

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

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



**Efecto de la dieta sobre la respuesta  
intestinal a un reto bacteriano en dorada  
(*Sparus aurata*, L.): Ensayo in vitro**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

<b>Localidad y fecha:</b>	Valencia, julio de 2018
<b>Curso académico:</b>	2017-2018
<b>Titulación:</b>	Grado en Biotecnología
<b>Autor:</b>	Irene Trujillo Martínez
<b>Director:</b>	David Sánchez Peñaranda
<b>Codirector:</b>	Silvia Martínez Llorens
<b>Director experimental:</b>	Guillem Estruch Cucarella

**Autora:** Irene Trujillo Martínez

**Tutor:** David Sánchez Peñaranda

**Cotutora:** Silvia Martínez Llorens

**Tutor experimental:** Guillem Estruch Cucarella

**Fecha:** Valencia, Julio 2018

**Título:** Efecto de la dieta sobre la respuesta intestinal a un reto bacteriano en dorada (*Sparus aurata*, L.): Ensayo in vitro

## RESUMEN

El creciente coste y limitada disponibilidad de la harina de pescado empleada en las formulaciones de los piensos acuícolas, ha promovido la necesidad de buscar nuevas estrategias, en relación a la dieta de los peces, que permitan alcanzar una acuicultura más rentable y sostenible. En este sentido, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se ha tratado de sustituir la harina y/o aceite de pescado por alternativas vegetales más baratas, como soja, girasol, trigo, etc. En el presente trabajo, se realizó un estudio *ex vivo* en el que se sustituyó un pienso basado en harina de pescado (dieta FM) por pienso de origen vegetal, durante un periodo de tiempo largo (dieta VM-Long) y corto (dieta VM-Short), en ejemplares de dorada (*Sparus aurata*, L.). Se evaluó la influencia sobre la respuesta inflamatoria e inmune, a nivel intestinal, exponiendo las muestras a dos tratamientos bacterianos distintos: *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damseae subsp. piscicida*. Para el ensayo *ex vivo*, se obtuvieron explantes del intestino de los ejemplares de dorada alimentados con las distintas dietas previamente al sacrificio, y se expusieron a los distintos retos bacterianos en un medio de cultivo CO<sub>2</sub> independent culture medium. Para determinar la influencia sobre la respuesta inmune, se llevó a cabo un análisis de RT-qPCR y se evaluó la expresión génica relativa de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (IL1 $\beta$ , IL6 y Cox 2), la respuesta inmune (IgM e I-Muc) y la integridad celular (Ocl).

Los resultados mostraron que *V. alginolyticus* indujo una respuesta inflamatoria en el tejido. Esta respuesta no tuvo una clara dependencia de la dieta, debido a la alta variabilidad individual existente para los genes estudiados, aunque es posible que los peces alimentados con dieta VM-Short presenten una mayor respuesta inflamatoria ante un reto bacteriano, de forma que los peces con una alimentación prolongada con dietas que incluyen un 100% de proteína vegetal podrían haber perdido, en parte, su capacidad de respuesta.

**Palabras clave:** acuicultura, dorada, VM-Short, RT-qPCR, expresión génica, respuesta inmune, inflamación

## ABSTRACT

The increasing cost and the limited availability of the fish meal in formulations of aquaculture feeds, has promoted the need of seek new strategies about fish diet, which allow to reach for a profitable sustainable aquaculture. This way, several studies have been carried out in order to replace fish meal and/or fish oil with cheaper vegetable sources, as soybean, sunflower, wheat, etc. This study aims to carry out an *ex vivo* approach with gilthead seabream individuals (*Sparus aurata*, L.) in which fish meal in commercial diets was replaced by a vegetable feed in a long-term time (VM-Long) and a short-term time (VM-Short). The influence in inflammation and immune response was evaluated in gut, infecting the samples with *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damseae* subsp. *Piscicida*. After obtaining the gut explants of gilthead seabream individuals fed with the different diets prior to sacrifice, they were exposed to the bacterial challenges in a culture medium Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM). In order to determine the influence over the immune response, a RT-qPCR analysis was carried out and the relative gene expression was evaluated in genes related to inflammatory response (IL1B, IL6 and Cox 2), immune response (IgM and I-Muc) and cellular integrity (Ocl).

Results showed that *V.alginolyticus* induced an inflammatory response in tissue, which did not have an evident dependence on diet, due to the high individual variability among the tested genes. Nevertheless, it is possible for fish fed with VM-Short diet to show a greater inflammation when they face a bacterial challenge, which could indicate an immunosuppression in fish fed with a long-term diet of 100% vegetable protein.

**Key words:** aquaculture, gilthead seabream, VM-Short, RT-qPCR, gene expression, immune response, inflammation

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por los tupper, la ropa limpia, y enseñarme a escuchar, respetar y tomar mis propias decisiones.

A Chus, por su ánimo, su apoyo y su complicidad.

A Javi y Roser, por hacer lo bueno aún mejor y *diezmar todo lo malo*.

A Ana, por estar siempre al otro lado del pasillo, por no habernos conseguido separar de edificio ni para hacer el TFG y por haber hecho de Valencia el mejor hogar que ha podido ser en estos años.

A David y Silvia, por su ayuda y dedicación durante la realización de este trabajo.

A Guillem, por hacerme un hueco en su despacho, y por su ayuda y su paciencia durante la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Estado de la producción acuícola .....	1
1.2. La dorada.....	3
1.2.1. Clasificación de la especie .....	3
1.2.2. Distribución y hábitat .....	3
1.2.3. Características biológicas .....	3
1.2.4. Ciclo de reproducción .....	4
1.2.5. La dorada en la acuicultura: historia y actualidad .....	4
1.3. Inclusión de materias primas vegetales en piensos para la acuicultura.....	5
1.3.1. La importancia de la alimentación en la acuicultura .....	5
1.3.2. Ejemplos de fuentes proteicas vegetales alternativas.....	6
1.3.3. Limitaciones y efectos negativos en los peces .....	7
1.4. Desarrollo de estudios anteriores .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	11
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	12
3.1. Aspectos éticos.....	12
3.2. Diseño experimental.....	12
3.2.1. Resumen del ensayo completo .....	12
3.2.2. Peces, sistema y condiciones.....	13
3.2.3. Dietas experimentales empleadas.....	13
3.3. Ensayo ex vivo .....	14
3.3.1. Preparación de los estímulos bacterianos.....	14
3.3.2. Obtención de los fragmentos intestinales y muestreo .....	15
3.3.3. Ensayo <i>ex vivo</i> .....	15
3.4. Expresión génica .....	16
3.4.1. Extracción RNA y tratamiento con DNAsa .....	16
3.4.2. Paso a cDNA .....	17
3.4.3. Ensayo RT-qPCR.....	17
3.5. Análisis estadísticos .....	19
<b>4. Resultados</b> .....	20
4.1. Evaluación de las muestras iniciales .....	20
4.2. Influencia del medio de cultivo.....	21
4.3. Estudio del reto bacteriano.....	23

<b>5. Discusión</b> .....	26
<b>6. Conclusión</b> .....	30
<b>7. Bibliografía</b> .....	31

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución mundial de la producción en la acuicultura y la pesca de captura. Fuente: FAO, 2016.....	2
<b>Figura 2.</b> Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas por especies, durante el periodo 1960-2016. Fuente: APROMAR, 2017.....	2
<b>Figura 3.</b> Imagen de una dorada. Fuente: FAO, 2009.....	3
<b>Figura 4.</b> Principales países productores de dorada de acuicultura. Fuente: FAO, 2009.....	4
<b>Figura 5.</b> Evolución de la producción de dorada de acuicultura en el área mediterránea y el resto del mundo en el periodo 1985-2016. Fuente: APROMAR, 2017.....	5
<b>Figura 6.</b> Esquema paso a paso del ensayo.....	12
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental de los retos bacterianos.....	16
<b>Figura 8.</b> Expresión génica de los genes <i>IL1<math>\beta</math></i> , <i>Cox2</i> , <i>Ocl</i> , <i>IgM</i> , <i>I-Muc</i> e <i>IL6</i> en las muestras iniciales. Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión. ....	20
<b>Figura 9.</b> Expresión génica de los genes <i>IL1<math>\beta</math></i> , <i>Cox2</i> , <i>Ocl</i> , <i>IgM</i> , <i>I-Muc</i> e <i>IL6</i> en las muestras iniciales y control. Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión.....	22
<b>Figura 10.</b> Expresión génica de los genes <i>IL1<math>\beta</math></i> , <i>Cox2</i> , <i>Ocl</i> , <i>IgM</i> , <i>I-Muc</i> e <i>IL6</i> en las muestras control y las correspondientes a los tratamientos con <i>V. alynoliticus</i> y <i>P. damsela</i> . Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión (a, b: diferencias entre tratamientos; A, B: diferencias entre dietas).....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Condiciones de crecimiento de los peces .....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 2. Ingredientes y composición de los piensos empleados.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 3. Composición del medio Marine Broth.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 4. Información sobre los primers correspondientes a los genes empleados .....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 5. p-values correspondientes al ANOVA simple de las muestras iniciales.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 6. p-values obtenidos tras el ANOVA simple de las muestras iniciales y control .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 7. p-values resultantes tras el ANOVA multifactorial de los FC correspondientes a muestras control y sometidas a tratamiento bacteriano. ....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 8. p-values resultantes del ANOVA simple para tratamiento bacteriano (T) y sección (S) para cada una de las dietas. Los valores significativos quedan marcados en rojo (<math>p &lt; 0,05</math>)..</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 9. p-values resultantes del ANOVA simple para dieta (D) y sección (S) para cada uno de los tratamientos bacterianos. Los valores significativos quedan marcados en rojo (<math>p &lt; 0,05</math>). </i>	<i>24</i>
<i>Tabla 10. p-values resultantes del ANOVA simple para dieta (D) y tratamiento (T) para cada una de las secciones del intestino. Los valores significativos quedan marcados en rojo.....</i> <i>(<math>p &lt; 0,05</math>). .....</i>	<i>24</i>



# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

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

EPA: ácido eicosapentaenoico

DHA: ácido docosahexaenoico

SMB: harina de soja

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

LPS: lipopolisacárido

FM: pienso basado en harina y aceite de pescado

VM: pienso basado en harina de origen vegetal

D.O.: densidad óptica

U.f.c.: unidades formadoras de colonias

PBS: buffer fosfato salino

DMEM: medio Dulbecco Modified Eagle

RNA: ácido ribonucleico

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

IL1 $\beta$ : interleukina 1 $\beta$

IL6: interleukina 6

Cox2: ciclooxigenasa 2

Ocl: ocludina

IgM: inmunoglobulina M

I-Muc: mucina intestinal

EF1 $\alpha$ : factor de elongación 1 $\alpha$

HK: gen housekeeping

ANOVA: análisis de varianza

FC: Fold Change

## **1. Introducción**

### 1.1. Estado de la producción acuícola

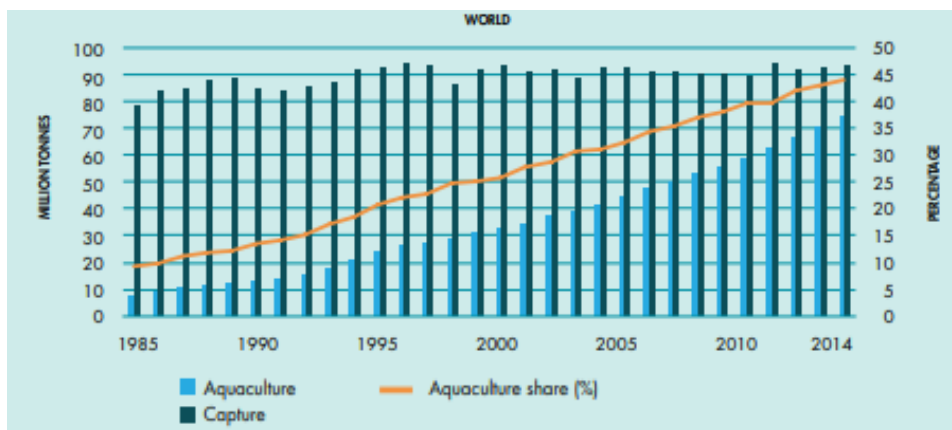
Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la acuicultura consiste en la cría de organismos acuáticos, tanto en zonas costeras como del interior, que implica intervenciones en el proceso reproductivo para aumentar la producción. Se trata del sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y actualmente representa en torno al 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial.

