%) al grupo FM0 (84%). Este último resultado podría llegar a ser significativo siempre y cuando se establezca un $p < 0,1$ lo que implica que la evidencia en este caso fue menor (Tabla 7).

Tabla 7 Parámetros de crecimiento por piensos experimentales.

	FM30	FM15	FM0	P value
Peso inicial (g)	40,45±0,931	40,29±0,932	38,25±0,932	ns
Peso final (g)	347,00 ^b ±8,703	341,38 ^b ±8,703	269,49 ^a ±8,703	0,0013
TCI (%/día)¹	1,09 ^b ±0,021	1,09 ^b ±0,021	0,99 ^a ±0,021	0,0263
TAD (g/100g/pez y día)²	1,19±0,024	1,12±0,024	1,19±0,024	ns
ICA³	1,47±0,048	1,52±0,048	1,58±0,048	ns
Supervivencia (%)	93,33 ^B ±2,464	92,67 ^B ±2,464	84,00 ^A ±2,464	0,0645

Media ± error estándar (n=3). Medias con diferentes superíndices en minúscula (a,b) indican diferencias significativas con $p < 0,05$ y en mayúscula (A,B) con $p < 0,1$. Test de Tukey-Kramer. ¹Tasa de crecimiento instantáneo; ²Tasa de alimentación diaria; ³Índice de conversión del alimento. ns: no significativo.

Asimismo, en la Figura 11 se representa la evolución del peso medio de las lubinas alimentadas con los diferentes piensos experimentales a lo largo del ensayo. Durante los primeros meses se observó un crecimiento similar en los tres grupos, sin embargo, a partir del día 112 aproximadamente se empezó a visualizar una tendencia hacia un mayor crecimiento en los grupos FM30 y FM15, coincidiendo con los valores de TCI previamente expuestos. Esta tendencia se confirmó al final del estudio, donde los datos del peso final mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos FM30 y FM15 con respecto al FM0 (Tabla 7).

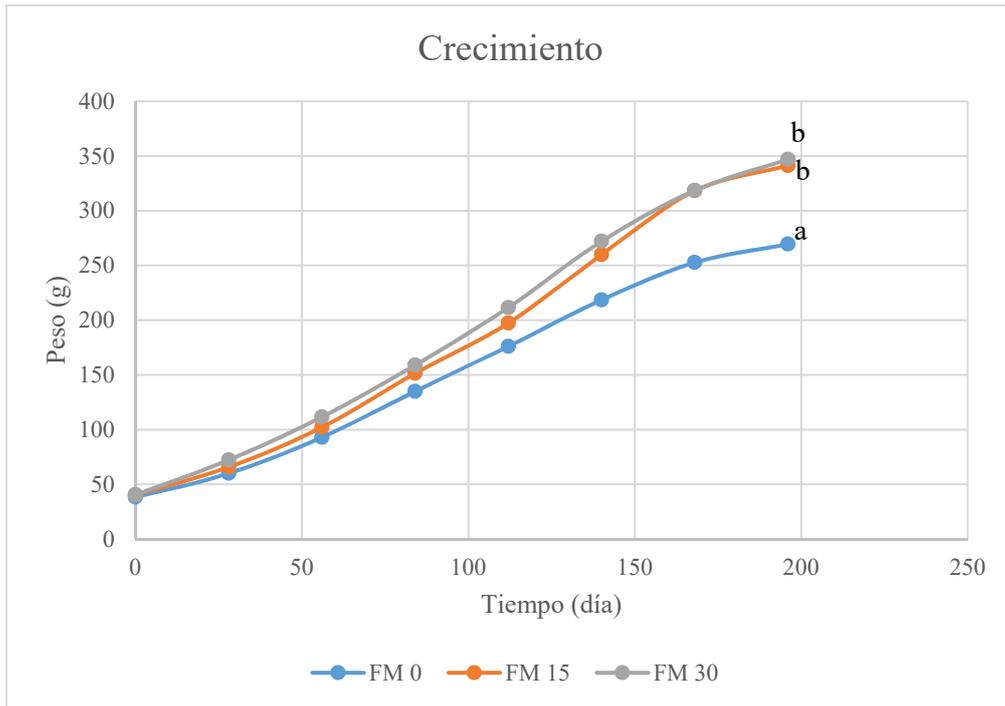


Figura 11 Crecimiento de las lubinas durante el ensayo experimental.

4.2 Ensayos preliminares

4.2.1 Gen de referencia y genes diferenciales

Tras el análisis de la estabilidad de los genes de referencia en las diferentes condiciones experimentales con el programa BestKeeper, se obtuvo una desviación estándar ($SD[\pm Ct]$) de 1,66 para la βact (media geométrica (Ct): $22,35 \pm 3,16$) y de 1 para $EF1\alpha$ (media geométrica (Ct): $21,21 \pm 2,0$), ambos con un $p < 0,05$, por lo que se seleccionó el gen $EF1\alpha$ como gen de referencia. En la Figura 12 se encuentra representada la variabilidad de ambos genes, empleando los datos de estabilidad individual, lo que pone de manifiesto la gran diversidad en cuanto a Cts del gen βact en comparación con $EF1\alpha$.

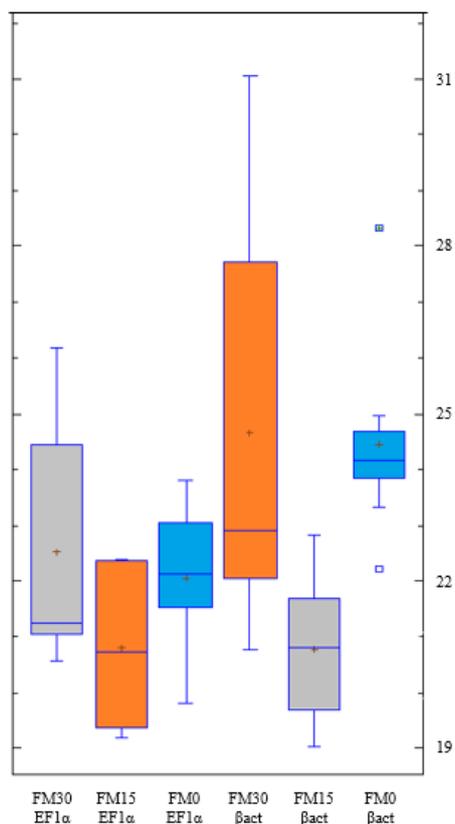


Figura 12 Variabilidad en Ct de los genes β act y EF1 α empleando un diagrama de box and whiskers. Los cuadraditos indican valores atípicos.

