

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y
del Medio natural



RESPUESTA INMUNITARIA E INFLAMATORIA A NIVEL INTESTINAL EN DORADA (*Sparus aurata, L.*): ESTUDIO IN VITRO

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Titulación: Grado en Biotecnología

Curso: 2016/2017

Convocatoria: CONVOCATORIA 7ª JULIO 2017 (150)

Autor: Carlos Pérez López

Director: David Sánchez Peñaranda

Codirector: Silvia Martínez Llorens

Alumno: Carlos Pérez López

Tutor: David Sánchez Peñaranda

Cotutor: Silvia Martínez Llorens

Fecha: Valencia, Julio 2017

Título: Respuesta inmunitaria e inflamatoria a nivel intestinal en dorada (*Sparus aurata*, L.): estudio *in vitro*

Resumen

La necesidad de reducir gastos en la producción acuícola, ha hecho que en los últimos años se hayan buscado alternativas alimenticias para los peces, las más estudiadas y que presentan un mayor potencial son los sustituyentes de origen vegetal. Se han realizado numerosas investigaciones en las que se han estudiado distintas plantas (girasol, soja, garbanzos...) como posibles fuentes proteicas y lipídicas, tanto parciales como totales. En este estudio se quiso confirmar *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo* en un trabajo anterior en el que se estudiaba el efecto de la sustitución total de los componentes animales en los piensos por componentes vegetales en la composición de la microbiota intestinal en dorada (*Sparus aurata*, L.), en el que se produjo un incremento en la mortalidad de los peces y un aumento en la inflamación intestinal. Los objetivos de este estudio fueron la puesta a punto para la realización de este análisis *in vitro* y el posterior análisis del efecto de una dieta con una composición total de ingredientes de origen vegetal (VM) en comparación a una dieta comercial basada en harina de pescado (FM), utilizando tres retos bacterianos: *Vibrio alginolyticus*, *Photobacterium damsela* sbsp *Piscicida* y *Pseudomonas anguilliseptica*.

Para la puesta a punto se determinó mediante la prueba LDH, a partir de peces alimentados con una dieta comercial, cuanto tiempo mantenía el tejido su integridad en el medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), empleado para el análisis posterior. Además se evaluó la calidad del ácido ribonucleico (RNA) mediante el análisis de diferentes genes de referencia. La capacidad del tejido a responder al reto en base a la dieta administrada al pez previamente al sacrificio, se evaluó mediante el análisis de la expresión génica de genes relacionados con procesos inflamatorios (*IL-1 β* , *IL-6* y *COX-2*), de respuesta inmune (*I-muc* e *IgM*) e integridad (*Ocl*).

Las pruebas realizadas para la puesta a punto determinaron que se podía trabajar hasta las 6 horas en el medio DMEM sin que la calidad del tejido y del RNA se viese afectada. A las 6 horas se produjo una respuesta inflamatoria tras la exposición al reto bacteriano con *Vibrio alginolyticus*, además de una respuesta inflamatoria en los tejidos de peces alimentados con la dieta VM.

Estos resultados permitieron confirmar la inflamación producida por la alimentación con VM en el estudio *in vivo*, así como determinar que la muerte de los peces en el estudio anterior fue debido a la variación de la microbiota intestinal consecuencia de una inmunosupresión al alimentar los peces con VM.

Palabras clave

Dorada, *in vitro*, VM, RT-qPCR, reto bacteriano, procesos inflamatorios, respuesta inmune, integridad de membrana.

Abstract

The need to reduce costs in aquaculture production has made that in recent years it has been searched food alternatives for fish, the most studied and the greatest potential are plants substitutes. Many researchers have been made in which it has been studied different plants (sunflower, soybean, chickpeas ...) as possible protein sources and lipids substitutes, both partial and total. In this study we wanted to confirm *in vitro* results obtained in a previous *in vivo* work in which the effect of the total substitution of the animal components in the fishmeal by vegetal components, in the composition of the intestinal microbiota in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.), in which there was an increase in fish mortality and an increase in intestine inflammation. The objectives of this study were the set-up for the realization of this *in vitro* analysis and the subsequent analysis of the effect of a diet with a total composition of ingredients of plant origin (VM) in comparison to a commercial diet based on fish meal (FM), using three bacterial challenges: *Vibrio alginolyticus*, *Photobacterium damsela* sbsp *Piscicida* and *Pseudomonas anguilliseptica*.

For the set-up, the LDH test was determined, from fish fed a commercial diet, how long the tissue maintained its integrity in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), used for the subsequent analysis. In addition, the quality of ribonucleic acid (RNA) was evaluated by the analysis of different house keeping. The ability of the tissue to respond to the challenge based on the diet given to the fish prior to slaughter was evaluated by the analysis of the gene expression of genes related to inflammatory processes (IL-1 β , IL-6 and COX-2) Immune response (I-muc and IgM) and integrity (Ocl).

The tests performed for the set-up determined that it was possible to work up to 6 hours in the DMEM medium without the quality of the tissue and the RNA being affected. After 6 hours, an inflammatory response was reported after exposure to bacterial challenge with *Vibrio alginolyticus*. In addition, an inflammatory response was reported on the tissues of fish fed with the VM diet.

These results allowed to confirm the inflammation produced by the feeding with VM in the study *in vivo*, as well as to determine that the death of the fish in the previous study was due to the variation of the intestinal microbiota consequence of an immunosuppression when feeding the fish with VM.

Key words

gilthead seabream, *in vitro*, VM, RT-qPCR, to bacterial challenges, inflammatory process, immune response, membrane integrity.

Índice general

Índice general.....	I
Índice de tablas.....	IV
Índice de figuras.....	V
Índice de abreviaturas	VII
1. Introducción	1
1.1- Estado de la producción acuícola	1
1.2- La dorada	4
1.2.1- Descripción	4
1.2.1.1- Condiciones ambientales	4
1.2.1.2- Ciclo vital y reproducción.....	5
1.2.2- Producción acuícola de la dorada.....	5
1.3. Inclusión de materias primas vegetales: problemas y retos	7
1.4. Efecto de la inclusión dietaría de fuentes vegetales en la fisiología digestiva de los peces	9
1.5 Desarrollo de sistemas de cultivo de tejido <i>in vitro</i>	10
2. Objetivos	12
3. Materiales y métodos	13
3.1- Aspectos éticos.....	13
3.2- Dietas empleadas en el ensayo	13
3.3- Alimentación y crecimiento de los peces.....	14
3.4 Puesta a punto del ensayo	14
3.4.1- Obtención de los tejidos intestinales	15
3.4.2- Prueba de mantenimiento de la integridad	15
3.4.3- Elección del gen de referencia (House keeping)	16
3.5- Reto bacteriano	16
3.5.1- Puesta a punto del reto bacteriano.....	16
3.5.1.1- Recuperación de los liofilizados.....	17

3.5.1.2- Preparación de curvas de calibrado de Densidad óptica (DO) – Unidades formadoras de colonias (UFC)	17
3.5.1.3 Preparación de amplicones 16S de las bacterias para secuenciación	18
3.5.1.4 Preparación de los estímulos bacterianos	19
3.5.2- Obtención de los intestinales	19
3.5.3- Ensayo in vitro	19
3.5.4- Evaluación de la expresión génica	21
3.5.4.1- Extracción, determinación de calidad y concentración de RNA	21
3.5.4.2- Paso de las muestras a cDNA	21
3.5.4.3- Ensayo de RT-qPCR	21
3.5.4.3.1- Análisis de la expresión génica influencia por los retos bacterianos	21
3.5.4.3.2- Condiciones empleadas en RT-qPCR	22
3.5.4.3.1- Cuantificación relativa	22
3.6- Estadística	23
4-Resultados	24
4.1- Puesta a punto	24
4.1.1 Prueba LDH	24
4.1.2 Evaluación del gen de referencia	25
4.1.3- Influencia del medio de cultivo	26
4.2- Evaluación de la expresión génica	26
4.2.1- Reto bacteriano a las 4 horas	26
4.2.1.1- Tratamiento con bacterias	27
4.2.1.2- Sección	27
4.2.1.3- Dieta	27
4.2.2- Reto bacteriano a las 6 horas	28
4.2.2.1- Tratamiento	28
4.2.2.2- Sección	29
4.2.2.3- Dieta	29
5- Discusión	30
5.1- Puesta a punto del ensayo	30
5.2- Reto bacteriano	31
5.2.1- Reto bacteriano a las 4 horas de incubación	31
5.2.2- Reto bacteriano a las 6 horas de incubación	31

6- Conclusión.....	34
7- Bibliografía.....	35

Índice de tablas

Tabla 1. Producción acuícola de los principales productores europeos. Fuente: FAO 2016.....	3
Tabla 2. Ingredientes y composición de los piensos empleadas en el estudio.....	14
Tabla 3. Información general sobre los genes candidatos a house keeping	16
Tabla 4. Composición de los medios Marine Broth y TSB.....	17
Tabla 5. Volúmenes y componentes de la PCR.....	19
Tabla 6. Información general sobre los genes empleados en el ensayo	22
Tabla 7. Resultados del ensayo para la determinación del gen de referencia	25
Tabla 8. p-values obtenidos trasel análisis multifactorial a las 4 horas.....	27
Tabla 9. P-values obtenidos en el análisis multifactorial a las 6 horas	28

Índice de figuras

Figura 1: Cantidad de pescado, en millones de toneladas, destinado a cada uso y suministro alimentario en kg per cápita en las fechas comprendidas entre 1950-2014. Fuente: FAO (2016)	2
Figura 2: Producción mundial de la pesca de captura y acuicultura en millones de toneladas. Fuente: FAO (2016)	2
Figura 3: A) Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas y por especies en el periodo 1060-2014 Fuente: FAO 2016. B) Evolución del valor de la producción de la acuicultura en España en millones de euros y por especie, en el periodo 1984-2014. Fuente: FAO 2016	3
Figura 4: Foto de una dorada. Fuente: www.nauticalnewstoday.com	4
Figura 5: Evolución de la producción de dorada de acuicultura en el área mediterránea y el resto del mundo en el periodo 1985-2015. Fuente: APROMAR (2016).....	6
Figura 6: Evolución de la producción acuícola de dorada en España (2006-2014). Se muestra la tasa de variación interanual. Fuente: www.observatorio-acuicultura.es	6
Figura 7: Evolución del precio de la harina de soja y de pescado entre los años 1986-2014.....	8
Figura 8: Esquema del diseño experimental en el que se refleja la procedencia de las distintas muestras.....	20
Figura 9: Media de la actividad LDH en el tejido a distintos tiempos en la sección anterior y posterior del intestino.....	24
Figura 10: Media de la actividad LDH en el medio de cultivo donde se han mantenido los fragmentos a distintos tiempos en la sección anterior y posterior del intestino. Diferentes letras indican grupos estadísticamente ($p < 0.05$) diferentes.	24
Figura 11: Expresión génica de EF1a, GAPDH, RPS18 y b-actina en el conjunto de muestras a tiempo inicial, a las 4 y a las 6 horas	25
Figura 12: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl en el grupo control a tiempo 0, y tras 4 y 6 horas de incubación. Diferentes letras indican grupos estadísticamente ($p < 0.05$) diferentes.	26
Figura 13: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles en intestino anterior y posterior tras 4 horas de incubación. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión.....	27

Figura 14: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles para peces alimentados con las distintas dietas a las 4 horas. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión..... 28

Figura 15: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles tras 6 horas de incubación con *P.anguilliseptica*, *V.algynoliticus* y *P.damselae*. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión..... 29

Figura 16: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles para peces alimentados con las distintas dietas a las 6 horas. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión..... 29

Índice de abreviaturas

β -Act: β -Actina

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

COX-2: ciclooxigenasa-2

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D.O: Densidad óptica

EF-1 α : Factor de elongación 1 α

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

FM: Dieta basada en harina de pescado

GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

HDL: lipoproteína de alta densidad

IgM: Inmunoglobulina M

IL-1 β : interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

I-Muc: mucina Intestinal

LDH: Lactato deshidrogenasa

Ocl: ocludina

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNA: Ácido ribonucleico

Rps18: Proteína ribosomal S18

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

U.F.C: Unidades formadoras de colonias

VM: Dieta con base vegetal

1. Introducción

1.1- Estado de la producción acuícola

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define la acuicultura como la “cría de organismos acuáticos, comprendidos peces, moluscos, crustáceos y plantas”.

Los primeros indicios de actividad acuícola se remontan al 2.500 a.C., donde se representa lo que pretendía ser una fase inicial de cultivo de peces en un estanque artificial. En 2014, los peces producidos a partir de la acuicultura ascendieron a 73,8 millones de toneladas, valorado en algo más de 142.200 millones de euros (FAO 2016).

Hoy en día el consumo de pescado forma parte de la tradición cultural contemporánea, siendo beneficioso tanto para la salud como nutricionalmente. El pescado contiene tanta proteína como la carne roja y menor cantidad de grasa, y además, está es rica en ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6) (FAO 2016), los cuales son esenciales para la formación de las membranas celulares o en la participación de la señalización celular (Hidaka et al. 2015). Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados tienen un efecto beneficioso tanto a nivel de prevención de enfermedades cardiovasculares (Lavie et al. 2009) como de recuperación de estas o aumento de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Albrektsen et al. 2001). El pescado también es una buena fuente de vitaminas y minerales destacando en el caso de las vitaminas la A, B5, B12 y D, y en los minerales principalmente fósforo, magnesio, selenio y yodo (FAO 2016).

En la actualidad, la acuicultura se postula como una solución para mantener el porcentaje actual de consumo de pescado en la dieta, ya que la pesca extractiva cubre con dificultades la demanda actual de pescado. Un ejemplo es China, siendo el país que más ha visto aumentada su producción acuícola en los últimos 40 años, llegando a representar hasta el 60% de la producción mundial (FAO 2016).

El aumento de la producción no sólo ha sido en China, sino a nivel mundial, y ha ido destinada casi en su totalidad a fines alimentarios, ya que desde 1960 el pescado destinado a usos no alimentarios se ha mantenido relativamente constante (Figura 1).