El aumento de la pesca y la producción acuícola registrado en las últimas décadas, así como el consiguiente crecimiento del consumo de pescado, han supuesto un paso hacia una dieta más saludable y rica nutricionalmente. El pescado es rico en vitaminas (D, A y B), así como en minerales (incluyendo yodo, selenio, zinc, hierro, calcio, fósforo y potasio). Es una de las fuentes de proteínas más importante, que proporciona todos los aminoácidos esenciales. Además, contiene ácidos grasos insaturados (fundamentalmente del tipo omega 3 de larga cadena), imprescindibles para una alimentación adecuada. Esto hace que el consumo de pescado ayude a prevenir enfermedades cardiovasculares, y beneficie el desarrollo del cerebro y el sistema nervioso, tanto del feto como durante los primeros años de crecimiento.

La acuicultura proporciona ingresos a los productores a pequeña escala, a la vez que permite a los acuicultores y empresas generar millones de empleos bien remunerados para personas con escasos recursos. Asimismo, mejora el estado nutricional de las familias consumidoras. Por todo esto, la acuicultura se está abriendo paso como un medio que puede contribuir a la erradicación del hambre, la inseguridad alimentaria y nutricional, y la pobreza en muchas zonas del mundo (FAO, 2016).

El principal productor acuícola a nivel mundial es China, ya que ha experimentado el mayor aumento en los últimos 40 años, representando más del 60% de la producción acuícola mundial (FAO, 2016). Sin embargo, este aumento no se ha limitado a China, sino que se ha reflejado en muchas otras regiones del mundo, a nivel de mercado local, regional e internacional.

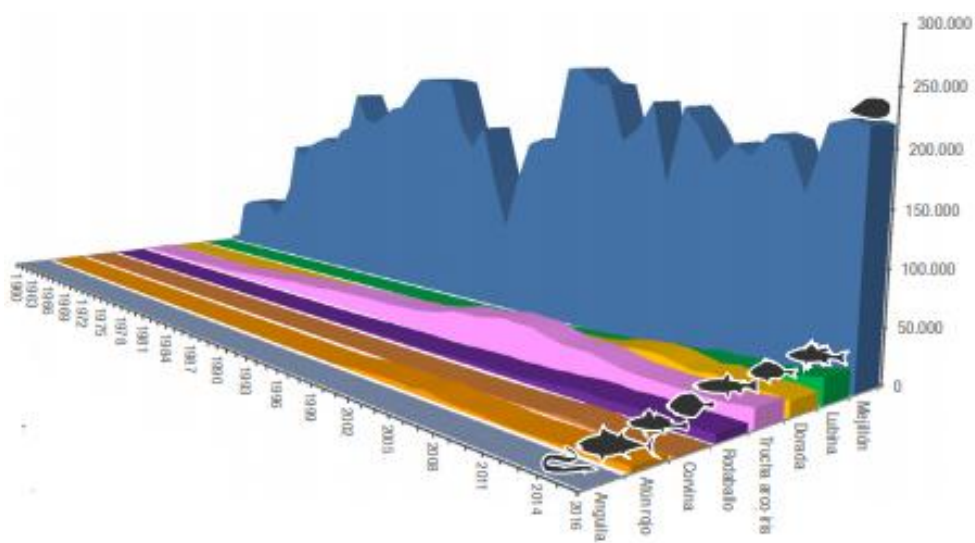
Mientras que el desarrollo de la pesca de captura se ha mantenido relativamente estancado desde la década de 1980, la acuicultura ha experimentado un importante crecimiento (Figura 1). En 2014, el pescado criado en acuicultura alcanzó los 73,8 millones de toneladas a nivel mundial, lo que supone casi un 50% de la producción total de pescado (FAO, 2016), y dicho porcentaje se encuentra en aumento actualmente (llegando a unos 80 millones de toneladas) (Brugère *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Evolución mundial de la producción en la acuicultura y la pesca de captura. Fuente: FAO, 2016

En la Unión Europea, la acuicultura también es una importante fuente de productos acuáticos. La producción acuícola superó los 1,300 millones de toneladas, representando un valor de 3.584 millones de euros. Esto supone un 19,4% del volumen de la producción acuática total (acuicultura y pesca) (APROMAR, 2017).

España es el estado miembro de la Unión Europea con una mayor producción acuícola, la cual supone un 22,3% del total de la UE, seguido por Reino Unido y Francia, aunque ocupa el cuarto puesto en cuanto a valor de producción. En 2015, la producción acuícola en España alcanzó un total de 289.821 toneladas, y sumó un valor de 407,8 millones de euros. La principal especie producida es el mejillón, seguido por la lubina y, en tercer lugar, la dorada (APROMAR, 2017).



**Figura 2.** Evolución de la producción de la acuicultura en España, en toneladas por especies, durante el periodo 1960-2016. Fuente: APROMAR, 2017

## 1.2. La dorada

### 1.2.1. Clasificación de la especie

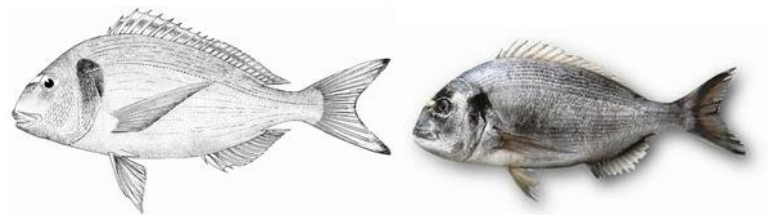
La dorada (*Sparus aurata*) es una especie de pez que pertenece a la familia Sparidae y género Sparus, dentro del orden de los Perciformes. Como curiosidad, recibe su nombre de la franja dorada característica que presenta entre sus dos ojos (FishBase, 2018)

### 1.2.2. Distribución y hábitat

Se trata de una especie marina, que se distribuye por el Atlántico oriental, así como por la zona del Mediterráneo (FishBase, 2018). Se trata de un pez sedentario, que vive en solitario o en pequeñas agregaciones. Se encuentra tanto en ambientes marinos como en aguas salobres, así como lagunas costeras y áreas estuarinas. Nacen, por lo general, en mar abierto durante los meses de octubre-diciembre; los juveniles suelen migrar a principios de primavera hacia aguas costeras protegidas, donde encuentran abundantes recursos tróficos y temperaturas más suaves. Son muy sensibles a bajas temperaturas. En mar abierto, la dorada se encuentra generalmente en prados rocosos y pastos marinos, aunque también podemos encontrarla en fondos arenosos (FAO, 2009).

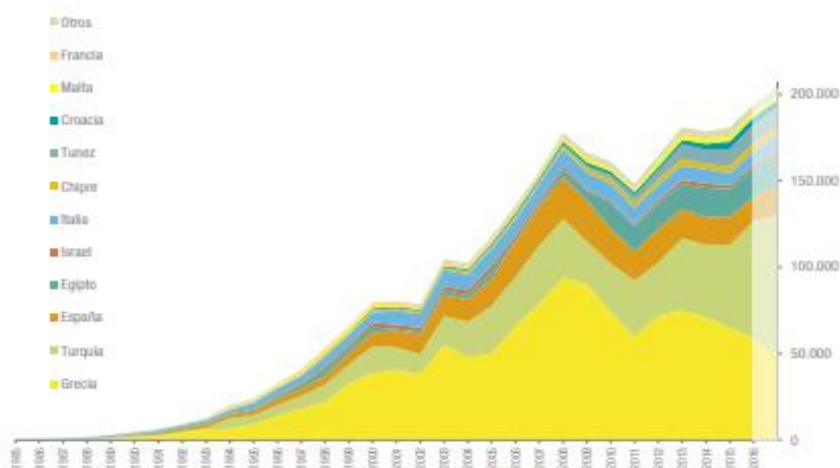
### 1.2.3. Características biológicas

La dorada puede llegar a vivir 11 años, pesar 17,2 kg y medir 70 cm, aunque su longitud, en general, se encuentra en torno a los 35 cm (FishBase, 2018). Posee un cuerpo ovalado y comprimido. Su cabeza presenta un perfil regularmente curvado, con ojos pequeños y la boca relativamente baja. Posee de cuatro a seis dientes similares a los caninos en la parte anterior de cada mandíbula, seguidos por unos dientes similares a los molares y dispuestos en dos, tres o cuatro filas. Tiene un color gris plateado, una gran mancha negra en el origen de la línea lateral que se extiende en el margen superior del opérculo, y una banda frontal dorada entre los ojos, bordeados por dos áreas oscuras. Posee también líneas longitudinales oscuras en los costados y una banda oscura en la aleta dorsal (FAO, 2009).



**Figura 3.** Imagen de una dorada. Fuente: FAO, 2009





**Figura 5.** Evolución de la producción de dorada de acuicultura en el área mediterránea y el resto del mundo en el periodo 1985-2016. Fuente: APROMAR, 2017

En España, la producción de dorada de acuicultura en 2016 ha sido de 13.740 toneladas. La Comunidad Valenciana ha encabezado esta producción, con un 40,9% del total, seguida por Murcia, Canarias, Andalucía y Cataluña. (APROMAR, 2017).

### 1.3. Inclusión de materias primas vegetales en piensos para la acuicultura

#### 1.3.1. La importancia de la alimentación en la acuicultura

La alimentación de los animales en la acuicultura, en particular la de los peces, es un elemento clave de su viabilidad. La optimización del uso de las materias primas, el conocimiento sobre los nutrientes, su digestibilidad y el correcto manejo son esenciales para el desarrollo responsable y rentable de esta actividad (APROMAR, 2017)

La creciente demanda de la producción acuícola ha llevado a un aumento en la demanda de los piensos empleados para la alimentación de los peces. Los piensos deben suplir el aporte proteico requerido por los peces. Así mismo, deben suministrarles cantidades óptimas de EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico), que garanticen su contenido en ácidos grasos omega 3 de cadena larga, de forma que se obtenga un pescado saludable y de alta calidad. Tradicionalmente, los piensos han estado constituidos por aceites y harinas de pescado, imprescindibles, particularmente, para conseguir un contenido óptimo de ácidos grasos omega 3 y proteínas en especies carnívoras (FAO, 2014).

En la actualidad, aproximadamente una tercera parte de la materia prima empleada para producir harina y aceite de pescado está formada por subproductos y desechos, en lugar del pescado entero. Sin embargo, a pesar de esto, la creciente producción del sector acuícola y la consiguiente demanda de los piensos, han encarecido sus precios de forma importante. Algunas alternativas, como la producción de EPA y DHA a partir de microalgas marinas, parecen ser demasiado caras para la elaboración de piensos y no son una opción viable en un futuro próximo. Para reducir los costes de producción, se está tratando de sustituir la costosa harina y aceites de pescado por

alternativas vegetales más baratas, y capaces de suplir el aporte nutricional requerido por los peces (FAO, 2014).

### 1.3.2. Ejemplos de fuentes proteicas vegetales alternativas

Las proteínas son el nutriente de mayor coste de los componentes incluidos en los piensos para la alimentación de los peces (Pereira and Oliva-Teles, 2002). La harina de pescado suele ser la única fuente de proteínas en las dietas de los peces, debido a su alto nivel nutricional y palatabilidad. Sin embargo, el creciente coste y la disponibilidad limitada de la harina y aceite de pescado en el mercado internacional (Estruch *et al.*, 2015), ha promovido la búsqueda de nuevas estrategias nutricionales para la producción de una dieta alternativa, más rentable y sostenible, siendo necesario reducir estos componentes en el alimento de los peces (Pereira and Oliva-Teles, 2002; FAO, 2016).

Entre las alternativas como fuentes proteicas, se está investigando y promoviendo el empleo de harinas de origen vegetal, ya que cuentan con ciertas ventajas, como una mayor sostenibilidad y composición nutricional relativamente constante, así como una gran disponibilidad y precios más competitivos (Pereira and Oliva-Teles, 2002).

Una de las alternativas más estudiadas y empleadas, es la inclusión de harina de soja (SBM) como principal fuente proteica (Fadel *et al.*, 2017). La SBM supone una opción muy rentable para sustituir la harina de pescado, debido a su alto contenido en proteínas, un perfil de aminoácidos relativamente equilibrado, buena digestibilidad y precio menor que el de la harina de pescado (Wang *et al.*, 2016). Su principal limitación es su bajo contenido en metionina y lisina, así como en fósforo, los cuales deben adicionarse al pienso para obtener un crecimiento óptimo (Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, aunque no de forma tan acentuada como las harinas de pescado, la harina de soja también está comenzando a encarecerse en los últimos años, por lo que es necesario buscar distintas alternativas (Fadel *et al.*, 2017).

