



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Efecto de la parasitación de *Diplectanum* *sp.* en lubinas alimentadas con bajos niveles de harina de pescado

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2019
Curso académico: 2018-2019
Titulación: Biotecnología
Autor: David Soler Segovia
Director del proyecto: Silvia Martínez Llorens
Codirector: David Sánchez Peñaranda
Director experimental: Cristina Zomeño Segado

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2019

Curso académico: 2018-2019

Titulación: Biotecnología

Autor: David Soler Segovia

Director del proyecto: Silvia Martínez Llorens

Codirector: David Sánchez Peñaranda

Director experimental: Cristina Zomeño Segado

Título del trabajo: Efecto de la parasitación de *Diplectanum sp.* en lubinas alimentadas con bajos niveles de harina de pescado

Resumen

La importancia del pescado como fuente proteica en la dieta humana ha ido aumentando en función del desarrollo de la acuicultura. No obstante, con la intensificación de esta actividad se han incrementado también los efectos negativos sobre el medio ambiente, y en particular, los derivados del uso de harinas y aceites de pescado empleados en la alimentación de los peces carnívoros. Se presenta, por tanto, la necesidad de medidas que permitan un desarrollo sostenible de la actividad. Por consiguiente, los esfuerzos en investigación deben ir dirigidos a evaluar nuevas dietas más sostenibles y determinar la respuesta de los peces frente a diferentes patologías.

El presente estudio se llevó a cabo con lubinas. Se diseñó un experimento de larga duración, similar a los ciclos de producción comercial de esta especie, en el cual los peces fueron alimentados en grupos por triplicado con 3 piensos con diferente nivel de sustitución vegetal añadiendo además la condición ecológica para los piensos experimentales (FM30 Control, FM30 ECO, FM25 ECO). El experimento se dividió en dos fases: una fase de engorde en la que se muestran los resultados de crecimiento y supervivencia bajo condiciones normales de producción, y una fase de parasitación en la que se muestran resultados de crecimiento, supervivencia, parámetros sanguíneos y expresión génica relativa bajo condiciones estresantes, como es la presencia de un ectoparásito (*Diplectanum sp.*) dentro del sistema de producción.

Los resultados mostraron diferencias significativas en el crecimiento para ambas fases, con un mayor crecimiento en los peces alimentados con el pienso control frente a los alimentados con piensos ecológicos. En la fase de parasitación las diferencias en crecimiento se acentuaron. En lo respectivo a la supervivencia, no se observó un efecto dieta significativo, sin embargo, se observaron diferencias entre fases, presentando una menor supervivencia en la fase de parasitación. Se detectó, como consecuencia del estrés de la fase de parasitación, un cuadro de anemia en los peces alimentados con piensos ecológicos y un cuadro de inmunosupresión generalizada en todos los ejemplares. En los análisis de expresión génica se detectó un efecto dieta significativo para el gen TGF- β . Pese a no mostrar diferencias significativas, se obtuvieron resultados numéricamente diferentes para los genes Casp-9 y TCR- β . Como conclusión cabe destacar la predominancia de la condición ecológica como parámetro diferencial del efecto dieta.

Palabras clave

Acuicultura, dietas ecológicas, *Diplectanum sp.*, respuesta inmune, *Dicentrarchus labrax*

Abstract

The importance of fish as protein source in human diet has been increased in function of aquaculture development. Nevertheless, the intensification of this activity has produced an increase of its negative effects over nature, particularly those effects due to the use of fish oil and fish meal in carnivorous fish diets. Hence, research must be led to evaluate more sustainable diets and to determine the response of fish to different pathologies.

The present study was carried out in sea bass. It was designed as a long term experiment, similar to the commercial production cycles of this species, in which fish were fed by groups in triplicate with 3 different diet with different levels of vegetal substitution, and for the experimental diets it was also added the organic condition (FM30 Control, FM30 ECO, FM25ECO). This experiment was divided in two phases: a fattening phase in which is shown results for the growth and survival analysis in normal production conditions, and a parasitism phase in which has been obtained results for growth, survival, blood parameters and relative gene expression under stressing conditions produced by the presence of an ectoparasite (*Diplectanum sp.*) in the production system.

Significant differences have been detected for growth in both phases, showing a higher growth rate for those fish fed with a control diet than the ones fed with organic diets. In the parasitism phase, these differences between diets were enlarged. Regarding survival, no significant diet effect has been stated, however it was observed a difference between phases, as in the parasitism phase the survival was remarkably lower. As a consequence of the stress generated during the parasitism phase, it was detected symptoms of anaemia in those fish fed with organic diets as well as symptoms of immunosuppression in all specimen studied. Considering the gene expression analysis, a significant diet effect was found for the TGF- β gene. Casp-9 and TCR- β genes did not presented significant differences between diets, however, different numerical results were obtained. As a conclusion, it should be pointed out that, there is a predominance of organic condition as a differential parameter for the diet effect.

Key words

Aquaculture, organic diets, *Diplectanum sp.*, immune response, *Dicentrarchus labrax*

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Los retos de la producción acuícola.....	1
1.2. Acuicultura ecológica.....	3
1.3. Producción de la lubina.....	4
1.4. Problemas asociados a patologías de peces en acuicultura.....	5
1.5. Estudios previos de expresión génica.....	9
2. Justificación y objetivos.....	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Aspectos éticos.....	12
3.2. Descripción de la instalación.....	12
3.3. Descripción del ensayo completo.....	13
3.3.1. Peces y condiciones experimentales.....	13
3.3.2. Piensos experimentales.....	13
3.3.3. Fases del ensayo.....	15
3.4. Análisis de expresión génica.....	17
3.4.1. Extracción de tRNA y paso a cDNA.....	17
3.4.2. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR).....	18
3.5. Análisis estadístico.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Fase de engorde.....	21
4.2. Fase de parasitación.....	22
4.2.1. Crecimiento y supervivencia.....	22
4.3. Parámetros sanguíneos.....	23
4.4. Análisis preliminar de expresión.....	23
4.4.1. Curvas estándar.....	24
4.4.2. Calibradores.....	24
4.5. Análisis final de expresión relativa.....	25
5. Discusión.....	26
6. Conclusión.....	30
7. Referencias.....	31

Índice de Figuras

Figura 1. Evolución del precio de la harina de pescado, comparada con la evolución del precio de la harina de soja 1983-2017 (FAO, 2018).....	2
Figura 2. Trash fish empleado normalmente para la producción de harinas de pescado	2
Figura 3. Evolución de la producción de pescados marinos en España (Apromar, 2017)	4
Figura 4. Evolución del valor de la acuicultura de España, en millones de euros y por especies en el período 1984-2016 (Apromar, 2017)	5
Figura 6. Principales hospedadores de las enfermedades más comunes en acuicultura (en base 100; Lafferty et al., 2015).....	6
Figura 5. Principales productores de patologías en acuicultura (en base 100; Lafferty et al., 2015)	6
Figura 7. Sección histológica de tejido branquial teñido con Alcian blue-PAS, en la que se observa la unión de <i>Diplectanum aequans</i> y como esta produce una reducción de la superficie respiratoria. Las flechas cortas denotas tejido no infectado y por tanto no afectado, mientras las flechas largas muestran el tejido afectado y unido entre si (Dezfuli et al., 2007).....	8
Figura 8. Distribución de los tanques de la línea 2 en el LAC	12
Figura 9. Juveniles de lubinas ecológica utilizados en la prueba.....	13
Figura 10. Resumen de las fases del experimento.....	15
Figura 11. Patologías que presentaban los peces. (A) Aspecto macroscópico de la dermatitis (B) <i>Diplectanum sp.</i> alojados en las branquias.....	16
Figura 12. Lupa utilizada para el conteo de parásitos	17
Figura 13. Resumen del proceso experimental del muestreo final (día 286)	17
Figura 14. Curvas de crecimiento en ambas partes del experimento para todos los tratamientos, donde ‘*’ indica una diferencia significativa entre el grupo FM30 Control y el resto.....	21
Figura 15. Porcentaje de supervivencia para todos los tratamientos en ambas fases del experimento.....	21
Figura 16. Niveles de expresión para los genes diferenciales empleando la pool de cada tratamiento.....	24
Figura 17. Valores de expresión relativa (Ct) en los calibradores empleados	25

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de principales productores de patología dependiendo de su grupo (Crane & Hyatt, 2011; Haenen, 2017; Ohtsuka, Suzaki, Horiguchi, Suzuki, & Not, 2015).....	6
Tabla 2. Biblioteca de genes estudiados en lubina.....	10
Tabla 3. Formulación y composición nutricional de los piensos empleados	14
Tabla 4. Composición de aminoácidos de los piensos experimentales.....	15
Tabla 5. Listado de los primers correspondientes a los genes candidatos (diferenciales y de referencia) para el análisis de RT-qPCR.....	19
Tabla 6. Pesos registrados durante la fase de parasitación para los diferentes tratamientos experimentales.....	22
Tabla 7. Recuento de parásitos para los diferentes tratamientos experimentales.....	22
Tabla 8. Parámetros sanguíneos para los diferentes tratamientos experimentales.....	23
Tabla 9. Parámetros de las curvas estándar para los genes seleccionados.....	24
Tabla 10. Niveles de expresión relativa de los diferentes genes por tratamiento.....	25

Abreviaturas

FM: *Fish meal*

FO: *Fish oil*

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

ECO: Condición ecológica

CE: Conformidad europea

PRRs: *Pathogen recognition receptors*

ROS: *Reactive oxygen species*

FOS: *Fructose oligosaccharides*

MOS: *Mannan oligosaccharides*

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*

UE: Unión Europea

UPV: Universitat Politècnica de València

LAC: Laboratorio de Acuicultura

AAE: Aminoácidos esenciales

AANE: Aminoácidos no esenciales

tRNA: RNA total

cDNA: DNA complementario

β actina: Beta actina

EF1 α : *Elongation factor 1 alfa*

GADPH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

IL1 β : Interleucina 1 beta

IL10: Interleucina 10

IL6: Interleucina 6

IL8: Interleucina 8

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Casp3: Caspasa 3

Casp9: Caspasa 9

COX2: Ciclooxygenasa 2

TCR β : Receptor de células T

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta

Ig: Inmunoglobulina

Trf: Transferrina

Fth: Ferritina

RCB: Recuento de células leucocitarias totales

SD: Desviación estándar

Ct: ciclos mínimos necesarios para que una muestra llegue al nivel de fluorescencia detectable

1. Introducción.

1.1. Los retos de la producción acuícola.

La acuicultura es uno de los sectores de la alimentación humana que ha ido ganando importancia en los últimos años. En los años cincuenta del siglo pasado, la producción por año rondaba el millón de toneladas, mientras que en el 2009 esta cifra alcanzaba los 55,1 millones de toneladas (Grigorakis & Rigos, 2011). Este aumento se debe a diversas revoluciones conocidas como ‘*blue revolutions*’, que se iniciaron en los 60s gracias a la aparición de mejoras en el control de calidad del agua, en la alimentación, en el control de enfermedades, avances en mejora genética (emparejamiento selectivo, hibridación) o la reproducción, que permitieron mejorar la productividad manteniendo la calidad (Cole et al., 2009). De hecho, en la actualidad la acuicultura supone un más de un 50% de la producción mundial de pescado, aunque este dato, según ciertos autores, se presenta sesgado debido al gran peso de la acuicultura china, la cual, en el 2016 representó un 61,5% de la producción mundial con más de 49 millones de toneladas producidas, consumidas principalmente por los habitantes del país (Cao et al., 2015; FAO, 2018).

A día de hoy, la acuicultura es una producción estable y variada, haciendo del pescado la principal fuente de proteína para 950 millones de personas en el mundo (teniendo especial importancia en la dieta asiática) e incluso, se espera que el consumo de pescado siga creciendo hasta un consumo per cápita de 19-20 kg en 2030 (cuando este consumo, a principio de este siglo rondaba de 9 a 10 kg; Costa-pierce, 2003). Por tanto, para que este aumento se haga realidad es necesario que venga acompañado de una sucesión de mejoras de la productividad, que permitan un desarrollo sostenible y una mayor rentabilidad, sin menoscabo de la calidad.

Por otro lado, la pesca aún se mantiene como la principal técnica extractiva de fauna del mundo (Costa-pierce, 2003). Esta actividad también se sustenta en parte para la producción de materias primas de origen marino que, a su vez, forma una parte crucial en la alimentación de los peces en acuicultura. La harina (*fish meal*, de aquí en adelante FM) y el aceite de pescado (*fish oil*, de aquí en adelante FO), suponen las principales fuentes de proteína y grasa, respectivamente, en los piensos para peces carnívoros (Fry et al., 2016). La necesidad de la inclusión de FM y FO en el pienso para peces es debido a su alta digestibilidad, su adecuado perfil aminoacídico y un elevado porcentaje de ácidos grasos altamente insaturados (Hassan & Tacon, 2007). Además, mejoran la palatabilidad del alimento, y proporcionan altas curvas de crecimiento y eficiencias nutritivas.

Así pues, la elaboración de piensos ha ido ganando importancia en el sector, incrementándose su precio a la par que la producción acuícola ha ido aumentando su producción (FAO, 2018; Figura 1). A pesar de las ventajas que tiene la inclusión de harina y aceite de pescado en la elaboración de piensos, ésta se basa en la captura indiscriminada de pescado de baja calidad (conocido como *trash fish*, Figura 2) con el fin de obtener un FM y FO de bajo precio. Por tanto, esta actividad conlleva graves problemas medioambientales, tales como la sobrepesca de especies pelágicas, con el consiguiente desequilibrio en la cadena trófica marina, la destrucción de hábitats marinos, la calidad del pescado para el consumo humano o la pérdida de biodiversidad (Cao et al., 2015; Fry et al., 2016).



Figura 1. Evolución del precio de la harina de pescado (azul), comparada con la evolución del precio de la harina de soja (naranja) 1983-2017 (FAO, 2018)

A día de hoy, la inclusión de harina de pescado en los piensos para acuicultura se ha hecho insostenible. En 2011, las cantidades de FM y FO que se consumieron ascendieron a 835,000 toneladas, lo que representó cerca de un 25% de toda la pesca marina (Turchini et al., 2011). Ante esta situación, la comunidad científica ha buscado alternativas más sostenibles para la alimentación de peces. Una posible solución a esta problemática, según diversos autores, es la sustitución de FM y FO por fuentes proteicas vegetales (Estruch et al., 2015; Figueiredo-Silva et al., 2005; Sitjà-Bobadilla et al., 2005; Torrecillas et al., 2017; Turchini et al., 2011).