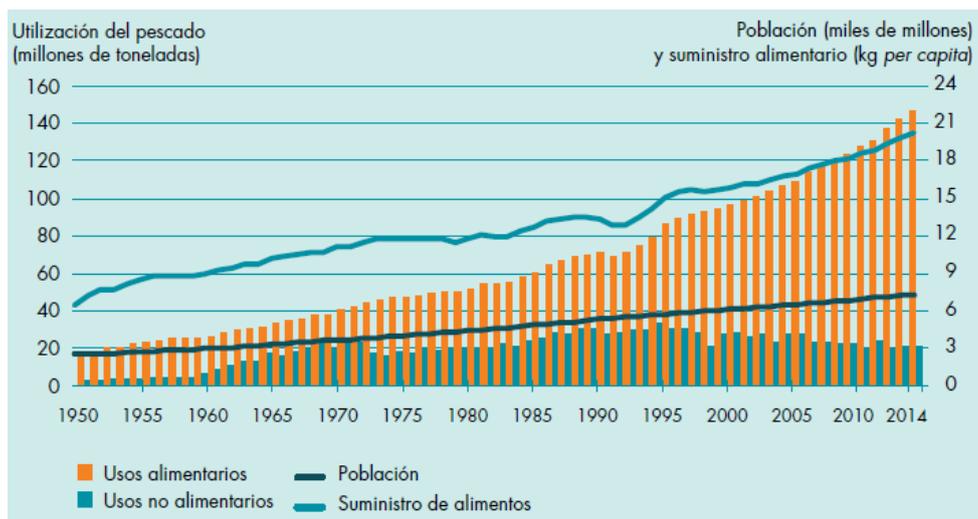


Figura 1: Cantidad de pescado, en millones de toneladas, destinado a cada uso y suministro alimentario en kg per cápita en las fechas comprendidas entre 1950-2014. Fuente: FAO (2016)

Según el Informe de la FAO sobre el estado de la pesca y la acuicultura en 2016, desde la década de los 60 se ha incrementado anualmente de media un 3,2% el consumo de pescado, mientras que en el mismo periodo la población ha crecido un 1,6%. Estos datos demuestran el incremento del número de proteínas procedente de fuente de pescado, llegando a aportar en 2013 el 17% de las proteínas de origen animal.

Desde finales de los años 80 la pesca de captura se mantiene bastante estable, mientras que la producción de pescado mediante acuicultura experimenta un aumento considerable (Figura 2). También cabe destacar como en los años 70 el porcentaje de pescado obtenido a partir de la acuicultura era aproximadamente del 5% mientras que en 2014 ya se encuentra entre el 40-50%.

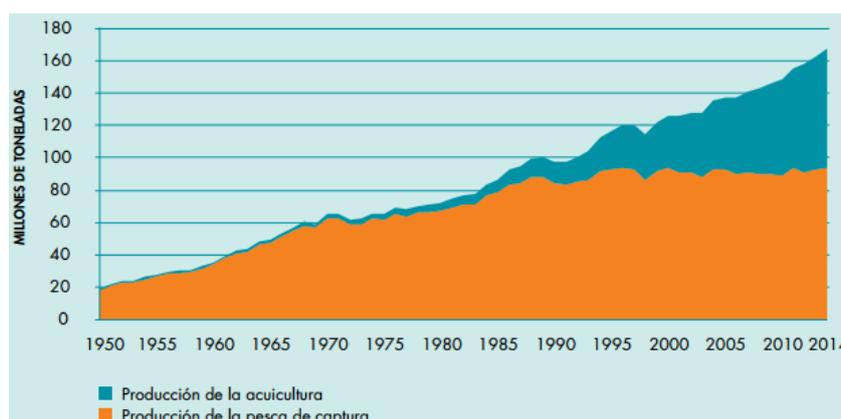


Figura 2: Producción mundial de la pesca de captura y acuicultura en millones de toneladas. Fuente: FAO (2016)

Analizando la producción europea, Noruega produce casi 1,250 millones de toneladas, alcanzando casi la mitad de la producción europea, siendo unas 5 veces mayor que en el segundo país productor, España seguido de Francia, Reino Unido, Italia, Rusia y Grecia (Tabla 1).

Tabla 1. Producción acuícola de los principales productores europeos. Fuente: FAO 2016

Producción		
Países	Toneladas	%
Noruega	1.247.865	44,9
España	223.707	8,0
Francia	201.860	7,3
Reino Unido	194.630	7,0
Italia	162.620	5,8
Rusia	154.653	5,6
Grecia	144.595	5,2

Si se analiza la producción española, la especie de mayor producción acuícola es el mejillón con una producción mucho mayor a la producción del segundo más abundante que sería la lubina (Figura 3A). Sin embargo, llama mucho la atención la gran diferencia de producción entre mejillón y lubina y la poca diferencia de ingresos que aporta cada una de estas, seguidas muy de cerca por la dorada (Figura 3B).

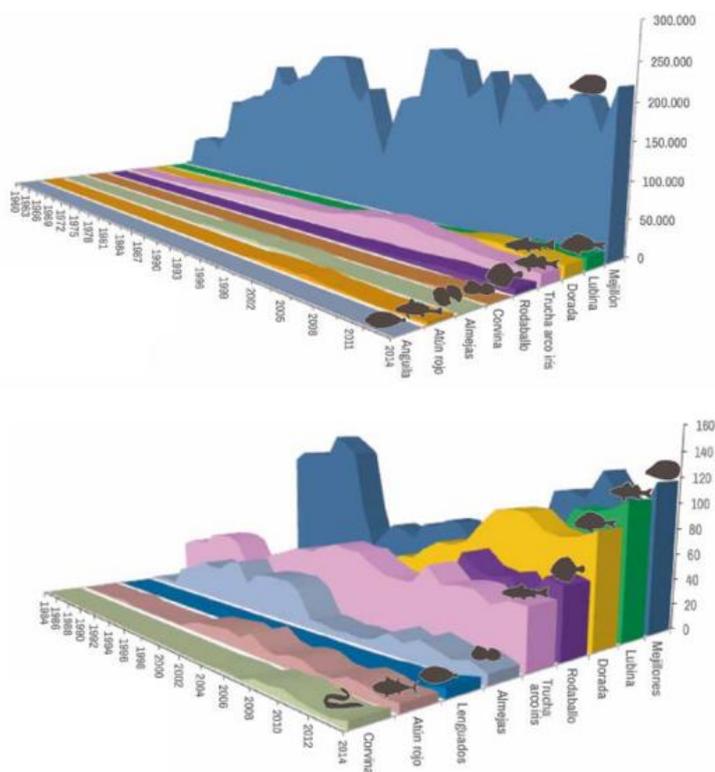


Figura 3: A) Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas y por especies en el periodo 1060-2014 Fuente: FAO 2016. B) Evolución del valor de la producción de la acuicultura en España en millones de euros y por especie, en el periodo 1984-2014. Fuente: FAO 2016

Se ha comprobado que la alimentación puede suponer el 50 % de los costes de producción de una piscifactoría marina de dorada (Castelló-orvay 2000; De Benito et al. 2015). Por lo tanto, una de las vías para aumentar la rentabilidad de la producción de una granja marina es disminuir

los costes por alimentación. Ya que disminuir la alimentación a los peces no es un opción viable, bajar los costes del pienso ha sido la estrategia por la cual generalmente se ha optado (Moldal et al. 2014). Inicialmente, los piensos se fabricaban utilizando harinas y aceites de pescado, que tienen un alto precio en el mercado y es necesario el uso de la pesca extractiva para su fabricación por lo que no es un proceso sostenible. La sustitución de las fuentes proteicas y lipídicas de pescado por materias primas de origen vegetal, de precio más reducido y menos fluctuante, han permitido bajar los precios de producción. Sin embargo, al observar los índices de conversión del pienso en explotaciones comerciales, se han observado menores valores, posiblemente debido a la alta cantidad de fuentes proteicas vegetales en la dieta de los peces carnívoros (APROMAR, 2014).

Siguiendo esta línea de trabajo, en el actual proyecto, se ha estudiado el efecto en la salud intestinal de la inclusión de fuentes de proteínas alternativas en la especie *Sparus aurata* (dorada).

1.2- La dorada

Sparus aurata, más conocida comúnmente como dorada o, en inglés, gilthead seabream es un pez que pertenece al Orden de Perciformes, Familia de Sparidae, Género *Sparus* y especie *aurata*.

1.2.1- Descripción

La dorada es un pez común de la zona del Mediterráneo y la costa del Atlántico correspondiente al espacio entre Gran Bretaña y Senegal que puede llegar a vivir hasta 10 años, pudiendo superar los 7 kg y los 70 cm de longitud, aunque su tamaño habitual no suele pasar los 50 cm y los 4 kg de peso, presentando mayor tamaño las hembras. Presentan un cuerpo ovalado, profundo y comprimido y una cabeza con un perfil también ovalado. Tiene unos ojos pequeños, una boca levemente oblicua con labios gruesos y 4-6 dientes anteriores de tipo canino en cada mandíbula, acompañados por una serie de dientes romos dispuestos en 2-4 filas (Figura 4) (Identidad 2010).



Figura 4: Foto de una dorada. Fuente: www.nauticalnewstoday.com

1.2.1.1- Condiciones ambientales

A pesar de ser un pez euritermo deja de alimentarse a bajas temperaturas (12-13 °C), siendo más resistente a altas temperaturas, con un crecimiento rápido a 25-26 °C. La dorada es un pez

que necesita unos niveles de oxígeno de 5-6 mg/L pudiendo sobrevivir hasta niveles de 3 mg/L. El pH adecuado de cultivo es similar al que tiene en el mar, alrededor de 8,3 (Identidad 2010).

Para la producción acuícola en tanques de engorde, se suele partir de juveniles de unos 45 días, los cuales se alimentan en un primer momento mediante sistema intensivo habiendo una densidad inicial de ejemplares de 10-20/litro, una temperatura y salinidad iniciales de 18 °C y del 35-37% respectivamente. Estas condiciones varían según van creciendo los ejemplares (Identidad 2010).

1.2.1.2- Ciclo vital y reproducción

Es una especie clasificada como hermafrodita proterándrica, lo que significa que en primer lugar maduran como machos, para posteriormente desarrollar un ovario. En su primer año de vida suelen ser inmaduros, aunque algunos pueden llegar a madurar como machos, sin embargo, la primera maduración sexual suele ocurrir durante el segundo año de vida. En este momento se desarrolla la parte ventral de la gónada, originando testículos funcionales. Después de este periodo se inicia la transformación sexual, que es concluida por aproximadamente un 80 % de la población a partir del tercer año de vida. El 20 % restante interrumpe los procesos de reversión y permanece como machos.

La maduración de la gónada se produce de forma progresiva, y esto se traduce en una puesta secuenciada que realiza durante 2-4 meses. El número total de huevos por hembra es variable, oscilando entre 500.000 y 3.000.000 huevos/kg de hembra. El diámetro de los huevos oscila entre 0,9 y 1 mm. En la naturaleza, la época de puesta se extiende de noviembre a febrero, aunque en función de la zona de puesta puede adelantarse o retrasarse algunas semanas.

1.2.2- Producción acuícola de la dorada

La dorada, es el tercer teleósteo de mayor producción acuícola en la Unión Europea (datos de Apromar, 2014), sólo por detrás de la trucha arco iris y el salmón atlántico. En el 2008 la producción alcanzó un valor máximo cercano a las 180 mil toneladas, a partir de este punto se produjo una bajada de la producción hasta 2011. La tendencia volvió a subir hasta las 180 mil toneladas nuevamente en 2013 donde se ha mantenido relativamente estable (Figura 5).

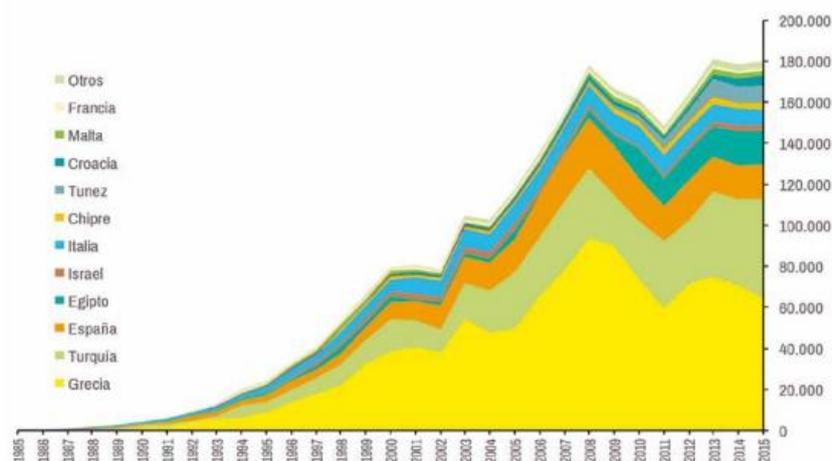


Figura 5: Evolución de la producción de dorada de acuicultura en el área mediterránea y el resto del mundo en el periodo 1985-2015. Fuente: APROMAR (2016)

En España el pico de producción se dio en 2008 registrando una bajada en los años sucesivos a excepción de 2012 (Figura 6).

El mercado de la dorada ha experimentado una serie de cambios en los últimos años, desde una producción de altos márgenes y bajos volúmenes a márgenes bajos y altos volúmenes. Los precios de la dorada comenzaron a bajar entre 1990 y 1995, aunque el beneficio seguía siendo suficiente para su producción, sin embargo, el precio siguió bajando hasta 2002 donde alcanzó su mínimo (2,9 euros/kg), disminuyendo el coste de producción debido a la excesiva producción por el desarrollo de las jaulas para la producción en masa (Bjørndal y Guillen 2017).