Otra de las fuentes vegetales que han sido empleadas en la alimentación de peces es la harina de girasol. Ésta se extrae del aceite de semillas de girasol utilizadas para alimentar el ganado. Se trata de una fuente de proteínas de alta calidad, disponible a bajo precio en comparación con otras fuentes proteicas vegetales. Las semillas contienen compuestos fenólicos, que pueden reducirse con técnicas comunes de procesamiento, como el calor seco o húmedo. Sin embargo, debido a la ausencia de un proceso de descascarillado efectivo, el contenido en fibra de las semillas de girasol es elevado (15-24%), limitando el porcentaje de inclusión en la dieta de los peces. Por otra parte, su contenido en lisina, así como la energía digestible son bajos en comparación con otras harinas. El máximo contenido en harina de girasol en piensos para dorada, no debe superar el 12%, ya que niveles mayores afectan negativamente al crecimiento de los peces y producen alteraciones a nivel intestinal (Nogales Mérida *et al.*, 2011).

Las semillas de algarroba constituyen otra alternativa que ha surgido ante el reciente encarecimiento de la harina de soja. Su semilla tiene un alto contenido en proteínas, y es la parte empleada como materia prima en la dieta de los peces. Estudios realizados en dorada empleando

piensos con distintos contenidos en semillas de algarroba, no han mostrado efectos adversos para un porcentaje en pienso del 20% de este componente (Martínez-Llorens *et al.*, 2012). Sin embargo, para niveles del 30%, aunque el crecimiento y la supervivencia permanecen inalterados, se observan anomalías en la composición bioquímica corporal y parámetros histopatológicos a nivel intestinal y hepático (Fadel *et al.*, 2017).

Otras semillas de leguminosas también han sido incluidas en piensos para peces, debido a su principal ventaja: pueden sustituir tanto el grano (maíz, trigo), como las proteínas (harina de pescado o de soja). Sin embargo, en la práctica, su nivel de inclusión en la dieta es limitado, debido a su bajo nivel de proteínas, alto nivel de carbohidratos y un perfil de aminoácidos menos adecuado que, por ejemplo, el que presenta la harina de soja (Pereira and Oliva-Teles, 2002). Por otra parte, el empleo de semillas de guisantes parece no alterar el comportamiento y fisiología de las doradas si se emplea en un 20% (Sánchez-Lozano *et al.*, 2011). No obstante, es necesario realizar más estudios e investigaciones en esta línea.

El gluten de trigo es un producto obtenido tras la extracción del almidón de la harina de trigo. En el proceso, se eliminan las fibras solubles y la fracción de almidón. Se compone principalmente de dos tipos de proteínas, gliadinas y gluteninas. Además, se trata de una fuente muy rica en proteínas y con un adecuado perfil de aminoácidos (Apper-Bossard *et al.*, 2013). Presenta un contenido bajo en lisina (Apper-Bossard *et al.*, 2013), encargada de regular la síntesis de carnitina en el músculo esquelético y el hígado, jugando un papel importante en el transporte de ácidos grasos de larga cadena a la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación (Malik, Shah and Azzam, 2017). Esto podría arreglarse añadiendo un suplemento de lisina en la dieta. Además, el gluten de trigo contiene un mayor nivel de sulfuro y glutamina que otras fuentes proteicas vegetales, lo que mejora la salud intestinal y ayuda a regular el sistema inmune. Debido a su buena digestibilidad y ausencia de factores antinutricionales, permite una sustitución de grandes proporciones de harina de pescado, sin alterar de forma importante el crecimiento y la composición bioquímica del pez (Apper-Bossard *et al.*, 2013). Sin embargo, el problema del gluten de trigo es el alto precio de éste, en ocasiones, mayor que el de la harina de pescado, lo que limita, por lo tanto, su inclusión en piensos para peces.

### 1.3.3. Limitaciones y efectos negativos en los peces

En general, las principales limitaciones que supone la sustitución de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales residen en la presencia de factores antinutricionales, un perfil de aminoácidos inadecuado, baja digestibilidad de nutrientes y bio-disponibilidad de los mismos (Daniel, 2018), así como una menor palatabilidad (Pereira and Oliva-Teles, 2002).

El intestino de los peces constituye un sistema multifactorial, con un importante papel fisiológico en la absorción de los nutrientes, la regulación osmótica y la respuesta inmune e inflamatoria (Minghetti *et al.*, 2017) así como constituyendo una barrera frente a patógenos, toxinas y microorganismos (Ringø *et al.*, 2010). El tracto gastrointestinal constituye una de las primeras líneas de defensa ante la invasión de agentes patógenos, ya que contiene una microbiota endógena



compleja, así como ácidos, sales biliares y enzimas que ayudan a crear un ambiente hostil para el invasor (Gómez and Balcázar, 2008).

Se ha demostrado que una microbiota endógena apropiada es clave para mantener un estado adecuado de salud, ya que interviene en el correcto metabolismo de nutrientes y sustratos orgánicos, y contribuye a la resistencia frente a contaminación por patógenos. Además, el establecimiento de una microbiota propicia juega un papel crucial en la regulación inmunofisiológica del huésped, proporcionando señales que ayudan al desarrollo y mantenimiento del sistema inmune (Gómez and Balcázar, 2008). En este sentido, el intestino tiene un rol fundamental, ya que alberga la mayor población de la microbiota del organismo (Gajardo *et al.*, 2016).

Muchos de los efectos limitantes del empleo de materias primas vegetales residen en que éstas afectan a la fisiología intestinal de los peces, ya que el intestino es uno de los primeros tejidos expuestos ante la ingestión de comida (Baeza-Ariño *et al.*, 2016). En el caso concreto de la dorada, se han observado alteraciones en la integridad del epitelio en casos de sustituciones del 60%, así como indicios de inmunosupresión si se alcanza un nivel del 75% (Estruch *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, la alimentación es uno de los principales factores que influyen en la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal. Las dietas con harinas vegetales han tenido un impacto en la composición de la microbiota, provocando alteraciones en las funciones inmunológicas del intestino, así como aumentando el daño en el área de absorción, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades intestinales.

En cuanto a los factores antinutricionales, se definen como componentes endógenos que reducen la ingesta de alimento, el crecimiento, la digestibilidad lipídica o proteica y el aprovechamiento de los nutrientes. Están involucrados en enfermedades como la enteritis y diarrea. Generalmente, la sustitución de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales incrementa el nivel de fibra en la dieta de los peces. Muchas especies tanto carnívoras como herbívoras no poseen una adecuada capacidad para digerir estas fibras, por lo que un alto contenido en las mismas supone una reducción de la digestibilidad del alimento, actuando como factores antinutricionales. Además de las fibras, los niveles de otros factores antinutricionales, como son el ácido fítico, inhibidores enzimáticos, lectinas, saponinas, fitoestrógenos, fitosteroles y oligosacáridos, se ven a su vez incrementados (Apper-Bossard *et al.*, 2013). Además, estos compuestos promueven el acceso de bacterias al intestino, alterando, por tanto, la microbiota intestinal en lo que se refiere a abundancia y riqueza de especies (Estruch *et al.*, 2015). Una microbiota desequilibrada puede dar lugar a los efectos anteriormente mencionados.

Los efectos negativos asociados a estas fuentes proteicas vegetales varían en función de la fuente vegetal, el proceso de producción del alimento y el porcentaje de inclusión en la dieta (Apper-Bossard *et al.*, 2013). Por ello, es necesario seguir investigando para evitar la dependencia de harina de pescado en los piensos para peces carnívoros, y maximizar los porcentajes de inclusión de fuentes vegetales alternativas, con el objetivo de alcanzar una acuicultura más rentable y sostenible.

#### 1.4.Desarrollo de estudios anteriores

Diversos autores han llevado a cabo investigaciones centradas en el estudio *in vivo* de la relación entre alteraciones en el tracto gastrointestinal de los peces e infecciones por distintos patógenos. Un ejemplo es el trabajo de Palaksha *et al.*, (2008), en el que se recoge el mucus cutáneo del lenguado (*Paralichthys olivaceus*) con una espátula. A partir del extracto de mucus, se estudia el contenido en IgM, un importante componente inmune humoral. Así mismo, se lleva a cabo un ensayo de hemaglutinación, y se observa la actividad de distintas enzimas, así como la del complemento y antibacteriana ante distintos estímulos de interés.

Sin embargo, medir el daño causado por bacterias patógenas a nivel intestinal y obtener las condiciones experimentales deseadas, resulta difícil trabajando con sistemas *in vivo*. Además, se requieren instalaciones específicas, altos costes operativos y un gran número de peces para cada experimento (Hartviksen *et al.*, 2015). Por tanto, es conveniente emplear métodos *ex vivo*, que ayudan a controlar condiciones experimentales específicas, así como a reducir el número de experimentos y de peces utilizados. En los últimos años, se ha empleado el método *ex vivo* del saco intestinal, con el objetivo de evaluar posibles cambios histológicos y bacteriológicos en el intestino tras la exposición a altos niveles de bacterias ácido lácticas y patógenos (Heikkinen *et al.*, 2006; Løvmo Martinsen *et al.*, 2011 ; Ringø *et al.*, 2010; Hartviksen *et al.*, 2015)). Este método consiste en extraer el intestino completo mediante la disección del pez y formar sacos a partir de diferentes secciones del mismo, de forma que éstos se pueden rellenar de las distintas soluciones de bacterias patógenas.

En el caso concreto del estudio de Hartviksen *et al.*, (2015), se analizaron ejemplares de Salmón Atlántico (*Salmo Salar L.*) que habían sido alimentados sustituyendo el pienso de pescado por distintos piensos vegetales (guisante, girasol y pluma) y expuestos a dos estímulos bacterianos (*C.divergens* y *A.salmonicida*). En este caso se estudiaron los impactos de la dieta y estímulos extrayendo el intestino completo y exponiéndolo a soluciones salinas o concentraciones bacterianas de interés, con un posterior análisis del estado de las mitocondrias del intestino proximal. Así mismo, se realizó un análisis microbiológico del intestino mediante extracción del RNA de las muestras y posterior RT-qPCR.

Los métodos *ex vivo* están limitados por el tiempo de viabilidad del tejido en las condiciones de cultivo. Por ello, algunos trabajos combinan métodos *in vivo* con técnicas *in vitro*. Es el caso de un estudio (Jiang *et al.*, 2015) en el que se analiza el efecto de un suplemento de arginina en la alimentación de juveniles de carpa (*Cyprinus carpio var. Jian*). Así, se analizó si la dieta con arginina atenuaba la inflamación inducida por LPS *in vivo*, al mismo tiempo que se estudiaba el efecto de la arginina en enterocitos aislados y expuestos a LPS.

En el caso de la dorada, se ha publicado un trabajo en el que la técnica consiste en extraer sangre con el objetivo de estudiar la actividad de la ruta del complemento, el grado de hemólisis y los niveles de IgM; así mismo se aíslan los leucocitos para estudiar su actividad fagocítica (Cerezuela, Guardiola, *et al.*, 2012).

El método *ex vivo* más empleado en caso de estudiar la interacción de estímulos bacterianos con el intestino es el método del saco intestinal, comentado anteriormente. Sin embargo, en el presente trabajo, se desarrolla un método *ex vivo* basado en la obtención de cultivo de explantes intestinales, que permite controlar las condiciones experimentales y simular un ambiente propicio para prolongar la viabilidad del tejido en cultivo el máximo tiempo posible, así como disminuir el número de peces empleados en el estudio.

## 2. Objetivos

Los estudios que desarrollan retos bacterianos en acuicultura, suponen el empleo de una gran cantidad de peces e instalaciones aisladas que aseguren un correcto aislamiento, respecto del resto de experimentos. Por lo tanto, implican un elevado tiempo, gasto económico y recursos humanos e instalaciones especiales. A pesar de que los procedimientos *ex vivo* permiten desarrollar retos bacterianos en cualquier momento de una prueba de crecimiento, han sido poco aplicados en acuicultura, especialmente a nivel intestinal

Por todo ello, el objetivo general del presente trabajo es el desarrollo de un estudio preliminar en el que se pretende evaluar, mediante un procedimiento *ex vivo*, el posible efecto de la dieta a nivel intestinal en el sistema inmune de las doradas al exponerlas ante distintos estímulos bacterianos, utilizando un reducido número de peces.