FIGURA 2. Trash fish empleado normalmente para la producción de harinas de pescado

Actualmente, a corto plazo, es posible la sustitución de altos niveles de proteínas o aceites vegetales en piensos para peces carnívoros, lo que permite un crecimiento dentro de los parámetros de producción durante los primeros meses de alimentación (Estruch et al., 2018; Monge-Ortiz et al., 2016). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que este tipo de dietas a largo plazo conllevan una inferior eficiencia nutricional, que deriva en un menor crecimiento y un aumento de la mortalidad (Dias et al., 2005; Estruch et al., 2018; Torrecillas et al., 2017). Estos efectos adversos se deben especialmente a los componentes anti-nutritivos (taninos, ácido fítico, lectinas, saponinas, inhibidores de proteasas, alérgenos) que contienen las fuentes proteicas vegetales, produciendo alteraciones a nivel intestinal, que a su vez desencadenan cambios en la microbiota intestinal (Estruch et al., 2015), alteraciones en el sistema inmune (Sitjà-Bobadilla et al., 2005), y por lo tanto, una mayor susceptibilidad a enfermedades que los peces alimentados con materias primas de origen marinos.

Los antinutrientes no son los únicos responsables de los efectos negativos del uso de fuentes vegetales para la alimentación de peces carnívoros. Las fuentes vegetales suelen carecer de algunos aminoácidos esenciales, lo que conlleva a una descompensación a nivel fisiológico y finalmente a un estado de estrés por una nutrición deficiente. Esta problemática se agrava cuando la sustitución se lleva a cabo por un única fuente de proteína vegetal (Martínez-Llorens et al., 2012a), por lo que suele ser necesario complementar la dieta con aminoácidos sintéticos, encareciendo de forma importante los piensos. Otra alternativa, es una dieta basada en múltiples fuentes vegetales, en la cual se complemente las deficiencias de unas con otras, necesitando por tanto una menor suplementación aminoacídica. Las mezclas proteicas vegetales han mejorado los resultados en términos de crecimiento en teleósteos (Dias et al., 2005), aunque a largo plazo, puede seguir causando problemas de inmunosupresión (Estruch et al., 2019).

1.2. Acuicultura ecológica

Es complicado establecer una huella ecológica para la acuicultura actual, ya que esta depende del tipo de pescado producido, la densidad de población y/o el modo de alimentación. No obstante, el auge de los piensos comerciales ha conllevado una sobreexplotación de los ecosistemas acuáticos, como se ha explicado con anterioridad, llevando al sector a una situación crítica debido al agotamiento gradual de los recursos naturales (Borja, 2002; Costa-pierce, 2003; Fry et al., 2016). Se estableció la sustitución proteica vegetal en los piensos, como una vía para reducir el uso de FM y FO, y con ello, disminuir la huella ecológica de la actividad. Sin embargo, la exposición a este tipo de dietas a largo plazo produce un empeoramiento de la salud de los ejemplares impidiendo un diseño de producción eficaz (Dias et al., 2005; Estruch, et al., 2018; Torrecillas et al., 2015). Además, no se debe olvidar que el impacto ambiental de la agricultura puede ser también muy elevado en determinadas condiciones.

Así pues, una posible solución podrían ser los piensos ecológicos. Estos piensos están basados en FM y FO, pero provenientes de pesca sostenible, similar a la que adquirirían los animales en la naturaleza, y una suplementación proteica a través de proteína vegetal de origen sostenible. Con esa composición, se asume que los piensos no presentan una peor eficiencia nutricional, aportando por tanto una vía para el desarrollo sostenible de la acuicultura (Costa-Pierce, 2010). Para una implementación más rápida de los piensos ecológicos, la modificación de la legislación actual sería conveniente. En España se aplica el reglamento (CE) N° 834/2007 del consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiqueta de los productos ecológicos. Así pues, en los piensos ecológicos, según artículo 15, se impide la adición de los suplementos aminoacídicos que facilitarían cubrir los requerimientos nutricionales de los peces, y por tanto, alcanzar mayores niveles de sustitución de FO y FM. Además, la acuicultura ecológica debe tener en consideración otros problemas ambientales derivados de la producción acuícola actual, tales como el aumento de la eutroficación producida mediante por una gran liberación de residuos orgánicos al medio ambiente (Di Marco et al., 2017). Por tanto, se deben de buscar avances técnicos que permitan mejorar las instalaciones actuales y con ello facilitar también el manejo de la alimentación y los animales. Destaca también la necesidad de nuevos tratamientos para las patologías más comunes en acuicultura, a fin de evitar el uso indiscriminado de antibióticos en el sector (Cole et al., 2009; Costa-pierce, 2003; Defoirdt, Boon, Sorgeloos, Verstraete, & Bossier, 2007; Grigorakis & Rigos, 2011).

Actualmente, la oferta de pescado ecológico destinado a alimentación tanto en España como en Europa es limitada. Si bien es cierto que esta oferta existe, no es lo suficiente importante como para desmarcarse en los análisis de producción y consumo realizados por las instituciones pertinentes, la FAO en Europa o Apromar en España. El único sector acuícola español con una producción ecológica destacable es el de las microalgas, empleadas tanto en alimentación animal como humana (Apromar, 2017; FAO, 2018). Esto no significa que no se estén tomando medidas para promover el paso a una acuicultura ecológica, por ejemplo, se aceptó en el parlamento europeo el informe presentado por el eurodiputado vasco Carlos Iturgaiz ‘Hacia un sector europeo de la acuicultura sostenible y competitivo: situación actual y futuros desafíos (2017/2118(INI))’ en el que se interpela por una producción orientada al desarrollo sostenible.

1.3. Producción de la lubina

La lubina representa una de las especies más relevantes en la acuicultura marina europea, con altos valores de producción. De hecho, la Unión Europea se considera el principal productor de lubina del mundo. A nivel estatal, el mayor productor sería Grecia seguido de España (CE, 2012).

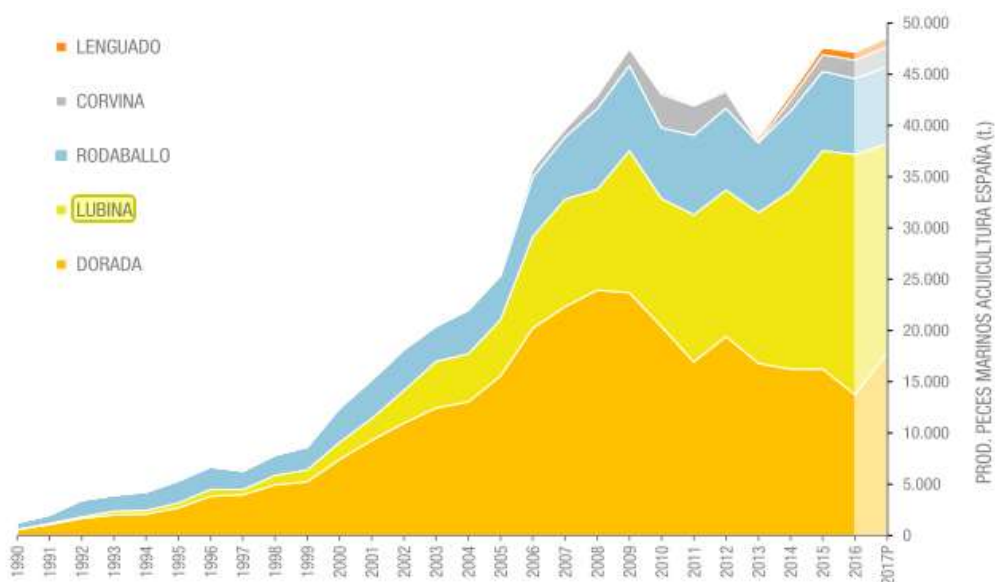


FIGURA 3. Evolución de la producción de pescados marinos en España (Apromar, 2017)

La lubina siempre ha supuesto una parte importante del mercado español, no obstante, es a partir de 2006 cuando se observa un acusado aumento de su producción (Figura 3). Siguiendo datos del 2015, la lubina se convirtió en la primera especie de pescado en la acuicultura española con una producción de 21.324 toneladas que pasaron a ser 23.445 toneladas en 2016 (un aumento del 9.9% anual de la producción), en total en Europa se produjeron 176.956 toneladas en el 2016 (Apromar, 2017).

Con un precio medio de venta en España de 5,67 €/kg, el valor total obtenido de la comercialización de la lubina asciende a 132,9 millones de euros. Con esto la lubina, pese a no ser la principal producción en la acuicultura española en cuanto a peso, sí lo es en cuanto a valor económico (Figura 4).

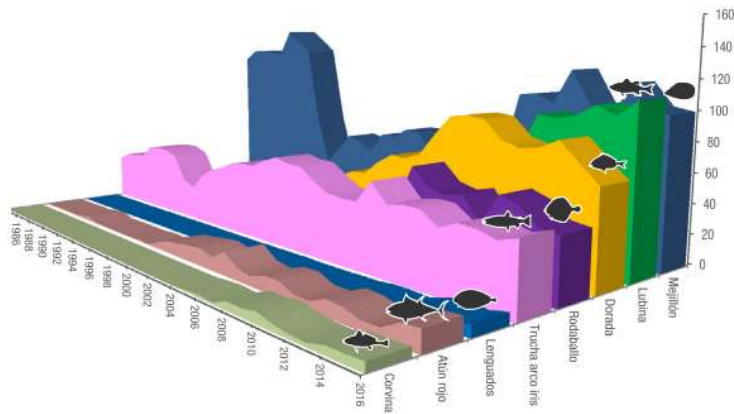


Figura 4. Evolución del valor de la acuicultura de España, en millones de euros y por especies en el período 1984-2016 (Apromar, 2017)

1.4. Problemas asociados a patologías de peces en acuicultura

Las patologías en acuicultura suponen de las mayores fuentes de pérdidas económicas en el sector (Meyer, 1991). La incidencia de éstas ha aumentado con la intensificación y la comercialización del sector (Bondad-Reantaso et al., 2005), ya que las altas densidades pueden desencadenar en condiciones estresantes que afecten negativamente a la salud del animal, incluyendo un mal funcionamiento del sistema inmune (Lafferty et al., 2015; Sommerset et al., 2014). Además, se ha sugerido que estas altas densidades también facilitan la propagación de patologías debido por una lado, a un incremento de la transmisión horizontal gracias a una mayor proximidad entre individuos, y por otro lado, la sobrepoblación de peces disminuye significativamente la calidad del agua, proporcionando un mejor ambiente para la presencia de patógenos (Buchmann & Bresciani, 2006; Ellis et al., 2002).

Se deben mejorar las condiciones de los peces reduciendo la sobrepoblación y aumentar las condiciones de higiene del tanque con tal de impedir un ambiente amistoso para patógenos y reduciendo, además, el nivel de productos tóxicos (amonio) en el agua. Adicionalmente, se pueden tomar medidas que mejoren la respuesta de los peces frente a las infecciones como es el uso de antibióticos o vacunas (Sommerset et al., 2014). Además, se ha comprobado que la alimentación también puede llegar a ser un método muy efectivo para combatir las patologías (Buchmann & Bresciani, 2006). Sin embargo, el tratamiento actual consiste fundamentalmente en una administración de antibióticos con su respectivo sobreuso, lo que conlleva a un grave problema de resistencia a antibióticos en los patógenos de pescado (Cole et al., 2009; Defoirdt et al., 2007; Grigorakis & Rigos, 2011). Según los datos recogidos por Lafferty et al. 2015, son alrededor de 67 las patologías más comunes en acuicultura, entre las cuales se observa que un 25% son provocadas por virus, 34% bacterias y 36% parásitos (protistas y metazoos: Figura 5). Dentro de la producción acuícola, el 49% de estas patologías afectan a la producción piscícola, 21% crustáceos, 28% moluscos y un 1% a equinodermos (Figura 6).

Productores de patologías

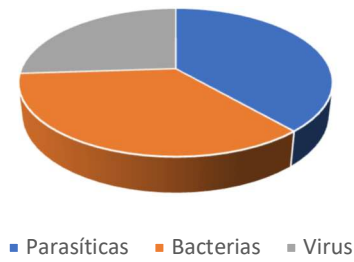


FIGURA 5. Principales productores de patologías en acuicultura (en base 100; Lafferty et al., 2015)

Principales hospedadores

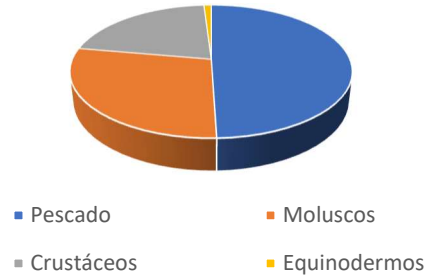


FIGURA 6. Principales hospedadores de las enfermedades más comunes en acuicultura (en base 100; Lafferty et al., 2015)

Las patologías producidas por bacterias y virus son las que presentan mayor índice de mortalidad. Sin embargo, las patologías parasitarias suelen desencadenar estados de inmunosupresión que en condiciones de estrés como las que tienen lugar en la acuicultura intensiva dan lugar a menores crecimientos, e incluso a largo plazo, pueden desencadenar en mayores mortalidades. Los organismos parasíticos pueden tener un origen diverso, desde protistas a metazoos (Tabla 1). Las condiciones en acuicultura solo permiten que se establezcan determinados parásitos, pero debido a la gran densidad de producción en la acuicultura intensiva, su impacto es mucho mayor (Meyer, 1991).