Paralelamente, los resultados de expresión de los genes en estudio fueron muy variados. Según la variabilidad mostrada entre grupos experimentales y su relevancia biológica (Figura 13), se seleccionaron los siguientes genes para el análisis de expresión génica: Casp9, TCR β , IL-8, IL-10, TGF β , TNF α , Muc2 y Fth. Tal y como se observa en la Figura 13 estos genes seleccionados presentaron valores de Ct comprendidos en un rango entre 26 – 35.

Los genes Trf, IL1 β , COX2 y CD8 α no se expresaron o mostraron valores de Ct demasiado elevados, asociados con una expresión muy baja, por lo que se decidieron eliminar en análisis posteriores. En el caso de IL-6, CD4, Casp3 e Ig presentaron valores de expresión aparentemente similares entre los tres grupos (Figura 13), por lo que tampoco se incluyeron en estos análisis.

Debido a que el gen de la β act finalmente no fue considerado como gen de referencia, se decidió incluir en la cuantificación relativa y posteriormente en el análisis estadístico como si de un gen diferencial se tratase.

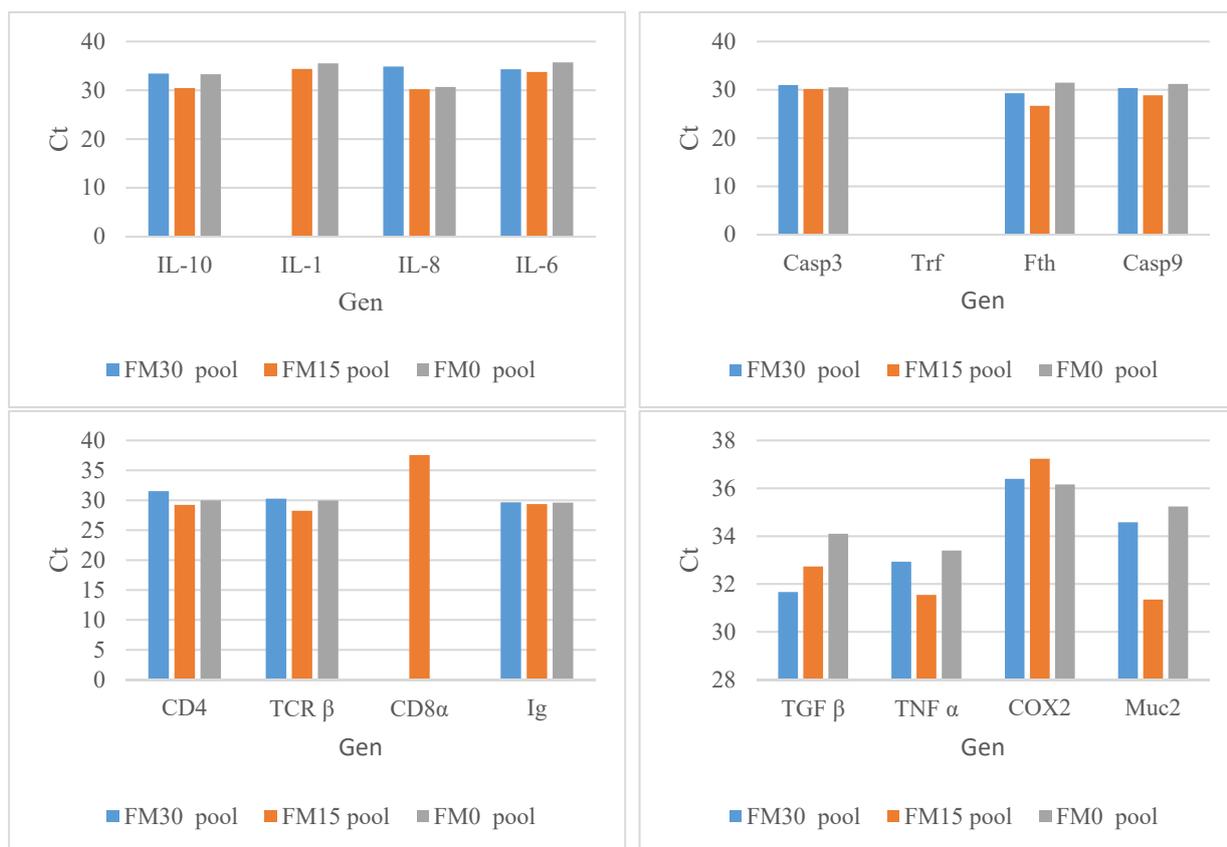


Figura 13 Resultados de RT-qPCR para cada gen diferencial empleando pools de muestras.

4.2.2 Cuantificación relativa

Curvas estándar

La Tabla 8 muestra los distintos valores de eficiencia, R^2 y pendiente que se consiguieron para cada uno de los genes testados mediante la realización de curvas estándar. Todos los genes registraron eficiencias comprendidas entre 1,85-2,1.

Tabla 8 Valores obtenidos a partir de las curvas estándar para los distintos genes.

Gen	Eficiencia	R ²	Pendiente
Genes diferenciales			
Casp9	1,90	0,995	-3,592
Fth	1,85	0,970	-3,415
IL-10	2,00	0,958	-3,320
IL-8	1,94	0,987	-3,487
Muc2	2,10	0,887	-2,899
TCR β	2,00	0,992	-3,312
TGF β	2,10	0,898	-2,907
TNF α	2,00	0,993	-3,330
βact	2,00	0,998	-3,322
Gen de referencia			
EF1α	2,00	0,988	-3,457

Calibradores

Los calibradores empleados para cada gen se encuentran descritos en la Figura 14. Los genes diferenciales IL-10, TGF β, IL-8, Muc2, Casp9, βact y el gen de referencia EF1α presentan una única barra ya que se empleó la media de un solo calibrador para la cuantificación relativa, debido a que cada uno de estos genes se pudo analizar de forma completa en una misma placa de 96 pocillos. Por otro lado, los genes TCR β, TNF α y Fth, también considerados como genes diferenciales, necesitaron de la media de dos calibradores distintos ya que su expresión tuvo que ser analizada empleando diferentes placas. Adicionalmente, en estos últimos genes se puede observar que la variación entre placas es mínima, por lo que se puede afirmar que el factor humano no jugó un papel relevante en dicha variación.