Siendo los objetivos específicos del estudio los que se describen a continuación:

- Estudiar el efecto de la dieta sobre genes relacionados con la respuesta inflamatoria, inmune, y la integridad celular.
- Evaluar la salud intestinal a través de la expresión génica de los genes anteriormente mencionados, al exponer el tejido intestinal *ex vivo* a distintos tratamientos bacterianos.
- Conocer la influencia de la sección del tracto intestinal empleada en el análisis.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Aspectos éticos

El protocolo experimental se llevó a cabo siguiendo el Real Decreto 53/2013 y la Directiva Europea 2010/63/UE sobre la protección de animales empleados para la investigación científica tras la evaluación y aprobación por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

Los peces se pesaron cada 30 días, y se empleó benzocaína (Guinama ®, Valencia, España) como anestésico, con el objetivo de minimizar el dolor animal durante los muestreos.

#### 3.2. Diseño experimental

##### 3.2.1. Resumen del ensayo completo

En líneas generales, el desarrollo del experimento se divide en dos etapas. La primera de ellas es la más breve y se realizó *in vivo*; comienza con la alimentación de los peces con las distintas dietas experimentales, las cuales se describirán con detalle en el apartado 3.2.3., y el posterior sacrificio de los animales. La segunda etapa constituye el ensayo *ex vivo*, en el que los peces se diseccionan para obtener sus intestinos, los cuales se dividen en dos secciones, de las que se obtienen a su vez 8 fragmentos de menor tamaño; en esta etapa se lleva a cabo la exposición al reto bacteriano, así como la extracción del RNA de las muestras, su paso a cDNA y, por último, un ensayo RT-qPCR mediante el cual se evaluó la expresión génica de los genes seleccionados (Figura 6).

A continuación, se describirá cada uno de los pasos de forma detallada.

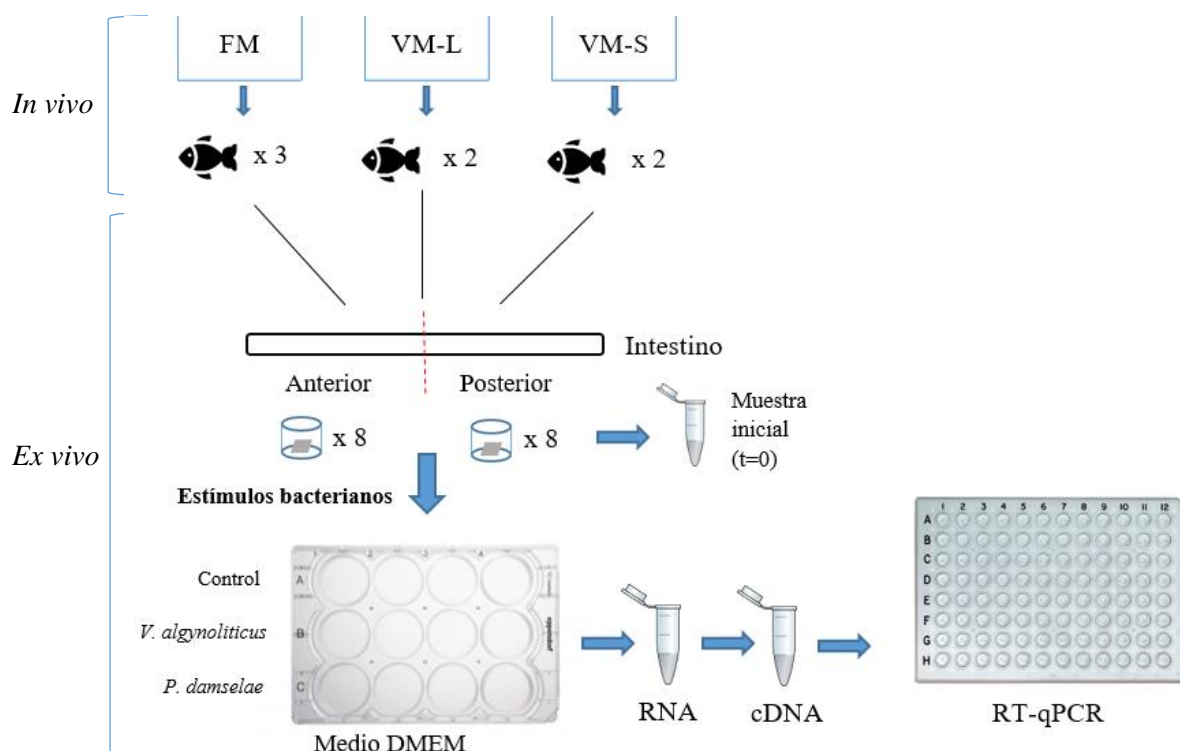


Figura 6. Esquema paso a paso del ensayo

### 3.2.2. Peces, sistema y condiciones

El ensayo *in vivo*, se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Politécnica de Valencia. Para ello, se emplearon tanques de fibra de vidrio con 1.750 L de capacidad. Se utilizó un sistema de recirculación de agua salada, con una capacidad de 75 m<sup>3</sup>, que incorporaba un filtro mecánico rotativo, así como un biofiltro de gravedad con una capacidad de 6 m<sup>3</sup>. En cuanto a las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento, se ven reflejadas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones de crecimiento de los peces

Temperatura	23,0±1,5 °C,
Salinidad	30±1,7 g/L
O2 disuelto	6,0±0,5 mg/L
pH del agua	7,5

Los alevines de dorada fueron suministrados por la empresa BERSOLAZ (Bersolaz Spain, S. L. U., Culmarex) en Port de Sagunt (Valencia, España). Durante el periodo de aclimatación a las nuevas condiciones de cultivo, éstos fueron alimentados con un pienso comercial estándar, cuya composición incluía un 55,2% de proteína cruda, 17,3% de grasa, 11,6% de carbohidratos, 9,4% de cenizas y 6,4% de humedad. Tras este periodo, los peces se distribuyeron de forma aleatoria en tanques separados, de forma que a cada uno de los cuales se suministraba un tipo de pienso distinto: FM (Fish Meal) y VM (Vegetable Meal), los cuales se describirán con detalle en la sección 3.2.3. El peso medio de los alevines al inicio del experimento era de 9,6±1,9 g. En total se consideraron tres grupos de peces: el grupo FM, alimentado durante todo el experimento con dieta FM, el grupo VM-Long (VM-L), que fue alimentado con VM durante todo el experimento, y el grupo VM-Short (VM-S), compuesto por peces alimentados con dieta FM, sustituyéndola por una VM durante los últimos 15 días antes del sacrificio. Todos los peces fueron alimentados dos veces al día (a las 9:00 h y a las 17:00 h) durante 6 días a la semana.

Se seleccionaron por azar 7 peces: 3 de ellos del grupo experimental FM, 2 del grupo VM-Long y 2 del grupo VM-Short, que fueron empleados para llevar a cabo el posterior ensayo *ex vivo*.

### 3.2.3. Dietas experimentales empleadas

Los piensos empleados para el ensayo fueron producidos en la fábrica de piensos de la Universidad Politécnica de Valencia, empleando un extrusor semi-industrial de doble tornillo (CLEXTRAL BC-45, Firminy, St Etienne, Francia).

Se proporcionaron dos tipos de dietas experimentales: la dieta FM, en la que la porción proteica procedía en su mayor parte de harina de pescado (59%) y la fuente de carbohidratos empleada era harina de trigo; y la dieta VM, en la que la harina de pescado era sustituida por fuentes proteicas vegetales, así como un suplemento de aminoácidos sintéticos, con el objetivo de satisfacer los requerimientos aminoacídicos de los juveniles de dorada (Peres and Oliva-Teles, 2009). Ambos tipos de pienso estaban constituidos por un 42% de proteína digerible y un 91% de materia seca. Los ingredientes y composición de cada uno aparecen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Ingredientes y composición de los piensos empleados

Ingredientes	VM (g·kg <sup>-1</sup> )	FM (g·kg <sup>-1</sup> )
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
Vitaminas y minerales *	10	10
Fosfato cálcico	38	
Arginina	5	
Lisina	10	
Metionina	7	
Taurina	20	
Treonina	3	

\*Vitaminas y minerales: 25 g·kg<sup>-1</sup>; Colina, 10 g·kg<sup>-1</sup>; DL - atocoferol, 5 g·kg<sup>-1</sup>; Ácido ascórbico, 5 g·kg<sup>-1</sup>; (PO4)2Ca3, 5 g·kg<sup>-1</sup>; Acetato de retinol, 1 000 000 (IU kg<sup>-1</sup>); Calciferol, 500 (IU kg<sup>-1</sup>); DL-a-tocoferol, 10 g·kg<sup>-1</sup>; Menadiona bisulfito sódico, 0,8 g·kg<sup>-1</sup>; Clorhidrato de tiamina, 2,3 g·kg<sup>-1</sup>; Riboflavina, 2,3 g·kg<sup>-1</sup>; Clorhidrato de piridoxina, 15 g·kg<sup>-1</sup>; Cianocobalamina, 25 g·kg<sup>-1</sup>; Nicotinamida, 15 g·kg<sup>-1</sup>; Ácido pantoténico, 6 g·kg<sup>-1</sup>; Ácido fólico, 0,65 g·kg<sup>-1</sup>; Biotina, 0,07 g·kg<sup>-1</sup>; Ácido ascórbico, 75 g·kg<sup>-1</sup>; Inositol, 15; Betaína, 100 g·kg<sup>-1</sup>; Polipéptidos, 12 g·kg<sup>-1</sup>.

### 3.3. Ensayo ex vivo

#### 3.3.1. Preparación de los estímulos bacterianos

Para llevar a cabo el ensayo, se emplearon cepas bacterianas causantes de importantes enfermedades gastrointestinales en dorada (Moriñigo *et al.*, 2002): *Vibrio alginolyticus* (CECT521) y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (CECT 7198), obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Ambas cepas fueron cultivadas en el medio Marine Broth, recomendado por la CECT, y mantenidas a 22°C. La composición específica de este medio se puede observar en la tabla 3.

Para preparar los estímulos bacterianos, se requiere una concentración de  $3 \cdot 10^7$  ufc/mL para el caso de *V. alginolyticus*, y de  $1 \cdot 10^7$  ufc/mL para *P. damsela* subsp. *piscicida*. Estas concentraciones fueron determinadas en estudios anteriores (Pérez, 2017), en los que se determinó la densidad óptica de los cultivos bacterianos y se realizó un conteo de las colonias cultivadas, de forma que se obtuvieron curvas de calibrado que relacionaban la densidad óptica (DO) con las

unidades formadoras de colonias (ufc). De esta forma, se determina el volumen de cultivo necesario para obtener las concentraciones requeridas de cada cepa, y se centrifuga a 11.000 rpm durante 3 min. A continuación, se elimina el sobrenadante, se lava el pellet empleando PBS y se resuspende en el volumen adecuado del medio de cultivo CO<sub>2</sub> independent culture medium (Gibco®, ThermoFisher), independiente de CO<sub>2</sub> y suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino al 5% y 1% v/v de L-glutamina 1X.

**Tabla 3.** Composición del medio Marine Broth

MARINE BROTH	g/L	μL/L
Bactopeptona	5	
Extracto de levadura	1	
Citrato de Fe (III)	0,1	
NaCl	19,45	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,16	
NaSO <sub>4</sub>	3,24	
CaCl <sub>2</sub>	1,8	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	18,78	
KCl	0,55	
KBr	0,08	
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0571	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,022	
Na·Silicate		2,88
NaF		2.400
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	0,0016	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,008	

### 3.3.2. Obtención de los fragmentos intestinales y muestreo

Siete peces (3 con dieta FM, 2 con dieta VM-Long y 2 con dieta VM-Short) fueron sacrificados exponiéndose a benzocaína (60 ppm) durante 15 min, y a continuación se diseccionaron para obtener sus intestinos, los cuales fueron divididos en dos secciones: intestino anterior e intestino posterior. Cada una de las secciones se fragmentó en 8 réplicas biológicas de 4 mm x mm. Por tanto, se obtuvieron 16 réplicas para cada pez, empleadas para el desarrollo del ensayo *ex vivo*.

### 3.3.3. Ensayo *ex vivo*

En primer lugar, dos réplicas de cada sección de cada pez (es decir, cuatro réplicas por pez) se mantuvieron como muestras iniciales (t=0), por lo que fueron guardadas directamente en un medio comercial para la conservación de la integridad del material genético (RNA later; QIAGEN, España), se almacenaron a 4°C durante la noche y finalmente fueron guardadas a -20°C hasta el proceso de extracción del RNA.