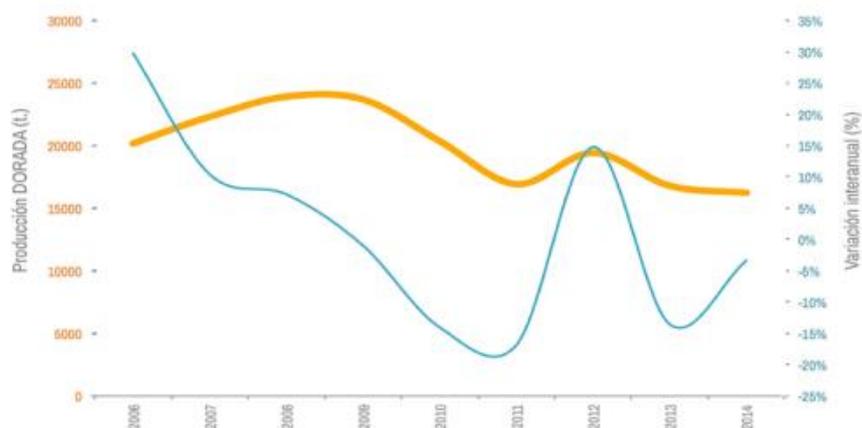


Figura 6: Evolución de la producción acuícola de dorada en España (2006-2014). Se muestra la tasa de variación interanual. Fuente: www.observatorio-acuicultura.es

La rentabilidad de la dorada estuvo comprometida, con la llegada de la crisis en 2008 y la bajada de los precios de venta, el sector de la dorada y lubina entro en pérdidas, de las que hoy en día todavía está intentando salir. La situación actual de la dorada está marcada por una pérdida de valor productivo probablemente producida por el estancamiento de los parámetros técnicos de producción de dorada tales como el índice de conversión. En los últimos años la subida de precios de alevines y alimentación ha influido negativamente en los resultados de económicos

obtenidos (STECF, 2014). Por lo tanto, la recuperación de la rentabilidad de la producción de la dorada, pasa necesariamente por una mejora de parámetros técnicos de alimentación.

1.3. Inclusión de materias primas vegetales: problemas y retos

En los últimos años, la baja disponibilidad y el aumento de precio de los ingredientes para la elaboración de los piensos para alimentación acuícola (harina de pescado y aceite de pescado) han supuesto un problema para la producción. Esto se ha visto acompañado de un aumento del precio final del pienso (Martínez-Llorens et al. 2012; Pereira y Oliva-Teles 2002). Como consecuencia del aumento del precio de las harinas y aceites de pescado, se han desarrollado nuevas líneas de investigación para la creación de dietas alternativas con un menor coste pero sin mermar la productividad.

Las harinas proteicas vegetales han sido la principal alternativa para disminuir la dependencia de la harina y el aceite de pescado, contribuyendo a su vez a la sostenibilidad y rentabilidad de la producción acuícola, ya que estos productos vegetales se producen localmente en los países de la Unión Europea con mayor producción acuícola (Adamidou et al. 2011; FAO 2016). Además, las fuentes proteicas vegetales presentan la ventaja de tener una composición nutricional relativamente constante, mayor disponibilidad y precios más competitivos (Pereira y Oliva-Teles 2002). Otra alternativa es la inclusión de fuentes proteicas de origen animal (no procedentes de pescado, ni de rumiantes), sin embargo, su inclusión está muy poco desarrollada ya que hasta 2013 las materias primas de origen animal estaban prohibidas (Comisión Europea 2013).

Una de las fuentes vegetales más utilizadas en acuicultura es la harina soja. Desde 1950 la cantidad de producción de soja se ha multiplicado por 15, localizándose en América el 80% de la producción mundial (Wang et al. 2015). La soja presenta un contenido relativamente alto de proteína cruda (37%), así como un buen equilibrio de aminoácidos esenciales, aunque es poco usada en la Unión Europea sobre todo en los alimentos sin procesar, ya que presenta el inconveniente de que incluye una gran cantidad de factores antinutricionales (Adamidou et al. 2011; Sitjà-Bobadilla et al. 2005; Wang et al. 2015).

El precio de la harina de pescado se ha disparado en los últimos años, sin embargo, el precio de la harina de soja, aunque también aumentó, no lo hizo de una forma tan acentuada (Figura 7).

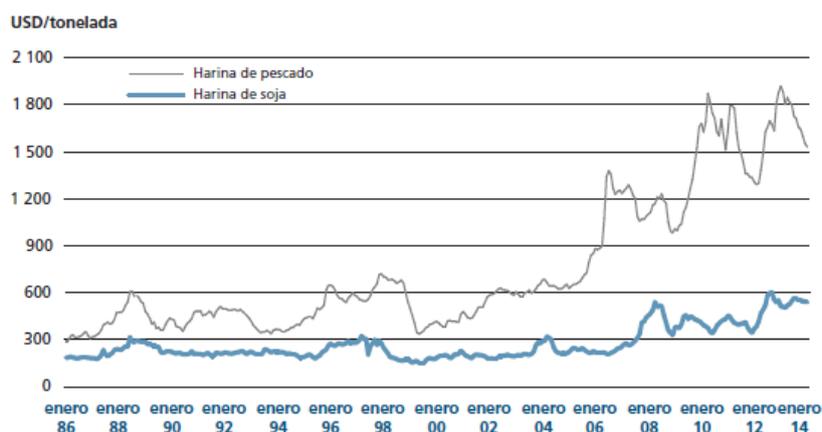


Figura 7: Evolución del precio de la harina de soja y de pescado entre los años 1986-2014

Otra fuente alternativa de origen vegetal utilizada en acuicultura es el gluten de trigo. Este presenta una buena digestibilidad, además es una fuente de proteína de alta calidad, altamente digestible, con un buen perfil de amino-ácidos (Apper-Bossard et al. 2013) para la alimentación de especies piscícolas. Prácticamente no se ha visto efecto de las sustancias antinutricionales que afecten a la absorción de nutrientes en peces, pudiendo llegar a sustituir en un 50% los componentes proteicos de pescado sin alterar el rendimiento (Apper-Bossard et al. 2013).

La harina de girasol también se ha utilizado como fuente proteica alternativa y se puede incluir en los piensos para peces marinos como el sargo picudo (hasta un 34,8%) sustituyendo así el 27% de la harina de pescado sin alterar el crecimiento de los peces (Nogales-Mérida et al. 2011). Sin embargo en dorada, una especie de hábitos más carnívoros, no se recomienda incluir más de un 10-12% en piensos, debido a que inclusiones más altas tiene efectos negativos sobre el crecimiento (Sánchez- Lozano et al. 2007).

También se ha pensado en emplear otros miembros de la familia de las leguminosas como fuente de proteína vegetal como garbanzos, ya que su cultivo es sencillo y requiere poca agua, además posee un 20% de proteína seca, aunque es deficiente en los aminoácidos metionina y cisteína (Oplinger et al. 1990). Otra fuente sería la semilla de algarroba, esta presenta una cantidad en seco de proteínas de un 45-50% y es menos costoso que la harina de soja, pero presenta el problema de que no se han observado deficiencias en el crecimiento cuando la sustitución supera el 34%, lo cual puede ser debido a la baja digestibilidad de la proteína y el bajo contenido en aminoácidos esenciales (Alexis 1990; Martínez-Llorens et al. 2012).

En conclusión, las fuentes proteicas vegetales son más rentables económicamente y tienen una mayor disponibilidad. Sin embargo, presentan una serie de deficiencias nutricionales, especialmente en algunos aminoácidos esenciales, y pueden provocar además alternaciones especialmente a nivel intestinal, que se ve traducido en una disminución del peso final del animal (Gómez-Requeni et al. 2004). El principal problema de las fuentes vegetales en alimentación de peces es el alto contenido de factores antinutricionales, como inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas y alérgenos entre otros, que pueden disminuir la actividad enzimática o formar complejos con minerales y proteínas, modificando de esta forma los procesos de digestión, limitando la biodisponibilidad de nutrientes e incluso pueden producir cambios

histológicos derivando en un daño en los procesos de absorción intestinal (Estruch et al. 2015; Santigosa et al. 2008).

Sin embargo estas alteraciones varían mucho en función de la fuente vegetal, el porcentaje de ésta en los piensos, las sinergias de diversos componentes antinutritivos y con otras fuentes vegetales, el peso y la especie del animal (Mart et al. 2016; Martínez-Llorens et al. 2012). Por tanto, es necesario aumentar el esfuerzo de las investigaciones encaminadas a disminuir la dependencia de las harinas de pescado en la alimentación de peces carnívoros, y aumentar así la productividad y sostenibilidad de la producción acuícola.

1.4. Efecto de la inclusión dietaria de fuentes vegetales en la fisiología digestiva de los peces

El intestino, además de su función en la digestión de los alimentos, juega un papel crucial en la respuesta inmunitaria (Guardiola et al. 2014; Kormas et al. 2014). El intestino es la primera línea de defensa ante una posible invasión microbiana, por lo que ha desarrollado mecanismos de defensa tanto innata como adaptativa que sirvan de defensa ante un amplio espectro de patógenos (Guardiola et al. 2014).

Hasta la actualidad, existe un conocimiento limitado acerca de los mecanismos de defensa de la mucosa epidérmica de peces, aunque se encuentran ambos mecanismos de defensa innatos constitutivos e inducibles. Dentro de las moléculas inmunes que se encuentran en el moco del pez se incluyen lisozimas, inmunoglobulinas, aglutinina, calmodulina, interferón, proteína C-reactiva, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, o vitelogenina (Guardiola et al. 2014).

En estudios anteriores se ha analizado durante 2 y 4 semanas la inclusión en el pienso de microalgas en doradas de un peso aproximado de 100 gramos, con el fin de observar el efecto en la actividad inmune. Los resultados mostraron que la alimentación con microalgas afectaba a la actividad del complemento hemolítico, capacidad fagocítica, la expresión de β -defensina, MHCII α y CSF-1R (Cerezuela et al. 2012).

También, se han realizado estudios sobre la inclusión en el pienso de inulina a partir de microalgas y de *Bacillus subtilis* en doradas de un peso aproximado de 50 gramos durante 4 semanas. Analizando los efectos, se ha visto que se produce una respuesta inflamatoria en el intestino y una variación en la integridad de la mucosa. Esta adición de componentes vegetales produjo un aumento en la respuesta inflamatoria y de la expresión de los genes involucrados en la integridad de la mucosa (Cerezuela et. al 2013b).

En otro trabajo (Montero et al. 2010) se ha estudiado, con doradas de 35 gramos de peso aproximado, los efectos de la sustitución total (100%) y parcial (hasta 70%) de los componentes de las harinas animales por lino o soja. Estos peces se alimentaron durante 80 días con piensos experimentales y tras este periodo, fueron expuestos a un patógeno intestinal (*Photobacterium damsela sub.piscicida*) con el objetivo de estudiar la respuesta inmune e inflamatoria. Tras la realización del estudio se observó una respuesta inflamatoria 3 días después de administrar bacterias infecciosas en el agua, además de presentar una menor respuesta inmune que los peces alimentados con harina de pescado.

Estos cambios en la dieta no solo pueden afectar la integridad del epitelio o la respuesta inmune del intestino, sino que también pueden producir alteraciones en la microbiota intestinal (Chen et al. 2014; Estruch et al. 2015; Kormas et al. 2014). Se ha observado que las fuentes proteicas de origen vegetal pueden afectar tanto la fermentación bacteriana como a la función de barrera del intestino. La microbiota intestinal juega un papel crucial en el metabolismo del huésped optimizando la obtención de energía de los alimentos, como por ejemplo, degradando polisacáridos que el huésped no puede digerir (Chen et al. 2014).

En conclusión, el perfil de la microbiota intestinal también se ha relevado como un factor muy relevante a tener en cuenta a la hora de evaluar la inclusión de fuentes alternativa.

1.5 Desarrollo de sistemas de cultivo de tejido *in vitro*

Las aproximaciones realizadas para evaluar la respuesta inmune de los teleósteos ante fuentes alternativas de alimentación han sido variadas. En trabajos anteriores (Cerezuela et al. 2012; Pérez-Jiménez et al. 2013) realizaron muestreos de sangre para medir la cantidad de proteína producida como respuesta a un inmunoestimulante u observar el nivel de absorción de lípidos.

En otros trabajos se evaluó la respuesta inmune de la mucosa, midiendo la cantidad de algunos de los principales componentes inmunes humorales, como la inmunoglobulina M, involucrados en la protección de los peces contra la infección patógena (Palaksha et al. 2008). Para realizar este análisis, se empleó un método que consistía en raspar el moco con una espátula de goma suave sin dañar el tejido para no arrastrar sangre ni otras secreciones.

Se han realizado trabajos que combinan tanto técnicas *in vivo* como *in vitro*, para comprobar los resultados y aportar mayor robustez. En un estudio de determinación de la respuesta inmune y los procesos inflamatorios en dorada, se quiso evaluar los efectos de una alta sustitución de componentes en el pienso por sustancias de origen vegetal frente a una exposición a *Vibrio anguillarum*. Para ello, primero se realizó la exposición *in vivo*, además de una exposición *in vitro* mediante tejidos y se midió la expresión de genes representativos relacionados con la respuesta inmune y los procesos inflamatorios.

Otra técnica empleada en teleósteos (Løvmo Martinsen et al. 2011) para evaluar la capacidad infectiva de bacterias en el intestino, y así estudiar cómo cambia la microbiota, se desarrolló llevando a cabo un ensayo *in vitro* en el que se extraía todo el intestino, se ataban fuertemente por el extremo posterior introduciendo en su interior solución salina o diluciones bacterianas de interés.

El hecho de evaluar la alimentación de los peces carnívoros con fuentes proteicas vegetales *in vivo* supone utilizar un alto número de animales. Además, el estudio del efecto del pienso sobre el sistema inmune, implica someter a los peces a unas condiciones de estrés, ya sean ambientales, o patológicas. En ambos casos, estas metodologías son contrarias al criterio de las 3R del bienestar animal (Annas et al. 2014).

Por otro lado, el desarrollo de técnicas *in vitro* nos permiten confirmar resultados previamente obtenidos en experimentos *in vivo*, como es el caso del presente estudio.

Actualmente, en teleósteos, el método más aceptado para la realización de retos bacterianos es el descrito por Løvmo Martinsen et al (2011). Sin embargo, en el actual trabajo se ha desarrollado una nueva metodología basada en el cultivo de tejidos, que permite disminuir en mayor medida el número de peces. Además, el uso de tejidos intestinales permite realizar estudios donde se prefijan las condiciones experimentales (Lodish, et al. 1995), como los componentes del medio, simulando lo máximo posible, un ambiente concreto para ver la respuesta.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar *in vitro* la respuesta inmune del intestino ante diferentes retos bacterianos en función de la dieta administrada antes del sacrificio, con el objetivo de evaluar si una alimentación basada en un 100% de fuente proteica vegetal puede inducir una inmunodepresión a nivel intestinal.