Tabla 1. Clasificación de principales productores de patología dependiendo de su grupo (Crane & Hyatt, 2011; Haenen, 2017; Ohtsuka et al., 2015)

Origen bacteriano	Origen vírico	Origen parasitario
<ul style="list-style-type: none"> • Gram negativas: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Vibriosis</i> • <i>Aeromonosis</i> • <i>Edwardsiellosis</i> • <i>Pseudomonosis</i> • <i>Flavobacteriosis</i> • Gram positivas: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycobacteriosis</i> • <i>Streptococcosis</i> • <i>Renibacteriosis</i> • <i>Infeción con bacterias anaerobias</i> • Infeción con bacterias intracelulares 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aquabirnavirus</i> • <i>Betanodavirus</i> • <i>Infectious Salmon anemia Virus</i> • <i>Salmon alphavirus</i> • <i>Infectious Hematopoietic Necrosis Virus</i> • <i>Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus</i> • <i>Viral Hemorrhagic Septicemia Virus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Parasitic protistan groups: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Amoebae</i> • <i>Ichthyophonus</i> • <i>Flagellates</i> • <i>Ciliates</i> • <i>Perkinsus</i> • <i>Marteila</i> • <i>Azumiobodo hoyamushi</i>

Por todo ello, se requiere una mejora de las condiciones de la acuicultura, así como una amplia información acerca de sintomatología con tal de ser capaces de hacer diagnósticos rápidos sobre la población de peces, y conocer también la vías de infectivas para poder tomar las medidas oportunas tanto a nivel de tratamiento farmacológico hasta el establecimiento de líneas en cuarentena. Si entre estas medidas se encuentra el suministro de antibióticos (ya que tenemos una infección bacteriana) se debe hacer un uso razonable de ellos, además, antes del suministro es importante la elaboración de un antibiograma, para observar si ese antibiótico es realmente efectivo contra la problemática en cuestión. (Austin & Austin, 1999; Haenen, 2017).

En el caso de la lubina, las principales pérdidas económicas se producen por infecciones parasitarias, concretamente el *Diplectanum aequans* y *Diplectanum laubieri* (Figura 7). Ambas especies se tratan de ectoparásitos de la clase Monogea (Buchmann & Bresciani, 2006), que pueden ocasionar mortalidades de alrededor del 5-10% (Dezfuli et al., 2007). Con todo ello, el impacto económico podría estar subestimado, ya que la sintomatología habitual es la inducción de una inmunosupresión facilitando una infección secundaria por otro agente patogénico (Faliex et al., 2008; Meyer, 1991).

La clase Monogea está incluida dentro del filo de *Platyhelminthes* reino Metazoo, los organismos pertenecientes a esta clase son gusanos planos que se encuentran en medios acuáticos, desde aguas salobres hasta medios marinos. La forma de vida de estas especies es mayormente la parasitaria, concretamente ectoparasitaria. En cuanto a los hospedadores, éstos son diversos: mamíferos, anfibios, cefalópodos y reptiles, aunque su hospedador principal son los peces. En el caso particular de estos ectoparásitos, suelen presentar especificidad por una especie en particular, existiendo casos que una misma especie de pez presenta varias especies de específicas monogéneas (Buchmann & Bresciani, 2006).

Al tratarse de ectoparásitos, los monogéneos afectan mayormente a las superficies externas del pez, presentando mayor afinidad por las partes de la superficie que presentan compartimentos. La razón es que les permite la creación de microclimas específicos, siendo un lugar habitual de colonización, las branquias. Este grupo, presenta una larga vida, evolutivamente hablando, y se afirma la presencia de un ancestro común ecto-comensal hace cientos de millones de años. Esta evolución específica del filo demuestra la gran capacidad de adaptación de estas especies a las condiciones ambientales, e incluso especializándose y adaptándose a las condiciones del hospedador. En esta evolución se dio lugar a una separación entre *Monopisthocotylea* y *Polyopisthocotylea*, que presentan diferencias en la unión al hospedador, dependiendo si tienen un punto de unión o varios, respectivamente. Saber observar y aplicar estas diferencias es un factor crucial, ya que el grupo al que pertenezcan presentará implicaciones a nivel de patogenicidad y respuesta por parte del hospedados, y por tanto el tratamiento podrá diferir (Buchmann & Bresciani, 2006).

Concretando un poco, la familia *Diplectinadae*, que está formada por *Diplectanum aequans* y *Diplectanum laubieri*, hospeda específicamente la lubina. Por tanto, comparte el mismo macrohábitat que esta especie, encontrándose principalmente en el mar Mediterráneo y el océano Atlántico. Son destacables algunas diferencias a nivel morfológico entre ambas especies que permiten la diferenciación mediante visualización al microscopio. Al tratarse de ectoparásitos, su microhábitat principal son las branquias de las lubinas, pudiéndose llegar a observar cientos de parásitos por hospedador. Los síntomas varían dependiendo del nivel de infección, llegando hasta la producción de hemorragias severas en las branquias. Sin embargo, lo que suele observarse es una hiperproducción de mucus o una inflamación e hiperplasia del tejido branquial. Esta infección localizada, produce una reducción de la superficie de respiración, como se puede observar en la Figura 7, afectando así al transporte de gases (Buchmann & Bresciani, 2006).

Varios estudios han demostrado la incapacidad de las lubinas a la hora de eliminar estos parásitos por sí mismas, normalmente se llega a un nivel basal de parásitos, que permite una vida sin demasiadas afecciones para el hospedador, dando así una situación de equilibrio. Esta reacción viene dada principalmente por parte del sistema inmune innato del organismo (Faliex et al., 2008). El tratamiento de estos parásitos pasa a través de los compuestos conocidos como antihelmínticos (Buchmann & Bresciani, 2006), que presentan unos efectos tóxicos y selectivos contra los parásitos. Sin embargo, con el tiempo se está observando una mayor resistencia a estos compuestos, además esta resistencia no solo afecta a un tratamiento en concreto, sino a todos los que compartan el modo de acción y/o selección. Por tanto, es importante conocer qué modo de acción presentan los diversos tratamientos con tal de ofrecer un tratamiento efectivo (Martin, 1997).

Además, se debe de considerar el sistema de producción en el que se aplique cada tratamiento. Así, por ejemplo, existe una alta restricción al uso de un gran abanico de compuestos dentro de los sistemas de recirculación en acuicultura. En estos sistemas se emplean biofiltros cebados de bacterias para oxidar el nitrógeno total amoniacal del agua, el cual es tóxico para los peces. Hay que asegurarse de que las bacterias nitrificantes no son afectadas por el compuesto utilizado y el biofiltro debe seguir funcionando después del tratamiento, por lo que esto limita mucho el tipo de tratamiento a aplicar en sistemas cerrados. También hay que considerar que los biofiltros a su vez, pueden ser un reservorio para patógenos y parásitos, por lo que a veces se complica mucho el tratamiento de estas patologías.



FIGURA 7. Sección histológica de tejido branquial teñido con Alcian blue-PAS, en la que se observa la unión de *Diplectanum aequans* y como esta produce una reducción de la superficie respiratoria. Las flechas cortas denotas tejido no infectado y por tanto no afectado, mientras las flechas largas muestran el tejido afectado y unido entre sí (Dezfuli et al., 2007).

Los monogéneos no son los únicos parásitos que están suponiendo pérdidas en la producción. Están apareciendo otras enfermedades emergentes como el síndrome del punto rojo, enfermedad de la piel hinchada o *rash petequial*. Siendo esta última, especialmente importante en besugo (*Sparus aurata*) y en lubina (*Dicentrarchus labrax*). En lubina, esta patología suele aparecer en los meses de invierno, aunque este tipo de afecciones conllevan un tiempo de desarrollo e incubación que varían entre meses a semanas, por lo que es difícil establecer el momento de infección. Sin embargo, los tratamientos con oxitetraciclina presentan una gran eficiencia en la erradicación de esta condición (Schmidt et al., 2018).

Respuesta de los peces frente a patologías

Los peces son capaces de responder frente a las patologías con respuestas inmunológicas diversas y complejas, a partir de la respuesta inmune innata y/o de la respuesta inmune adaptativa (Alvarez-Pellitero, 2008). Sin embargo, ha sido observado que la respuesta innata tiene una mayor importancia, ya que la adaptativa presenta algunas limitaciones (Carbone & Faggio, 2016).

Entre los diferentes procesos o sistemas que presenta la respuesta inmune innata, destacan: primeramente, el reconocimiento de enfermedades infecciosas gracias a los PRRs (*Pathogen recognition receptors*); la fagocitosis; el estallido respiratorio, algunas células liberan especies químicas muy oxidantes al medio (*ROS*), que presentan en algunos casos efectos antimicrobianos; las lisozimas, generadas mayormente en el hígado, capaces de la degradación de la pared bacteriana; el sistema complemento y las citoquinas, entre otros (Carbone & Faggio, 2016). Con el fin de mejorar la respuesta inmune de los peces, está creciendo el uso de la suplementación con prebióticos en las dietas (sustancias que sirven como sustrato para los organismos probióticos). Un ejemplo podrían ser los FOS (*fructose oligosaccharides*), los MOS (*mannan oligosaccharides*) y la insulina, conocidos ahora como inmunosacáridos que son capaces de afectar a diferentes aspectos de la respuesta inmune innata (Carbone & Faggio, 2016; Torrecillas et al., 2015), así como también otros compuestos, que sin ser prebióticos se ha demostrado que modulan la actividad inmune y se encuentra de forma natural en muchas materias primas vegetales, por ejemplo la cebada (Pinedo-Gil et al., 2019).

1.5. Estudios previos de expresión génica

Los análisis de expresión génica suponen una herramienta de gran importancia para los estudios actuales en acuicultura. Algunos autores, como Estruch et al. (2018) los han utilizado para estudiar el efecto dieta sobre los ejemplares, concretamente en este estudio se analiza la respuesta de genes inmunes e inflamatorios frente a una larga exposición de los ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) a una dieta con altos niveles de sustitución vegetal. Esta técnica también ha sido empleada para observar cómo afecta la introducción de un nuevo componente en la dieta, por ejemplo en el trabajo de Torrecillas et al. (2015) se describe cómo afecta la introducción de concentrado de *mannan oligosaccharides* (MOS) en la respuesta inmune en el intestino y en el metabolismo de lípidos en juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Por otra parte, también es importante conocer cómo los ejemplares pueden responder ante situaciones adversas, y qué órganos se pueden ver más afectados. La parasitación, que como se ha comentado con anterioridad es uno de los mayores problemas en acuicultura, supone un tema relevante en los estudios de este tipo. Estos estudios suelen estar relacionados con el análisis de expresión de genes inflamatorios e inmunes y se pueden encontrar en diferentes especies. En Lu et al. (2013) se muestra el análisis de expresión de TNF- α 1, TNF- α 2, IL-1 β 2, TGF- α β , iNOS α e iNOS β en las branquias para una infección del parásito *Dactylogyrus intermedius* en carpa dorada. Otros estudios pueden centrarse no solo en observar el nivel de expresión, sino comparar este nivel entre tejidos, como es el caso de Faliex et al. (2008) que estudia la expresión de los genes TGF- β , TCR- β e IL-1 β tanto en bazo como en las branquias en lubina tras una infección de *Diplectanum aequans*.

Los estudios que desarrollan análisis de expresión génica en acuicultura conllevan el empleo de una gran cantidad de peces con tal de tener una n relativamente alta para los análisis estadísticos, por ende, también se requieren unas instalaciones que aseguran unas condiciones óptimas para el desarrollo óptimo de los peces. En el caso de la lubina, pese a ser una especie con menos estudios que otras especies del campo de la acuicultura, como el salmón o la dorada, se han desarrollado múltiples ensayos de expresión génica, algunos ejemplos pueden observarse en la Tabla 2.

Tabla 2. Biblioteca de genes estudiados en lubina

CATEGORÍA	GEN	ÓRGANO	REFERENCIA
Nutricional	Catepsina L	Intestino	Calduch-Giner et al., 2016
	<i>Insulin growth factor 1 (crecimiento)</i>	Intestino	Carnevali et al., 2006
	<i>Fatty acid desaturase 2</i>	Intestino and hígado	Geay et al., 2010
	<i>Insulin growth factor 1 (crecimiento)</i>	Intestino and hígado	Patruno et al., 2007
	<i>Lipoprotein lipase</i>	Hígado	Torrecillas et al., 2015
Inflamatoria	<i>Transforming growth factor β</i>	Intestino	Torrecillas et al., 2015
	Interleucina 10	Intestino and hígado	Buonocore et al., 2007
	Mucina 2	Intestino	Terova et al., 2016
	<i>Transforming growth factor β</i>	Bazo and branquias	Faliex et al., 2008
	Interleucina 1	Bazo and branquias	Faliex et al., 2008
Genes de referencia	Beta-actin	Intestino	Carnevali et al., 2006
	<i>Elongation Factor 1</i>	Intestino and hígado	Geay et al., 2010
	<i>Beta actin 1</i>	Hígado	Mitter et al., 2009
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hígado	Mitter et al., 2009
	<i>18S ribosomal RNA</i>	Testículos	Viñas et al., 2008
Respuesta al estrés	Heat shock protein 70	Hígado	P.Enes et al., 2006
	<i>Elongation factor 1</i>	Hígado	P.Enes et al., 2007
	<i>Proiomelanocortin</i>	Hígado y otros	Varsamos et al., 2003
	<i>Heat shock protein 70</i>	Pancreas, hígado, corazón, músculo, espina and intestino	Tovar-Ramírez et al., 2010
Respuesta inmune	Caspasa 9	Intestino	Torrecillas et al., 2015
	<i>Recombination activating gene 1</i>	Intestino and hígado	Boschi et al., 2011
	Transferrina	Hígado	Neves et al., 2009
	Ferritina	Hígado	Neves et al., 2009
	T cell receptor β	Bazo and branquias	Faliex et al., 2008
Otros	Citocromo P450 1A1	Intestino	Calduch-Giner et al., 2016
	Superóxido dismutasa	Pancreas, hígado, corazón, músculo, espina and intestino	Tovar-Ramírez et al., 2010
	Catalasa	Pancreas, hígado, corazón, músculo, espina and intestino	Tovar-Ramírez et al., 2010

2. Justificación y objetivos

La producción de acuicultura ecológica es una realidad en España, y aunque está en una situación incipiente (1.450 toneladas) presenta un gran futuro en respuesta a la “preferencia de determinados consumidores por productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales” (Reg. 834/2007). Los fundamentos básicos de la producción ecológica se basan en la utilización de las mejores prácticas ambientales posibles, preservación de los recursos naturales, y el elevado nivel de biodiversidad, el bienestar animal, y obtención de productos de calidad, que son perfectamente aplicables a la producción de animales acuáticos.

Sin embargo, la propia normativa de producción ecológica (Reglamento (CE) N° 889/2008 y N° 710/2009) impone unas limitaciones en la alimentación (ingredientes, aditivos, etc) y en el manejo (densidad, etc) que pueden suponer una reducción en la productividad, que se debería compensar con una mayor calidad y valor del producto final. Por ello, es fundamental evaluar la viabilidad de los piensos ecológicos, especialmente en aquellos que incluyan altos porcentajes de fuentes vegetales ecológicas, que puedan influir en la salud del animal. Además, la alimentación es un factor clave en las infecciones parasitarias, que de no ser adecuada puede romper el equilibrio huésped-hospedador, provocando una disminución del crecimiento, mayores mortalidades, y por lo tanto, una menor productividad.