Cada uno de los fragmentos restantes se introdujo de forma individual en pocillos móviles con membranas de poliéster en el fondo, colocándose siempre con la sección epitelial hacia arriba. Por otra parte, se prepararon los distintos tratamientos bacterianos:

- Medio *CO<sub>2</sub> independent* sin cultivo bacteriano, que se mantuvo como control
- Medio *CO<sub>2</sub> independent* con *Vibrio alginolyticus*
- Medio *CO<sub>2</sub> independent* con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Se emplearon placas de 12 pocillos, de forma que cada uno de los tratamientos se repartió en 4 pocillos distintos (Figura 7). Posteriormente, se añadieron a la placa los pocillos móviles con los fragmentos de intestino, empleando una placa para cada pez. Se colocaron dos fragmentos de intestino anterior y dos de intestino posterior, cada uno de ellos en uno de los cuatro pocillos correspondientes al mismo tratamiento. De esta forma, se obtienen dos réplicas (R1 y R1) por sección intestinal para cada uno de los tratamientos, como se muestra en la Figura 7. Finalmente, se añadió a cada pocillo un volumen final de la solución correspondiente, para asegurar que los fragmentos estaban totalmente cubiertos.

Los fragmentos de intestino se mantuvieron expuestos a los estímulos bacterianos durante un periodo de 6 h, de acuerdo con un estudio previamente realizado (Pérez, 2017; Estruch *et al.*, 2015), en el que se llevaba a cabo una comprobación de la integridad celular empleando la enzima LDH (lactato deshidrogenasa), y se establecía que el tejido mantenía su viabilidad tras 6 h en condiciones de cultivo.

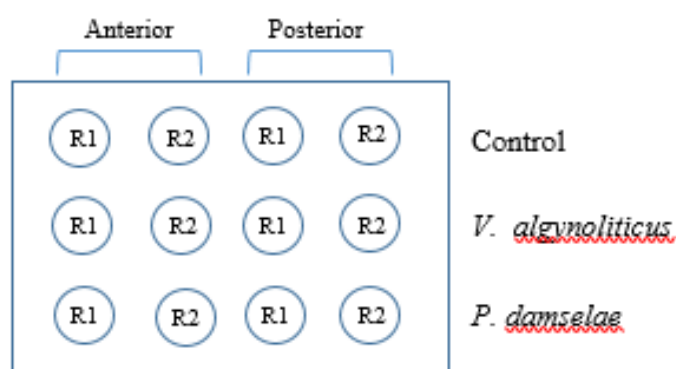


Figura 7. Diseño experimental de los retos bacterianos

### 3.4. Expresión génica

#### 3.4.1. Extracción RNA y tratamiento con DNAsa

El RNA total fue extraído de las muestras de tejido intestinal mediante el método de Fenol/Cloroformo empleando Trizol (Invitrogen, España). Todo el proceso se lleva a cabo en cabina.

Una vez extraído el RNA, realizamos un tratamiento con DNAsa I (Roche) para eliminar cualquier resto de DNA que pueda haber contaminado las muestras. Durante todo el proceso se

trabaja en cabina. Para ello, preparamos una pre-mix en un tubo de 0,2 mL, siguiendo las proporciones indicadas en el protocolo: 1  $\mu$ L DNase : 2,3  $\mu$ L DNase buffer : 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, y añadimos un volumen de 23,3  $\mu$ L de Pre-Mix a cada muestra. A continuación, incubamos las muestras en el termociclador 40 min a 37°C y 5 min a 90°C y, por último, cuantificamos la concentración, calidad e integridad de las muestras con el equipo Nanodrop 2000C (Fisher Scientific SL, España).

### 3.4.2. Paso a cDNA

El paso a cDNA se realiza siguiendo las indicaciones del kit qScript de síntesis de cDNA (Quanta BioScience). En primer lugar, se descongelan en hielo los extractos del RNA total. Se añade a nuevos tubos el volumen de extracto correspondiente a 1  $\mu$ g de RNA total y se completa hasta 15  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Se añaden 5  $\mu$ L del mix de reacción, constituido, siguiendo el kit, por unas proporciones de 4  $\mu$ L qScript Reaction Mix (5x) : 1  $\mu$ L enzima qScript RT. Por último, las muestras se incuban en el termociclador (5 min 22 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C,  $\infty$  4 °C), y se almacenan a -20°C.

### 3.4.3. Ensayo RT-qPCR

#### 3.4.3.1. Condiciones empleadas

Teniendo en cuenta estudios realizados en trabajos anteriores (Pérez, 2017), se decidió emplear como gen de referencia o housekeeping (HK) el gen EF-1 $\alpha$  (Elongator Factor 1 $\alpha$ ).

Se analizó la expresión relativa de 6 genes (Tabla 4), considerados de interés:

- En primer lugar, se seleccionan la interleukina 1 $\beta$  (IL1b) y la interleukina 6 (IL6), dos importantes citocinas que juegan un papel fundamental en la inflamación y en la función de células relacionadas con la respuesta inmune (Heinrich *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008). La ciclooxigenasa 2 (Cox2) se emplea porque se sabe que su expresión se induce en respuesta a mediadores de la inflamación y citocinas, por lo que se encuentra sobreexpresada durante la inflamación (Cerezuela, Meseguer and Esteban, 2013). Se trata de genes relacionados principalmente con procesos inflamatorios.
- La inmunoglobulina M (IgM) es la principal inmunoglobulina producida por los linfocitos B en teleósteos (Rubio-Godoy, 2010). La mucina intestinal (I-Muc) juega un papel importante en la inmunidad innata (Dharmani *et al.*, 2009). Por tanto, ambos genes se seleccionan por su relación con la respuesta inmune.
- Por último, se analizó la expresión del gen de la ocludina (Ocl), por su papel en el mantenimiento de la integridad epitelial (Cunningham and Turner, 2012).

**Tabla 4.** Información sobre los primers correspondientes a los genes empleados

Gene	GeneBank ID	Primer Forward	Primer Reverse	Length	Reference
IL1 $\beta$	AJ277166	GCGACCTACCTGCC ACCTACACC	TCGTCCACCGCCTC CAGATGC	131	Couto et al. 2014
IL6	AM749958	AGGCAGGAGTTTGA AGCTGA	ATGCTGAAGTTGGT GGAAGG	101	Cerezuela et al. 2013
Cox2	AM296029	GAGTACTGGAAGCC GAGCAC	GATATCACTGCCGC CTGAGT	192	Cerezuela et al. 2013 Reyes-Becerril et al. 2013
I-Muc	JQ277712	GTGTGACCTCTTCC GTTA	GCAATGACAGCAAT GACA	102	Pérez-Sánchez et al. 2013
IgM	JQ811851 T	TCAGCGTCCTTCAG TGTTTATGATGCC	CAGCGTCGTCGTCA ACAAGCCAAGC	131	Estensoro et al. 2012
Ocl	JK692876	GTGCGCTCAGTACC AGCAG	TGAGGCTCCACCAC ACAGTA	81	Cerezuela, et al. 2013 Reyes-Becerril et al. 2013
EF1 $\alpha$	AF184170	CTGTCAAGGAAATC CGTCGT	TGACCTGAGCGTTG AAGTTG	87	Cerezuela et al 2013 ReyesBecerril et al. 2013

Todos los ensayos de RT-qPCR y los análisis de expresión génica fueron llevados a cabo mediante el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, y empleando SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Para llevar a cabo el ensayo, empleamos placas de 96 pocillos. Cada reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado, y su volumen final fue de 20  $\mu$ l, incluyendo las muestras diluidas de cDNA (5  $\mu$ l, dilución 1:20), ROX (2  $\mu$ l, dilución 1:500), SYBR® Green (10  $\mu$ l), H2O libre de nucleasas (1  $\mu$ l) y primers forward y reverse (1  $\mu$ l por primer, dilución 1:10). Como calibrador se empleó un pool de muestras para cada una de las dietas, y como blanco, se sustituyó el cDNA por un volumen de agua libre de DNAsas.

Las condiciones en las que se realizaron las reacciones comenzaron con un primer paso de 10 min a 95°C, para la activación de la Taq polimerasa; a continuación, se realizaron 42 ciclos de PCR en los que las muestras se expusieron a 95°C durante 10 s y 60°C durante 20 s. Para evaluar la especificidad de las reacciones, se realizaron análisis de las curvas de melting tras los ciclos de PCR, incrementando la temperatura de 60 a 96°C (1°C/min) y registrando los cambios de intensidad en la emisión de fluorescencia.

#### 3.4.3.2. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa de la expresión de los genes se expresó con respecto al gen de referencia (EF1 $\alpha$ ). Además, el calibrador incluido en cada placa permitió minimizar posibles diferencias en el rendimiento de las reacciones entre distintas placas. Para el análisis de la expresión génica se empleó el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , aplicando la siguiente fórmula:

$$E = 2^{(Ct(c)-Ct(x))} \cdot 2^{(CtHK(x)-CtHK(c))}$$

Donde E es la expresión génica; C es el calibrador; X es la muestra; HK es el gen de referencia (Housekeeping).

Los valores de expresión génica relativa de las muestras correspondientes a los tratamientos bacterianos, se normalizaron con respecto a los valores de expresión génica de las muestras control, calculando así el *fold change* (FC) para cada muestra. De esta forma es posible conocer el efecto de los tratamientos, y eliminar otros factores que no nos interesan.

### 3.5. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics © Centurion XVII (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA).

En primer lugar, para conocer la expresión génica inicial de los peces, es decir, el impacto de la dieta sobre el estado inflamatorio e inmune previamente al ensayo (Torrecillas *et al.*, 2017), se seleccionaron los datos de expresión de estas muestras iniciales para realizar un ANOVA multifactorial para cada gen, empleando el factor dieta.

A continuación, se compararon las muestras iniciales (t=0) con respecto a las muestras control (sin estímulo bacteriano), con el objetivo de estudiar la influencia del medio de cultivo.

Posteriormente, se calculó el *fold change* de las distintas muestras sometidas a estímulo bacteriano, normalizando los valores de su expresión génica relativa con respecto a los valores de las muestras control. A partir de estos valores normalizados, se llevó a cabo el análisis estadístico. En primer lugar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multivariante, en el que se compararon todos los factores influyentes en el estudio: dieta (FM, VM-Long, VM-Short), sección (intestino anterior o posterior) y estímulo (*V. alginolyticus* o *P. damsela* subsp. *piscicida*). A continuación, se llevó a cabo un ANOVA simple para cada uno de estos factores de forma individual. En todos los casos, las diferencias en la expresión génica se consideran estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Evaluación de las muestras iniciales

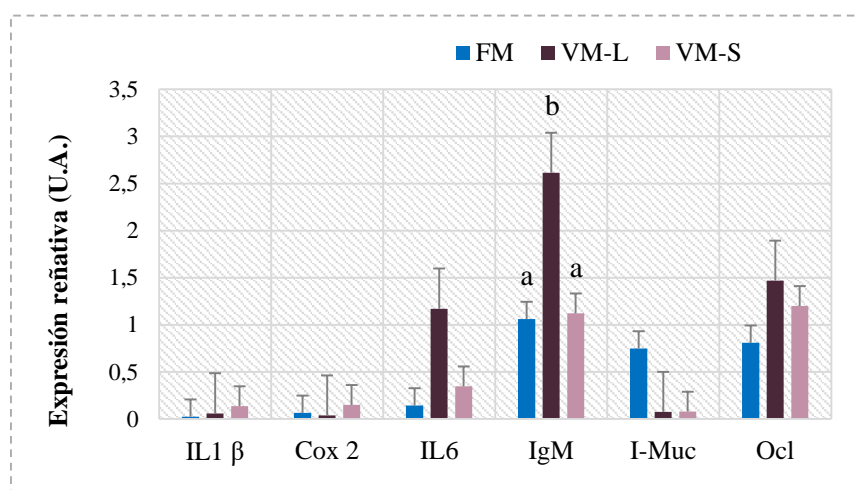
Las muestras iniciales son las correspondientes a los peces sacrificados con anterioridad al reto bacteriano, tras finalizar el periodo de alimentación.

En primer lugar, se llevó a cabo, para cada gen, una ANOVA simple empleando únicamente las muestras iniciales, teniendo en cuenta el factor de la dieta. Los p-values obtenidos en el análisis muestran que en el caso del gen IgM existen diferencias significativas entre las distintas dietas (Tabla 5).