Por otro lado, los objetivos específicos se describen a continuación:

- I. Poner a punto un ensayo de cultivo de tejidos de intestino de dorada en condiciones de cultivo *in vitro*
- II. Estudiar el efecto de distintos estímulos bacterianos sobre la expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios, inmunes y con la integridad epitelial en el intestino de dorada en condiciones *in vitro*.
- III. Evaluar la respuesta diferencial a los estímulos de los tejidos de intestino obtenidos de secciones distintas del tracto intestinal y de peces alimentados con piensos distintos.

3. Materiales y métodos

3.1- Aspectos éticos

El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), siguiendo el Real Decreto 53/2013 y la Directiva Europea 2010/63 / UE sobre la protección de los animales utilizados para la investigación científica.

Los peces fueron pesados cada 30 días y se empleó aceite de clavo con un 87% de eugenol (Guinama[®], Valencia, España) como anestésico (1mg / 100mL de agua) para minimizar el dolor del animal durante los muestreos mensuales.

3.2- Dietas empleadas en el ensayo

Los piensos utilizados en este trabajo se fabricaron en la fábrica de piensos de la Universitat Politècnica de València utilizando un extrusor semi-industrial de doble tornillo (CLEXTRAL BC-45, Firminy, St Etienne, Francia).

Se elaboraron dos piensos distintos, isonitrogenadas e isoenergéticas, con un 42% de proteína digestible y un 91% de materia seca, utilizando los ingredientes que aparecen en la Tabla 2:

- **Pienso con base vegetal (VM):** Se basa en una mezcla de harinas vegetales como fuente de proteínas, e incluye aminoácidos sintéticos para cumplir con los requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales para la alimentación de la dorada (Peres y Oliva-Teles 2009).
- **Pienso basado en harina de pescado (FM):** La proteína fue proporcionada por harina de pescado y se incorpora la harina de trigo como fuente de carbohidratos. En este caso no se incluyeron aminoácidos sintéticos.

Tabla 2. Ingredientes y composición de los piensos empleadas en el estudio

Ingredientes (g kg⁻¹)	VM	FM
Harina de pescado		589
Harina de trigo		260
Gluten de trigo	295	
Harina de frijol	41	
Harina de soja	182	
Harina de guisante	41	
Harina de girasol	158	
Aceite de pescado	90	38.1
Aceite de soja	90	92.9
Lecitina de soja	10	10
Mezcla de vitaminas y minerales*	10	10
Fosfato cálcico	38	
Arginina	5	
Lisina	10	
Metionina	7	
Taurina	20	
Treonina	3	

* Mezcla de vitaminas y minerales (los valores son g*kg-1, excepto los que están entre paréntesis): 25; Colina, 10; DL - atocoferol, 5; Ácido ascórbico, 5; (PO₄)₂Ca₃,5; Acetato de retinol, 1 000 000 (IU kg-1); Calciferol, 500 (IU kg - 1); DL-a-tocoferol, 10; Menadiona bisulfito sódico, 0,8; Clorhidrato de tiamina, 2,3; Riboflavina, 2,3; Clorhidrato de piridoxina, 15; Cianocobalamina, 25; Nicotinamida, 15; Ácido pantoténico, 6; Ácido fólico, 0,65; Biotina, 0,07; Ácido ascórbico, 75; Inositol, 15; Betaína, 100; Polipéptidos 12.

3.3- Alimentación y crecimiento de los peces

El ensayo de crecimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Politécnica de Valencia. Se utilizaron dos tanques de fibra de vidrio, con una capacidad de 1750L, en un sistema de recirculación de agua salada (75m³ de capacidad) con un filtro mecánico rotativo y un biofiltro de gravedad de 6m³ de capacidad. Las condiciones de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH del agua fueron de 22.0±0.52 °C, 30±1.7gL⁻¹, 6.5±0.49 mgL⁻¹ y 7.5 - 8.5, respectivamente.

Los alevines fueron suministrados por la empresa BERSOLAZ (Bersolaz Spain, S. L. U., Culmarex), y se alimentaron con un pinso comercial estándar (55.2% de proteína cruda, 17.3% de grasa, 11.6% de carbohidratos, 9.4% de cenizas y 6.4% de humedad) durante su aclimatación a las nuevas condiciones de cultivo. El experimento se inició, dos semanas después, con un peso medio inicial de los alevines de 9,6±1,9 g, y los peces fueron distribuidos de forma aleatoria en los dos tanques (n=50), asignándole a cada uno un pienso experimental: VM y FM.

Los peces fueron alimentados a saciedad dos veces al día (9:00 y 17:00) durante seis días a la semana. Tras 120 días, 6 peces por tanque fueron utilizados para llevar a cabo el ensayo *in vitro*.

3.4 Puesta a punto del ensayo

El diseño experimental empleado en este trabajo se basa en el estudio previo de (Bäuerl et al. 2013), en el cual, a partir de un experimento *in vitro* con tejidos de colon humanos, se estudia

la respuesta inflamatoria e inmunitaria del epitelio intestinal tras la exposición a diferentes retos bacterianos (*L. paracasei* BL23 y *L. plantarum* 299v).

3.4.1- Obtención de los tejidos intestinales

Para la puesta a punto del ensayo, dos peces fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico (benzocaína 60 ppm durante 10 minutos) y posteriormente diseccionados para obtener el tracto digestivo. Se obtuvieron dos réplicas técnicas de cada sección para cada pez de 16 mm². Los fragmentos se introdujeron en placas de cultivo con membranas de poliéster (Corning Netwell inserts). Cada fragmento se colocó en un pocillo individual, siempre con la sección epitelial hacia arriba, inmersas en 1 mL de medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) independiente de CO₂ suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino al 5% y 1% v/v de L-glutamina 1x.

3.4.2- Prueba de mantenimiento de la integridad

Previamente a la realización del ensayo, se determinó el tiempo durante el cual el tejido del intestino mantenía su integridad en las condiciones de cultivo *in vitro*. Para ello se determinó la actividad enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el tejido y en el medio de cultivo DMEM a distintos tiempos.

La LDH es una enzima ubicua que cataliza la reacción de producción de lactato a través de la reducción de piruvato durante la glucólisis anaeróbica. Por lo tanto, midiendo el nivel de LDH que se encuentra en el medio extracelular, se puede determinar la integridad de las células ya que un alto nivel de LDH en el medio sería indicativo de necrosis celular ya que se trata de un enzima citosólico (Joshi y Golgire 2014).

Los fragmentos obtenidos fueron colocados en las placas con los insertos, tal y como se detalla en el punto 3.4.1. Las muestras de tejido se recuperaron a las 6 y a las 24 horas (una réplica de cada pez y sección), mientras que el medio de cultivo se aspiró parcialmente (100 µL de cada pocillo) a las 4 horas (generando un pool para cada sección), y de manera total a las 6 y a las 24 horas (de aquellos pocillos de los que se retiró el fragmento a la misma hora).

Se empleó un kit comercial (BioSystems S. A., Barcelona, Spain) para determinar la actividad LDH.

- En el caso de los fragmentos de tejido, se homogeneizó el fragmento (16 mm²) en 2 mL de buffer Tris-HCl, 100 mM a pH 7.4, manteniéndolo siempre en hielo y a continuación se centrifugó (12.000 rpm, 15 min, 4 °C). Posteriormente, se realizó el ensayo de la actividad LDH, siguiendo las instrucciones del kit, registrando la caída de la absorbancia a 340 nm en el sobrenadante. Finalmente, y tras la obtención de la actividad LDH por L (1), se determinó la concentración de proteína mediante un ensayo Bradford para obtener la actividad específica (U/g proteína).

- En el caso del medio, se centrifugaron directamente las muestras en las mismas condiciones anteriores, se determinó la variación de la absorbancia a 340 nm con el tiempo y se obtuvo la actividad LDH por unidad de volumen (1).

$$(1) \quad \frac{U}{L} = \frac{Vt \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} * \Delta A / \text{min} \quad (1)$$

Donde el coeficiente de absorción molar (ϵ) del NADH a 340 nm es $6300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, el paso de luz (l) es 1 cm, el volumen total de reacción (Vt) es 1,02 mL, el volumen de muestra (V_s) es 0,02 mL.

3.4.3- Elección del gen de referencia (House keeping)

Con el objetivo de seleccionar el mejor gen de referencia para el experimento, se seleccionaron 4 genes de referencia candidatos: Elongation Factor 1α , Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Ribosomal Protein S18 y β -Actina, cuyas secuencias de cebadores se encuentran reflejadas en la tabla 3.

Tabla 3. Información general sobre los genes candidatos a house keeping

Gene	Abbreviation	GeneBank ID	Primer Forward	Primer Reverse	Lenght	Reference
Elongation Factor 1α	EF- 1α	AF184170	CTGTCAAGGAAATCCGTCGT	TGACCTGAGCGTTGAAGTTG	87	Cerezuela et al 2013b, Reyes-Becerril et al. 2013
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	DQ641630	CCAACGTGTCAGTGGTTGAC	AGCCTTGACGACCTTCTTGA	80	Couto et al. 2014
Ribosomal Protein S18	Rps18	AM490061	AGGGTGTGGCAGACGTTAC	CGCTCAACCTCCTCATCAGT	97	Couto et al. 2014
β -Actin	β -Act	X89920	TCTGTCTGGATCGGAGGCTC	AAGCATTTCGGTGGACG	113	Montero et al. 2010

Para determinar qué gen presentaba mayor estabilidad en nuestro conjunto de muestras, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR) para determinar la expresión de éstos genes en un pool de muestras ($n=6$): a las 0, 4 y 6 horas de incubación tanto en la sección anterior como posterior del intestino. La estabilidad se analizó gracias al programa BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) a partir de los valores de Ct obtenidos.

3.5- Reto bacteriano

3.5.1- Puesta a punto del reto bacteriano

Los cultivos bacterianos empleados en este experimento se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las cepas bacterianas escogidas para el ensayo fueron: *Vibrio alginolyticus*, *Photobacterium damsela* sbsp *Piscicida* y *Pseudomonas anguilliseptica* ya que estas bacterias son las causantes de las principales enfermedades gastrointestinales en dorada (vibriosis, pasteurelosis y el síndrome de la enfermedad de invierno respectivamente) (Identidad 2010).

3.5.1.1- Recuperación de los liofilizados

La recuperación del liofilo se llevó a cabo en condiciones estériles. Se resuspendió la bacteria en medio de cultivo líquido, guardando parte del liofilo resuspendido como un glicerinado (20% el glicerol al 80% y 80% bacteria en medio de cultivo). Paralelamente, se realizó una siembra en triple estría a partir del liofilo resuspendido, y a su vez se realizó un cultivo líquido en un matraz Erlenmeyer, introduciendo el resto del liofilo restituido en medio de cultivo líquido.

Los medios de cultivo utilizados fueron el Marine Broth para *V. alginolyticus* y *P. damsela*, y el Tryptic Soy Broth (TSB) para *P. anguilliseptica* (tabla 3), que son los medios recomendados por la CECT para estas cepas bacterianas. En el caso de los cultivos en placa, se empleó agar para conseguir los medios sólidos. Todos los cultivos fueron mantenidos a 26° C. En el caso de los cultivos líquidos, los matraces empleados se mantuvieron en agitación (200 rpm).

Tabla 4. Composición de los medios Marine Broth y TSB

TSB	MARINE BROTH	g/L	uL/L
	Bactopeptona	5	
	Extracto de levadura	1	
	Citrato de Fe(III)	0,1	
	NaCl	19,45	
	Na ₂ CO ₃	0,16	
	NaSO ₄	3,24	
	CaCl ₂ *	1,8	
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	18,78	
	KCl	0,55	
	KBr	0,08	
	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,0571	
	H ₃ BO ₃	0,022	
	Na-Silicate		2,88
	NaF		2400
	(NH ₄)NO ₃	0,0016	
	Na ₂ HPO ₄	0,008	
Caldo soja Trypticaseina		30	

El crecimiento bacteriano se verificó observando la densidad y opacidad del medio en el matraz, y la densidad óptica que alcanza como máximo este cultivo. Por otro lado, se observó el crecimiento de las bacterias en medio sólido y se verificó mediante observación que se trataba de cultivos puros.

3.5.1.2- Preparación de curvas de calibrado de Densidad óptica (DO) – Unidades formadoras de colonias (UFC)

Se construyeron rectas de calibrado, para cada una de las cepas, que permitían relacionar la densidad óptica con el número de unidades formadoras de colonias.

Para ello, se generaron dos diluciones (2:3 y 1:3) de cada uno de los cultivos líquidos crecidos, obteniéndose 3 cultivos para cada bacteria, y se determinó la DO de cada uno. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los cultivos (desde 10^{-1} a 10^{-6}) y se realizó una siembra en placa. Finalmente, se realizaron los recuentos de las colonias en aquellas placas que contenían entre 20 y 400 ufc, y se obtuvo la relación de las ufc/mL con la DO del cultivo, teniendo en cuenta las diluciones realizadas para cada placa y los volúmenes empleados en las siembras. Las curvas de calibrado obtenidas fueron:

Vibrio alginolyticus: $UFC/mL = 2 \cdot 10^9 \cdot DO - 4 \cdot 10^8$

Photobacterium damsela subsp piscicida: $UFC/mL = 2 \cdot 10^8 \cdot DO + 3 \cdot 10^6$

En el caso de *Pseudomonas anguilliseptica*, las colonias formaban agregados y no fue posible obtener una relación entre las UFC y la DO. Como alternativa, se realizó un recuento en cámara Thoma de las diluciones del cultivo de *Pseudomonas* de DO conocida, tras una tinción con azul de metileno y sonicación. No obstante, las bacterias seguían sin poder ser contadas con claridad, con lo que se decidió utilizar la curva de calibrado obtenida para *P. damsela subsp. piscicida* para ajustar la concentración de *P. anguilliseptica*.

3.5.1.3 Preparación de amplicones 16S de las bacterias para secuenciación

Para asegurar que los estímulos bacterianos se preparaban con cultivos puros, se dispusieron cultivos líquidos a partir de colonias individuales obtenidas de los cultivos en placa. Posteriormente, se centrifugaron las muestras de cultivo líquido crecido (200 mL) durante 3 min a 4 °C y 11.000 g y el pellet se resuspendió en agua milliQ.