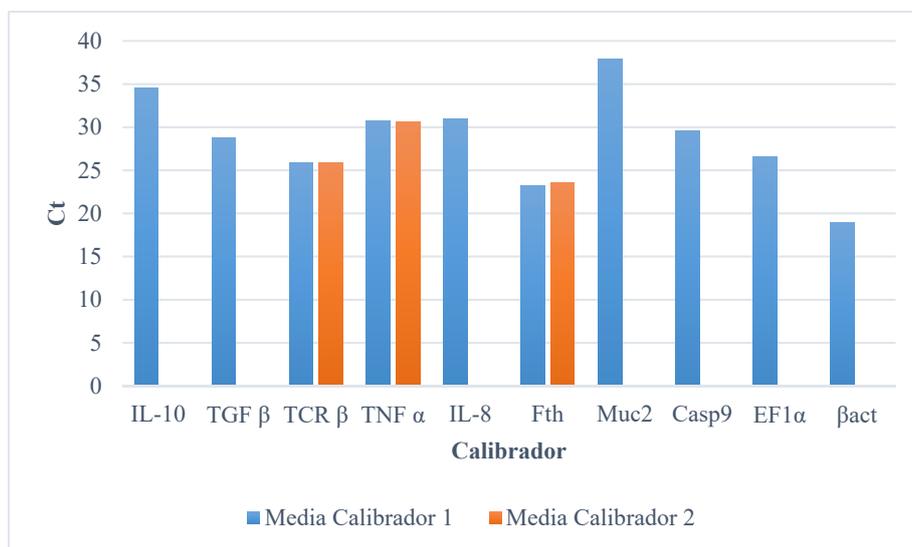


Figura 14 Variación entre placas.

4.3 Análisis de expresión

Cuando se evaluó el efecto de la dieta sobre la expresión génica de los genes diferenciales, se registraron diferencias significativas para dos genes: Muc2 y β act (Figura 15).

Concretamente, se observó que ambos genes seguían un patrón similar, sin diferencias significativas entre las dietas FM30 y FM0 (10,273 y 8,458 para Muc2; 0,002 y 0,001 para β act respectivamente) pero sí entre estas y el tratamiento FM15 (22,527 para Muc2; 0,006 para β act) donde los niveles de expresión aumentaron considerablemente (Tabla 9).

No se obtuvieron diferencias significativas en los genes restantes Casp9, TCR β , IL-8, IL-10, TGF β , TNF α y Fth (Tabla 9). En el caso del TNF α , se vio una tendencia del tratamiento FM30 hacia resultados de expresión más elevados en comparación con los tratamientos FM0 y FM15, sin embargo, no hay evidencias significativas que afirmen estos resultados. Algo similar se observó con TGF β donde el grupo FM15 presentó una expresión ligeramente más elevada que el FM0 pero estas diferencias tampoco fueron significativas. IL-8 presentó una tendencia a aumentar a medida que la sustitución de pescado fue mayor pero sin pruebas significativas de ello (Tabla 9).

Tabla 9 Expresión relativa de los genes analizados y valores de P value.

Gen	FM30	FM15	FM0	P value
Casp9	0,025±0,0030	0,026±0,0030	0,022±0,0028	ns
TCR β	0,004±0,0022	0,007±0,0022	0,007±0,0021	ns
IL-8	0,085±0,0580	0,112±0,0580	0,215±0,0547	ns
IL-10	0,326±0,1101	0,298±0,1101	0,230±0,1038	ns
TGF β	0,009±0,0023	0,013±0,0023	0,001±0,0022	ns
TNF α	0,078±0,0214	0,026±0,0214	0,027±0,0202	ns
Muc2	10,273 ^a ± 0,1103	22,527 ^b ± 0,0745	8,458 ^a ± 1103	<0,0001
Fth	0,015±2,8715	0,043±1,7029	0,006±4,4524	ns
βact	0,002 ^a ± 0,0008	0,006 ^b ± 0,0008	0,001 ^a ± 0,007	0,0012

Media \pm error estándar (n=9). Medias con diferentes superíndices (a,b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Test de Tukey-Kramer.

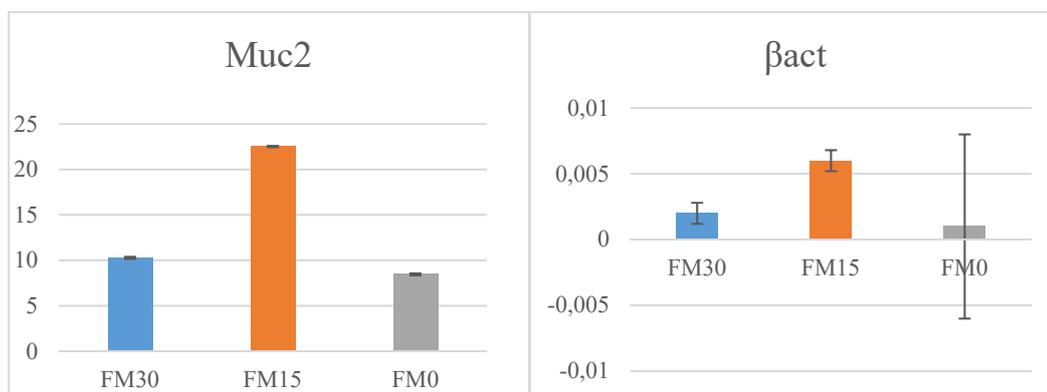


Figura 15 Expresión relativa de los genes cuya expresión fue significativa considerando un $p < 0,05$. Las líneas verticales indican el error estándar.

5. Discusión

Crecimiento y supervivencia

Estudios recientes realizados tanto en *D,labrax* como en otras especies de peces carnívoros sugieren que una alta sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas vegetales se encuentra relacionada con un menor consumo del pienso y/o una conversión más deficiente del alimento y por tanto un menor crecimiento (Geay et al., 2011; Gomes et al., 1995). En el presente trabajo se pudo observar que las materias primas vegetales utilizadas no tuvieron un efecto negativo en la ingesta (no afectaron a la palatabilidad), sin embargo, el crecimiento sí se vio afectado con la sustitución total, seguramente debido a una menor eficiencia del alimento, relacionado con una peor digestión y absorción de los nutrientes procedentes del pienso sin harina de pescado.