Con todo ello, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la respuesta de lubinas alimentadas con piensos con diferentes niveles de inclusión de harinas vegetales, añadiendo además la condición de ecológicos, ante la infección por un parásito (*Diplectanum* sp.).

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

- Caracterizar el efecto dieta sobre el crecimiento y la supervivencia de los ejemplares en las diversas fases del estudio: fase de engorde y fase de parasitación.
- Estudiar las consecuencias de la respuesta ante la parasitación dependiendo de la dieta administrada.
- Determinar el efecto de la dieta en la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria e inmune frente a una infección parasitaria.

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 Universitat Politècnica de València (UPV).

3.2. Descripción de la instalación

La parte experimental de este trabajo se realizó conjuntamente entre el Laboratorio de Acuicultura (LAC) y el Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Ciencia Animal de la UPV. El LAC dispone de varias líneas de experimentación, integradas en un circuito cerrado de recirculación de agua que permite realizar diversos experimentos con especies tanto de agua dulce como de agua salada a distintas temperaturas. El actual trabajo se realizó en la línea 2 del LAC, perteneciente al circuito cerrado de agua marina que, tras una correcta depuración de la misma, permite su reutilización evitando un gasto excesivo de agua. Esta línea consta de una red de canaletas que recogen el agua de los tanques y la llevan a un filtro rotatorio, donde se eliminan los sólidos. Después, el agua pasa a un aljibe general y, a continuación, a un biofiltro que elimina el exceso de amonio. De este biofiltro, el agua pasa a otro aljibe desde el cual es enviada a los tanques por medio de bombas de impulsión.

La instalación también cuenta con una bomba de calor/frío para mantener la temperatura del agua constante durante todo el año. El aporte de oxígeno se realiza mediante un sistema de aireación con bombas electrosoplantes, que toman el aire del exterior, lo filtran y lo introducen en los tanques mediante difusores de material poroso asegurando una distribución uniforme del aire en pequeñas burbujas. En caso de un fallo del sistema de aireación, existe un sistema de emergencia con el que se inyecta oxígeno al agua.

La línea 2 del laboratorio está formada por 18 tanques de fibra de vidrio, de forma cilíndrica, con una capacidad de 1750 litros cada uno, de los cuales solo se usaron 9 para la realización de este estudio. Los tanques se distribuyen en una fila doble, con soportes para la red de agua, desagüe, aireación y oxigenación (Figura 8).



Figura 8. Distribución de los tanques de la línea 2 en el LAC

3.3. Descripción del ensayo completo

3.3.1. Peces y condiciones experimentales

Se utilizaron 450 juveniles de lubina ecológica (como los que se pueden observar en la Figura 9) provenientes de la piscifactoría Sonrionansa (Pesues; Cantabria). Los animales fueron transportados a las instalaciones de la UPV mediante una furgoneta adaptada para el transporte de peces vivos. Antes de introducir los peces en los tanques se realizó una aclimatación gradual a la salinidad y temperatura del sistema. Además, durante las primeras dos semanas, los peces fueron alimentados con un pienso ecológico comercial. Transcurrido este tiempo, se pesaron y se introdujeron 50 peces en cada tanque.



Figura 9. Juveniles de lubinas ecológica utilizados en la prueba

Los peces fueron alimentados manualmente hasta la saciedad en dos tomas diarias de lunes a viernes (a las 9 am y a las 2 pm) y en una toma matinal los sábados. La cantidad ingerida se registró diariamente. También diariamente, se controlaba la temperatura y el oxígeno disuelto en el agua (oxímetro portátil o sonda OxyGuard Handy Polaris) y dos veces por semana la salinidad (refractómetro, Hanna Instruments), el pH (tiras de papel tornasol) y la concentración de amonio, nitritos y nitratos (test colorímetro MERCK). Los valores medios obtenidos fueron: 21,53°C (temperatura), 7,62 mg/L (oxígeno disuelto), 7,02 (pH), 16,15‰ (salinidad), 0,18 mg/L (amonio), 0,25 mg/L (nitritos), y 92,32 mg/L (nitratos). El fotoperiodo utilizado fue natural y todos los tanques tenían unas condiciones de iluminación similares.

3.3.2. Piensos experimentales

Los piensos fueron elaborados en la instalación de granjas departamento de Ciencia Animal de la UPV siguiendo un proceso de cocción-extrusión mediante un extruder semi-industrial (CLEXTRAL BC 45, St. Etienne, France). Cabe destacar que la UPV es una de las pocas universidades públicas españolas que disponen de un extruder semi-industrial que permite la fabricación de piensos a gran escala experimental.

Tabla 3. Formulación y composición nutricional de los piensos empleados

Piensos	FM30 Control	FM30 ECO	FM25 ECO
Materias primas (g kg⁻¹)			
Harina de pescado (FM)	300	300	250
Trigo	179	22	
Gluten de trigo	122		
Salvado de espelta		10	
Maíz		8	
Harina de soja	218	504	586
Aceite de soja	72	59	55
Aceite de pescado (FO)	71	67	72
Fosfato Cálcico	20	20	27
Taurina	5		
Metionina	3		
Vitaminas ^X	10	10	10
Composición nutricional (g 100 g⁻¹ MS)			
Materia seca	92	92	92
Proteína bruta	47.2	46.7	46.1
Grasa bruta	15.4	17.1	17.1
Cenizas	8.1	9.2	9.3
Energía (kJ g ⁻¹)	24.3	24	24.2

^X Contiene: pmezcla 25g; Colina: 10g; DL-a-tocoferol: 5g; ácido ascórbico: 5g; Ca₃(PO₄): 5g. Composición pmezcla por kg: acetato de retinol: 1 000 000 UI kg⁻¹; calciferol: 500 UI kg⁻¹; DL-a-tocoferol: 10g; bisulfito de sodio menadiona: 0.8g; clorhidrato de tiamina: 2.3g; rivo-flamina: 2.3g; clorhidrato de piridoxina: 15g; cianocobalamina: 25g; nicotinamida: 15g; ácido pantoténico: 6g; ácido fólico: 0.65g; biotina: 0.07g; ácido ascórbico: 75g; inositol: 15g; betaína: 100g; polipéptidos: 12g.

De los tres piensos experimentales, dos de ellos debían contener la condición de ecológico, por lo que para su correcta elaboración se siguieron los requisitos de la normativa de producción ecológica (Reglamento (CE) N° 889/2008 y N° 710/2009), es decir, se eliminó la suplementación de los piensos mediante sustancias químicas no permitidas (como aminoácidos sintéticos) y se emplearon materias primas con certificación especial. Se formularon 3 piensos isolipídicos (18%) e isoproteicos (45%) con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por fuentes vegetales (Tabla 3): un pienso control FM30 Control con un 30% de harina de pescado, pero sin ingredientes ecológicos y adicionando aminoácidos libres cumpliendo con las necesidades de la especie (Tibaldi & Kaushik, 2005) , y dos piensos ecológicos experimentales FM30 ECO y FM25 ECO, con un 30% y un 25% de harina de pescado, respectivamente, cumpliendo la normativa ecológica. El perfil aminoacídico de cada uno de los piensos experimentales se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de aminoácidos de los piensos experimentales.

Piensos	FM30 Control	FM30 ECO	FM25 ECO
Aminoácidos esenciales¹ (g 100g⁻¹ en peso húmedo)			
Arginina	2,85	2,57	2,74
Histidina	0,74	0,94	0,90
Isoleucina	1,58	1,71	1,72
Leucina	2,82	2,94	2,96
Lisina	2,00	2,41	2,54
Metionina	1,25	0,77	0,70
Fenilalanina	1,76	1,79	1,77
Treonina	1,34	1,44	1,54
Valina	1,83	1,97	1,97
Aminoácidos no esenciales (g 100g⁻¹ en peso húmedo)			
Alanina	1,62	1,90	1,85
Ácido aspártico	2,87	3,69	4,04
Cisteína	0,36	0,38	0,41
Ácido glutámico	7,86	6,13	6,22
Glicina	1,79	1,91	1,90
Prolina	2,11	1,50	1,52
Serina	1,71	2,26	1,59
Tirosina	1,18	1,30	1,19
AAE/AANE	0,83	0,87	0,90

¹Los piensos ecológicos no tienen suplementación de AA sintéticos

3.3.3. Fases del ensayo

El diseño experimental del actual estudio se divide en dos fases (Figura 10). En la fase de engorde se analizaron los índices de crecimiento y supervivencia, para los diferentes tratamientos. En la fase de parasitación se analizaron los mismos índices de la fase anterior, pero además se añadieron análisis de parámetros sanguíneos y expresión génica en hígado, que permitieron establecer el grado de la parasitación y sus efectos para los diversos tratamientos.

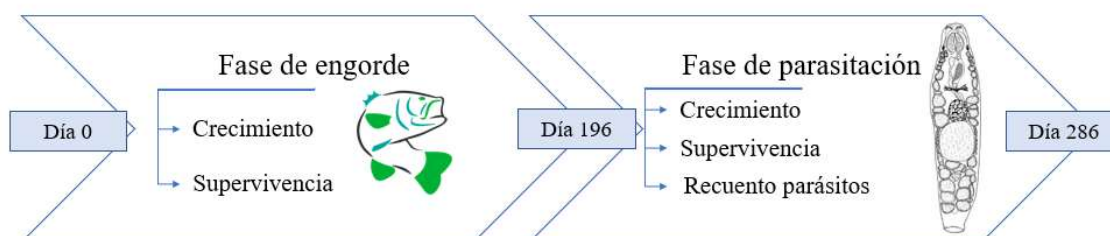


Figura 10. Resumen de las fases del experimento

Fase de engorde

La primera fase del ensayo se inició el día 18 de mayo de 2018 y se prolongó 196 días, hasta que las lubinas alcanzaron la talla comercial de aproximadamente 350 g. El crecimiento de los peces durante esta fase fue evaluado mensualmente. Para ello, el primer lunes de cada mes, es decir, con un intervalo entre muestreos de unos 28 días, se realizaba un control del peso y de la biomasa en cada tanque. En primer lugar, se vaciaban los tanques hasta la mitad de su nivel normal y se extraían los peces mediante salabres, desde donde se llevaban a cubos con solución de aceite de clavo con un 87% de eugenol (Guinama ®, España) y agua, que servía de analgésico para facilitar su manejo y reducir en la medida de lo posible el estrés sufrido por los peces. Una vez dormidos, se pesaban en una báscula digital. Además, en el primer y último muestreo de esta fase el peso fue registrado de forma individual.

Fase de parasitación

La segunda fase del ensayo comenzó a continuación de la fase de engorde (diciembre de 2018) hasta marzo de 2019. Mensualmente, se realizó el control de crecimiento de los peces, como se ha descrito para la fase anterior. Además, en el primer y último muestreo de esta fase el peso también fue registrado de forma individual.

A finales del mes de diciembre se produjo una avería en la bomba de calor de la instalación que generó unas condiciones de temperatura subóptimas para los peces (17,1-17,4°C). Esta bajada de temperatura pudo contribuir a que algunos peces presentaran lesiones en la piel compatibles con una dermatitis (Figura 11) como las descritas en trucha arcoíris (*Red Mark Syndrome* o *Strawberry disease*) o en dorada (*Rash petequal* o punto rojo). En enero de 2019 se enviaron muestras de peces que presentaban estas lesiones al laboratorio ICTIOVET S.C.P para su necropsia y posterior análisis. Según el informe del laboratorio, el aspecto macroscópico e histológico de las lesiones de piel era compatible con una dermatitis crónica de tipo liquenoide. Se trata de una condición de piel de curso crónico/subagudo, que no suele estar asociada a un nivel de mortalidad incrementado y que desapareció en el momento en que se reguló la temperatura. Adicionalmente, en las secciones de branquias se detectó la presencia de parásitos monogénea *Diplectanum* sp, tal y como se observa en la Figura 11.

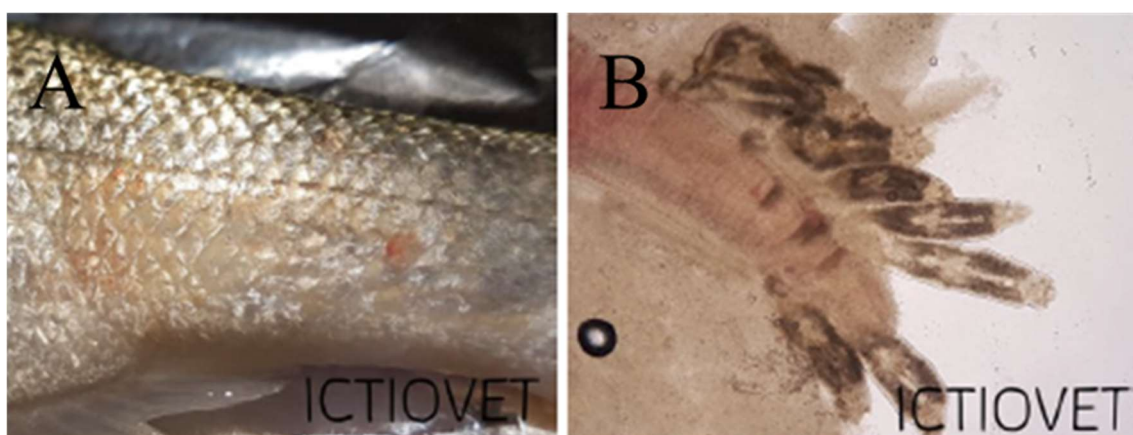


Figura 11. Patologías que presentaban los peces. (A) Aspecto macroscópico de la dermatitis (B) *Diplectanum* sp. alojados en las branquias

Teniendo en cuenta que los animales se encontraban en circuito cerrado, se realizaron tratamientos curativos con OX-VIRIN® (dosis de 100 ppm; 70 ml/tanque) durante tres días consecutivos. Para ello, se procedió a vaciar los tanques hasta la mitad de su nivel y se añadió la dosis de producto. Durante una hora se paró la recirculación de agua funcionando solo la aireación. Estos tratamientos fueron realizados el 5, 6 y 7 de febrero de 2019. Además, para monitorizar el grado de parasitación en los peces, se procedió a contar el número de parásitos presentes en las laminillas branquiales mediante el uso de una lupa model KTD-2 (Euromex Arnhem) (Figura 12). El recuento parasitario se realizó de forma individual en aquellos peces que aparecían muertos en los diferentes tanques.



