

Estrategias nutricionales para la mejora en el rendimiento productivo: uso de piensos funcionales y dietas salud en acuicultura (DIETApplus)

CONVOCATORIA 2016

**INFORME FINAL
CIENTÍFICO-TÉCNICO**



FECHA: 24/07/2019

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. DATOS ADMINISTRATIVOS.....	3
1.1. TÍTULO DEL PROYECTO.....	3
1.2. ENTIDADES PARTICIPANTES	3
1.3. COORDINADOR TÉCNICO DEL PROYECTO	3
1.4. PERIODO DE EJECUCIÓN	3
1.5. AYUDA CONCEDIDA.....	3
2. DATOS ECONÓMICOS	4
3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO	4
3.1. MODIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES	4
3.2. CAMBIOS EN EL EQUIPO DE TRABAJO.....	5
3.3. CAMBIOS EN EL PRESUPUESTO	7
3.4. CAMBIOS EN EL CRONOGRAMA DE TRABAJO.....	8
4. SEGUIMIENTO TÉCNICO	9
4.1. OBJETIVOS.....	9
4.2. ACTIVIDADES	10
4.3. RESULTADOS	15
ACTIVIDAD 1. DETERMINACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE ALIMENTACIÓN CON ADITIVOS QUE MEJOREN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS EN PECES CULTIVADOS.....	15
Tarea A.1.1. Detección del aditivo más eficaz que mejore la resistencia al estrés.....	15
Tarea A.1.2. Optimización de la concentración de aditivo y tiempo de administración	47
Tarea A.1.3. Ensayos bajo condiciones crónicas de estrés	53
Tarea A.1.4. Prueba de validación de dietas con aditivos que mejoren la resistencia al estrés en peces	64

ACTIVIDAD 2. USO DE DIETAS PARA LA MEJORA DE LA INTEGRIDAD Y SALUD DE MUCOSAS (INTESTINO, PIEL Y BRANQUIA).....	73
Tarea A.2.1. Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de distintos niveles de inclusión en la dieta de un extracto de aceite de oliva enriquecido en compuestos bioactivos combinado con hidrolizado de proteína en dorada.....	73
Tarea A.2.2. Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de la inclusión de levadura y dietas inmunoestimulantes en dorada.....	137
Tarea A2.3: Ensayos con aceites esenciales como herramientas para el tratamiento de ectoparásitos.....	197
Tarea A2.3.1: Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de distintos niveles de inclusión de aceites esenciales en la dieta y la respuesta frente a una exposición de ectoparásitos en dorada	197
Tarea A2.3.2: Tratamiento frente a ectoparásitos mediante distintos aceites esenciales en corvina.....	224
Tarea A2.4: Ensayo nutricional de tipo dosis respuesta de dietas promotoras de la salud e integridad de las mucosas en corvina	237
Tarea A2.4.1 Ensayo de dietas salud promotoras de la salud e integridad de las mucosas en la corvina	237
Tarea A2.4.2: Estudio nutricional combinado de tipo dosis-respuesta de aditivos promotores de la salud y condición intestinal con funciones antiparasitarias y antimicrobianas asociadas en corvina	248
Tarea A2.5: Prueba de validación sobre el uso de un aditivo con propiedades sedantes para el transporte de peces.....	255
 ACTIVIDAD 3. COORDINACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL PROYECTO	 272
 ACTIVIDAD 4. DIFUSION DE LOS RESULTADOS.....	 274
4.4. ADECUACIÓN AL CRONOGRAMA DE TRABAJO	284
4.5. SEGUIMIENTO DE INDICADORES DE EJECUCIÓN Y EVALUACIÓN DEL PROYECTO	284
4.6. TRANSFERENCIA DE RESULTADOS AL SECTOR	285
4.7. ACTUACIONES DE DIFUSIÓN Y PUBLICIDAD DE LAS AYUDAS	286
4.8. VALORACIÓN DEL COORDINADOR SOBRE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO	287
4.9. CONCLUSIONES	289

1. DATOS ADMINISTRATIVOS

1.1. TÍTULO DEL PROYECTO

Estrategias nutricionales para la mejora en el rendimiento productivo: uso de piensos funcionales y dietas salud en acuicultura

Acrónimo: DIETApplus

1.2. ENTIDADES PARTICIPANTES

- **Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)**, Centro de Sant Carles de la Ràpita – CA de Cataluña.
- **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**, Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia – CA de Cataluña.
- **Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)**, Centro de Aguas del Pino – CA de Andalucía.
- **Universidad de Murcia (UMU)**, Facultad de Biología, Departamento de Biología Celular e Histología – CA de la Región de Murcia, en asociación con la **Universidad de Málaga**, Departamento de Microbiología (UMA) – CA de Andalucía.
- **Universidad de Cádiz (UCA)**, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales – CA de Andalucía. Entidad subcontratada por el IFAPA.
- **Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN)**, CSIC – CA de Andalucía. Entidad subcontratada por el IRTA.
- **Universitat de Barcelona (UB)**, Facultad de Biología, Departamento de Fisiología e Inmunología – CA de Cataluña. Entidad subcontratada por la UAB.