Se llevó a cabo la extracción de RNA total empleando el kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel®, Duren, Germany). Posteriormente las muestras se sometieron a un tratamiento de DNAsas y purificación utilizando el kit comercial RNA clean-up (Macherey-Nagel®, Duren, Germany).

Se realizó una PCR a partir de los reactivos de la tabla 4 para amplificar el gen 16S de la muestra bacteriana. Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos a 72 °C; a continuación 30 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C y 1 minuto a 72 °C; y por último 5 minutos a 72°.

Posteriormente, se preparó un gel de agarosa (al 1,4 o 2%) y se realizó una electroforesis para comprobar el tamaño del producto de amplificación, de aproximadamente 500 pares de bases (pb). Finalmente, se realizó una purificación en columna, se comprobó, mediante nanoespectrofotometría, que la concentración de DNA final en las muestras era superior a 20 ng/ mL, y se enviaron las muestras al Servicio de Secuenciación de la Universitat de València, que confirmó la pureza de los cultivos.

Tabla 5. Volúmenes y componentes de la PCR

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
<i>PCR Buffer</i>	10X	1X	5
<i>dNTPs</i>	2,5 mM	0,2 mM	4
<i>Primer 27F</i>	25 mM	0,5 mM	1
<i>Primer 558R</i>	10 mM	0,5 mM	2,5
<i>Taq Biotools</i>	50X	1X	1
<i>H2O</i>			35,5
<i>Muestra</i>			1
			50

3.5.1.4 Preparación de los estímulos bacterianos

El día del experimento se determinó la DO de cultivos líquidos frescos (2 días de crecimiento a 26º C). Empleando las curvas de calibrado, se calculó el volumen necesario de cultivo para obtener el número de ufc necesarias para obtener una concentración final en el medio DMEM de $3 \cdot 10^7$ ufc/mL, en el caso del *Vibrio alginolyticus*, y de $1 \cdot 10^7$ ufc/mL para *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas anguilliseptica*.

Para ello, se centrifugó el volumen necesario durante 3 min a 11.000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se lavó con PBS y finalmente se resuspendió en el volumen adecuado de medio DMEM.

3.5.2- Obtención de los intestinales

Seis peces de cada grupo experimental (VM y FM) fueron sacrificados como se especifica en el punto 3.4.1. Se separó el intestino en dos partes, intestino anterior y posterior, guardándose 4 fragmentos (réplicas técnicas) de 16 mm² de cada sección. Los fragmentos de dos de los seis peces de cada grupo experimental (de ambas secciones) se emplearon para la obtención de las muestras iniciales a tiempo 0, y fueron directamente guardados en un medio comercial de conservación de la integridad del material genético (RNA later; Qiagen, España), almacenados a 4º C durante la noche y guardados finalmente a -20º C hasta la etapa de extracción del RNA. Los otros fragmentos (de cuatro peces por grupo experimental) fueron utilizados para el ensayo *in vitro*.

3.5.3- Ensayo *in vitro*

Los fragmentos se introdujeron en placas de cultivo con las condiciones base especificadas en el punto 3.4. En este medio se resuspendieron los distintos cultivos bacterianos, existiendo 4 ‘tratamientos distintos’:

- Medio DMEM con *Vibrio alginolyticus*
- Medio DMEM con *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*
- Medio DMEM con *Pseudomonas anguilliseptica*

- Medio DMEM sin presencia de bacterias (tratamiento control)

Las réplicas técnicas obtenidas de un mismo pez y sección (para cuatro peces de cada dieta) fueron colocadas pocillos con tratamientos distintos. Cada pocillo contenía previamente 1 mL de medio DMEM con un estímulo distinto, y posteriormente a la adición de los tejidos, se adicionaron 100 μ L del mismo medio a cada pocillo.

Tras la preparación de las placas, los tejidos se mantuvieron en un incubador a 24°C y sin control de CO₂. A las 4 horas, los fragmentos de dos peces por grupo experimental fueron recogidos en RNA later y almacenados de la misma manera que los fragmentos iniciales. Finalmente, a las 6 horas, se recogieron en RNA later los fragmentos que quedaban en incubación (de dos peces de cada grupo experimental). La elección de los tiempos "4 horas" y "6 horas" se justifican de acuerdo a la prueba de mantenimiento de la integridad, detallada en el punto 3.4.2 y cuyos resultados se muestran en el punto 4.1.

Por otro lado, se midió el pH del medio de incubación a las 4 y a las 6 horas, puesto que la acidificación excesiva del medio podría tener un efecto inflamatorio sobre los tejidos, siendo importante comprobar que esta no se produce y no interfiere con los resultados reales a consecuencia del reto bacteriano.

En definitiva, en el experimento se consideraron 2 grupos experimentales distintos (VM y FM), 2 secciones (intestino anterior y posterior), 4 tratamientos distintos (control, *V. alginolyticus*, *P. damselae subsp. piscicida* y *P. anguilliseptica*) y dos tiempos de incubación (4 y 6 horas). El número de réplicas biológicas para cada condición específica fue de 2 (n=2) (Figura 8).

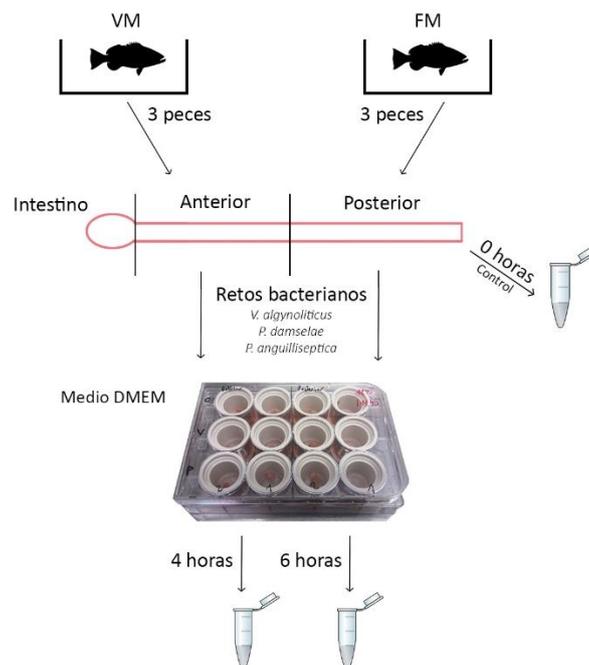


Figura 8: Esquema del diseño experimental en el que se refleja la procedencia de las distintas muestras

3.5.4- Evaluación de la expresión génica

3.5.4.1- Extracción, determinación de calidad y concentración de RNA

La obtención del RNA total se realizó mediante el método de extracción convencional Fenol-Cloroformo usando Trizol (Invitrogen SA, Barcelona, España). Posteriormente las muestras se purificaron y se eliminó las posibles contaminaciones de DNA utilizando el kit comercial NucleoSpin RNA Clean-up XS (Alemania). Finalmente, se calculó tanto la calidad como la concentración del RNA total mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Fisher Scientific SL, España). Se catalogaron con buenas las muestras que registraron un ratio de $A_{260/280}$ entre 1,8-2.

Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la etapa de síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), para evitar la degradación del RNA.

3.5.4.2- Paso de las muestras a cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 1 g de RNA total, con un volumen final de reacción de 20 mL, siguiendo las instrucciones del kit comercial qScript (Quanta BioScience) y utilizando el termociclador Applied Biosystems 2720. Los tiempos y ciclos de la reacción de PCR fueron de 5 min a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 30 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5 min a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez obtenido el cDNA se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.4.3- Ensayo de RT-qPCR

3.5.4.3.1- Análisis de la expresión génica influencia por los retos bacterianos

Se analizó la expresión de 3 genes relacionados con la inflamación: Interleukin 1β e Interleukin 6, se seleccionan porque se ha demostrado su importancia como marcador de la inflamación; y Cyclooxygenase 2 debido a su relación con los procesos inflamatorios y al poco conocimiento que existe en el comportamiento de este gen (Cerezuela et al. 2013b; Di Paolo y Shayakhmetov 2016; Reyes-Becerril et al. 2013). También se estudiaron 2 genes relacionados con el sistema inmune: Intestinal Mucin, se ha visto que es el más regulado por el fondo nutricional dentro de todas las mucinas que hay en el intestino (Pérez-Sánchez et al. 2013); e Immunoglobulin M, es el anticuerpo en peces por excelencia (Palaksha et al. 2008). Además para medir la integridad del epitelio intestinal se estudió el gen Occludin ya que se ha visto que tiene un importante papel como proteína de unión intermembrana en el intestino de muchos vertebrados (Adamidou et al. 2011; Reyes-Becerril et al. 2013). Los cebadores utilizados para la reacción de amplificación están reflejados en la tabla 6.

Tabla 6. Información general sobre los genes empleados en el ensayo

Gene	Abbreviation	GeneBank ID	Primer Forward	Primer Reverse	Length	Reference
Interleukin 1 β	IL-1 β	AJ277166	GCGACCTACCTGCCACCTA CACC	TCGTCCACCGCTCCAGAT GC	131	Couto et al. 2014
Interleukin 6	IL-6	AM749958	AGGCAGGAGTTTGAAGCT GA	ATGCTGAAGTTGGTGGAA GG	101	Cerezuela et al. 2013b
Cyclooxygenase 2	COX-2	AM296029	GAGTACTGGAAGCCGAGC AC	GATATCACTGCCGCCTGA GT	192	Cerezuela et al. 2013b; Reyes-Becerril et al. 2013
Intestinal Mucin	I-Muc	JQ277712	GTGTGACCTTCCGTTA	GCAATGACAGCAATGACA	102	Pérez-Sánchez et al. 2013
Immunoglobulin M	IgM	JQ811851	TCAGCGTCCTTCAGTGTTA TGATGCC	CAGCGTCGTCGTCAACAA GCCAAGC	131	Estensoro et al. 2012
Occludin	Ocl	JK692876	GTGCGCTCAGTACCAGCAG	TGAGGCTCCACCACACAG TA	81	Cerezuela, et al. 2013b; Reyes-Becerril et al. 2013

3.5.4.3.2- Condiciones empleadas en RT-qPCR

Para este estudio se empleó el modelo de termociclador 7500 de Applied Biosystems con SYBR® Green (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) como sistema de detección.

Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos y cada reacción se llevó a cabo por duplicado. En cada pocillo se adicionó 20 μ L de volumen final de los cuales 5 μ L se obtienen de la muestra de cDNA diluido 1:40, 10 μ L correspondían a la solución SYBER Green Master Mix, 1 μ L de cada uno de los de primers del gen que se estudia en esa reacción a 5 mM y 2 μ L de la referencia pasiva ROX™ (6-carboxi-X-rhodamina) a 100 nM para normalizar las reacciones y evitar interferencias por error de pipeteo o evaporación de muestras.

Un pool de cDNA de varias muestras se incluyó en cada ensayo y actuando como calibrador, y un blanco para cada par de cebadores, en el que el cDNA se reemplazó por agua, se incluyó en todas las placas. La RT-qPCR consistió en un primer paso de 2 minutos a 50 $^{\circ}$ C, un aumento a 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos y 40 ciclos en los que primero se sometían las muestras a una temperatura de 95 $^{\circ}$ C durante 1 segundo y después se bajaba a 60 $^{\circ}$ C durante 30 segundos.

3.5.4.3.1- Cuantificación relativa

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Wetzel et al. 2005) aplicando la fórmula 2. La cuantificación de la expresión del gen de interés se expresó en relación a la expresión del gen de referencia seleccionado. Además, se empleó un calibrador (una muestra que se incluyó en todas las placas) para poder minimizar las diferencias de rendimiento en la reacción que puedan existir entre placas.

$$(2) \quad E = 2^{Ct(C)-Ct(M)} * 2^{CtHK(M)-CtHK(C)}$$

Donde:

E: Expresión génica relativa

C: Calibrador

M: Muestra

HK: Gen de referencia

Una vez calculada la expresión génica relativa, se calcula el fold change de las distintas muestras sometidas a tratamiento normalizando los valores de cada muestra respecto a su control y así eliminar influencias externas a las estudiadas.

3.6- Estadística

Los análisis de datos estadísticos se realizaron con el software Statgraphics © Centurion XVI (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, EUA)

En primer lugar, se analizaron la expresión de las muestras cultivadas sin haber sido sometidas a ningún reto mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el tiempo como único factor, para determinar si las propias condiciones del ensayo afectaban a la expresión de los distintos genes aun sin la presencia del estímulo bacteriano.

A continuación se obtuvieron los distintos fold change de la expresión en los fragmentos sometidos a tratamiento, para ello se normalizaron los valores de expresión relativa de las muestras con respecto a los valores de expresión relativa de los fragmentos control.

Se realizó un análisis multifactorial usando los datos obtenidos del fold change para cada gen a las 4 horas y otro a las 6 horas incluyendo los siguientes factores: dieta, tratamiento y sección. Finalmente se estudió la significación de cada uno de los 3 factores anteriores a las 4 y 6 horas para cada gen individualmente. Las diferencias en la expresión se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Los resultados de expresión de los distintos genes para cada uno de los factores estudiados se representaron gráficamente utilizando el programa SigmaPlot v11.0 © Systat.

4-Resultados

4.1- Puesta a punto

4.1.1 Prueba LDH

No se detectaron cambios en la actividad LDH en el tejido intestinal a las 6 y a las 24 horas con respecto a la actividad inicial. Tampoco se observaron diferencias entre las secciones en ninguno de los tiempos (Figura 9).