Figura 12. Lupa utilizada para el conteo de parásitos

En el muestreo final llevado a cabo en marzo de 2019, se procedió a anestesiarse a los peces en una disolución de aceite de clavo ($1\text{mg } 100\text{mL}^{-1}$). A continuación, se tomaron muestras de sangre de 3 peces por tanque (total de 27 peces; Figura 13) de la vena caudal utilizando jeringuillas tratadas con heparina (14 UI/ml). Las muestras fueron refrigeradas (4°C) y remitidas al laboratorio ICTIOVET S.C.P. para el análisis del hemograma.

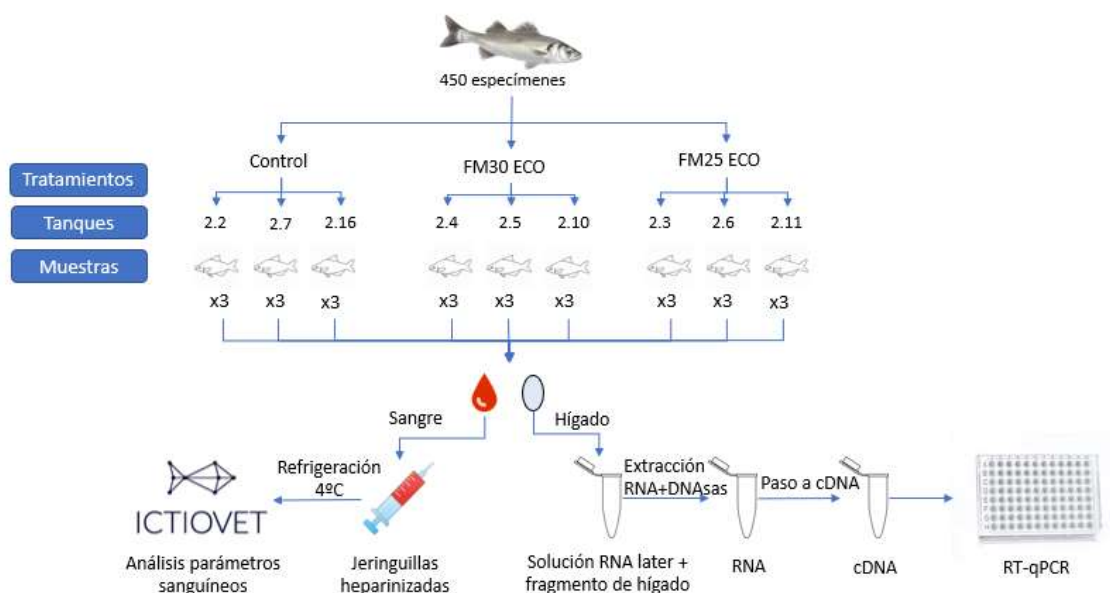


Figura 13. Resumen del proceso experimental del muestreo final (día 286)

Una vez extraída la sangre, los peces fueron sacrificados mediante un corte en la sutura branquial. Se extrajo el hígado inmediatamente, el cual fue dividido en dos fragmentos o réplicas que fueron introducidos en una solución de RNAlater (Qiagen, España). Se obtuvieron un total de 27 muestras diferentes formadas por dos réplicas cada una, 9 por tratamiento (FM30 Control, FM30 ECO y FM25 ECO) (Figura 13). Las muestras fueron mantenidas a 4°C durante 24 horas y a continuación a -80°C hasta el momento de los análisis de expresión génica.

3.4. Análisis de expresión génica

3.4.1. Extracción de tRNA y paso a cDNA

Se extrajo el ácido ribonucleico total (tRNA) de los tejidos de la sección posterior del intestino mediante extracción tradicional de fenol/cloroformo, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, España), y luego se trató con Dnase I recombinant RNase-free (Roche, Francia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, La concentración, calidad e integridad del RNA total se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Fisher Scientific SL, España). Solo las

muestras que obtuvieron un ratio de absorbancia A260/280 entre 1,8 - 2 y A260/230 mayor de 2, fueron incluidos en el análisis. Las muestras de tRNA se almacenaron a -80 °C hasta la etapa de síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), para evitar la degradación del tRNA.

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

3.4.2. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Con el fin de evaluar el efecto del uso de distintos niveles de sustitución de FM por fuentes vegetales en piensos ecológicos ante un fenómeno de parasitación, se seleccionaron una serie de genes que por su relevancia fisiológica podrían estar afectados por las condiciones experimentales.

Genes candidatos de estudio

Para un correcto análisis de la expresión génica, en primer lugar, es necesario seleccionar un gen de referencia que permita normalizar la expresión de los genes en estudio. Para ello, se buscó en la bibliografía (Tabla 5; Mitter et al., 2009; Torrecillas et al., 2015) genes de referencia empleados en trabajos anteriores para análisis de expresión en lubina: Beta actina (β actina); *Elongation factor 1 α* (EF1 α) y *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GADPH). La estabilidad de expresión en los diferentes grupos experimentales para la selección del gen de referencia se realizó mediante el programa BestKeeper (Pfaffl et al., 2004). Valores con una desviación estándar menores de 1, se consideran genes lo suficientemente estables para ser utilizados como genes de referencia.

Además de los genes de referencia, también se probaron 15 posibles genes diferenciales (Tabla 5). Tanto en los genes de referencia como en los genes diferenciales, se evaluó su expresión en tres pools, una para cada tratamiento, procedentes de la adición de 1 µl cada muestra de cDNA para ese tratamiento diluidos en agua libre de DNAsas (Sigma-Aldrich, Germany) hasta conseguir una dilución de 1/20, permitiendo ver de forma rápida el posible efecto de las condiciones experimentales en su expresión.

En relación a los genes diferenciales seleccionados, se encuentran genes relacionados respuesta innata como las citoquinas proinflamatorias Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 10 (IL10), Interleucina 6 (IL6) e Interleucina 8 (IL8), u otras moléculas proinflamatorias como el Factor de necrosis tumoral (TNF α), Caspasa 3 (Casp3), Caspasa 9 (Casp9) y Ciclooxygenasa 2 (COX2) (Torrecillas et al., 2015). Además también se incluyeron aquellos genes relacionados con la respuesta inmune ante las infecciones parasitarias, destacando el Factor de crecimiento transformante (TGF β) y T cell receptor β (TCR β) que ejercen un papel principal en ésta, entre los cuales también se encuentran los genes que codifican para anticuerpos Inmunoglobulina (Ig) o para proteínas presentes en las células inmunes, CD4 y CD8 α (Faliex et al., 2008; Torrecillas et al., 2015). Asimismo se estudiaron genes que estaban relacionados tanto con el sistema inmune como con el metabolismo del hierro, directamente relacionado con la anemia, una patología recurrente en condiciones de parasitación, como la Transferrina (Trf) y la Ferritina (Fth) (Witeska, 2015)(Neves et al., 2009).

Tabla 5, Listado de los primers correspondientes a los genes candidatos (diferenciales y de referencia) para el análisis de RT-qPCR

Gen	Nº de acceso GenBank	Forward	Reverse	Tm (°C)	Referencia
Genes diferenciales					
Casp3	DQ345773	CTGATTTGGATCCAGGCATT	CGGTCTAGTGTTCTCCAT	60	Torrecillas et al., 2015
Casp9	DQ345775	GGCAGGACTCGACGAGATAG	CTCGCTCTGAGGAGCAAAC	60	Torrecillas et al., 2015
CD4	AM491135	GTGATAACGCTGAAGATCGAGCC	GAGGTGTGTCATCTTCCGTTG	52	Boschi et al., 2011
CD8 α	AJ846849	CCACTGCATGCGCCGGTGAGG	GTGGACGTCGACTTAAACGTG	55	Boschi et al., 2011
COX2	AJ630649	CATTCTTTGCCAGCACTTCACC	AGCTTGCCATCCTTGAAGAGTC	52	Torrecillas et al., 2015
Fth	FJ197144	AACCATGAGTTCTCAGGTGAG	TTAGCTGCTCTCTTGGCCAG	59	Neves et al., 2009
Ig	AJ400233	GAGCTGCAGGAGGACAGTG	TCAGACTGGCCTCACAGCT	52	Torrecillas et al., 2015
IL-1 β	AJ537421	ATTACCCACCACCCACTGAC	TCTCTCCACTATGCTCTCCAG	58	Torrecillas et al., 2015
IL10	AM268529	ACCCCGTTTCGCTTGCCA	CATCTGGTGACATCACTC	52	Torrecillas et al., 2015
IL6	AM490062	ACTTCCAAAACATGCCCTGA	CCGCTGGTCAGTCTAAGGAG	60	Torrecillas et al., 2015
IL8	AM490063	GTCTGAGAAGCCTGGGAGTG	GCAATGGGAGTTAGCAGGAA	60	Torrecillas et al., 2015
TCR β	AJ493441	GACGGACGAAGCTGCCCA	TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA	52	Torrecillas et al., 2016
TGF β	AM421619	GACCTGGGATGGAAGTGG	CAGCTGCTCCACCTTGTG	52	Torrecillas et al., 2015
TNF α	DQ200910	ACAGCGGATATGGACGGTG	GCCAAGCAAACAGCAGGAC	58	Torrecillas et al., 2015
Trf	FJ197144	CAACAGTATGGGTGCTGACG	ACTGGCAGAGCACTTGGACT	59	Neves et al., 2009
Genes de referencia					
β actina	AJ269472	ATGTGGATCAGCAAGCAGG	AGAAATGTGTGGTGTGGTTCG	58	Torrecillas et al., 2015
EF1 α	AJ866727	GCTTCGAGGAAATCACCAAG	CAACCTTCCATCCCTTGAAC	60	Torrecillas et al., 2015
GADPH	AY863148	GTGCCAGCCAGAATCAT	TGTCGTCATATTTGGCGGGTTTC	57	Mitter et al., 2009

Condiciones del ensayo

Los ensayos de RT-qPCR y los análisis de expresión génica fueron llevados a cabo mediante el equipo qPCR LightCycler® 96 Instrument (Roche). Para el ensayo se emplearon placas de 96 pocillos, que presentaban un volumen final de 10 μ l donde se incluye 3 μ l de muestra cDNA (dilución 1/20), 5 μ l de Light cycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche) y 1 μ l tanto de *primer forward* como de *reverse* (dilución 1/20).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes. Después de una activación inicial de la polimerasa a 95°C durante 10 min, se realizaban 40 ciclos de amplificación PCR con las siguientes condiciones: 95°C durante 1s y 60°C durante 30s para todos los genes. A fin de evaluar la especificidad, se realizó una curva de *melting* directamente después de la PCR incrementando la temperatura (1°C/min) desde 60 hasta 97°C, manteniendo un registro continuo de los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por cada pocillo.

Con el objetivo de registrar la eficiencia de los *primers* para las condiciones del presente estudio, se realizaron curvas de calibrado para cada gen. Se prepararon diluciones consecutivas (1/8 - 1/2048), a partir de los *pools* de los diferentes tratamientos, y se realizó una qPCR con las mismas condiciones establecidas con anterioridad. Con los resultados obtenidos se realiza una curva, y la eficiencia del par de *primers* vendrá determinada por la pendiente de la curva. Además, señaló un calibrador por gen y por placa, que permitió observar la posible variación entre placas debido a factores humanos. Como calibrador se empleó un *pool* de muestras de cada uno de los tratamientos.

La cuantificación relativa de los resultados se realizó siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C}$ (Schmittgen & Livak, 2008), que permite expresar la expresión del gen cuantificado en valores relativos al valor expresión del gen de referencia para esa muestra, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio Normalizado} = E_T^{C_{IT}(C) - C_{IT}(S)} \times E_R^{C_{IR}(S) - C_{IR}(C)}$$

Dónde:

E_T/E_R : Eficiencia de la amplificación del gen diferencial/gen de referencia

C_{IT}/C_{IR} : Número del ciclo en el que se da la detección del nivel basal de fluorescencia (*crossing point*) en el gen diferencial/gen de referencia

C: Calibrador

S: Muestra desconocida

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico SAS 9,4 software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Para ello se realizó un análisis de la varianza considerando el efecto dieta como el factor principal. En las variables de peso registradas durante la fase de parasitación, se empleó como covariable el peso inicial registrado a 196 días. Las variables que presentaban una distribución normal fueron analizadas con el procedimiento GLM y aquellas con una distribución no normal (Casp9) con el procedimiento GLIMMIX. En este último caso se asumió una distribución de *Poisson*.

El test de Tukey-Kramer fue el método utilizado para comparar las medias ajustadas entre los grupos experimentales. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados se han expresado como la media \pm ES (error estándar de la media).

4. Resultados

4.1. Fase de engorde

Las curvas de crecimiento de los grupos experimentales estudiados fueron similares durante la mayor parte de esta primera fase, sin embargo, en el último mes, entre el muestreo realizado a 168 y 196 días, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. El grupo alimentado con el pienso control presentó un mayor crecimiento que los grupos alimentados con los piensos FM30 ECO y FM25 ECO (Figura 14).

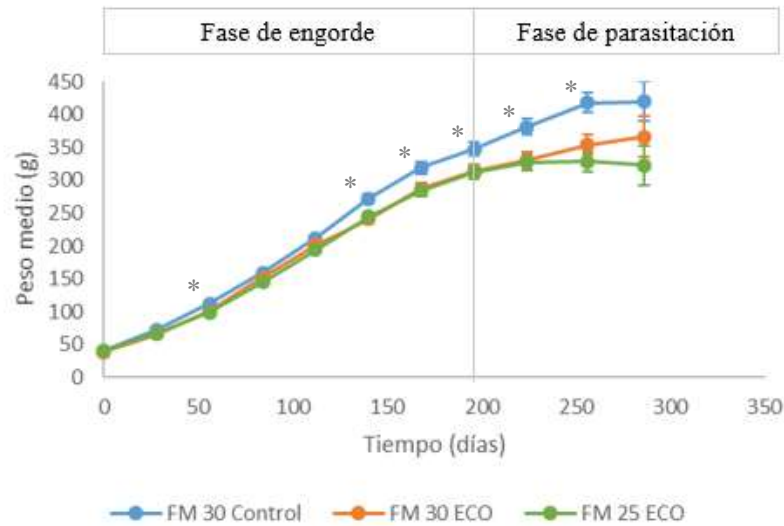


Figura 14. Curvas de crecimiento en ambas partes del experimento para todos los tratamientos, donde ‘*’ indica una diferencia significativa entre el grupo FM30 Control y el resto

La mortalidad durante esta primera etapa fue muy baja, manteniendo niveles inferiores al 5%, y sin diferencias entre tratamientos, obteniéndose unas tasas de supervivencia óptimas para todos los grupos experimentales. Esta mortalidad se atribuye principalmente al estrés causado en el manejo de los peces durante los muestreos (Figura 15).