1.3. COORDINADOR TÉCNICO DEL PROYECTO

Dr. Enric Gisbert Casas, investigador titular del Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentaries (IRTA).

1.4. PERIODO DE EJECUCIÓN

Desde la fecha de la resolución definitiva del 5 diciembre de 2016 hasta 31 de octubre 2018.

1.5. AYUDA CONCEDIDA

Importe total: 626.220,70 €

2. DATOS ECONÓMICOS

En relación al presupuesto concedido, éste es el que se muestra en la siguiente tabla según la Modificación de la Resolución Definitiva de las Ayudas a la Investigación en los Planes Nacionales de Acuicultura (Orden APM/484/2018 de 8 de mayo de 2018 (BOE 11/05/2018), modificada por la Orden APM/612/2018 de 30 de mayo (BOE de 06/06/2018).

	2016	2017	2018	TOTAL AYUDA
Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias	99.715,06 €	49.857,52 €	49.857,52 €	199.430,10 €
Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera	64.096,93 €	32.048,45 €	32.048,45 €	128.193,83 €
Universidad de Murcia	67.136,80 €	33.568,40 €	33.568,40 €	134.273,60 €
Universidad Autónoma de Barcelona	82.161,59 €	41.080,79 €	41.080,79 €	164.323,17 €
	313.110,38 €	156.555,16 €	156.555,16 €	626.220,70 €

Asimismo, destacar que el plan financiero resultante tras la modificación acordada en los plazos de ejecución del proyecto, no alteró las cuantías totales aprobadas por anualidad para cada una de las instituciones participantes ni el montante total resultante de la ayuda establecida, trasladando únicamente el montante correspondiente a la anualidad 208 a la anualidad 2019.

En cuanto a la cuantificación del total ejecutado por institución participante en el proyecto, esta información no se presenta en este informe técnico ya que los datos económicos del proyecto todavía están siendo procesados por las oficinas de proyectos de cada una de las instituciones participantes en DIETApplus en fecha de presentación del presente informe.

3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO¹

3.1. MODIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES

No se ha procedido a modificar los objetivos y las tareas de la propuesta inicial del proyecto (Anexo IV) pese a que la propuesta sufrió un recorte importante en el presupuesto otorgado frente al presentado en la solicitud inicial.

¹ Las modificaciones técnicas o económicas del proyecto deberán haber sido aprobadas por el órgano instructor (punto 4 del apartado decimocuarto de la orden de convocatoria).

3.2. CAMBIOS EN EL EQUIPO DE TRABAJO

Las instituciones que participan en el proyecto y su adscripción geográfica se encuentran ilustrados en la Imagen 1. El equipo de trabajo para cada una de las entidades que forman el proyecto son:

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA)

- Investigador principal: Dr. Enric Gisbert; investigador plantilla.
- Investigadores plantilla del equipo de trabajo: Dr. Karl B. Andree; Dra. Alicia Estévez García; Dra. Dolors Furones Nozal; Dra. Ana Roque; investigadores plantilla.
- Investigadores en formación: Joana Pereira Firmino (becaria doctorado industrial financiado por la AGAUR – Generalitat de Catalunya y TECNOVIT S.A.; núm. expediente: 2017 DI 017); Hector Ricardo Salmón (becario gobierno de Paraguay).
- Personal gestión económica: Judith García, Silvia Fernández, IRTA-SSCC.

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

- Investigador principal: Dr. Lluís Tort; catedrático.
- Investigadores del equipo de trabajo: Dr Felipe E. Reyes López; contratado post-doctoral - técnico superior de investigación; Eva Vallejos Vidal: contratada post-doctoral con cargo al proyecto desde septiembre 2017.

Universidad de Murcia (UMU) – Universidad de Málaga (UMA)

- Investigadora principal: Dra. María Ángeles Esteban Abad; catedrática (UMU).
- Investigadores del equipo de trabajo: Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez (UMA); catedrático; Dra. María del Carmen Balebona Accino (UMA); profesora titular; Alberto Cuesta Peñafiel; profesor titular (UMU); Dr. Cristóbal Espinosa Ruíz; técnico superior contratado a tiempo completo con cargo del proyecto desde 18 mayo hasta 30 de septiembre de 2017; Dr. José Ignacio Llorente López; Licenciado Investigador contratado a tiempo parcial (35 horas) desde el 22/09/2018 a 31/10/2018; Graduado José Carlos Campos Sánchez; Licenciado Investigador contratado a tiempo parcial (35 horas) desde el 22/09/2018 a 31/10/2018.

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)

- Investigador principal: Dr. Marcelino Herrera, investigador plantilla.
- Investigadores y personal técnico del equipo de trabajo: Lda. M. Luisa Cordero Villafáfila; Ldo. F. Javier Alaminos Ternero, Licenciado en Biología; M. Antonia Hervés, titulada superior - analista de laboratorio; Ramón López Fernández, titulado superior contratado con cargo al proyecto y Natalia Salamanca de Las Nieves, contratada pre-doctoral.