**Tabla 5.** p-values correspondientes al ANOVA simple de las muestras iniciales

	IL1B	IL6	Cox2	IgM	I-Muc	Ocl
Dieta	0,3814	0,2355	0,3024	0,0479	0,3299	0,6825

Por otra parte, se comparó gráficamente la expresión génica de las muestras iniciales entre las distintas dietas para cada gen, observándose que en los peces alimentados con dieta VM-Long, la expresión de IgM aumentaba respecto a la del resto de dietas (Figura 8).



**Figura 8.** Expresión génica de los genes IL1β, Cox2, Ocl, IgM, I-Muc e IL6 en las muestras iniciales. Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión.

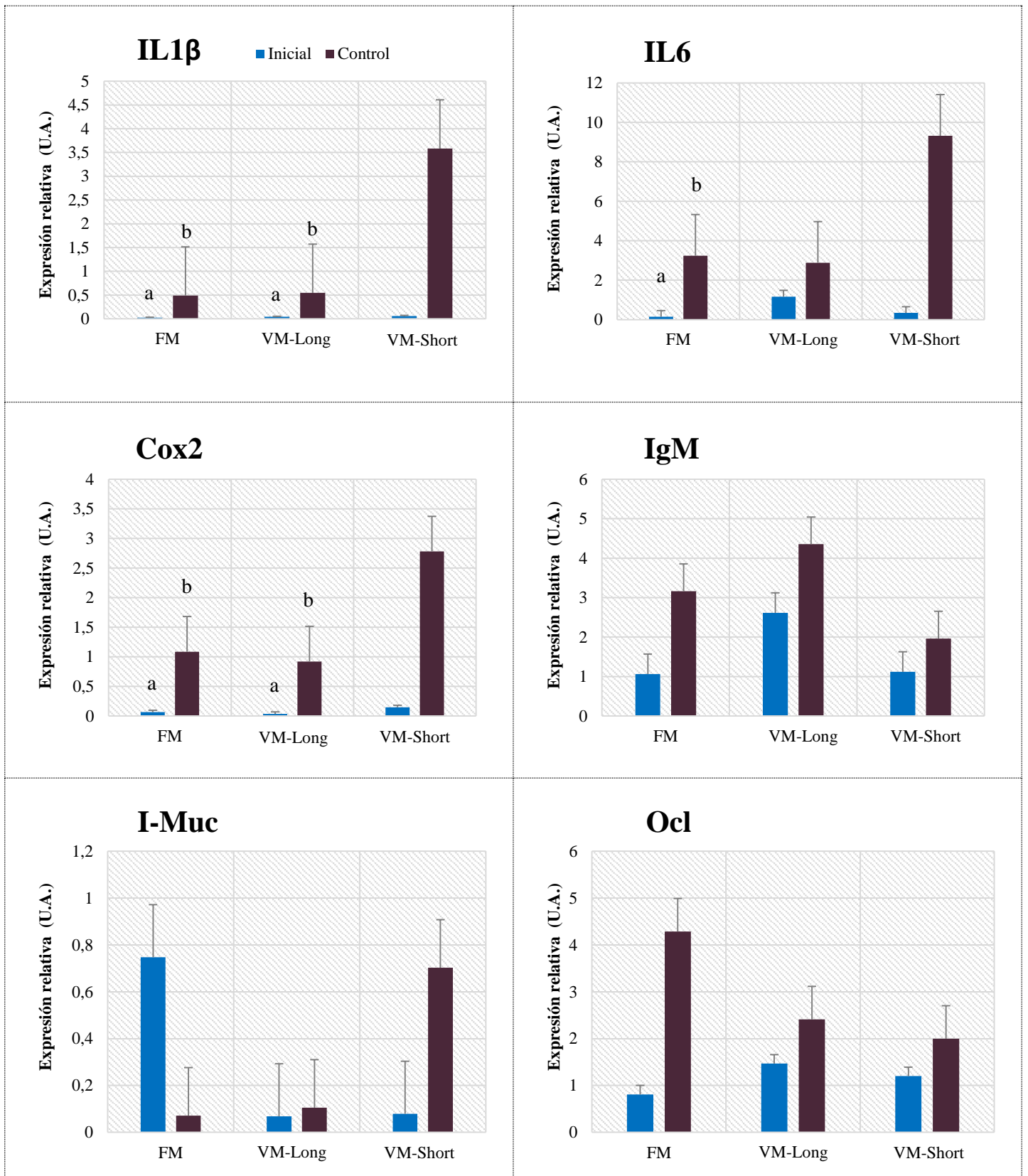
#### 4.2. Influencia del medio de cultivo

Para evaluar la influencia del medio de cultivo sobre la expresión génica de las muestras, se comparó la expresión relativa de las muestras iniciales con la de las muestras control, definidas como las muestras que fueron incubadas en medio de cultivo sin añadir ningún tipo de reto bacteriano. Se llevó a cabo una ANOVA simple para cada una de las dietas, registrándose diferencias entre muestras iniciales y control en los genes inflamatorios (Tabla 6).

**Tabla 6.** *p-values* obtenidos tras el ANOVA simple de las muestras iniciales y control

	IL1B	IL6	Cox2	IgM	I-Muc	Ocl
FM	0,0353	0,0138	0,0006	0,1195	0,1584	0,1827
VM-L	0,0099	0,1146	0,0202	0,4123	0,1876	0,5463
VM-S	0,2332	0,3223	0,2405	0,4151	0,2155	0,6686

A excepción del gen IL6, donde sólo se observó un aumento significativo en el grupo experimental FM, los genes inflamatorios mostraron una mayor expresión para los grupos experimentales FM y VM-Long (Figura 9, véase página 22).



**Figura 9.** Expresión génica de los genes *IL1 $\beta$* , *Cox2*, *Ocl*, *IgM*, *I-Muc* e *IL6* en las muestras iniciales y control. Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión.

### 4.3. Estudio del reto bacteriano

Dado las diferencias obtenidas entre el grupo inicial y el control, se normalizó la expresión de todas las muestras correspondientes a los tratamientos bacterianos respecto a las muestras control, eliminando así los efectos debidos a la metodología experimental del estudio.

En primer lugar, gracias a una ANOVA multifactorial, se evaluó la posible interacción entre dieta, tratamiento y sección para cada gen. Se puede observar que el reto bacteriano afectó a los genes relacionados con la inflamación, tanto a nivel de dieta como de tratamiento. Por otra parte, no se muestran diferencias con respecto a la sección (Tabla 7). Asimismo, no se observaron interacciones significativas entre los factores.

**Tabla 7.** *p-values* resultantes tras el ANOVA multifactorial de los FC correspondientes a muestras control y sometidas a tratamiento bacteriano.

	IL1B	IL6	Cox2	IgM	I-Muc	Ocl
Dieta	0,5266	0,5496	0,0246	0,2558	0,0721	0,5705
Tratamiento	0,0028	0,0405	0,0244	0,1568	0,3995	0,1778
Sección	0,1553	0,1351	0,1714	0,8977	0,4066	0,6174

A continuación, se analizaron estos genes teniendo en cuenta la dieta, tratamiento y sección, pero de forma independiente.

En base a la dieta, se registraron diferencias entre tratamientos en el grupo FM tanto en genes inflamatorios (IL1 $\beta$  e IL6) como del sistema inmune (I-Muc), mientras que en el grupo VM-Long y VM-Short se observaron únicamente en los genes inflamatorios (IL1 $\beta$ ) e inmunes (I-Muc), respectivamente. Además, se registraron diferencias entre secciones dentro del grupo VM-Long en el gen IL6 (Tabla 8).

**Tabla 8.** *p-values* resultantes del ANOVA simple para tratamiento bacteriano (T) y sección (S) para cada una de las dietas. Los valores significativos quedan marcados en rojo ( $p < 0,05$ ).

	IL1B		IL6		Cox2		IgM		I-Muc		Ocl	
	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
FM	0,0007	0,8465	0,0262	0,7663	0,2748	0,159	0,8744	0,1536	0,0281	0,2614	0,3932	0,364
VM-L	0,0002	0,2455	0,2575	0,039	0,3758	0,3935	0,4721	0,7193	0,5088	0,3383	0,1413	0,4502
VM-S	0,2876	0,209	0,3453	0,2056	0,108	0,3777	0,2803	0,504	0,0442	0,9814	0,3176	0,2103

En segundo lugar, se evaluó la influencia de la dieta y la sección intestinal para cada uno de los tratamientos bacterianos (Tabla 9). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ningún caso, para ninguno de los genes.



**Tabla 9.** *p-values* resultantes del ANOVA simple para dieta (D) y sección (S) para cada uno de los tratamientos bacterianos. Los valores significativos quedan marcados en rojo ( $p < 0,05$ ).

	IL1B		Cox2		IL6		IgM		I-Muc		Ocl	
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
V. alginoliticus	0,7051	0,2781	0,2576	0,1747	0,6771	0,2418	0,4706	0,4559	0,1971	0,3789	0,2586	0,5494
P.damselae	0,6583	0,2549	0,1106	0,6677	0,9251	0,4525	0,4853	0,3329	0,3349	0,4118	0,5707	0,9694

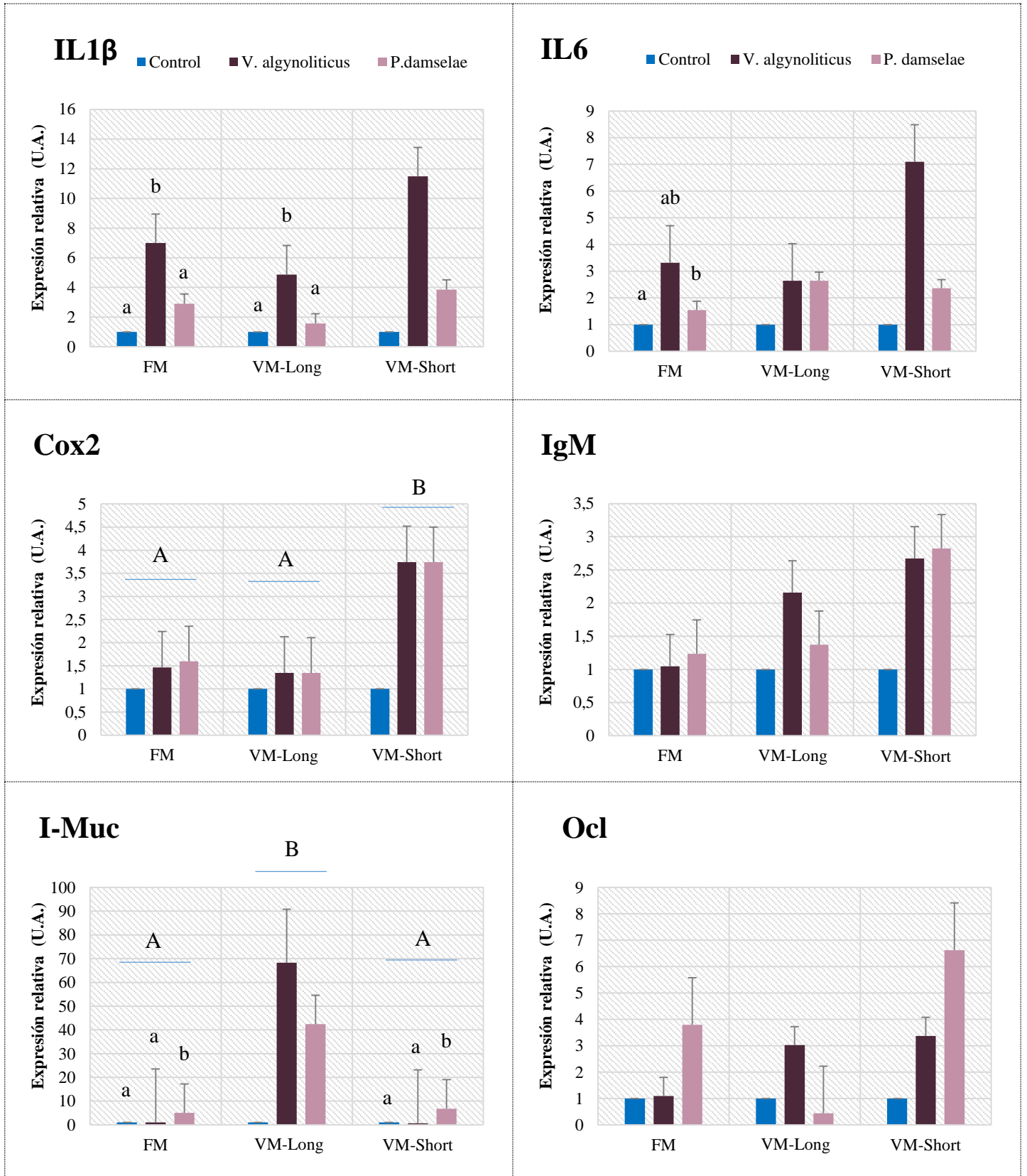
Por último, se evaluó la influencia de la dieta y el tratamiento bacteriano para cada una de las secciones intestinales, de forma que se registraron diferencias entre tratamientos para el gen IL1 $\beta$  en ambas secciones, y para el gen I-Muc únicamente en la sección anterior (Tabla 10).