Aunque las diferentes dietas se formularon con el objetivo de cubrir las necesidades nutricionales de los peces, el crecimiento para el grupo FM0 fue menor, posiblemente como consecuencia de una menor disponibilidad de dichos nutrientes. Las causas pueden ser por diversos factores o una combinación de los mismos. Por ejemplo, una mayor proporción de fuentes vegetales en los piensos se traduce en un incremento de fibra insoluble, cuya presencia se relaciona con un aumento del tránsito intestinal y un menor tiempo de absorción de nutrientes (Bonvini et al., 2018). Por otro lado, una mayor sustitución incrementa los niveles de carbohidratos, componentes cuya capacidad de hidrólisis es limitada en especies carnívoras como las lubinas, lo que puede producir un decrecimiento de la digestibilidad (Enes et al., 2011). Finalmente, la presencia de antinutrientes se ha demostrado como responsables de la inhibición de enzimas digestivos tales como las proteasas (Magalhães et al., 2018).

Resultados similares se han observado en trabajos anteriores con *D,labrax*, sin diferencias significativas con bajos niveles de harina de pescado, pero sí cuando ésta era eliminada totalmente de la dieta (Kaushik et al., 2004; Torrecillas et al., 2017a). Adicionalmente, los resultados parecen coincidir con los obtenidos en otras especies como *Sparus aurata*, alimentadas exclusivamente con fuentes proteicas vegetales (Estruch et al., 2018b), *Lateolabrax japonicus* con dietas de sustitución ricas en soja (Zhang et al., 2017) o *Oncorhynchus mykiss* empleando combinaciones de harina de pescado y gluten de trigo (Voller et al., 2018).

Una dieta que no es capaz de suplir las necesidades nutricionales, no sólo influye directamente en el crecimiento, sino también puede considerarse un factor estresante para el pez, ya que no es capaz de cubrir correctamente su gasto energético (Estruch et al., 2018b). Si dicho factor se prolonga en el tiempo acaba derivando en un problema de estrés crónico, el cual produce, comúnmente, una supresión de los procesos que requieran una fuente continua de energía, tales como el sistema inmune, causados por un incremento en los niveles de cortisol (Samaras et al., 2016; Tort, 2011). Como consecuencia y desde un punto de vista global, tiene lugar un incremento del número de neutrófilos y una reducción de los linfocitos circulantes y macrófagos lo que se asocia a una menor resistencia frente a posibles organismos oportunistas y una mayor propensión a sufrir infecciones (Wendelaar, 1997). Este estado de inmunodepresión podría explicar el efecto de la dieta sobre la supervivencia de los peces alimentados con la dieta sin harina de pescado, este grupo experimentó una mayor susceptibilidad a agentes externos, lo que se traduce en una mayor mortalidad, tal y como se observa en los resultados presentados. De igual forma ocurre en trabajos anteriores de *D,labrax* (Geay et al., 2011; Torrecillas et al., 2017a), donde se observa una tendencia hacia una menor supervivencia en ejemplares con sustitución total o alta de harina de pescado aunque sin establecerse diferencias significativas ($p < 0,05$), lo que podría deberse a la corta duración de estos experimentos (90 días). Sin embargo, en otras especies, como la dorada sí que se observó una mayor mortalidad en el grupo con una sustitución total de harina de pescado tras 112 días de experimento (Estruch et al., 2018b). En

Lateolabrax japonicus, se obtuvieron conclusiones similares, ya que el grupo con una mayor sustitución por soja (75%) mostró de forma significativa el mayor número de bajas (78,8% de supervivencia) (Zhang et al., 2017). En resumen, los resultados parecen indicar que inclusiones de harina de pescado del 10% o inferiores afectan considerablemente la supervivencia.

Salud intestinal

Diversos autores han sugerido que una inclusión de elevadas cantidades de fuentes de proteína vegetales en la dieta de especies carnívoras pueden desencadenar una reacción inmunitaria o inflamatoria debido al elevado contenido en factores antinutricionales (Dani, 2018). Estos efectos se han relacionado principalmente con las saponinas y lectinas presentes en la soja (Ma et al., 2019; Miao et al., 2018; Urán et al., 2008; Zhang et al., 2017). Las lectinas son proteínas de unión a azúcares capaces de unirse al IP afectando la regulación del transporte, secreción de hormonas y proliferación de células caliciformes. Por otro lado, las saponinas son moléculas que se agrupan en forma de micelas intercalándose en los colesterolos presentes en las membranas celulares y propiciando la formación de agujeros. De este modo se incrementa la permeabilidad de las células y la absorción de sustancias tales como alérgenos (Krogdahl et al., 2010; Miao et al., 2018). También han sido asociadas con la producción de citocinas, actuando como inmunoestimuladores (Urán et al., 2008).

Adicionalmente, la FM es conocida por actuar como fuente de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas entre otros. Este equilibrio permite un crecimiento y desarrollos óptimos, además de relacionarse con un correcto mantenimiento de la salud inmunitaria (Miles & Chapman, 2010). Sustituciones de FM en la dieta pueden producir cambios en estado de salud de los peces los cuales se relacionan con una pérdida de dicha homeostasis (Yang et al., 2004).

Signos propios del proceso inflamatorio pueden observarse en diversas especies tras un análisis histológico de la mucosa intestinal presentando un incremento de la submucosa asociada a un aumento en el número de células secretoras del moco (Hansen & Hemre, 2013), un cambio en su composición o en la microbiota (Gajardo et al., 2017) y una infiltración en el tejido de células inflamatorias en el tejido conectivo (Estruch et al., 2018b; Torrecillas et al., 2017a).

En el presente trabajo no se realizaron análisis histológicos, pero los análisis de expresión génica revelaron un incremento significativo de la expresión del gen *Muc2* en el grupo FM15 respecto a FM30 y FM0, lo que podría deberse a una mayor secreción de mucina intestinal por parte de las células caliciformes presentes en el IP. Este aumento se podría interpretar como un mecanismo de defensa cuya función sería la protección intestinal. Un aumento de la expresión de este gen cabría esperarse también en el grupo FM0, pues presenta el grupo con mayor sustitución, por contra, se obtuvieron valores de expresión similares al grupo control (FM30). Ésta disminución de los niveles de expresión podría deberse a que este grupo no presentó una respuesta inflamatoria relacionada con la dieta una vez finalizado el experimento, lo que coincidiría con que estos peces se encontraban en un estado inmunodeprimido debido a una situación de estrés crónico. El aumento de expresión de la mucina, concuerda con estudios previos en otras especies, donde sustituciones por fuentes proteicas vegetales se asociaron a un incremento de células caliciformes y una mayor expresión de mucina en *Sparus aurata* (Monge-Ortiz et al., 2016; Pérez et al., 2013, Estruch et al., 2018b) y en *Gadus morhua* (Hansen & Hemre, 2013). Sin embargo, no concuerda con un estudio realizado con *Salmo salar* en el cual no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de este gen (Gajardo et al., 2017).