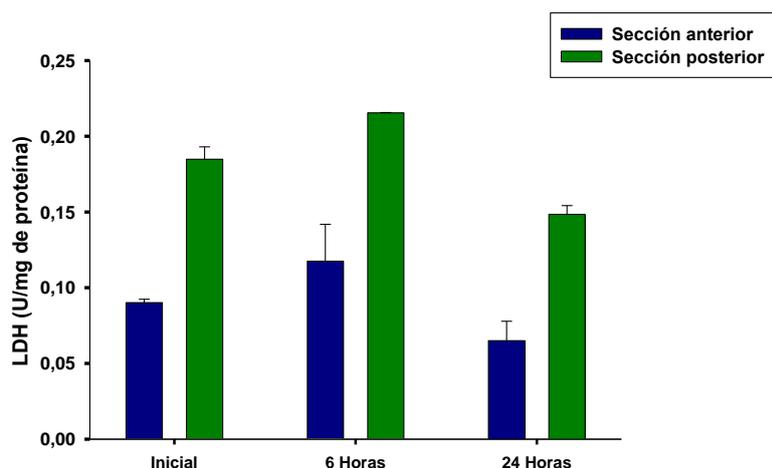


Figura 9: Media de la actividad LDH en el tejido a distintos tiempos en la sección anterior y posterior del intestino

En el caso del medio donde se han cultivado los distintos tejidos (Figura 10), se determinó un aumento de la actividad LDH entre las 6 y las 24 horas. Por otra parte en el medio no se observan variaciones en la actividad LDH para las distintas secciones en un mismo tiempo.

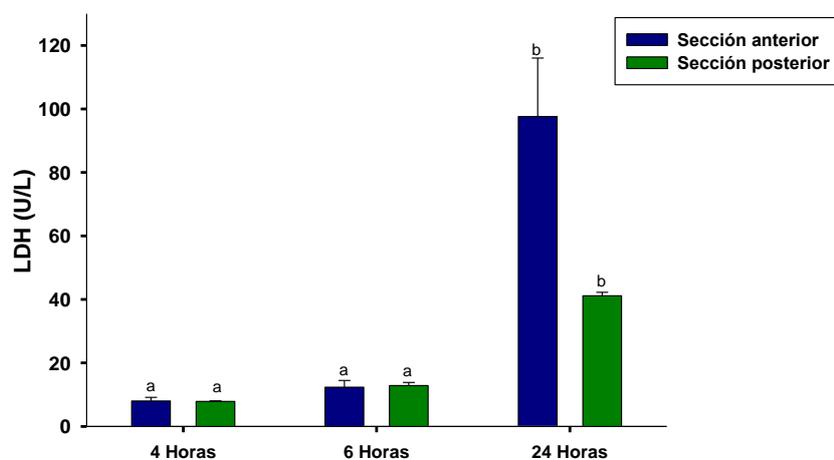


Figura 10: Media de la actividad LDH en el medio de cultivo donde se han mantenido los fragmentos a distintos tiempos en la sección anterior y posterior del intestino. Diferentes letras indican grupos estadísticamente ($p < 0.05$) diferentes.

4.1.2 Evaluación del gen de referencia

El análisis de los resultados (Tabla 7) muestra que los Ct de los distintos candidatos varían desde $17,42 \pm 1,46$ hasta $21,28 \pm 1,58$. El gen que presentó mayor estabilidad fue EF-1 α con una desviación estándar de 0.43, además de alta expresión (Ct = $19,97 \pm 1,35$).

Tabla 7. Resultados del ensayo para la determinación del gen de referencia

	EF-1 α	GAPDH	RPS18	Actina
n	6	6	6	6
geo Mean [Ct]	19,97	21,28	20,33	17,42
ar Mean [Ct]	19,97	21,30	20,34	17,43
min [Ct]	18,98	19,93	19,49	16,47
max [Ct]	20,63	22,43	21,30	18,40
std dev [\pm Ct]	0,43	0,66	0,59	0,54
CV [% Ct]	2,17	3,11	2,88	3,12
min [x-fold]	-1,99	-2,55	-1,79	-1,93
max [x-fold]	1,58	2,21	1,95	1,97
std dev [\pm x-fold]	1,35	1,58	1,50	1,46

Los distintos candidatos a gen de referencia permanecen constantes a lo largo del intervalo de tiempo en el que se realiza el experimento (Figura 11).

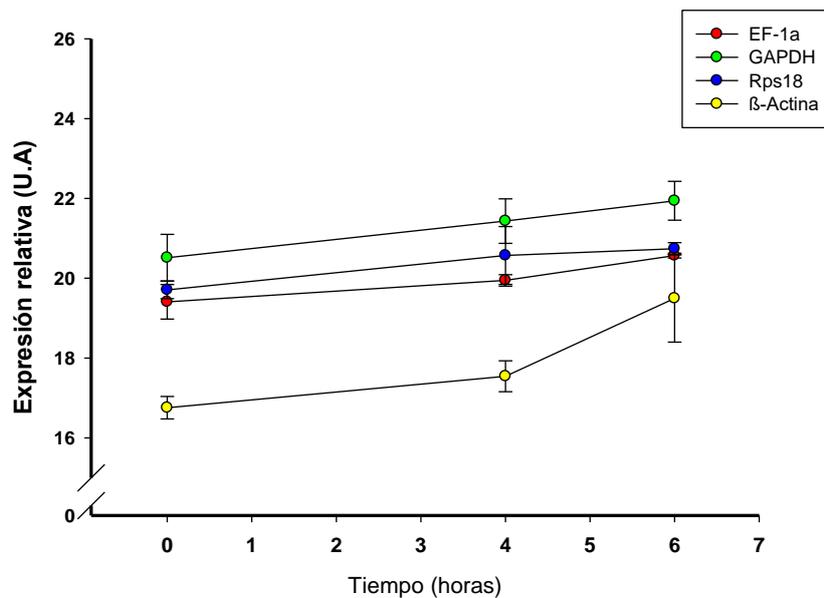


Figura 11: Expresión génica de EF1 α , GAPDH, RPS18 y b-actina en el conjunto de muestras a tiempo inicial, a las 4 y a las 6 horas

4.1.3- Influencia del medio de cultivo

Las muestras control, aquellas que el tejido fue incubado a distintos tiempos sin añadir en el medio ningún reto bacteriano, registraron cambios en la expresión génica en todos los genes estudiados. En todos los casos, a excepción de la expresión génica relacionado con el gen IgM, que decreció su expresión a las 6 horas de incubación, registraron un aumento progresivo a lo largo de la incubación (Figura 12).

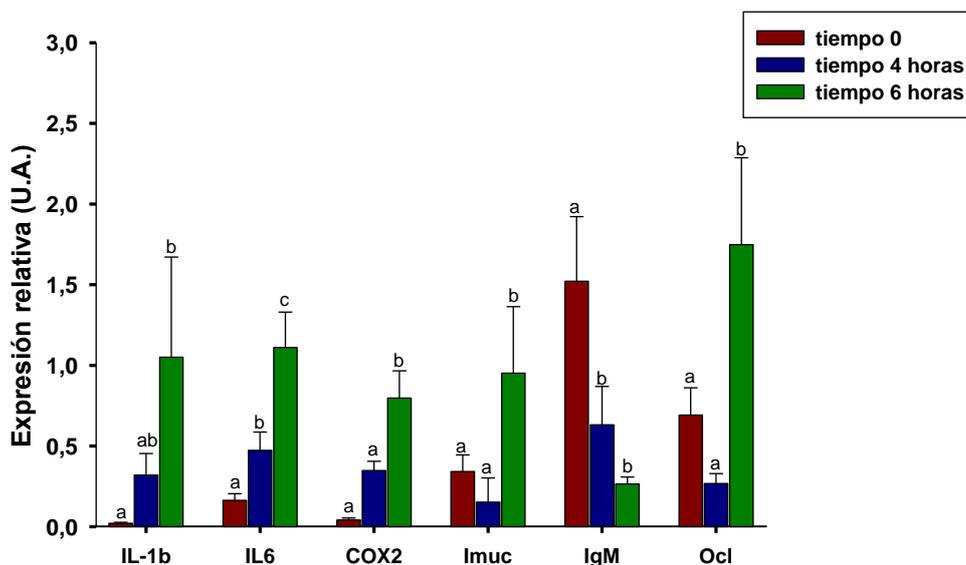


Figura 12: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl en el grupo control a tiempo 0, y tras 4 y 6 horas de incubación. Diferentes letras indican grupos estadísticamente ($p < 0.05$) diferentes.

Las medidas de pH que se realizaron durante este ensayo no mostraron variaciones respecto al valor inicial próximo a la neutralidad.

4.2- Evaluación de la expresión génica

Se calcularon los fold changes de expresión de las distintas muestras, para ello se normalizaron los valores de expresión relativa de las distintas muestras sometidas a tratamiento respecto a los valores de expresión de las muestras control.

Realizando las extracciones de los tejidos se perdieron una serie de muestras debido a un problema con el Bead Beater, entre ellas se encontraban los controles de la sección anterior de peces alimentados a con FM a las 6 horas por lo que las muestras pertenecientes a este tiempo y sección no se pudieron normalizar como el resto.

4.2.1- Reto bacteriano a las 4 horas

Los resultados a las 4 horas de incubación, tras un análisis funcional, mostraron diferencias para el gen IL-6 en función de la sección y en función de la dieta para el gen de la Ocl (Tabla 8).

Tabla 8. p-values obtenidos tras el análisis multifactorial a las 4 horas

	IL-1 β	IL-6	COX-2	I-muc	IgM	Ocl
Tratamiento	0,145	0,116	0,523	0,940	0,771	0,680
Sección	0,078	0,005	0,670	0,515	0,223	0,098
Dieta	0,481	0,181	0,228	0,121	0,074	0,017

4.2.1.1- Tratamiento con bacterias

Los genes estudiados en este ensayo, no experimentan ninguna diferencia significativa en su expresión para los distintos tratamientos con respecto al control a las 4 horas.

4.2.1.2- Sección

El análisis de la expresión génica en ambas secciones revela diferencias en uno de los genes inflamatorios, concretamente en el gen IL-6, registrando mayores valores en la sección anterior (Figura 13).

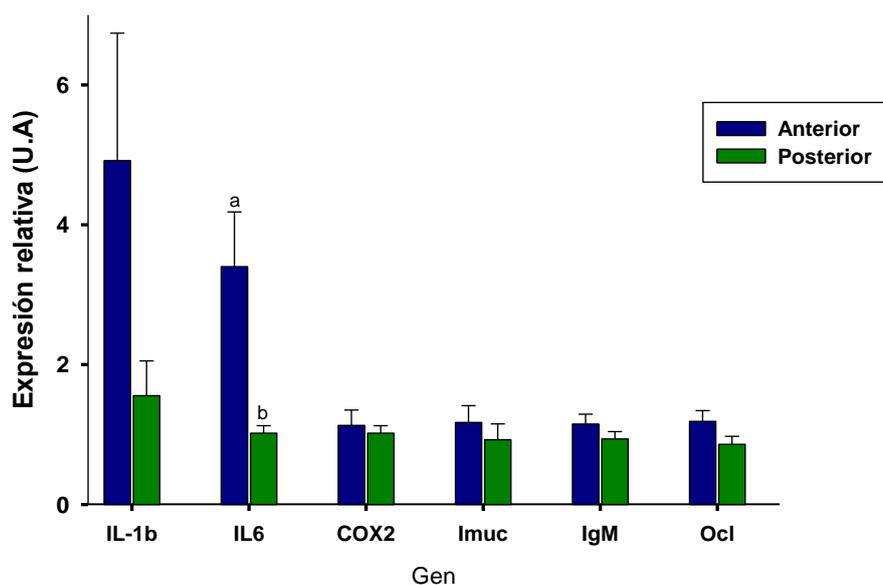


Figura 13: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles en intestino anterior y posterior tras 4 horas de incubación. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión.

4.2.1.3- Dieta

Los animales alimentados con una fuente proteica de pescado, mostraron una mayor expresión para el gen de la Ocl (Figura 14).

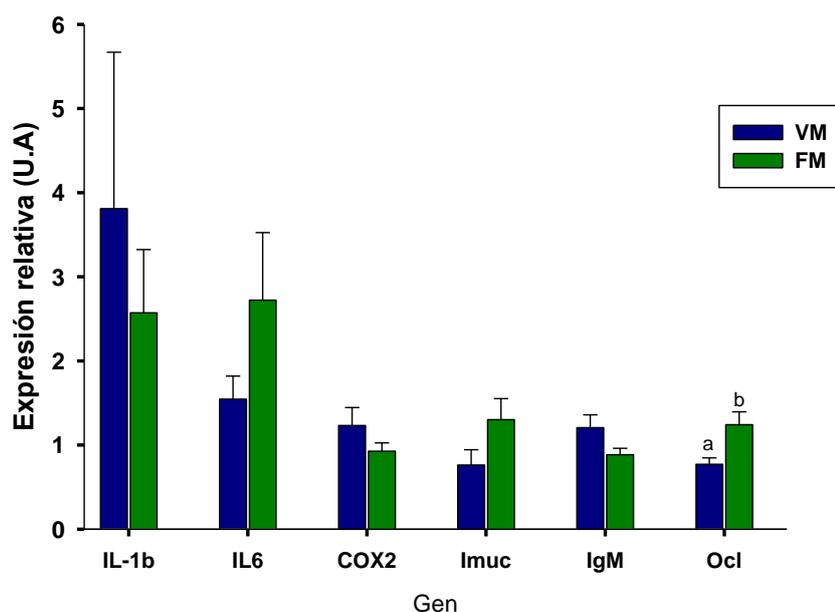


Figura 14: Expresión génica de IL-1 β , IL-6, COX-2, I-muc, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles para peces alimentados con las distintas dietas a las 4 horas. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión.

4.2.2- Reto bacteriano a las 6 horas

Tras 6 horas de incubación, el análisis multifactorial registra un mayor número de genes con cambios significativos (Tabla 9). La exposición a bacterias afectó a los genes relacionados con los procesos inflamatorios (IL-1 β y COX-2). En función de la sección, IL-6 ya no muestra diferencias respecto al control y sí registra diferencias en los genes relacionados con el sistema inmune y la integridad, como el I-muc y la Ocl. Finalmente, si nos centramos en la dieta, la Ocl continúa mostrando diferencias significativas, pero además vemos también cambios en genes inflamatorios (IL-6, COX-2) e inmunes (I-muc).

Tabla 9. P-values obtenidos en el análisis multifactorial a las 6 horas

	IL-1 β	IL-6	COX-2	I-muc	IgM	Ocl
Tratamiento	0,002	0,0859	0,0315	0,2131	0,1024	0,0865
Sección	0,2378	0,241	0,1748	0,007	0,6555	0,025
Dieta	0,2378	0,0118	0,0135	0,007	0,1024	0,007

4.2.2.1- Tratamiento

Los tratamientos bacterianos indujeron una respuesta diferencial en los procesos inflamatorios, concretamente en el gen IL-1 β tras la exposición al cultivo de *V. alginolyticus* (Figura 15).