**Tabla 10.** *p-values* resultantes del ANOVA simple para dieta (D) y tratamiento (T) para cada una de las secciones del intestino. Los valores significativos quedan marcados en rojo ( $p < 0,05$ ).

	IL1B		Cox2		IL6		IgM		I-Muc		Ocl	
	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T
Anterior	0,3186	0,026	0,0578	0,0735	0,3221	0,0565	0,187	0,293	0,7509	0,0137	0,1537	0,3426
Posterior	0,121	0,0152	0,3376	0,296	0,0588	0,5507	0,9039	0,0975	0,0985	0,4177	0,4934	0,3585

Los gráficos correspondientes a la respuesta de las muestras ante el reto bacteriano en función del tratamiento y la dieta, mostraron que los peces alimentados con dieta FM registraron un aumento de los genes IL1 $\beta$  e IL6 y los peces con dieta VM-Long registraron mayor expresión únicamente del gen IL1 $\beta$  en presencia de *V. alginoliticus*. Al mismo tiempo, *P. damsela*e indujo un aumento de la expresión de los genes I-Muc (en peces con dieta FM y VM-Short) e IL6 (para la dieta FM) (Figura 10, véase página 25).

Por otro lado, la dieta VM-Short indujo un aumento significativo respecto a las demás dietas en el gen Cox 2, y la dieta VM-Long lo indujo en el gen I-Muc (Figura 10, véase página 25).



**Figura 10.** Expresión génica de los genes *IL1 $\beta$* , *Cox2*, *Ocl*, *IgM*, *I-Muc* e *IL6* en las muestras control y las correspondientes a los tratamientos con *V. alynoliticus* y *P. damsela*. Las líneas verticales indican el error típico, y las distintas letras representan los grupos con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión (a, b: diferencias entre tratamientos; A, B: diferencias entre dietas).

## 5. Discusión

En primer lugar, tras una alimentación prolongada *in vivo* con las 3 dietas experimentales (FM, VM-Long y VM-Short), se registró un aumento significativo de IgM en peces alimentados con dieta VM-Long, lo que coincide con otros estudios (Krogdahl *et al.*, 2000), en los que se observa un aumento de IgM en la mucosa intestinal de los peces ante la alimentación con dietas vegetales. La ausencia de alteraciones observadas *in vivo* para el resto de genes seleccionados podría indicar que las dietas utilizadas no afectan la expresión de los mismos. Por otro lado, en trabajos anteriores (Estruch *et al.*, 2015), se ha sugerido que una alimentación prolongada con dietas que incluyen una alta sustitución supone una depresión tanto del sistema inmune como inflamatorio, lo que explicaría la falta de respuesta para la mayoría de genes en el grupo experimental VM-Long. En el caso del grupo experimental VM-Short, la ausencia de diferencias estadísticas podría deberse a que la duración del estímulo (2 semanas con una dieta VM) fuera demasiado corta para estimular una respuesta.

La expresión diferencial de las muestras control respecto a las iniciales indica una posible influencia del medio de cultivo, pero estas diferencias podrían deberse más a la respuesta inflamatoria del tejido debido al estrés al que se somete el intestino en el proceso de cirugía para la obtención de los explantes, que a la influencia del mismo medio (Harms and Lewbart, 2000).

Por otro lado, el reto bacteriano indujo respuestas diferenciales según los factores de sección intestinal, dieta y tratamiento bacteriano. A continuación, se discutirá la respuesta intestinal en base a cada uno de los factores en estudio, individualmente o en combinación.

Con respecto a la **sección intestinal**, se registró un aumento significativo del gen IL6 en la sección anterior, en peces del grupo VM-Long. La sección anterior del intestino tiene una función de absorción de nutrientes (Estruch *et al.*, 2015), lo que podría explicar su respuesta ante una alimentación con dieta vegetal. Sin embargo, se trata de un caso aislado para este gen y esta dieta, lo que lleva a pensar que el aumento registrado podría constituir una anomalía, siendo resultado de la variabilidad existente entre los ejemplares seleccionados y del bajo número de peces empleados en este estudio. De hecho, la expresión de los genes inmunes e inflamatorios suele verse ligeramente aumentada en los fragmentos de la sección posterior, debido a cambios en la microbiota de los mismos (Estruch *et al.*, 2015).

En relación a la **dieta**, es importante mencionar, en primer lugar, la elevada variabilidad individual observada en los genes estudiados. Este ensayo no supone un caso aislado con respecto a esta variabilidad, sino que es algo que se repite en distintos estudios. En el caso del estudio de Rojo *et al.* (2007), se infectaron ejemplares de pez cebra intraperitonealmente con *Listonella anguillarum*, y se estudió también la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Los resultados permitieron detectar una amplia variación interindividual en la expresión génica para la mayoría de ellos, tanto en los inoculados como en los que no. Así mismo, Gerwick, Corley-Smith and Bayne (2007) llevaron a cabo un estudio de los cambios transcripcionales en el hígado de individuos de trucha arcoíris tras la inyección intraperitoneal de *Listonella (Vibrio) anguillarum*. Tanto los análisis de qPCR como los microarrays dejaron evidencia de unas marcadas diferencias entre individuos de la especie en la transcripción de los genes.

El gen Cox 2 es el único en el que se observaron diferencias significativas con respecto a la dieta VM-Short, aunque parece existir, al mismo tiempo, un aumento no significativo de la expresión del resto de genes proinflamatorios para esta misma dieta. Un mayor número de ensayos sería necesario para confirmar estos resultados. Los resultados obtenidos con respecto a este gen se comentarán detalladamente más adelante. El aumento de expresión en estos genes sería razonable sabiendo que Cox 2 se induce de forma rápida en respuesta a distintos mediadores de la inflamación, por lo que, ante un aumento de la expresión de Cox 2, cabría esperar un aumento de la expresión de dichos genes, como se observa en distintos estudios con ciertas citokinas proinflamatorias (Cerezuela, Meseguer and Esteban, 2013; Reyes-Becerril *et al.*, 2013). La respuesta inflamatoria se produciría como consecuencia de la alimentación con pienso vegetal (Cerezuela *et al.*, 2012; Estruch *et al.*, 2015).

Debemos tener en cuenta que cuando el agente estresante es agudo y afecta a corto plazo (en este caso, la dieta VM-Short), el patrón de respuesta es estimulante, y la respuesta inmune del pez muestra una fase de activación. Esta fase de activación está relacionada con la producción de citokinas, hormonas y péptidos almacenados o producidos de forma rápida. Si, por el contrario, el agente estresante es crónico (en este caso, la dieta VM-Long), la respuesta inmune sufre efectos supresores (Tort, 2011). De esta forma, se explica que la respuesta obtenida en los genes inflamatorios afecte únicamente a la dieta VM-Short, de forma que para la VM-Long habrían perdido, en parte, su capacidad de respuesta (Torrecillas *et al.*, 2017).

Por otra parte, con respecto a la dieta VM-Long, se observaron diferencias significativas en el gen I-Muc. Los resultados obtenidos en general con respecto a este gen se comentarán detalladamente más adelante.

Por último, con respecto al **tratamiento bacteriano**, se sabe que cuando se induce una respuesta inflamatoria en respuesta a una infección por una bacteria gram negativa, como son las empleadas en este estudio, la cascada de secreción de citokinas comienza con la liberación de TNF $\alpha$ ; esto provoca la liberación de IL1 $\beta$ , seguida por la de IL6. Este inicio de la respuesta inflamatoria da lugar a la liberación de otras citokinas (Gómez and Balcázar, 2008).

En el caso del tratamiento con *V. alginolyticus*, se indujo una respuesta inflamatoria: en peces del grupo FM, se registró un aumento de la expresión de IL1 $\beta$  e IL6; en peces del grupo VM-Long, se induce un aumento del gen IL1 $\beta$ ; y en peces del grupo VM-Short, aunque *V. alginolyticus* no indujo diferencias significativas, se registró una tendencia de aumento de los tres genes inflamatorios. Esta bacteria es causante de una enfermedad conocida como vibriosis, caracterizada por la aparición de úlceras en el cuerpo, hemorragias severas, deterioro aletas y desarrollo de procesos inflamatorios (Jun, Zhou and Woo, 2003), lo que explica la respuesta inflamatoria observada. Por otra parte, si comparamos entre dietas, observamos una ligera respuesta en peces con dieta VM-Short para los tres genes inflamatorios, mientras que para la VM-Long solo se ha registrado un aumento en uno de ellos. Por tanto, los peces alimentados con dieta VM durante un periodo de tiempo más corto (VM-Short), podrían presentar una mayor capacidad de respuesta ante estímulos bacterianos, mientras que los del grupo VM-Long, habrían sufrido cierta inmunosupresión en la respuesta inflamatoria (Tort, 2011).

Los resultados obtenidos concuerdan con previos estudios *in vivo* (Torrecillas *et al.*, 2017), en el que se alimentaron ejemplares de lubina con piensos constituidos por distintos porcentajes de sustitución de harina y aceite de pescado. Tras la exposición a diferentes estímulos bacterianos de *Vibrio anguillarum* se comprobó que la expresión de genes relacionados con la inflamación (IL1 $\beta$ , Cox2, TNF $\alpha$  e IL10) aumentaba durante las primeras horas de exposición, en peces alimentados con un menor porcentaje de harina de pescado. Sin embargo, tras varios días de exposición a esta misma dieta, la expresión de los genes decrecía, como consecuencia de un último esfuerzo por parte del pez para recuperar la homeostasis intestinal.

Por su parte, *P. damsela* subsp. *piscicida* indujo un aumento del gen I-Muc, relacionado con el sistema inmune, en peces de los grupos FM y VM-Short. Los resultados obtenidos con respecto a este gen se comentarán detalladamente más adelante. Esta bacteria es causante de la pasteurelosis, entre cuyos síntomas destaca el desarrollo de una septicemia hemorrágica. Se registró también un aumento del gen IL6 en peces del grupo VM-Short, lo que podría explicarse por la activación de la respuesta inflamatoria provocada por este tipo de bacterias. Sin embargo, este aumento fue menor que el inducido por *V. alginolyticus*; además, *P. damsela* no indujo un aumento del resto de genes inflamatorios, en contraste con la respuesta inducida por *V. alginolyticus*. El crecimiento de esta bacteria en las condiciones de cultivo es de menor eficiencia que en condiciones *in vivo* (Romalde, 2002), lo que podría explicar la ausencia de respuesta para la mayoría de los genes. Se debe tener en cuenta que las diferencias en la respuesta proinflamatoria observadas entre especies bacterianas, y el consiguiente patrón de expresión génica, pueden ser dependientes de la dosis inoculada y no del patógeno en sí (Boltaña *et al.*, 2014).

De hecho, en un estudio previo (Montero *et al.*, 2010), se evaluó la expresión de los genes IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en ejemplares de dorada alimentados con piensos vegetales e inoculados a nivel intestinal posteriormente con *P. damsela* subsp. *piscicida*. En dicho estudio se observaron aumentos en la expresión de estas citocinas para todas las dietas tras la infección con la bacteria durante los primeros días post-inoculación. Sin embargo, a partir del séptimo día, la expresión retomaba niveles basales. En el mismo estudio se observaron también dichos resultados en el caso de la lubina europea.