Además, se ha observado que el sistema inmune se encuentra asociado a las mucosas del intestino. En el actual estudio, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero sí una cierta tendencia del gen TGF β a aumentar en FM15 con respecto a FM0 y FM30, y del gen IL-8 a incrementarse en FM0 con respecto a FM30 y FM15. TGF β es una citocina multifuncional considerada principalmente por su función antiinflamatoria ya que es capaz de inhibir la

diferenciación de células B, Th1 y Th2 (Wang & Secombes, 2013; Zou & Secombes, 2016). Así pues, su tendencia a una mayor expresión en el grupo FM15 indicaría que los peces bajo este tratamiento estarían intentando volver a un estado de normalidad, intentando reducir el proceso de inflamación. Respecto al grupo FM0, como ya se ha comentado, se podría deducir que se encuentra en un estado inmunodeprimido, lo que indicaría que no es capaz de presentar una respuesta antiinflamatoria, coincidiendo así con una menor expresión de este gen. De igual forma en *Cyprinus carpio* se obtuvo un incremento de la expresión de TGF β en dietas con un 20% de soja tras 5 semanas de ensayo (Urán et al., 2008).

Paralelamente, IL-8 es conocida como uno de los atrayentes químicos más potentes a la hora de reclutar neutrófilos, basófilos, células T y eosinófilos a los lugares de inflamación durante la fase aguda (Oliveira et al., 2013; Van Der Aa et al., 2010) por lo que tendría sentido que su expresión aumentase en el grupo FM15 con respecto al FM30. Considerando que los peces del tratamiento FM0 se encuentran en un estado de incapacidad inmune, se esperaría que IL-8 no se expresase, sin embargo, se ha sugerido que TGF β juega un papel fundamental en la regulación negativa de este gen (Smith et al., 1996) por lo que una supresión de TGF β en FM0 podría implicar la tendencia hacia un aumento en la expresión de IL-8. La expresión de IL-8 también se incrementó en estudios con incursión de un 20% de harina de soja empleando *Lateolabrax japonicus* (Zhang et al., 2017) mientras que no fue significativa en *Channa argus* con diferentes niveles de sustitución de soja (Miao et al., 2018), aunque estos resultados podrían deberse al corto período de tiempo del ensayo, ya que solo duró 63 días. Para ambos genes, un mayor número de muestras son necesarias para confirmar si la tendencia observada puede convertirse en diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Finalmente, el gen de la β act presentó el mismo patrón que Muc2, incrementándose la expresión en el tratamiento FM15 y reduciéndose en el FM0 con respecto a FM30 debido a una situación de estrés prolongado. Este gen se encuentra presente en la mayoría de células del organismo actuando como componente estructural, ya que conforma el citoesqueleto, de integridad y motilidad (Lin & Redies, 2012). Por tanto, es lógico pensar que su expresión se vea modulada durante un proceso inflamatorio ya que la estructura de las células intestinales es afectada. Curiosamente, se trata de uno de los primeros trabajos en estudiar la expresión diferencial de este gen, demostrando que los genes de referencia comúnmente empleados para este tipo de estudios no siempre es el más adecuado, tal y como se indica en otros estudios (Mitter et al., 2009; Paria et al., 2016).

6. Conclusión

En el presente estudio se ha evaluado a largo plazo el impacto de las altas sustituciones de harina de pescado por proteínas vegetales en parámetros productivos como crecimiento o supervivencia, así como la expresión génica de genes relacionados con la salud intestinal en lubina (*D. labrax*). En base a los resultados podemos concluir que:

- Es posible alimentar a la lubina con piensos que únicamente contengan un 15% de harina de pescado sin que ello afecte al crecimiento, supervivencia y parámetros nutritivos.
- La alta sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas vegetales en piensos destinados a la lubina europea podría inducir a largo plazo una respuesta inflamatoria, además de una pérdida de la integridad de las células caliciformes.
- Una sustitución del 15% es capaz de producir una respuesta inmunitaria e inflamatoria a largo plazo, mientras que una sustitución total podría estar desencadenando una inmunodepresión moderada, lo que implicaría una pérdida en la función protectora de la mucosa intestinal.
- Una alimentación con altos niveles de fuentes vegetales a largo plazo tiene efectos en la estructura del intestino posterior tal y como indican los elevados niveles de expresión de Muc2 y β act.

7. Bibliografía

- ABELLI, L., PICCHIETTI, S., ROMANO, N., MASTROLIA, L. & SCAPIGLIATI, G. (1997). Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax*(L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 7(4), 235–245. <https://doi.org/10.1006/FSIM.1996.0079>
- APROMAR. (2017). *La Acuicultura en España 2017* . Recuperado de <http://www.apromar.es/content/informes-anales>
- BONVINI, E., BONALDO, A., PARMA, L., MANDRIOLI, L., SIRRI, R., GRANDI, M., FONTANILLAS, R., VIROLI, C. & GATTA, P. P. (2018). Feeding European sea bass with increasing dietary fibre levels: Impact on growth, blood biochemistry, gut histology, gut evacuation. *Aquaculture*, 494, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.05.017>
- BOREY, M., PAROISSIN, C., QUILLET, E., TERRIER, F., MAUNAS, P., BUREL, C. & LAUGA, B. (2018). Acute hypoxia reveals diverse adaptation strategies to fully substituted plant-based diet in isogenic lines of the carnivorous rainbow trout. *Aquaculture*, 490, 288–296. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.02.005>
- CAO, L., NAYLOR, R., HENRIKSSON, P., LEADBITTER, D., METIAN, M., TROELL, M. & ZHANG, W. (2015). China’s aquaculture and the world’s wild fisheries. *Science*, 347(6218), 133–135.
- CARDA-DIEGUEZ, M., MIRA, A. & FOUZ, B. (2014). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *Federation of European Microbiological Societies.*, 87(2), 451–459. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12236>
- CARNEVALI, O., DE VIVO, L., SULPIZIO, R., GIOACCHINI, G., OLIVOTTO, I., SILVI, S. & CRESCI, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1–4), 430–438. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.04.025>
- CLEMENTS, K.D. & RAUBENHEIMER, D. (2006). Chapter 2: feeding and nutrition. Evans DH, Claiborne JB, editors in *The physiology of fishes*. 3rd ed. Boca Raton (FL): Taylor and Francis. 47-82.
- COUPER, K. N., BLOUNT, D. G. & RILEY, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5771–5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
- DANI, D. (2018). A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 164–179.
- DHARMANI, P., SRIVASTAVA, V., KISSOON-SINGH, V. & CHADEE, K. (2009). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*, 1(2), 123–135. <https://doi.org/10.1159/000163037>
- EGERTON, S., CULLOTY, S., WHOOLEY, J., STANTON, C. & ROSS, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in Microbiology*, 9(873), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- EL AAMRI, F., REAL, F., ACOSTA, F., BRAVO, J., ROMÁN, L., DÉNIZ, S. & PADILLA, D. (2015). Differential innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 436–441. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.05.054>