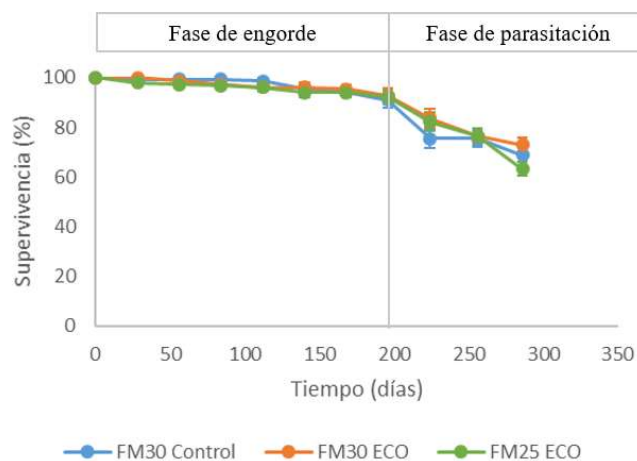


Figura 15. Porcentaje de supervivencia para todos los tratamientos en ambas fases del experimento

4.2. Fase de parasitación

4.2.1. Crecimiento y supervivencia

Durante la segunda fase, se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los peces alimentados con el pienso control (FM30 Control) y los alimentados con los piensos ecológicos (FM30 ECO y FM25 ECO) (Figura 14). Además, entre el muestreo del día 256 y el muestreo del día 286 tuvo lugar una etapa crítica, que se pone de manifiesto con una acusada disminución de la pendiente de la curva de crecimiento (Figura 14), que afectó a todos los grupos experimentales pero en mayor medida a los peces alimentados con el pienso FM25 ECO, que no solo interrumpieron su crecimiento, sino que perdieron peso. Los peces del tratamiento FM30 Control disminuyeron su ritmo de crecimiento, aunque se mantuvo a unos niveles aceptables considerando el cuadro clínico.

Como se muestra en la Tabla 6, los peces alimentados con el pienso FM30 Control presentaron un mayor peso que los peces alimentados con los piensos ecológicos, a 196 y 256 días. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el peso registrado en el muestreo final (286 días), que en parte puede deberse que en el muestreo final se pesaron menos peces que en el resto de los muestreos. No obstante, numéricamente se puede observar un peso más elevado en los peces alimentados con el pienso FM30 Control frente a los piensos ecológicos, y, entre estos últimos, un peso mayor en los alimentados con FM30 ECO frente a los FM25 ECO.

Tabla 6. Pesos registrados durante la fase de parasitación para los diferentes tratamientos experimentales.

	FM30 Control	FM30 ECO	FM25 ECO	p-value
Peso final engorde ¹ (g)	354 ±10,2 ^a	310±10,2 ^b	312±10,2 ^b	0,037
Fase parasitación				
Peso intermedio ² (g)	379±8,7 ^a	375±6,5 ^b	347 ±6,5 ^b	0,013
Peso final ³ (g)	401±50,1	376 ±38,5	331 ±37,4	n.s

Los datos son las medias ± error estándar (n=3). Datos con diferentes superíndices indican diferencia significativas (p<0,05). Test de Tukey-Kramer. ¹ a 196 días; ² a 256 días; ³ a 286 días.

La supervivencia sigue la misma tendencia que en la fase de engorde, sin embargo, a partir del muestreo del día 196 se observa un pronunciado incremento de la mortalidad. Pese a esto, los niveles de supervivencia se mantienen alrededor del 70% (Figura 15).

Finalmente, los resultados del grado de parasitación registrados durante esta fase no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 7). A pesar de ello, se muestra una diferencia numérica relevante entre tratamientos, con una carga parasitaria superior en los peces del tratamiento FM25 ECO, seguido de los peces alimentados con el FM30 ECO y por último los del FM30 Control. Es importante destacar que el recuento de parásitos se realizó en las bajas que se producían en los diferentes tanques, y por ello, el número de peces analizados por tratamiento es diferente. Esto se ve reflejado en los elevados errores obtenidos.

Tabla 7. Recuento de parásitos para los diferentes tratamientos experimentales

	FM30 Control	FM30 ECO	FM25 ECO	p-value
Recuento de parásitos (Nº de parásitos/pez)	15 ± 15,1	25 ±15,1	33 ± 12,3	n.s

Los datos son las medias ± error estándar (n=2 para FM30 Control y FM25ECO, n=3 para FM30 ECO). Datos con diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05). Test de Tukey-Kramer.

4.3. Parámetros sanguíneos

Los valores de hematocrito no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 8). No obstante, sí se observa una diferencia numérica importante, especialmente para el grupo FM ECO25 que presenta unos valores de hematocrito inferiores a los valores normales para la lubina ($51 \pm 5\%$) y podrían ser indicadores de una situación de anemia.

En el caso del recuento de las células leucocitarias totales, tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos, pero todos los grupos presentaron unos valores por debajo de los valores promedio descritos para la especie (30.900 ± 8.350 cel/ μ l). Asimismo, el tipo celular predominante en los recuentos leucocitarios fue el linfocitario, el cual tampoco varió entre tratamientos. Estos resultados son compatibles con un cuadro de inmunosupresión. Esta condición puede ser un factor de predisposición al problema parasitario en branquia o consecuencia de una condición patológica crónica.

Tabla 8. Parámetros sanguíneos para los diferentes tratamientos experimentales

Parámetros sanguíneos	Dieta			p-value
	FM30 Control	FM30 ECO	FM25 ECO	
Hematocrito (%)	57,2 \pm 6,42	47,5 \pm 6,42	43,1 \pm 6,42	n.s
Recuento leucocitario (células/ μ l)	2651 \pm 1979	2652 \pm 1979	6659 \pm 1979	n.s
Linfocitos (células / μ l)	2986 \pm 2049	1413 \pm 2049	6052 \pm 2049	n.s
Linfocitos (%)	78,7 \pm 7,27	64,2 \pm 7,27	78,2 \pm 7,27	n.s

Los datos son las medias \pm error estándar (n=3). Datos con diferentes superíndices indican diferencia significativas (p<0,05). Test de Tukey-Kramer.

4.4. Análisis preliminar de expresión

Tras someter el análisis de estabilidad de BestKeeper se estableció el EF1 α como mejor gen de referencia debido a los altos valores de desviación estándar (SD) de los genes β actina y GADPH.

En la Figura 16 se muestran los resultados de RT-qPCR de los *pools* de cDNA para los diferentes tratamientos. Se representan en función de su resultado de Ct, que indica el número de ciclos mínimo necesario para que una muestra llegue al nivel de fluorescencia detectable; por tanto, se puede sobreentender que a menor nivel de Ct, menor número de ciclos y con ello mayor expresión. Se registró, de forma generalizada, un mayor nivel de expresión en el *pool* del tratamiento FM25 ECO, mientras que FM30 Control y FM30 ECO mostraron valores similares. La selección de los gens se basó en su relevancia biológica y su nivel de expresión (niveles de Ct más bajos). El TGF- β , el TCR- β y la Il1 β presentan un papel central en la expresión de enzimas relacionadas con la activación de la respuesta inflamatoria en la defensa contra parásitos para *Dicentrarchus labrax* (Faliex et al., 2008) por tanto fueron añadidos al estudio. Ante el cuadro de anemia presentado por los peces, se decidió estudiar los genes Trf y Fth por su relación con la respuesta inmune y el metabolismo del hierro. Finalmente entre el grupo de citoquinas se seleccionó Il6 ya que presenta unas mayores diferencias entre tratamientos, y para el grupo de moléculas proinflamatorias se seleccionó Casp9, ya que se trata de un iniciador de la apoptosis celular frente a Casp3 que se trata de un producto intermedio de esta reacción.

Por tanto, la lista de genes estudiados para el total de las muestras fue: EF1 α como gen de referencia, y como genes experimentales, Trf, Fth, TGF- β , TCR- β , Casp9, Il-1 β y Il6.

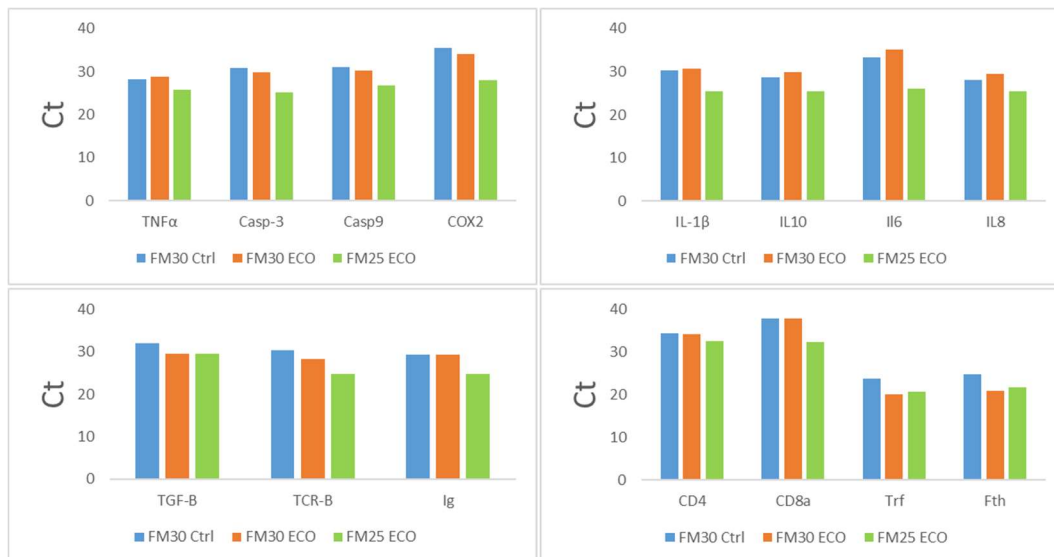


Figura 16. Niveles de expresión para los genes diferenciales empleando la pool de cada tratamiento

4.4.1. Curvas estándar

Los análisis de curvas estándar establecieron un buen funcionamiento de los *primers* para las condiciones del presente trabajo ($1.8 < \text{Eficiencia} < 2.11$; Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de las curvas estándar para los genes seleccionados

Genes	Eficiencia	R ²	Pendiente
Casp9	1,90±0,23	0,9951	-3,5919
Fth	1,85±0,69	0,9700	-3,4152
Il-1β	1,89±0,73	0,9500	-3,6200
Il6	1,81±1,11	0,9200	-3,8800
TCR-β	2,00±0,23	0,9900	-3,3124
TGF- β	2,10±0,78	0,8977	-2,9067
Trf	1.83±0,95	0,9400	-3,7362

4.4.2. Calibradores

En la Figura 17 se pueden ver los valores obtenidos para los calibradores empleados en las diferentes placas. Los genes que solo presentan un calibrador se deben a que su análisis se realizó en una sola placa de qPCR, mientras que los que presentan dos datos es porque se realizaron en dos placas. Estos datos son realmente útiles para regular los datos de expresión gracias al método de $2^{-\Delta\Delta C}$, explicado en el punto anterior, reduciendo así la variabilidad entre placas. En general en la gráfica se observa unos datos muy similares, lo que indica unas condiciones semejantes entre placas.

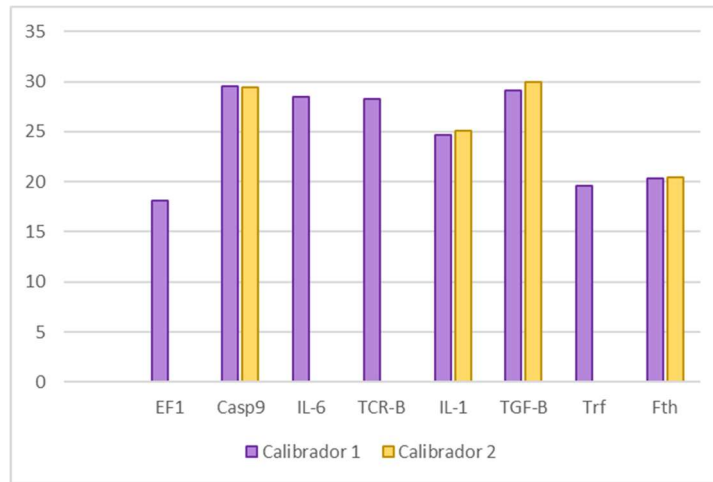


Figura 17. Valores de expresión relativa (Ct) en los calibradores empleados

4.5. Análisis final de expresión relativa

De todos los genes diferenciales estudiados, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas para el gen TGF- β (Tabla 10), con un nivel de expresión superior en el tratamiento FM30 control respecto a los tratamientos FM30 ECO y FM25 ECO, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, se observa cierta tendencia en la expresión de los genes Casp9, donde el tratamiento FM25 ECO muestra una respuesta superior que FM30 control y FM30 ECO, y TCR- β , donde el tratamiento FM30 ECO muestra una respuesta inferior que FM30 control y el tratamiento FM25 ECO se muestra en un punto intermedio.

En cuanto al gen Il6, su expresión fue tan reducida que sobrepasaba el límite inferior de detección del qPCR LightCycler® 96, se infirió este hecho ya que para las muestras de las que se pudo extraer parámetros se obtuvieron Ct realmente altos, alrededor de 37-38. Se observa, por tanto, una expresión muy baja para ambas interleucinas (excepto para IL1 β en el grupo FM25 ECO).

Tabla 10. Niveles de expresión relativa de los diferentes genes por tratamiento

Genes	FM30 control	FM30 ECO	FM25 ECO	p-value
Casp9	0,3493±0,1970	0,3676±0,2021	1,0085±0,3348	n.s
Fth	0,6817±0,2137	0,9148±0,2137	0,4072±0,2137	n.s
IL1 β	0,0376±0,3921	0,0162±0,3395	0,6337±0,2772	n.s
Il6	-	-	-	-
TCR- β	1,0208±0,1733	0,4965±0,1733	0,8202±0,1733	n.s
TGF- β	1,3853±0,1897 ^a	0,6118±0,1897 ^b	0,7025±0,1897 ^b	0,0156
Trf	1,1027±0,5788	1,9078±0,5457	0,9284±0,5457	n.s

Los datos son las medias \pm error estándar (n=3). Datos con diferentes superíndices indican diferencia significativas (p<0,05). Test de Tukey-Kramer.