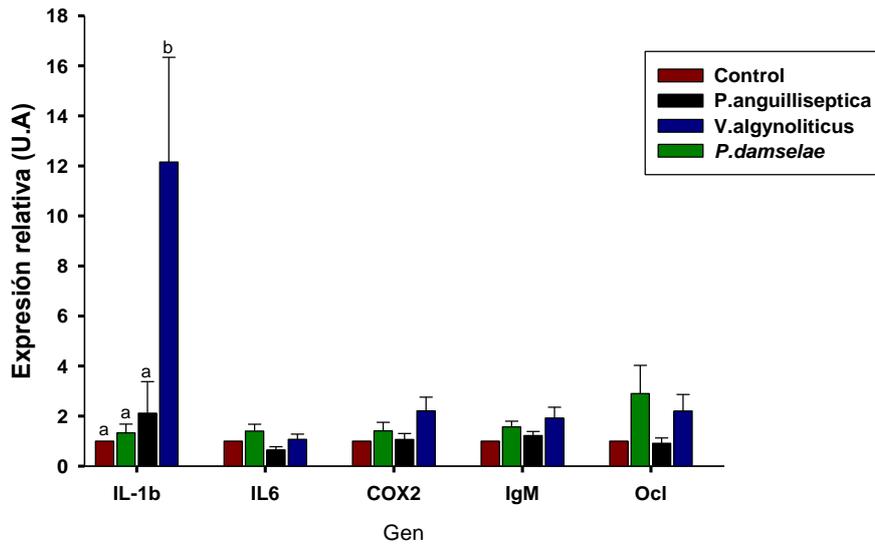


Figura 15: Expresión génica de IL-1b, IL-6, COX-2, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles tras 6 horas de incubación con *P.anguilliseptica*, *V.algynolicus* y *P.damselae*. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión.

4.2.2.2- Sección

Analizando los distintos genes en las secciones anterior y posterior del intestino no existe ninguna diferencia significativa en la expresión.

4.2.2.3- Dieta

Los peces alimentados con VM ven afectados sus procesos inflamatorios a las 6 horas, más concretamente, los genes IL-6 y COX-2 vieron disminuida su expresión (Figura 16).

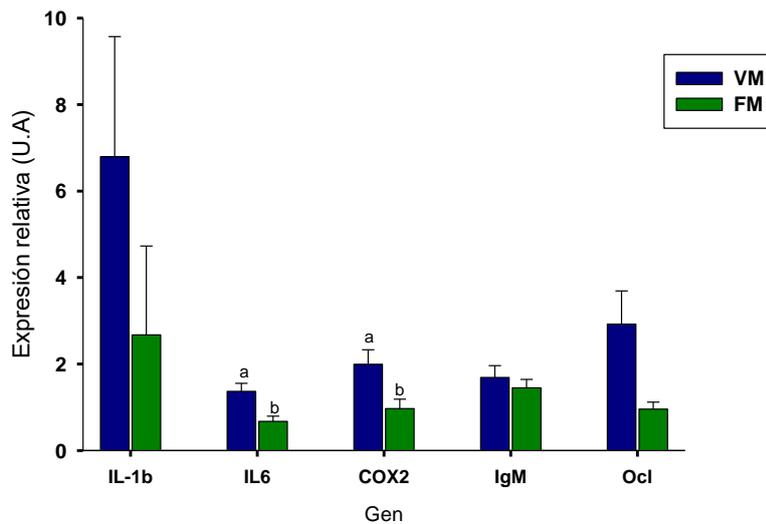


Figura 16: Expresión génica de IL-1b, IL-6, COX-2, IgM y Ocl normalizada respecto a los controles para peces alimentados con las distintas dietas a las 6 horas. Dentro de cada gen las columnas con distinta letra refleja diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión.

5- Discusión

5.1- Puesta a punto del ensayo

La puesta a punto del tejido conlleva una serie de pruebas como: comprobar hasta cuándo se mantiene la integridad del tejido en condiciones *in vitro* y si la expresión basal del intestino se ve afectada por el medio de cultivo.

Para la prueba de mantenimiento de la integridad se establecieron como tiempos las 4 horas en base a otros experimentos (Bäuerl et al. 2013) y las 6 y 24 horas para comprobar si se podían alargar un poco más los tiempos de trabajo, ya que en estudios anteriores la duración del reto ha sido menor (30-120 minutos) (Salinas et al. 2008; Torrecillas et al. 2017).

Los resultados de la prueba LDH realizada para estudiar la integridad de los fragmentos refleja un aumento de la actividad LDH en el medio donde se han cultivado los fragmentos entre las 6 y las 24 horas, lo cual indica que se ha producido una degradación del tejido que lleva a una pérdida de LDH citoplasmática (ZOU et al. 2013) después de las 6 horas de incubación y que por lo tanto no es completamente fiable alargar más allá de las 6 horas el ensayo, estos resultados mejoran lo visto en trabajos anteriores en los que los tejidos únicamente conservan su calidad hasta 4 horas después de ser sometidos a condiciones de isquemia (Baste et al. 2015).

Por otro lado, cuando se evaluó la integridad a nivel génico no se observó degradación entre las 0 y las 6 horas, lo que indica que el medio era capaz de mantener el tejido en condiciones óptimas al menos tras 6 horas de incubación. De hecho, todos los genes candidatos a gen de referencia se mantuvieron relativamente estables durante las primeras 6 horas de incubación, necesitándose de 3 a 5 genes constitutivos estables para confirmar la integridad del RNA de un tejido (Taylor et al. 2010). Este ensayo también resultó útil para confirmar que EF-1 α era el mejor candidato para utilizarlo en la cuantificación de la expresión génica como gen de referencia (Cerezuela et al. 2013).

Por último se evaluó el efecto del medio de cultivo sobre los genes en estudio. En general, se observa que hay un efecto sobre la expresión génica, registrándose cambios en todos los genes. Al estudiar la influencia del medio sobre la inflamación de las muestras control que no han sido sometidas a ninguno de los tratamientos, se observa un aumento de su expresión a lo largo del tiempo. Este fenómeno se podía esperar ya que se puede relacionar la interacción de células adherentes del tejido con proteínas del suero fetal bobino que forma parte del medio de cultivo produciendo un incremento de la respuesta inflamatoria (Castillo-Briceño Patricia et al. 2011); otra causa de esta respuesta podría ser una simple reacción inflamatoria del tejido al proceso de la cirugía para la obtención de la muestra, el cual produce una respuesta para intentar volver a la homeostasia (Di Paolo y Shayakhmetov 2016).

También se observan cambios en la respuesta inmune del tejido en los controles con el paso del tiempo. Por parte de I-muc, se observó una respuesta similar a los genes de la inflamación, esta respuesta se podía esperar ya que existe una relación entre este gen y los genes involucrados en procesos inflamatorios (Pérez-Sánchez et al. 2013). Por otra parte la expresión de IgM se ve disminuida, esto también es algo que se podría esperar ya que se ha visto que esta

inmunoglobulina presenta una acción sistémica (Boes et al. 1998) por lo tanto es probable que al trabajar con tejidos se requiera de un sistema más complejo para desencadenar una respuesta de una magnitud a la que desarrollaría normalmente, en estudios anteriores (German et al. 2000) se ha visto que existe una disminución de células plasmáticas productoras en tejidos gastrointestinales.

En cuanto a la integridad del tejido se observa un aumento de la expresión similar al observado en los genes de procesos inflamatorios y al gen I-muc, esto se podría esperar ya que hay estudios (Cerezuola et al. 2013b) anteriores en los que se ha relacionado la función de la Ocl con la regulación de la respuesta inflamatoria.

Tras analizar los resultados de las distintas pruebas realizadas para ver los cambios inducidos por la incubación se decidió continuar con el experimento ya que el mantenimiento no afectó de forma significativa la integridad del material genético, ni produjo degradación del explante en los tiempos en los que se pretende trabajar, y los cambios en la expresión de los genes son cambios que se podrían esperar.

5.2- Reto bacteriano

Como se ha visto en el apartado anterior, existe cierta influencia del medio que puede alterar la expresión de los genes. Para evaluar los distintos efectos de los retos bacterianos a los que se sometieron los tejidos sin que se produzcan falsos resultados, se trabajó con la expresión del fold change (Tan et al. 2015).

Al finalizar la incubación con los diferentes tratamientos bacterianos, se observó que el pH se mantenía constante tras los retos por lo que se descartó un rápido deterioro del fragmento de tejido (Zimerman 2005).

5.2.1- Reto bacteriano a las 4 horas de incubación

A las 4 horas se observa que existen diferencias tanto a nivel de sección en los procesos inflamatorios para IL-6 como a nivel de dieta en la integridad del tejido para Ocl. Anteriores trabajos con suplementos de origen vegetal (Reyes-Becerril et al. 2013), también se observaron cambios en la expresión de Ocl en pruebas *in vivo*, lo cual correlacionan con una ligera inflamación a nivel intestinal, debido a la alimentación. Sin embargo, en el actual estudio la expresión de Ocl a las 6 horas de incubación vuelve a los valores iniciales, por lo que se podrían atribuir a las variaciones naturales que existen entre individuos (Pickrell et al. 2010), y que podrían confirmarse o desmentirse con un mayor número de muestras.

5.2.2- Reto bacteriano a las 6 horas de incubación

A las 6 horas de incubación se observó que el único tratamiento bacteriano que desencadenó una expresión diferencial fue el de *V.algynoliticus*, siendo común esta diferencia de expresión en los genes estudiados relacionados con los procesos inflamatorios, produciendo, entre otros un aumento en la expresión del gen IL-1 β . Esta bacteria, *V.algynoliticus*, es la causante de la vibriosis, una enfermedad que se caracteriza por la aparición de úlceras en el cuerpo, hemorragias severas, que producen podredumbre en cola y aletas, desencadenando procesos

inflamatorios (Jun et al. 2003). Si se comparan estos resultados con los resultados previos que se han obtenido *in vivo* (Estruch et al., 2017), se puede observar que la respuesta inflamatoria es diferente, de hecho los peces alimentados con VM presentaron una baja expresión gen IL-1 β . Estas diferencias entre *in vivo* e *in vitro* en los retos con parásitos ya han sido también observadas en lubinas alimentadas con altos niveles dietarios de harinas vegetales (*Dicentrarchus labrax*), debido a que depende del tiempo transcurrido tras el reto con patógenos (Torrecillas et al. 2017). Por lo tanto, y de acuerdo con ambos experimentos, en general se observa al iniciar el reto una elevada respuesta del intestino de los peces alimentados con bajos niveles de FM en la dieta con elevadas expresiones de los genes relacionados con la inflamación (como por ejemplo, de IL-1 β , IL-5 y TNF α). Sin embargo, cuando tras un tiempo de exposición del patógeno (*in vivo*), se observa una baja respuesta de estos genes (Estruch et al., 2017) y una mayor de IL-10, probablemente en un último esfuerzo de los peces alimentados con VM para recuperar la homeostasis intestinal (Torrecillas et al. 2017).

P. damselae no produjo ninguna respuesta en los retos bacterianos. Esta bacteria se puede aislar a partir de órganos de los peces infectados tras 2-4 días de la infección. Por otro lado, se ha visto que su crecimiento en el laboratorio no es tan eficiente como *in vivo* (Romalde 2002). Esta deficiencia de desarrollo *in vitro* podría ser la causante de que no se produzca ninguna respuesta.

Pseudomona anguilliseptica, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos, formaba agregados, por lo que no se pudo determinar su curva de calibrado y se utilizó la de *P. damselae*. La falta de respuesta podría ser explicada por una baja concentración bacteriana, ya que al usar la curva de *P. damselae* lo que se tiene es una estimación aproximada de la concentración de *P. anguilliseptica*, no la concentración exacta y esta falta de concentración puede requerir más tiempo para desencadenar una respuesta.

En función de la dieta, a las 6 horas existe una diferencia significativa en los genes involucrados en la respuesta inflamatoria (IL-6 y COX-2), confirmando los resultados observados en trabajos anteriores cuando se ha empleado un pienso con componentes vegetales (Cerezuela et al. 2013; Reyes-Becerril et al. 2013). La respuesta de COX-2 en otros trabajos se ha visto aumentada tras la alimentación de los peces con dietas ricas en componentes vegetales, sin embargo, se informa de una bajada de expresión a las 24 horas tras la exposición al reto bacteriano (S Torrecillas et al. 2017). Estos resultados coinciden con los vistos anteriormente *in vivo* (Estruch et al. 2015) en el que se produce un aumento de los procesos inflamatorios en los peces alimentados con un pienso rico en componentes vegetales.

En el presente estudio, no se han visto diferencias a nivel inmunológico, al contrario que lo observado en estudios previos, donde una inclusión de proteínas vegetales en el pienso produjo un aumento de la respuesta inmune (Cerezuela et al. 2012; Reyes-Becerril et al. 2013). Aunque se requieren réplicas adicionales en los valores control para normalizar parte de las muestras que pertenecen al pienso FM, los resultados de inflamación del tejido y deterioro de la actividad inmune obtenidos en el ensayo *in vitro* permiten confirmar lo visto anteriormente en el ensayo *in vivo* (Estruch et al. 2015). En éste, la mortalidad causada por patógenos oportunistas superó el 30%, aunque sólo en los peces que fueron alimentados con el pienso VM, que junto con la

baja expresión de la IgM a nivel intestinal, hace suponer que estos peces estaban inmunosuprimidos (Estruch et al., 2017).

Hay que destacar los valores anormales que se han dado en algunas muestras para el gen I-muc, ya que es regulada por las células calciformes mediante estímulos paracrinos pudiendo variar en gran medida su expresión de forma rápida ante daños en estas células tras los distintos retos bacterianos (Torrecillas et al. 2017). También se puede atribuir a la pérdida de las muestras control antes mencionada además de que este gen se expresa con un valor muy superior en los segmentos posteriores del intestino (Pérez-Sánchez et al. 2013). A esto habría que añadirle la variación natural que existe entre individuos (Pickrell et al. 2010).