- ENES, P., PANSEERAT, S., KAUSHIK, S. & OLIVA-TELES, A. (2011). Dietary carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science*, 19(3), 201–215. <https://doi.org/10.1080/10641262.2011.579363>
- ESTRUCH, G. (2018a). Assessment of the long-term impact of high plant protein diets on the intestinal status of the on-growing gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). Doctoral Thesis in Science and Technology of Animal Production. Universidad Politécnica de Valencia. 382 pp.
- ESTRUCH, G., COLLADO, M. C., MONGE-ORTIZ, R., TOMÁS-VIDAL, A., JOVER-CERDÁ, M., PEÑARANDA, D. S., MARTÍNEZ, G.P. & MARTÍNEZ-LLORENS, S. (2018b). Long-term feeding with high plant protein based diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) leads to changes in the inflammatory and immune related gene expression at intestinal level. *BMC Veterinary Research*, 14, 302. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1626-6>
- FAO. (2005). *Species Fact Sheet Dicentrarchus labrax*. Retrieved May 6, 2019, from <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en>
- FAO. (2016). *Culture Aquatic Species Information Programme Dicentrarchus labrax*. Retrieved May 6, 2019, from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en
- FERRUFINO, J.C., TAXA, L. & GLADIS, A. (1996). Histología normal del intestino delgado. *Revista Medica Herediana*, 7, 46–57.
- GAJARDO, K., JARAMILLO-TORRES, A., KORTNER, T. M., MERRIFIELD, D. L., TINSLEY, J., BAKKE, A. M. & KROGDAHL, Å. (2017). Alternative Protein Sources in the Diet Modulate Microbiota and Functionality in the Distal Intestine of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/aem.02615-16>
- GATESOUBE, F., HUELVAN, C., LE BAYON, N., LE DELLIU, H., MADEC, L., MOUCHEL, O., QUAZUGUEL, P., MAZURAS, D. & ZAMBONINO-INFANTE, J.L. (2016). The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories. *BMC Microbiology*, 16(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0885-2>
- GEAY, F., FERRARESSO, S., ZAMBONINO-INFANTE, J. L., BARGELLONI, L., QUENTEL, C., VANDEPUTTE, M., KAUSHIK, K., CAHU, C.L. & MAZURAS, D. (2011). Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12(1), 522. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-522>
- GHANBARI, M., KNEIFEL, W. & DOMIG, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.06.033>
- GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R. & MATHIEU, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386-401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- GOMES, E. F., REMA, P. & KAUSHIK, S. J. (1995). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 130(2–3), 177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)
- GÓMEZ, G. & BALCÁZAR, J. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish, *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52(2), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>

- GOMEZ, D., SUNYER, J. O. & SALINAS, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1729–1739. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.09.032>
- HAFFRAY, P., TSIGENOPOULOS, C.S., BONHOMME, F., CHATAIN, B., MAGOULAS, A., RYE, M., TRIANTAFYLIDIS, A. & TRIANTAFYLIDIS, C. (2000). European sea bass - *Dicentrarchus labrax*. *Genimpact*, 28–39. <https://doi.org/10.1079/9780851995199.0028>
- HAKIM, Y., HARPAZ, S. & UNI, Z. (2009). Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. *Aquaculture*, 290(1–2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.02.008>
- HANSEN, A. C. & HEMRE, G. I. (2013). Effects of replacing fish meal and oil with plant resources in on-growing diets for Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 641–650. <https://doi.org/10.1111/anu.12078>
- JANSSEN, K., CHAVANNE, H., BERENTSEN, P. & KOMEN, H. (2017). Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture*, 472, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.03.012>
- JERBI, M. A., AUBIN, J., GARNAOUI, K., ACHOUR, L. & KACEM, A. (2012). Life cycle assessment (LCA) of two rearing techniques of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquacultural Engineering*, 46, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2011.10.001>
- JOHANSSON, M.V., SJÖVALL, H. & HANSSON, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10(6), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- KAUSHIK, S. J., COVÈS, D., DUTTO, G. & BLANC, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 230(1–4), 391–404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)
- KHOJASTEH, S. M. B. (2012). The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes : a brief review. *International Journal of Aquatic Science*, 3(2), 71-88.
- KLEIN, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9)
- KOUSOULAKI, K., SAETHER, B.S., ALBREKTSSEN, S. & NOBLE, C. (2015). Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 129–151. <https://doi.org/10.1111/anu.12233>
- KROGDAHL, Å., PENN, M., THORSEN, J., REFSTIE, S. & BAKKE, A. M. (2010). Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3), 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- LANARI, D. & D'AGARO, E. (2005). Alternative plant protein sources in sea bass diets. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 365–374.
- LIN, J. & REDIES, C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*, 222(6), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0420-x>
- LØKKA, G. & KOPPANG, E. O. (2016). Antigen sampling in the fish intestine. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 138–149. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2016.02.014>