La mucina intestinal es una glicoproteína presente en el mucus del intestino; posee un patrón de expresión bien definido, que se interrumpe en respuesta a un amplio rango de alteraciones y retos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). Como se ha comentado anteriormente, en el presente estudio se ha registrado un aumento de este gen en peces alimentados con dieta VM-Long; al mismo tiempo, *P. damsela* ha inducido un aumento del gen I-Muc para las dietas FM y VM-Short. Sin embargo, experimentos recientes en dorada han demostrado que la expresión de esta mucina intestinal disminuía considerablemente al someter las muestras de intestino a un reto bacteriano con *Enteromyxum leei*, afectando principalmente al intestino posterior (Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). Además, en el presente trabajo se ha observado un comportamiento general anómalo en la expresión de este gen, especialmente para la dieta VM-Long. Se debe tener en cuenta que la secreción de la mucina intestinal se lleva a cabo por las células caliciformes mediante estímulos paracrinos, por lo que las anomalías observadas en cuanto a sus valores de expresión podrían

deberse a daños producidos en estas células tras la exposición a los retos bacterianos (Perez-Sánchez *et al.*, 2017).

En cuanto al gen *Ocl*, un componente transmembrana esencial en las uniones estrechas, no se observó ningún tipo de diferencia. Sin embargo, en un estudio previo, se evaluó el efecto de una dieta basada en microalgas liofilizadas en la expresión de distintos genes en ejemplares de dorada, y se observó un aumento en la expresión de la ocludina a nivel intestinal tras un periodo de cuatro semanas, pudiendo estar asociado al desarrollo de un proceso inflamatorio (Reyes Becerril *et al.*, 2013).

Respuesta similar se observó para el gen de la IgM, no registrándose diferencias significativas. Estos resultados también difieren respecto a lo observado en otros estudios, en los que la introducción de piensos de origen vegetal suponía un aumento de la respuesta inmune (Cerezuela, Meseguer and Esteban, 2013; Reyes-Becerril *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha observado que en ejemplares de salmón atlántico alimentados con piensos de alto contenido en soja se obtenían altos niveles de IgM en la mucosa intestinal (Krogdahl *et al.*, 2000). En otro estudio con dorada (Estensoro *et al.* 2012), se sustituyó el aceite de pescado de los piensos por aceites vegetales. Una sustitución del 66% no tenía ningún efecto en la expresión del gen IgM en peces no infectados; sin embargo, cuando los peces se infectaban con *Enteromyxum leei*, se observaba un importante efecto en su expresión para peces alimentados con aceites vegetales, dando lugar a un efecto reto bacteriano-dieta. La ausencia de una respuesta de la IgM en el presente trabajo, podría atribuirse al hecho de que esta inmunoglobulina presenta una acción sistémica (Boes et al. 1998), por lo que necesitaría un sistema más complejo que un tejido intestinal a la hora de desencadenar una respuesta clara.

## 6. Conclusión

La respuesta de los genes seleccionados no tuvo una clara dependencia de la dieta, debido a la alta variabilidad individual existente entre individuos para los genes estudiados, así como al bajo número de peces empleado en este estudio. Sin embargo, es posible que los peces alimentados con dieta VM-Short presenten una mayor respuesta inflamatoria, de forma que los peces con una alimentación prolongada con dietas que incluyen un 100% de proteína vegetal podrían presentar una pérdida de la capacidad inflamatoria.

En cuanto a la exposición a los retos bacterianos, *V. alginolyticus* indujo una respuesta inflamatoria a nivel intestinal, mientras que *P. damsela* es probable que requiera un mayor tiempo de incubación o una mayor dosis inoculada. La respuesta inflamatoria inducida por *V. alginolyticus* se observa en mayor medida en peces del grupo VM-Short, lo que podría indicar una mayor capacidad de respuesta ante un reto bacteriano en peces alimentados con este tipo de dieta, en contraste con los peces del grupo VM-Long que, debido a su cierta inmunosupresión, habrían perdido, en parte, su capacidad de respuesta inflamatoria ante un estímulo bacteriano.

La sección intestinal anterior y posterior parece no influir en la expresión de los genes. Sin embargo, sería necesario contrastar estos resultados empleando un mayor número de peces.

A partir de estos resultados y considerando el presente trabajo como un estudio preliminar, será conveniente realizar nuevos estudios en esta línea en el futuro, aumentando el número de muestras biológicas para paliar, en lo posible, los efectos de la variabilidad individual.

## 7. Bibliografía

- Apper-Bossard, E. *et al.* (2013) 'Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds', *Aquatic Biosystems*, 9(1). doi: 10.1186/2046-9063-9-21.
- APROMAR (2017) 'La Acuicultura en España 2017', *Apromar*, p. 93. Available at: [http://www.apromar.es/sites/default/files/2017/informe/APROMAR\\_Informe\\_ACUICULTURA\\_2017.pdf](http://www.apromar.es/sites/default/files/2017/informe/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2017.pdf).
- Baeza-Ariño, R. *et al.* (2016) 'Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates', *Aquaculture Research*, 47(2), pp. 460–471. doi: 10.1111/are.12507.
- Boltaña, S. *et al.* (2014) 'Lipopolysaccharides isolated from *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* show quantitative but not qualitative differences in inflammatory outcome in *Sparus aurata* (Gilthead seabream)', *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), pp. 475–482. doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.003.
- Brugère, C. *et al.* (2018) 'The ecosystem approach to aquaculture 10 years on - a critical review and consideration of its future role in blue growth', *Reviews in Aquaculture*, pp. 1–22. doi: 10.1111/raq.12242.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., *et al.* (2012) 'Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae', *Cell and Tissue Research*, 350(3), pp. 477–489. doi: 10.1007/s00441-012-1495-4.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., *et al.* (2012) 'Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 32(6), pp. 1032–1040. doi: 10.1016/j.fsi.2012.02.025.
- Cerezuela, R., Meseguer, J. and Esteban, M. Angeles (2013) 'Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 34(3), pp. 843–848. doi: 10.1016/j.fsi.2012.12.026.
- Cunningham, K. E. and Turner, J. R. (2012) 'Myosin light chain kinase: Pulling the strings of epithelial tight junction function', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), pp. 34–42. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06526.x.
- Daniel, N. (2018) 'A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources', (February).
- Dharmani, P. *et al.* (2009) 'Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens', *Journal of Innate Immunity*, 1(2), pp. 123–135. doi: 10.1159/000163037.
- Estensoro, I. *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*. Elsevier Ltd, 33(2), pp. 401–410. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.029.
- 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), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0136389.



Fadel, A. H. I. *et al.* (2017) 'Carob seed germ meal as a partial soybean meal replacement in the diets of red hybrid tilapia', *Egyptian Journal of Aquatic Research*. National Institute of Oceanography and Fisheries, 43(4), pp. 337–343. doi: 10.1016/j.ejar.2017.09.007.

FAO (2009) *FAO - Sparus aurata Linnaeus*. Available at: [http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/I1129m/file/en/en\\_giltheadseabr.htm](http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/I1129m/file/en/en_giltheadseabr.htm) (Accessed: 23 May 2018).

FAO (2014) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Fao*. doi: 978-92-5-308275-9 ISSN1020-5500.

FAO (2016) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma*. doi: 978-92-5-306675-9.

FishBase (2018) *Search FishBase*. Available at: <http://www.fishbase.org/search.php> (Accessed: 23 May 2018).

Gajardo, K. *et al.* (2016) 'A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(August), pp. 1–10. doi: 10.1038/srep30893.

Gerwick, L., Corley-Smith, G. and Bayne, C. J. (2007) 'Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus', *Fish and Shellfish Immunology*, 22(3), pp. 157–171. doi: 10.1016/j.fsi.2006.04.003.

Gómez, G. D. and Balcázar, J. L. (2008) 'A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2), pp. 145–154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x.

Harms, C. A. and Lewbart, G. A. (2000) 'Surgery in fish.', *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*. W.B. Saunders Company, 3(3), pp. 759–774. doi: 10.1016/S1094-9194(17)30074-9.

Hartviksen, M. *et al.* (2015) 'Probiotic and Pathogen Ex-vivo Exposure of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Intestine from Fish Fed Four Different Protein Sources', *Journal of Aquaculture Research & Development*, 06(05). doi: 10.4172/2155-9546.1000340.

Heinrich, P. C. *et al.* (2003) 'Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation', *Biochemical Journal*, 374(1), pp. 1–20. doi: 10.1042/bj20030407.

Jiang, J. *et al.* (2015) 'Invitro and invivo protective effect of arginine against lipopolysaccharide induced inflammatory response in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)', *Fish and Shellfish Immunology*, 42(2), pp. 457–464. doi: 10.1016/j.fsi.2014.11.030.

Jun, L., Zhou, L. and Woo, N. Y. S. (2003) 'Invasion route and pathogenic mechanisms of *Vibrio alginolyticus* to silver sea bream *Sparus sarba*', *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(4), pp. 302–313. doi: 10.1577/H03-034.1.

Krogdahl, Å. *et al.* (2000) 'Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: Effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa', *Aquaculture Nutrition*, 6(2), pp. 77–84. doi: 10.1046/j.1365-2095.2000.00129.x.

Lu, D. Q. *et al.* (2008) 'Interleukin-1 $\beta$  gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction', *Molecular Immunology*, 45(4), pp. 857–867. doi: 10.1016/j.molimm.2007.08.009.

- Malik, M. F., Shah, S. H. and Azzam, A. (2017) 'Lysine Supplementation in Fish Feed Lysine Supplementation in Fish Feed', (June).
- Martínez-Llorens, S. *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*. Elsevier B.V., 338–341, pp. 124–133. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.01.029.
- Minghetti, M. *et al.* (2017) 'A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC', *Cell Biology and Toxicology*. Cell Biology and Toxicology, 33(6), pp. 539–555. doi: 10.1007/s10565-017-9385-x.
- 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*. Elsevier Ltd, 29(6), pp. 1073–1081. doi: 10.1016/j.fsi.2010.08.024.
- Moriñigo, M. A. *et al.* (2002) 'Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*', *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(5), pp. 298–303.
- Nogales Mérida, S. *et al.* (2011) 'A study of partial replacement of fish meal with sunflower meal on growth, amino acid retention, and body composition of sharpnose seabream, *Diplodus puntazzo* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae)', *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 41(1), pp. 47–54. doi: 10.3750/AIP2011.41.1.07.
- Palaksha, K. J. *et al.* (2008) 'Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)', *Fish and Shellfish Immunology*, 24(4), pp. 479–488. doi: 10.1016/j.fsi.2008.01.005.
- Pereira, T. G. and Oliva-Teles, A. (2002) 'Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles', *Aquaculture Research*, 33(14), pp. 1183–1189. doi: 10.1046/j.1365-2109.2002.00782.x.
- Peres, H. and Oliva-Teles, A. (2009) 'The optimum dietary essential amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 296(1–2), pp. 81–86. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.046.
- Pérez-Sánchez, J. *et al.* (2013) 'Mucins as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in a Fish-Parasite Model: Transcriptional and Functional Analysis', *PLoS ONE*, 8(6), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0065457.
- Pérez-Sánchez, J. *et al.* (2017) 'Skin mucus of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). protein mapping and regulation in chronically stressed fish', *Frontiers in Physiology*, 8(February), pp. 1–18. doi: 10.3389/fphys.2017.00034.
- Reyes-Becerril, M. *et al.* (2013) 'Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*)', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 35(3), pp. 883–889. doi: 10.1016/j.fsi.2013.06.026.
- Ringø, E. *et al.* (2010) 'Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: A review', *Aquaculture Research*, 41(4), pp. 451–467. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02339.x.
- Rojo, I. *et al.* (2007) 'Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation', *Fish and Shellfish Immunology*, 23(6), pp. 1285–1293. doi: 10.1016/j.fsi.2007.07.002.

- Romalde, J. L. (2002) 'Photobacterium damsela subsp. piscicida: An integrated view of a bacterial fish pathogen', *International Microbiology*, 5(1), pp. 3–9. doi: 10.1007/s10123-002-0051-6.
- Rubio-Godoy, M. (2010) 'Inmunología de los Peces. Revisión', *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(1), pp. 47–57.
- Sánchez-Lozano, N. B. *et al.* (2011) 'Amino acid retention of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate', *Aquaculture Nutrition*, 17(2). doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00803.x.
- Torrecillas, S. *et al.* (2017) 'Disease resistance and response against *Vibrio anguillarum* intestinal infection in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal and fish oil diets', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 67, pp. 302–311. doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.022.
- Tort, L. (2011) 'Stress and immune modulation in fish', *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd, 35(12), pp. 1366–1375. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002.
- Wang, Y. *et al.* (2016) 'Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion of juvenile *Pseudobagrus ussuriensis*', *Aquaculture Research*, 47(10), pp. 3145–3155. doi: 10.1111/are.12765.