5. Discusión

Uno de los aspectos más relevantes de este estudio es su larga duración, permitiendo observar cómo respondieron los ejemplares frente a condiciones patológicas y de estrés (Carnevali et al., 2006; Faliex et al., 2008; Lu et al., 2013; Torrecillas et al., 2017). Tal y como se ha mostrado en resultados, los grupos estudiados presentaban indicadores de unas condiciones de salud deficientes, que se van a detallar con mayor profundidad a continuación, entre los que se encuentran un cierto desequilibrio dietario de AAE, el cuadro de anemia, la inmunosupresión y la parasitación por *Diplectanum sp.*

Fase de engorde

Los resultados mostraron que al final de la fase de engorde, y antes de la fase de parasitación, el grupo control registró un mayor crecimiento. Sin embargo, y debido a que no hubo un factor estresante ambiental, la supervivencia en todos los grupos estaba de los valores normales para esta especie. Estas diferencias de crecimiento podrían haber sido causadas por el perfil de aminoácidos de las dietas ECO. Con respecto al nivel de AAE en los piensos, el pienso control presentó un nivel mayor de metionina (1,25 g 100g⁻¹) que los piensos ecológicos (0,77 y 0,70 g 100g⁻¹ en FM30 y FM25, respectivamente) debido a la suplementación con metionina sintética en el pienso control para cubrir las necesidades de la especie. La lisina, sin embargo, tenía un contenido inferior en el pienso control (2 g 100g⁻¹) frente a las ecológicas (2,41 y 2,54 g 100g⁻¹ en FM30 y FM25, respectivamente), aunque cubría las necesidades aminoacídicas para el óptimo crecimiento de esta especie (Peres & Oliva-Teles, 2006). En los AAE restantes, los valores para los diferentes piensos son similares. La proporción de AEE/AANE es más baja en el pienso control. Esto se debe a la mayor cantidad de AANE en el pienso control, principalmente a causa del alto valor de ácido glutámico (7,86 g 100g⁻¹) frente a los piensos ecológicos (6,13 y 6,22 g 100g⁻¹ en FM30 y FM25, respectivamente).

Por tanto, la principal diferencia entre los piensos ecológicos y el pienso control, se trata de la deficiencia de AAE, concretamente metionina, que es uno de los AA más limitantes en la síntesis proteica para los peces (Martínez-Llorens et al., 2007) y por lo tanto, una deficiencia en este AAE, puede provocar una disminución del crecimiento, como se ha observado en el presente trabajo, y una reducción de la eficiencia alimentaria, como se ha observado en varios trabajos previos (Martínez-Llorens et al., 2012; Nogales Mérida et al., 2010).

Fase de parasitación

Al finalizar la fase de engorde, tuvieron lugar una serie de cambios en las condiciones experimentales que provocaron una fase de estrés que acabaron afectando al crecimiento y supervivencia de los peces. Paralelamente a la fase de estrés, los peces empezaron a mostrar síntomas de parasitación, registrando una mayor incidencia en los tratamientos ecológicos respecto a los control. Ya que esta dualidad se presentó en la segunda fase, se estima las alteraciones observadas tanto en términos de crecimiento como de supervivencia puedan ser debidos a un estado de inmunosupresión.

Como se comentó en la introducción, la alimentación es factor clave en el mantenimiento del estado inmunitario de los peces. Los piensos estudiados no presentaron el mismo perfil aminoacídico, destacando las diferencias en metionina. Aminoácido que ejerce un papel crucial en el sistema inmune innato en la lubina (Li et al., 2007). Se ha observado que la metionina es capaz de aumentar la capacidad antioxidante gracias al aporte de cisteína para la producción de glutatión (Azeredo et al., 2017). Además, su importancia en la respuesta innata humoral se ha puesto en relevancia gracias a estudios de suplementación aminoacídica en las dietas de peces (Azeredo et al., 2017; Machado et al., 2015).

Por tanto, no sería aventurado afirmar que la metionina tiene un papel central en la respuesta de la activación de la respuesta inmune (Azeredo et al., 2017), y su carencia podría afectar sistema de defensa de la lubina ante procesos infecciosos o de parasitación. Cabe destacar que los datos de nivel de parasitación son limitados, y por tanto con el fin de confirmar esta relación, deberían realizarse estudios estadísticos con un mayor número de peces con diferentes niveles de suplementación.

La anemia es una afección que produce un descenso de la concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos resultando en una escasez de oxígeno en los tejidos, produciendo en el pez un desajuste de nivel de desarrollo y crecimiento. El individuo para combatir esta patología suele llevar a cabo una acción compensatoria aumentando el número de eritroblastos en sangre periférica o una división amitótica de los eritrocitos circundantes, pero para realizar esta acción compensatoria es necesario que las condiciones nutricionales y ambientales del animal sean óptimas (Witeska, 2015). Diferentes autores han descrito procesos de anemia para *Dicentrarchus labrax* causados por concentraciones tóxicas de nitritos en el agua, observándose un descenso del nivel de hemoglobina (Scarano et al., 1984). También se han observado descensos del nivel de hemoglobina por infecciones, además de un descenso del nivel de hematocrito y del conteo de eritrocitos (Horton & Okamura, 2003). Además, en el presente estudio se observó un destacado descenso a nivel de hematocrito respecto al nivel de individuo sano de la especie, por lo que se presenta relación con los datos obtenidos por Horton & Okamura en 2003. Este tipo de anemias suelen estar producidas por una pérdida de volumen de sangre, debido a la alimentación del parásito, ya que este puede alimentarse de esta sangre directamente o inducir sangrados internos (Witeska, 2015). Sin embargo, también se ha demostrado que deficiencias nutricionales pueden llegar a producir anemia, aunque los niveles de deficiencia requeridos para producir esta patología varían entre especies (Witeska, 2015). Al analizar los parámetros sanguíneos por tratamientos se observa que el cuadro de anemia está presente únicamente en los peces alimentados con piensos ecológicos, mientras que los alimentados con el pienso control se encuentran dentro de los valores normales de individuo sano para la especie. Este efecto dieta podría estar debido a una deficiencia nutricional en los piensos ecológicos, no obstante, no se observó ningún indicativo de carencia nutricional en el crecimiento de los peces alimentados con estos piensos durante la fase de engorde, por lo que, esta hipótesis resulta poco probable. Finalmente, las diferencias a nivel de hematocrito vienen a confirmar la hipótesis de la importancia capital de la metionina en la respuesta inmune, aumentando el efecto de la parasitación cuando hay deficiencias de este aminoácido en la alimentación.

La inmunosupresión es un estado común entre peces sometidos a un nivel de elevado estrés (Carbone & Faggio, 2016; Vazzana et al., 2002). El estrés actúa principalmente sobre el sistema neuroendocrino induciendo la liberación de corticosteroides y catecolaminas. En teleósteos destaca el cortisol como principal corticosteroide, es por ello por lo que, los niveles de cortisol y glucosa en plasma son los principales indicadores de estrés entre estas especies. Con niveles altos de cortisol-glucosa se producen cambios en el metabolismo y procesos celulares, incluyendo una reducción de la capacidad del sistema inmunitario (Castro et al., 2011; Machado et al., 2015; Vazzana et al., 2002). De los resultados de recuento leucocitario obtenidos en el presente experimento se establece un cuadro de inmunosupresión, que indica por tanto un alto nivel de estrés en la totalidad de los peces del estudio. Por tanto, un cuadro de inmunosupresión puede favorecer la presencia de episodios infecciosos o parasíticos, como el observado en el actual trabajo. Esta condición estresante puede venir dada en parte por la dieta, debido a los altos niveles de proteína vegetal utilizada, y por ende a los factores antinutritivos presentes en todos los tratamientos. Este condición estresante fue general en todos los peces, también ha sido observada en estudios anteriores de sustitución para otras especies tales como en Dorada (*Sparus aurata*) (Estruch et al., 2015; Estruch et al., 2018).

Los análisis de expresión génica obtenidos aportan aspectos clave en el estudio de la respuesta inmune frente a la parasitación, pese a la falta de significación estadística en ciertos genes. Esta falta de significación se debe posiblemente a unos niveles de error elevado producidos, principalmente por la alta variabilidad en la respuesta de los peces.

La citoquina TGF- β juega un papel central en la inmunidad innata de los peces, la cual supone el principal sistema de defensa frente a enfermedades parasíticas. Se ha demostrado que su expresión influye en la activación del proceso de inflamación. Cabe destacar que TGF- β se trata de una citoquina antiinflamatoria, por tanto esta citoquina impide el desarrollo de una reacción inflamatoria desmesurada restringiendo esta inflamación a los puntos afectados por la parasitación (Faliex et al., 2008; Lu et al., 2013). Concretamente se han establecido estudios que afirman TGF- β puede inhibir la sobreproducción de IL-1 β , una de las principales citoquinas inflamatorias, o afectar al funcionamiento de los macrófagos (activados mediante TNF α) inhibiendo su respuesta de óxido nítrico (Zou & Secombes, 2016). Pese a tener principalmente una función antiinflamatoria, TGF- β es capaz de actuar de forma variable dependiendo de su nivel de concentración. Se comporta como una citoquina proinflamatoria a bajas concentraciones (favoreciendo una rápida actuación de la respuesta innata) y como una citoquina antiinflamatoria a altas concentraciones, manteniendo un equilibrio inmunológico necesario para controlar la respuesta inmune frente a una parasitación/inflamación (Faliex et al., 2008). Esta variabilidad es la que permite que no se elimine totalmente IL-1 β de los tejidos manteniéndolo a un nivel basal (Zou & Secombes, 2016). Además, TGF- β , promueve la fibrosis y estimula la producción de la matriz extracelular por los fibroblastos, por tanto, esta citoquina ejerce además un importante papel de regeneración celular y curación de heridas. En este estudio TGF- β presenta expresión diferencial entre el tratamiento control y los tratamientos ecológicos, presentando una mayor expresión en el grupo control. Considerando los resultados de TGF- β se pueden establecer diferentes hipótesis basadas en estudios anteriores, no obstante, observando el nivel realmente bajo de enzimas proinflamatorias (IL-1 β y IL-6) que se ha obtenido en el presente trabajo, se puede afirmar que el nivel de TGF- β presente entre los individuos alimentados con el pienso FM30 Control, ejerce un papel de regeneración celular y tratamiento de heridas producidas por el *Diplectanum sp.*; en cambio, el bajo nivel en los individuos alimentados con los piensos ecológicos puede deberse a un agotamiento del sistema inmune para este gen (siguiendo el cuadro de inmunosupresión), debido a que han sido afectados en mayor medida por el parásito. Se pone de manifiesto nuevamente la diferencia de la respuesta entre los ejemplares del tratamiento control y los tratamientos ecológicos.

Pese a no mostrar diferencias significativas entre grupos, numéricamente se puede observar un efecto del factor dieta para los genes TCR- β (p-value= 0,1188) y Casp-9 (p-value=0,1548). El TCR- β se trata de un receptor de linfocitos T, por tanto, se analiza como un indicador para observar la posible implicación del sistema inmune adaptativo en la respuesta frente a la patología. Faliex et al. (2008) demuestra que no existe una diferencia para la expresión de TCR- β entre lubinas parasitadas con *Diplectanum aequans* y lubinas no parasitadas, ni en las branquias ni en el bazo, y por tanto sostiene que el sistema inmune adaptativo no está tan relacionado con la respuesta a la parasitación como la inmunidad innata. No obstante, esto no coincide con nuestros resultados numéricos donde se observa una diferencia entre los ejemplares del tratamiento FM30 Control que presentan un valor superior descriptivamente a los ejemplares de FM30 ECO, indicando una mayor actuación del sistema inmune adaptativo en FM30 Control, resultado que coincide con el recuento de parásitos. Sin embargo, no se puede establecer una afirmación concluyente con estos datos, y por tanto se necesita una mayor investigación en este aspecto.

Por otro lado, en las respuestas inflamatorias se establece una relación entre *Toll-like receptors* (TLRs), que se trata de unos receptores de reconocimiento de patógenos, y los receptores intracelulares de patógenos *NOD-like receptors* (NLRs), induciendo la expresión de IL-1 β y propiciando la formación del complejo inflamasoma en el cual se activan las caspasas (Alvarez-Pellitero, 2008). En este experimento se puede observar una relación entre los niveles de expresión de IL-1 β (p-value=0,3156, pese a este elevado p-value las diferencias entre los resultados numéricos son destacables) y Casp-9 del tratamiento FM25 ECO ya que, en ambos genes, los ejemplares de este tratamiento presentan unos niveles de expresión más elevado que los ejemplares para el resto de los tratamientos. Faliex et al. (2008) observó que la parasitación (*Diplectanum aequans*) dio como respuesta un aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias, sin embargo, esto no corresponde con los datos obtenidos en el actual estudio. Se podría hipotetizar que los niveles de expresión de este gen fueron tan bajos debido a que las muestras se tomaron en un período en el cual la respuesta inmune se encontraba en una fase crónica (inmunodeprimida), frente a la incapacidad de eliminar el parásito.

En resumen, la diferencia entre el pienso FM30 Control y los piensos ecológicos radicaba en una carencia de metionina. Esta carencia provocó una diferencia de crecimiento significativa durante la fase de engorde. La metionina ejerce un importante papel en la respuesta inmune innata, por tanto, su deficiencia en los piensos ecológicos provocó un mayor nivel de parasitación (*Diplectanum sp.*) en los peces alimentados con ellos. La anemia se ha establecido como un efecto directo de la parasitación, por tanto, los grupos más afectados por la parasitación (FM30 ECO y FM25 ECO) presentaban un mayor cuadro de anemia. Por otra parte, se observó, que el estado de inmunosupresión se dio de forma generalizada, debido a una alimentación continuada con dietas con altos niveles de sustitución vegetal. Finalmente, para este estudio el TGF- β , que mantuvo una función de reparación y regeneración celular, muestra un nivel de expresión bajo en los peces alimentados con piensos ecológicos frente a los peces alimentados con el pienso FM30 Control. Esta diferencia se justifica por un estado de agotamiento de la respuesta inmune en los peces alimentados con piensos ecológicos. También se obtuvieron datos numéricos que representan indicios de diferencias para los genes TCR- β , Casp9 e IL-1 β , sin embargo, se necesitan más estudios al respecto para confirmarlas.