- LOKMAN, P. M. & SYMONDS, J. E. (2014). Molecular and biochemical tricks of the research trade: -omics approaches in finfish aquaculture. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(3), 492–505. <https://doi.org/10.1080/00288330.2014.928333>
- MA, Z., HASSAN, M. M., ALLAIS, L., HE, T., LETERME, S., ELLIS, A., MCGRAW, B. & QIN, J. G. (2019). Comparison of partial replacement of fishmeal with soybean meal and EnzoMeal on growth performance of Asian seabass *Lates calcarifer*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 216, 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2018.10.006>
- MACHADO, M., AZEREDO, R., DÍAZ-ROSALES, P., AFONSO, A., PERES, H., OLIVA-TELES, A. & COSTAS, B. (2015). Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 353–362. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.11.024>
- MACHADO, M., AZEREDO, R., FONTINHA, F., FERNÁNDEZ-BOO, S., CONCEIÇÃO, L. E. C., DIAS, J. & COSTAS, B. (2018). Dietary methionine improves the european seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status, inflammatory response, and disease resistance. *Frontiers in Immunology*, 9 (2672). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02672>
- MACHADO, M., CASTRO, C., OLIVA-TELES, A. & COSTAS, B. (2019). Interactive effects of dietary vegetable oil and carbohydrate incorporation on the innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles subjected to acute stress. *Aquaculture*, 498, 171–180. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.08.050>
- MAGALHÃES, R., DÍAZ-ROSALES, P., DIÓGENES, A. F., ENES, P., OLIVA-TELES, A. & PERES, H. (2018). Improved digestibility of plant ingredient-based diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with exogenous enzyme supplementation. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1287–1295. <https://doi.org/10.1111/anu.12666>
- MIAO, S., ZHAO, C., ZHU, J., HU, J., DONG, X. & SUN, L. (2018). Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead. *Scientific Reports*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18430-7>
- MICELI, M. C. & PARNES, J. R. (1993). Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation and Differentiation. *Advances in Immunology*, 53, 59–122. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60498-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60498-8)
- MILES, R. D. & CHAPMAN, F. A. (2010). The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. *Fisheries and Aquatic Sciences Department*. 1–6.
- MITTER, K., KOTOULAS, G., MAGOULAS, A., MULERO, V., SEPULCRE, P., FIGUERAS, A., NOVOA, B. & SARROPOULOU, E. (2009). Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2009.04.009>
- MONGE-ORTIZ, R., MARTÍNEZ-LLORENS, S., MÁRQUEZ, L., MOYANO, F. J., JOVER-CERDÁ, M. & TOMÁS-VIDAL, A. (2016). Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Archives of Animal Nutrition*, 70(2), 155–172. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2016.1141743>
- MORAIS, S., SILVA, T., CORDEIRO, O., RODRIGUES, P., GUY, D. R., BRON, J. E., TAGGART, J.B., BELL, J.G. & TOCHER, D. R. (2012). Effects of genotype and dietary fish oil replacement with vegetable oil on the intestinal transcriptome and proteome of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 13(1), 448. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-448>

- MOURENTE, G. & BELL, J. G. (2006). Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(3–4), 389–399. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2006.08.012>
- MUNGUÍA-FRAGOZO, P., ALATORRE-JACOME, O., RICO-GARCIA, E., TORRES-PACHECO, I., CRUZ-HERNANDEZ, A., OCAMPO-VELAZQUEZ, R. V., GARCIA-TREJO, J.F. & GUEVARA-GONZALEZ, R. G. (2015). Perspective for Aquaponic Systems: “ Omic ” Technologies for Microbial Community Analysis . *BioMed Research International*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/480386>
- NEHR, O., BLANCHETON, J.-P. & ALLIOT, E. (1996). Development of an intensive culture system for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae in sea enclosures. *Aquaculture*, 142(1–2), 43–58. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01248-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01248-6)
- NEVES, J. V., WILSON, J. M. & RODRIGUES, P. N. S. (2009). Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(7), 848–857. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2009.02.001>
- OLIVA-TELES, A., ENES, P. & PERES, H. (2015). Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, 203–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8>
- OLIVA-TELES, A. (2000). Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International*, 8(6), 477–492. <https://doi.org/10.1023/A:1009236517555>
- OLIVEIRA, S., REYES-ALDASORO, C. C., CANDEL, S., RENSHAW, S. A., MULERO, V. & CALADO, Â. (2013). Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, 190(8), 4349–4359 . <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203266>
- PARIA, A., DONG, J., SURESH BABU, P. P., MAKESH, M., CHAUDHARI, A., THIRUNAVUKKARASU, A. R., PURUSHOTHAMAN, C.S. & RAJENDRAN, K. V. (2016). Evaluation of candidate reference genes for quantitative expression studies in Asian seabass (*Lates calcarifer*) during ontogenesis and in tissues of healthy and infected fishes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(9), 597–605.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, J., ESTENSORO, I., REDONDO, M. J., CALDUCH-GINER, J. A., KAUSHIK, S. & SITJÀ-BOBADILLA, A. (2013). Mucins as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in a Fish-Parasite Model: Transcriptional and Functional Analysis. *PLoS ONE*, 8(6), e65457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065457>
- PFÄFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity : BestKeeper© - Excel-based tool using pair-wise correlation. *Biotechnology Letters*, 26, 509–515.
- RASKOVIC, B., STANKOVIC, M.B., MARKOVIC, Z.Z. & POLEKSIC, V.D. (2011). Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences*, 56(1), 87–100. <https://doi.org/10.2298/jas1101087r>
- REIS, M. I. R., DO VALE, A., PINTO, C., NASCIMENTO, D. S., COSTA-RAMOS, C., SILVA, D. S. P., SILVA, M.T. & DOS SANTOS, N. M. S. (2007). First molecular cloning and characterisation of caspase-9 gene in fish and its involvement in a gram negative septicaemia. *Molecular Immunology*, 44(7), 1754–1764. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2006.07.293>