En resumen, todos estos cambios producidos a nivel intestinal de los peces alimentados con VM, junto a los observados en el perfil de la microbiota intestinal (Estruch et al. 2015) se deberán tener en consideración a la hora de formular piensos para especies carnívoras, pues pueden conllevar a pérdidas de productividad importantes en las granjas marinas, debido a que los peces alimentados con fuentes proteicas vegetales tienen una menor respuesta.

6- Conclusión

- I. Es posible, en teleósteos, incubar tejidos de intestino hasta las 6 horas sin que exista una degradación del tejido ni del material genético.
- II. La exposición a retos bacterianos presenta una respuesta en los procesos inflamatorios a las 6 horas para *V. alginolyticus*. El resto de retos bacterianos es posible que necesiten incubaciones más prolongadas.
- III. No se observan diferencias entre la sección anterior y posterior del intestino para los genes estudiados
- IV. Los peces que han sido alimentados con VM presentan una mayor respuesta inflamatoria (IL-6 y COX-2) a las 6 horas.

7- Bibliografía

- Adamidou, S. et al. 2011. "Effects of Dietary Inclusion of Peas, Chickpeas and Faba Beans on Growth, Feed Utilization and Health of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*)."
Aquaculture Nutrition 17(2).
- Albrektsen, Grethe, Knud Landmark, Solfrid Moen, and Leik Woie. 2001. "Effects of a High-Dose Concentrate of N & 3 Fatty Acids or Corn Oil Introduced Early after an Acute Myocardial Infarction on Serum." : 50–56.
- Alexis, M N. 1990. "Comparative Evaluation of Soybean Meal and Carob Seed Germ Meal as Dietary Ingredients for Rainbow Trout Fingerlings." *Aquatic Living Resources* 3: 235–41.
- Annas, Anita et al. 2014. "Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing ." 9(7): 1–11.
- Apper-Bossard, Emmanuelle, Aurélien Feneuil, Anne Wagner, and Frédérique Respondek. 2013. "Use of Vital Wheat Gluten in Aquaculture Feeds." *Aquatic Biosystems* 9(1): 1–13.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://aquaticbiosystems.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-9063-9-21>.
- Baste, Jean-marc et al. 2015. "Organotypic Lung Culture : A New Model for Studying Ischemia and In vitro Perfusion in Lung Transplantation Organotypic Lung Culture : A New Model for Studying Ischemia and In vitro Perfusion in Lung Transplantation." 2148(December).
- Bäuerl, Christine et al. 2013. "Lactobacillus Paracasei and Lactobacillus Plantarum Strains Downregulate Proinflammatory Genes in an In vitro System of Cultured Human Colonic Mucosa." *Genes and Nutrition* 8(2): 165–80.
- Beatriz, Nury et al. 2007. "Growth and Economic Profit of Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata* , L .) Fed Sunflower Meal." 272: 528–34.
- Bjørndal, Trond, and Jordi Guillen. 2017. "Market Integration between Wild and Farmed Seabream and Seabass in Spain." *Applied Economics* 0(0): 1–12.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00036846.2017.1287856>.
- Boes, M et al. 1998. "A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense against Systemic Bacterial Infection." *The Journal of experimental medicine* 188(12): 2381–86.
- Castelló-orvay, Francesc. 2000. "Alimentos Y Estrategias de Alimentación Para Reproductores Y Juveniles de Peces Marinos." : 550–69.
- Castillo-Briceño Patricia, P. et al. 2011. "A Role for Specific Collagen Motifs during Wound Healing and Inflammatory Response of Fibroblasts in the Teleost Fish Gilthead Seabream." *Molecular Immunology* 48(6–7): 826–34.
- Cerezuela, Rebeca et al. 2013. "Changes in Intestinal Morphology and Microbiota Caused by Dietary Administration of Inulin and Bacillus Subtilis in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata* L.) Specimens." *Fish and Shellfish Immunology* 34(5): 1063–70.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>.
- Cerezuela, Rebeca, Francisco Antonio Guardiola, José Meseguer, and M. Ángeles Esteban. 2012. "Enrichment of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L.) Diet with Microalgae: Effects on the Immune System." *Fish Physiology and Biochemistry* 38(6): 1729–39.

- Cerezuela, Rebeca, José Meseguer, and M. Ángeles Esteban. 2013b. "Effects of Dietary Inulin, Bacillus Subtilis and Microalgae on Intestinal Gene Expression in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L.)." *Fish & shellfish immunology* 34(3): 843–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.026>.
- Chen, Jia, Xianzhi He, and Jinhai Huang. 2014. "Diet Effects in Gut Microbiome and Obesity." *Journal of Food Science* 79(4).
- Comisión Europea. 2013. "Reglamento UE N°56/2013 Que Modifica Los Anexos I Y IV Del Reglamento CE N°99/2001 Por El Que Se Establecen Las Disposiciones Para La Prevención, El Control Y La Erradicación de Determinadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles." *Diario Oficial de la Unión Europea* L 21(2007): 3–16.
- Couto, A. et al. 2014. "Effects of Dietary Soy Saponins and Phytosterols on Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) during the on-Growing Period." *Animal Feed Science and Technology* 198: 203–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.005>.
- Estensoro, Itziar et al. 2012. "Modulation of the IgM Gene Expression and IgM Immunoreactive Cell Distribution by the Nutritional Background in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) Challenged with *Enteromyxum Leei* (Myxozoa)." *Fish and Shellfish Immunology* 33(2): 401–10.
- Estruch, G. et al. 2015. "Impact of Fishmeal Replacement in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) on the Gastrointestinal Microbiota Determined by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene." *PLoS ONE* 10(8): 1–22.
- FAO. 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. *El Estado Mundial de La Pesca Y La Acuicultura 2016*. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>.
- German, A. J., E. J. Hall, and M. J. Day. 2000. "Relative Deficiency in IgA Production by Duodenal Explants from German Shepherd Dogs with Small Intestinal Disease." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 76(1–2): 25–43.
- Gómez-Requeni, P. et al. 2004. "Protein Growth Performance, Amino Acid Utilisation and Somatotropic Axis Responsiveness to Fish Meal Replacement by Plant Protein Sources in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*)." *Aquaculture* 232(1–4): 493–510.
- Guardiola, Francisco A. et al. 2014. "Comparative Skin Mucus and Serum Humoral Defence Mechanisms in the Teleost Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*)." *Fish and Shellfish Immunology* 36(2): 545–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.001>.
- Hidaka, Brandon H. et al. 2015. "Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Blood and Breast Tissue of High-Risk Women and Association with Atypical Cytomorphology." *Cancer Prevention Research* 8(5): 359–64.
- Identidad, I. 2010. "Identidad Perfil Antecedentes Históricos." : 1–10.
- Joshi, PriyaShirish, and Someshwar Golgire. 2014. "A Study of Salivary Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Levels in Patients with Oral Leukoplakia and Squamous Cell Carcinoma by Gel Electrophoresis Method." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 18(4): 39. <http://www.jomfp.in/text.asp?2014/18/4/39/141342>.
- Jun, Li, Liran Zhou, and Norman Y S Woo. 2003. "Invasion Route and Pathogenic Mechanisms of *Vibrio Alginolyticus* to Silver Sea Bream *Sparus Sarba*." *Journal of Aquatic Animal Health* 15(4): 302–13.
- Kormas, Konstantinos A., Alexandra Meziti, Eleni Mente, and Athanasios Frentzos. 2014.

- “Dietary Differences Are Reflected on the Gut Prokaryotic Community Structure of Wild and Commercially Reared Sea Bream (*Sparus Aurata*).” *MicrobiologyOpen* 3(5): 718–28. <http://doi.wiley.com/10.1002/mbo3.202>.
- Lavie, Carl J., Richard V. Milani, Mandeep R. Mehra, and Hector O. Ventura. 2009. “Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases.” *Journal of the American College of Cardiology* 54(7): 585–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.084>.
- Løvmo Martinsen, Lisbeth et al. 2011. “Carnobacterium Maltaromaticum vs. Vibrio (Listonella) Anguillarum in the Midgut of Atlantic Cod (*Gadus Morhua* L.): An In vitro Study.” *Aquaculture Research* 42(12): 1830–39.
- Mart, Silvia et al. 2016. “Study of Liver and Gut Alterations in Sea Bream , *Sparus Aurata* L ., Fed a Mixture of Vegetable Protein Concentrates.” : 460–71.
- Martínez-Llorens, Silvia et al. 2012. “Carob Seed Germ Meal as a Partial Substitute in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) Diets: Amino Acid Retention, Digestibility, Gut and Liver Histology.” *Aquaculture* 338–341: 124–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.029>.
- Mérida, Silvia Nogales, Miguel Jover Cerdá, Silvia Martínez Llorens, and Ana Tomás Vidal. 2011. “A STUDY OF PARTIAL REPLACEMENT OF FISH MEAL WITH SUNFLOWER MEAL ON GROWTH , AMINO ACID RETENTION , AND BODY COMPOSITION OF SHARPSNOUT SEABREAM , *DIPLodus PUNTAZZO* (ACTINOPTERYGII : PERCIFORMES : SPARIDAE).” 41: 47–54.
- Moldal, Torfinn et al. 2014. “Substitution of Dietary Fish Oil with Plant Oils Is Associated with Shortened Mid Intestinal Folds in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*).”
- Montero, D. et al. 2010. “Replacement of Dietary Fish Oil by Vegetable Oils Affects Humoral Immunity and Expression of pro-Inflammatory Cytokines Genes in Gilthead Sea Bream *Sparus Aurata*.” *Fish and Shellfish Immunology* 29(6): 1073–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.024>.
- Palaksha, K. J., Gee Wook Shin, Young Rim Kim, and Tae Sung Jung. 2008. “Evaluation of Non-Specific Immune Components from the Skin Mucus of Olive Flounder (*Paralichthys Olivaceus*).” *Fish and Shellfish Immunology* 24(4): 479–88.
- Di Paolo, Nelson C, and Dmitry M Shayakhmetov. 2016. “Interleukin 1 α and the Inflammatory Process.” *Nature Immunology* 17(8): 906–13. <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3503>.
- Pereira, T. G., and A. Oliva-Teles. 2002. “Preliminary Evaluation of Pea Seed Meal in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*) Juveniles.” *Aquaculture Research* 33(14): 1183–89.
- Peres, Helena, and Aires Oliva-Teles. 2009. “The Optimum Dietary Essential Amino Acid Profile for Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Juveniles.” *Aquaculture* 296(1–2): 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.046>.
- Pérez-Jiménez, Amalia, Helena Peres, Vera Cruz Rubio, and Aires Oliva-Teles. 2013. “Effects of Diet Supplementation with White Tea and Methionine on Lipid Metabolism of Gilthead Sea Bream Juveniles (*Sparus Aurata*).” *Fish Physiology and Biochemistry* 39(3): 661–70.
- Pérez-Sánchez, Jaume et al. 2013. “Mucins as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in a Fish-Parasite Model: Transcriptional and Functional Analysis.” *PLoS ONE* 8(6): 1–9.
- Pfaffl, Michael Walter, Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P Neuvians. 2004.

- “Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper--Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations.” *Biotechnology letters* 26(6): 509–15.
- Pickrell, JK et al. 2010. “Understanding Mechanisms Underlying Human Gene Expression Variation with RNA Sequencing.” *Nature* 464(7289): 768–72.
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medc&NEWS=N&AN=20220758>.
- Reyes-Becerril, Martha et al. 2013. “Dietary Administration of Microalgae *Navicula* Sp. Affects Immune Status and Gene Expression of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*).” *Fish and Shellfish Immunology* 35(3): 883–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.026>.
- Romalde, Jes??s L. 2002. “Photobacterium Damselae Subsp. Piscicida: An Integrated View of a Bacterial Fish Pathogen.” *International Microbiology* 5(1): 3–9.
- Salinas, Irene, Reidar Myklebust, Maria Angeles, and Rolf Erik. 2008. “In Vitro Studies of *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp . Lactis in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L .) Foregut : Tissue Responses and Evidence of Protection against *Aeromonas Salmonicida* Subsp . *Salmonicida* Epithelial Damage.” 128: 167–77.
- Santigosa, E. et al. 2008. “Modifications of Digestive Enzymes in Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Sea Bream (*Sparus Aurata*) in Response to Dietary Fish Meal Replacement by Plant Protein Sources.” *Aquaculture* 282(1–4): 68–74.
- Sitjà-Bobadilla, A. et al. 2005. “Effect of Fish Meal Replacement by Plant Protein Sources on Non-Specific Defence Mechanisms and Oxidative Stress in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*).” *Aquaculture* 249(1–4): 387–400.
- Tan, Lijun et al. 2015. “Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) and Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) Treatments Affect Degeneration of Cultured Articular Cartilage Explants.” : 549–57.
- Taylor, Sean et al. 2010. “A Practical Approach to RT-qPCR-Publishing Data That Conform to the MIQE Guidelines.” *Methods* 50(4): S1–5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>.
- Torrecillas, S et al. 2017. “Fish & Shell Fi Sh Immunology Disease Resistance and Response against *Vibrio Anguillarum* Intestinal Infection in European Seabass (*Dicentrarchus Labrax*) Fed Low Fi Sh Meal and Fi Sh Oil Diets.” *Fish and Shellfish Immunology* 67: 302–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.022>.
- Torrecillas, Silvia et al. 2011. “Fish & Shell Fi Sh Immunology Reduced Gut Bacterial Translocation in European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Fed Mannan Oligosaccharides (MOS).” *Fish and Shellfish Immunology* 30(2): 674–81.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.020>.
- Wang, Dan et al. 2015. “Efficient Production of Free Fatty Acids from Soybean Meal Carbohydrates.” *Biotechnology and Bioengineering* 112(11): 2324–33.
- Weltzien, Finn-arne, Catherine Pasqualini, Philippe Vernier, and Sylvie Dufour. 2005. “A Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for European Eel Tyrosine Hydroxylase.” 142: 134–42.
- Zimmerman, Maria. 2005. “Capítulo 11. pH de La Carne Y Factores Que Lo Afectan.” *Aspectos estratégicos para obtener carne ovina de calidad en el cono sur americano*: 141–52.

ZOU, Yanan et al. 2013. "Application of LDH-Release Assay to Cellular-Level Evaluation of the Toxic Potential of Harmful Algal Species." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77(2): 345–52. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.120764>.