6. Conclusión

Los resultados del estudio sobre la respuesta de lubinas alimentadas con piensos con bajos niveles de harina de pescado y ecológicos, frente a la infección de un parásito (*Diplectanum sp.*), nos permiten concluir que:

- En la fase de engorde los peces alimentados con el pienso control, presentaron mayores crecimientos, debido principalmente, a que en los otros grupos los piensos presentaban un desequilibrio en el perfil de aminoácidos. Sin embargo, la supervivencia entre los diferentes grupos del estudio fue similar y dentro de los valores normales para la especie.
- Durante la fase de parasitación se observó una ralentización en el crecimiento de los peces, especialmente en el grupo alimentado con el pienso FM ECO25. Se estima, por tanto, que esta diferencia viene determinada por un aspecto de respuesta inmune frente al parásito.
- Se detectaron anemia e inmunosupresión durante la fase de parasitación, generadas debido una alta condición de estrés en los ejemplares. Se ha detectado una influencia significativa de la dieta en el nivel de la anemia, y además se destacó el nivel de parasitación como origen para esta patología.
- Por otra parte, la inmunosupresión se presenta generalizada en todos los tratamientos, y se atribuye principalmente a la exposición continuada de las lubinas a una dieta de sustitución vegetal.
- Únicamente se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para el gen TGF- β , siendo mayor su expresión para el tratamiento FM30 Control, frente a los tratamientos ecológicos. Se atribuye esta expresión a una función de reparación de tejidos frente a la parasitación.
- Se observaron tendencias para los genes Casp-9 y TCR- β , pero se requiere una mayor investigación al respecto. Cabe destacar un bajo nivel de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y IL-6), que podría ser debido al proceso de inmunosupresión.

7. Referencias

- ALVAREZ-PELLITERO, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3–4), 171–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- APROMAR (2017). Informe Acuicultura en España. Recuperado de: <http://www.apromar.es/content/apromar-publica-su-informe-anual-%E2%80%99Clacuicultura-en-espa%C3%B1a-2017%E2%80%9D>
- AUSTIN, B., & AUSTIN, D. A. (2007). 10 Control, Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* (Vol. 19). DOI: 10.1007/978-1-4020-6069-4
- AZEREDO, R., SERRA, C. R., OLIVA-TELES, A., & COSTAS, B. (2017). Amino acids as modulators of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, innate immune response: an in vitro approach. *Nature Scientific Reports*, 7(18009). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18345-3>
- BONDAD-REANTASO, M. G., SUBASINGHE, R. P., ARTHUR, J. R., OGAWA, K., CHINABUT, S., ADLARD, R., ZILONG, T., & SHARIFF, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132, 249–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>
- BORJA, Á. (2002). Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad, Instituto español de oceanografía, 18, 41–49. Recuperado de: www.revistas.ieo.es/index.php/boletin_ieo/article/download/163/156
- BUCHMANN, K., & BRESCIANI, J. (2006). 9 *Monogenea (Phylum Platyhelminthes)*. *Fish Diseases and Disorders. Volume 1 Protozoan and Metazoan Infections*. (P. T. K. Woo, Ed.). CABI Publishing, ISBN: 9780851990156
- CAO, L., NAYLOR, R., HENRIKSSON, P., LEADBITTER, D., METIAN, M., TROELL, M., & ZHANG, W. (2015). China's aquaculture and the world's wild fisheries- supplementary information. *American Association for the Advancement of Science*, 347(6218), 133–135. <https://doi.org/10.1126/science.1260149>
- CARBONE, D., & FAGGIO, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.011>
- CARNEVALI, O., DE VIVO, L., SULPIZIO, R., GIOACCHINI, G., OLIVOTTO, I., SILVI, S., & CRESCI, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1–4), 430–438. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.04.025>
- CASTRO, R., ZOU, J., SECOMBES, C. J., & MARTIN, S. A. M. (2011). Cortisol modulates the induction of inflammatory gene expression in a rainbow trout macrophage cell line. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.010>
- COLE, D. W., COLE, R., GAYDOS, S. J., GRAY, J., HYLAND, G., JACQUES, M. L., POWELL-DUNFORD, N., SAWHNEY, C., & AU, W. W. (2009). Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.08.003>

- COMISIÓN EUROPEA (2012) Pesca y acuicultura en Europa, 57. Recuperado de: https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/seabass_es.pdf
- COSTA-PIERCE, B. (2003). Use of Ecosystems Science in Ecological Aquaculture. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada*, 103(2), 32–40.
- COSTA-PIERCE, B. A. (2010). Sustainable Ecological Aquaculture Systems: The Need for a New Social Contract for Aquaculture Development Aquaculture Is Not a Global Panacea for Seafood. *Marine Technology Society Journal*, 44(3), 88–112. <https://doi.org/10.4031/MTSJ.44.3.3>
- CRANE, M., & HYATT, A. (2011). Viruses of fish: An overview of significant pathogens. *Viruses*, 3(11), 2025–2046. <https://doi.org/10.3390/v3112025>
- DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., & BOSSIER, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001>
- DEZFULI, B. S., GIARI, L., SIMONI, E., MENEGATTI, R., SHINN, A. P., & MANERA, M. (2007). Gill histopathology of cultured European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), infected with *Diplectanum aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitology Research*, 100(4), 707–713. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0343-4>
- DI MARCO, P., PETOCHI, T., MARINO, G., PRIORI, A., FINOIA, M. G., TOMASSETTI, P., PORRELLO, S., GIORGI, G., LUPI, P., BONELLI, A., & POLI, B. M. (2017). Insights into organic farming of European sea bass *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream *Sparus aurata* through the assessment of environmental impact, growth performance, fish welfare and product quality. *Aquaculture*, 471, 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.012>
- DIAS, J., ALVAREZ, M. J., ARZEL, J., CORRAZE, G., DIEZ, A., BAUTISTA, J. M., & KAUSHIK, S. J. (2005). Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 142(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.005>
- ELLIS, T., NORTH, B., SCOTT, A. P., BROMAGE, N. R., PORTER, M., & GADD, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 493–531. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.2057>
- ESTRUCH, G., COLLADO, M. C., PEÑARANDA, D. S., TOMÁS VIDAL, A., JOVER CERDÁ, M., PÉREZ-MARTÍNEZ, G., & MARTÍNEZ-LLORENS, S., (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136389>
- ESTRUCH, GUILLEM, BÄUERL, C., TOMÁS-VIDAL, A., JOVER CERDÁ, M., S. PEÑARANDA, D., PÉREZ-MARTÍNEZ, G., & MARTÍNEZ-LLORENS, S. (2019). Respuesta proinflamatoria de la mucosa de la dorada (*Sparus aurata* L.) alimentada con proteínas vegetales frente los patógenos bacterianos: Ensayo ex-vivo. In *Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena, Murcia.
- ESTRUCH, GUILLEM, COLLADO, M. C., MONGE-ORTIZ, R., TOMÁS-VIDAL, A., JOVER-CERDÁ, M., PEÑARANDA, D. S., MARTÍNEZ-PÉREZ, G., & MARTÍNEZ-LLORENS, S. (2018). Long-term feeding with high plant protein based diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) leads to changes in the inflammatory and immune related gene expression at intestinal level. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1626-6>

- ESTRUCH, GUILLEM, TOMÁS-VIDAL, A., EL NOKRASHY, A. M., MONGE-ORTIZ, R., GODOY-OLMOS, S., JOVER CERDÁ, M., & MARTÍNEZ-LLORENS, S. (2018). Inclusion of alternative marine by-products in aquafeeds with different levels of plant-based sources for on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.): effects on digestibility, amino acid retention, ammonia excretion and enzyme activity. *Archives of Animal Nutrition*, 72(4), 321–339. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2018.1472408>
- FALIEX, E., DA SILVA, C., SIMON, G., & SASAL, P. (2008). Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(6), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.011>
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Recuperado de: www.fao.org/publications
- FIGUEIREDO-SILVA, A., ROCHA, E., DIAS, J., SILVA, P., REMA, P., GOMES, E., & VALENTE, L. M. P. (2005). Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 147–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00337.x>
- FRY, J. P., LOVE, D. C., MACDONALD, G. K., WEST, P. C., ENGSTROM, P. M., NACHMAN, K. E., & LAWRENCE, R. S. (2016). Environmental health impacts of feeding crops to farmed fish. *Environment International*, 91, 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.022>
- GRIGORAKIS, K., & RIGOS, G. (2011). Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere*, 85(6), 899–919. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.015>
- HAENEN, O. (2017). Major Bacterial Diseases Affecting Aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture*. Recuperado de: http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen.pdf
- HASSAN, M. R., & TACON, A. G. J. (2007). Global synthesis and regional reviews. *FAO Fisheries Technical Paper*, 497, 3–17. Recuperado de: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016025433>
- HORTON, T., & OKAMURA, B. (2003). Post-haemorrhagic anaemia in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), caused by blood feeding of *Ceratothoa oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). *Journal of Fish Diseases*, 26(7), 401–406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00476.x>
- LAFFERTY, K. D., HARVELL, C. D., CONRAD, J. M., FRIEDMAN, C. S., KENT, M. L., KURIS, A. M., POWELL, E., RONDEAU, D., & SAKSIDA, S. M. (2015). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science*, 7, 471–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- LI, P., YIN, Y.-L., LI, D., WOO KIM, S., & WU, G. (2007). Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 237–252. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>
- LU, C., LING, F., JI, J., KANG, Y. J., & WANG, G. X. (2013). Expression of immune-related genes in goldfish gills induced by *Dactylogyrus intermedius* infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.004>
- MACHADO, M., AZEREDO, R., DÍAZ-ROSALES, P., AFONSO, A., PERES, H., OLIVA-TELES, A., & COSTAS, B. (2015). Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish and Shellfish Immunology*, 42(2), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.024>

- MARTIN, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154(1), 11–34. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X)
- MARTÍNEZ-LLORENS, S., BAEZA-ARIÑO, R., NOGALES-MÉRIDA, S., JOVER-CERDÁ, M., & TOMÁS-VIDAL, A. (2012a). 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, 124–133. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.01.029>
- MARTÍNEZ-LLORENS, S., BAEZA-ARIÑO, R., NOGALES-MÉRIDA, S., JOVER-CERDÁ, M., & TOMÁS-VIDAL, A. (2012b). 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, 124–133. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.01.029>
- MARTÍNEZ-LLORENS, S., MOÑINO, A. V., TOMÁS VIDAL, A., SALVADOR, V. J. M., PLA TORRES, M., & JOVER CERDÁ, M. (2007). Soybean meal as a protein source in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) diets: effects on growth and nutrient utilization. *Aquaculture Research*, 38(1), 82–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01637.x>
- MEYER, F. P. (1991). Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science*, 69, 4201–4208. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2271-2_23
- MITTER, K., KOTOULAS, G., MAGOULAS, A., MULERO, V., SEPULCRE, P., FIGUERAS, A., NOVOA, B., SARROPOULOU, E. (2009). Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2009.04.009>
- MONGE-ORTIZ, R., MARTÍNEZ-LLORENS, S., MÁRQUEZ, L., MOYANO, F. J., JOVER-CERDÁ, M., & TOMÁS-VIDAL, A. (2016). Potential use of high levels of vegetal proteins in diets for market-sized gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Archives of Animal Nutrition*, 70(2), 155–172. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2016.1141743>
- NEVES, J. V., WILSON, J. M., & RODRIGUES, P. N. S. (2009). Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(7), 848–857. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.001>
- NOGALES MÉRIDA, S., TOMÁS-VIDAL, A., MARTÍNEZ-LLORENS, S., & JOVER CERDÁ, M. (2010). Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture*, 298(3–4), 275–281. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.10.025>
- OHTSUKA, S., SUZAKI, T., HORIGUCHI, T., SUZUKI, N., & NOT, F. (2015). Fish and Shellfish Diseases Caused by Marine Protists. *Marine Protists: Diversity and Dynamics*, v–vi. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55130-0>
- PERES, H., & OLIVA-TELES, A. (2006). Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 256(1–4), 395–402. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.02.010>
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C., & NEUVIANS, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- PINEDO-GIL, J., MARTÍN-DIANA, A. B., BERTOTTO, D., SANZ-CALVO, M. Á., JOVER-CERDÁ, M., & TOMÁS-VIDAL, A. (2019). Effects of dietary barley on rainbow trout exposed to an acute stress challenge. *Aquaculture*, 501, 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.10.070>

- SCARANO, G., SAROGLIA, M. G., GRAY, R. H., & TIBALDI, E. (1984). Hematological Responses of Sea Bass *Dicentrarchus labrax* to Sublethal Nitrite Exposures. *Transaction of American Fisheries Society*, 113. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113)
- SCHMIDT, J. G., THOMPSON, K. D., & PADRÓS, R. (2018). Emerging skin diseases in aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 38(3), 122–129.
- SCHMITTGEN, T. D., & LIVAK, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- SITJÀ-BOBADILLA, A., PEÑA-LLOPIS, S., GÓMEZ-REQUENI, P., MÉDALE, F., KAUSHIK, S., & PÉREZ-SÁNCHEZ, J. (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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031>
- SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E., & FROST, P. (2014). Vaccines for fish in aquaculture review. *Taylor and Francis*, 89–101. DOI: 10.1586/14760584.4.1.89
- TIBALDI, E., & KAUSHIK, S. (2005). Amino acid requirements of Mediterranean fish species. *Cahiers Options méditerranéennes*, 63, 59-65.
- TORRECILLAS, S., MOMPSEL, D., CABALLERO, M. J., MONTERO, D., MERRIFIELD, D., RODILES, A., ROBAINA, L., ZAMORANO, M. J., KARALAZOS, V., KAUSHIK, S., & IZQUIERDO, M. (2017). Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 468, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.005>
- TORRECILLAS, S., MONTERO, D., CABALLERO, M. J., ROBAINA, L., ZAMORANO, M. J., SWEETMAN, J., & IZQUIERDO, M. (2015). Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 508–516. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.11.033>
- TURCHINI, G. M., FRANCIS, D. S., SENADHEERA, S. P. S. D., THANUTHONG, T., & DE SILVA, S. S. (2011). Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: Evidence of an “omega-3 sparing effect” by other dietary fatty acids. *Aquaculture*, 315(3–4), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.016>
- VAZZANA, M., CAMMARATA, M., COOPER, E. L., & PARRINELLO, N. (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210(1–4), 231–243. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00818-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00818-3)
- WITESKA, M. (2015). Anemia in Teleost fishes. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 35(4).
- ZOU, J., & SECOMBES, C. (2016). The Function of Fish Cytokines. *Biology*, 5(2), 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>