- RIMOLDI, S., FINZI, G., CECCOTTI, C., GIRARDELLO, R., GRIMALDI, A., ASCIONE, C. & TEROVA, G. (2016). Butyrate and taurine exert a mitigating effect on the inflamed distal intestine of European sea bass fed with a high percentage of soybean meal. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0041-9>
- RINGØ, E., ZHOU, Z., VECINO, J. G., WADSWORTH, S., ROMERO, J., KROGDAHL, Å., OLSEN, R.E., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., DAVIES, S., OWEN, M., LAUZON, H.L., MARTINSEN, L.L., DE SCHRYVER, P., BOSSIER, P., SPERSTAD, S. & MERRIFIELD, D. L. (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 219–282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>
- RODRIGUES, P. M., SILVA, T. S., DIAS, J. & JESSEN, F. (2012). PROTEOMICS in aquaculture: Applications and trends. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4325–4345. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2012.03.042>
- ROMERO, J., RINGØ, E. & MERRIFIELD, D. L. (2014). Chapter 4: The Gut Microbiota of Fish. In E. Ringø & D. Merrifield (Eds.) in *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, 1st Ed. Jhon Wiley & Sons, 75-100. <https://doi.org/10.1002/9781118897263.ch4>
- SAMARAS, A., DIMITROGLOU, A., SARROPOULOU, E., PAPAHRISIS, L., KOTTARAS, L. & PAVLIDIS, M. (2016). Repeatability of cortisol stress response in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and transcription differences between individuals with divergent responses. *Scientific Reports*, 6(34858), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34858>
- SCAPIGLIATI, G., ROMANO, N., BUONOCORE, F., PICCHIETTI, S., BALDASSINI, M. R., PRUGNOLI, D., GALICE, A., MELONI, S., SECOMBES, C.J., MAZZINI, M. & ABELLI, L. (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00057-X)
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- SILVA-BRITO, F., TIMÓTEO, F., ESTEVES, Â., PEIXOTO, M. J., OZORIO, R. & MAGNONI, L. (2019). Impact of the replacement of dietary fish oil by animal fats and environmental salinity on the metabolic response of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 233, 46–59. <https://doi.org/10.1016/J.CBPPB.2019.04.004>
- SMITH, W. B., NOACK, L., KHEW-GOODALL, Y., ISENMANN, S., VADAS, M. A. & GAMBLE, J. R. (1996). Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *The Journal of Immunology*, 157(1), 360–368.
- SVEC, D., TICHOPAD, A., NOVOSADOVA, V., PFAFFL, M. W. & KUBISTA, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- VOLLER, S.W., MERRIFIELD, D.L. & APPER, E. (2018). The Effect of Dietary Wheat Gluten Products on Gut Morphology, Non-Specific Immune Parameters, and Allochthonous Intestinal Microbial Population of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed with a High Plant Protein Diet. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 3(1), 4-19. <https://doi.org/10.21767/2572-5459.100042>
- TAKLE, H. & ANDERSEN, Ø. (2007). Caspases and apoptosis in fish. *Journal of Fish Biology*, 71, 326–349. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01665.x>
- TIBALDI, E. & KAUSHIK, S. J. (2005). Amino acid requirements of Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, 59–65.

- IBALDI, E., TULLI, F., PICCOLO, G. & GUALA, S. (2003). Wheat gluten as a partial substitute for fish meal protein in sea bass (*D. labrax*) diets. *Italian Journal of Animal Science*, 2, 613–615.
- TORRECILLAS, S., MOMPTEL, D., CABALLERO, M. J., MONTERO, D., MERRIFIELD, D., RODILES, A., ROBAINA, L., ZAMORANO, M.J., KARALAZOS, V., KAUSHIK, S. & IZQUIERDO, M. (2017a). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386–398. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.11.005>
- TORRECILLAS, S., ROBAINA, L., CABALLERO, M. J., MONTERO, D., CALANDRA, G., MOMPTEL, D., KARALAZOS, V., KAUSHIK, S. & IZQUIERDO, M. S. (2017). Combined replacement of fishmeal and fish oil in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Production performance, tissue composition and liver morphology. *Aquaculture*, 474, 101–112. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.03.031>
- TORRECILLAS, S., MAKOL, A., BETANCOR, M. B., MONTERO, D., CABALLERO, M. J., SWEETMAN, J. & IZQUIERDO, M. (2013). Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6), 1485–1495. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.03.351>
- TORRECILLAS, S., MONTERO, D., CABALLERO, M. J., ROBAINA, L., ZAMORANO, M. J., SWEETMAN, J. & IZQUIERDO, M. (2015). Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 508–516. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.11.033>
- TORT, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.07.002>
- TOVAR-RAMÍREZ, D., MAZURAS, D., GATESOUBE, J. F., QUAZUGUEL, P., CAHU, C. L. & ZAMBONINO-INFANTE, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300(1–4), 142–147. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.12.015>
- TURCHINI, G. M., TRUSHENSKI, J. T. & GLENCROSS, B. D. (2019). Thoughts for the Future of Aquaculture Nutrition: Realigning Perspectives to Reflect Contemporary Issues Related to Judicious Use of Marine Resources in Aquafeeds. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1), 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- URÁN, P. A., GONÇALVES, A. A., TAVERNE-THIELE, J. J., SCHRAMA, J. W., VERRETH, J. A. J. & ROMBOUT, J. H. W. M. (2008). Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 751–760. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2008.02.013>
- VALENTE, L.M.P., CUSTÓDIO, M., BATISTA, S., FERNANDES, H. & KIRON, V. (2019). Defatted microalgae (*Nannochloropsis* sp.) from biorefinery as a potential feed protein source to replace fishmeal in European sea bass diets. *Fish Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00621-w>
- VAN DER AA, L. M., CHADZINSKA, M., TIJHAAR, E., BOUDINOT, P. & VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. (2010). CXCL8 Chemokines in Teleost Fish: Two Lineages with Distinct Expression Profiles during Early Phases of Inflammation, *PLoS One*, 5(8), e12384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012384>
- VANDEPUTTE, M., GAGNAIRE, P. -A. & ALLAL, F. (2019). The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/age.12779>

- VANGUILDER, H. D., VRANA, K. E. & FREEMAN, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619–626. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- VOLCKAERT, F. A. M., BATARGIAS, C., CANARIO, A., CHATZIPLIS, D., CHISTIAKOV, D., HALEY, C., LIBERTINI, A. & TSIGENOPOULOS, C. (2008). Chapter 5: European Sea Bass. In *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 117–133 https://doi.org/10.1007/978-3-540-73837-4_5
- WANG, T. & SECOMBES, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1703–1718. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.08.030>
- WENDELAAR, B.S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- WILSON, J.M. & CASTRO, L.F. (2011). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. *Fish Physiology*, 30, 1-55. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)
- YANG, Y., XIE, S., LEI, W., ZHU, X. & YANG, Y. (2004). Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(2), 105–114. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2003.11.006>
- ZHANG, C., RAHIMNEJAD, S., WANG, Y., LU, K., SONG, K., WANG, L. & MAI, K. (2017). Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 483, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>
- ZOU, J. & SECOMBES, C. J. (2016). The Function of Fish Cytokines. *Biology*, 5(2), 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>