Imagen 1. Universidades y centros de investigación públicos que han participado en el proyecto DIETApplus y su adscripción por comunidad autónoma.

Además, de los grupos de trabajo inicialmente incluidos en la propuesta (Anexo IV) aprobada por el organismo financiador, se han producido tres subcontrataciones tal como estaba planteado en la memoria original del proyecto. Las subcontrataciones estuvieron destinadas a complementar las herramientas metodológicas, capacidades y conocimientos del consorcio con grupos externos a éste. Las subcontrataciones que se han dado dentro del proyecto DIETApplus han sido las siguientes:

La **Universidad de Cádiz (UCA)**, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales (CA de Andalucía) ha sido subcontratada por el IFAPA. Miembros del grupo de trabajo de dicha institución:

- Investigador principal: Dr. Juan Miguel Mancera; catedrático.
- Investigadores del Equipo: Dr. Antonio Astola González, profesor titular; Dr. Gonzalo Martínez-Rodríguez, investigador ICMAN-CSIC.
- Investigadores en formación: Ismael Jerez Cepa, becario doctoral de la UCA; André Barany, becario doctoral de la UCA; Miriam Fernández Castro, estudiante Máster UCA.

El grupo de Investigación en Histofisiología e Histopatología Marina del Dpto. Biología Marina perteneciente al **Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN)** (CSIC – CA de Andalucía) ha sido subcontratado por el IRTA. Los miembros del grupo de trabajo de dicha institución son:

- Investigador Principal: Dra. Mari Carmen Sarasquete Reiriz, profesora de investigación.
- Dr. Juan Bosco Ortiz-Delgado, científico titular.
- Dr José Luis Palazón, titulado superior, contratado laboral por obra y servicio

El grupo de la **Universitat de Barcelona (UB)** dirigido por el Dr. Antonio Ibarz (Grupo de Investigación de “Energética y metabolismo intermediario en peces” del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología) ha sido subcontratado por la UAB mediante concurso por licitación (4-2017). El grupo UB está compuesto por los siguientes miembros:

- Investigador Principal: Dr. Antonio Ibarz Valls; profesor colaborador permanente.
- Investigador Post-doctoral: Dra. Laura Fernández Alacid; profesora asociada.
- Investigadores en formación: Sergio Sánchez Nuño; profesor asociado; Borja Ordóñez Grande; profesor asociado; Ignasi Sanahuja Piera; profesor asociado.

3.3. CAMBIOS EN EL PRESUPUESTO

No se han producido modificaciones en el presupuesto global del proyecto. Sin embargo, se han realizado cambios entre las partidas (gastos de personal y funcionamiento), cambios que han sido aprobados por la entidad financiadora.

Así, en el caso del **IFAPA** se solicitaron y aprobaron dos disminuciones en la partida de personal (25.638,76 € y 12.444,57 €) que fueron destinadas íntegramente a funcionamiento. Dichos cambios vienen dados por el siguiente motivo tal y como argumenta la institución receptora de la ayuda: debido a la transferencia del presupuesto del presente proyecto al IFAPA tras haber cerrado los trámites presupuestarios para el año 2017 en la Junta de Andalucía, la incorporación efectiva, administrativa y contable del presupuesto ha requerido de un proceso administrativo complejo y excepcional que ha retardado la disponibilidad del dinero para su gasto real. Este retraso ha ocasionado una considerable disminución de los meses de contratación de personal. Además, cuestiones técnicas fortuitas como la falta de disponibilidad de peces en el mercado y su consecuente encarecimiento hacen necesario el aumento de gastos de funcionamiento. Este cambio no ha supuesto ninguna modificación de los presupuestos anuales, ni de la ejecución de los trabajos.

En el caso de la **Universidad de Murcia** se solicitó y aprobó un traspaso de 11.229,43 € desde la partida de personal a la de fungible. El motivo esgrimido por la UMU fue poder disponer de más dinero para reactivos y materiales desechables para realizar convenientemente todas las tareas

planteadas en los objetivos de la propuesta. Este cambio no ha supuesto ninguna modificación de los presupuestos anuales, ni de la ejecución de los trabajos.

3.4. CAMBIOS EN EL CRONOGRAMA DE TRABAJO

No se han realizado cambios en el cronograma de trabajo en relación al inicio y ejecución de las distintas Actividades contempladas en el Anexo IV de la solicitud del proyecto.

4. SEGUIMIENTO TÉCNICO

4.1. OBJETIVOS

A continuación, en la siguiente tabla resumen se indica el grado de consecución de cada uno de los objetivos (generales y específicos) contemplados en la memoria científico técnica presentada y otros que se han generado durante la ejecución del proyecto DIETApplus:

Objetivos generales (G) y específicos (E)	Consecución objetivos (%)
G: Evaluar el uso de distintos aditivos en acuicultura	100
G: Mejorar la competitividad del sector acuícola español mediante el desarrollo, estandarización e implementación de dietas funcionales.	100
G: Desarrollo de dietas funcionales dirigidas a mejorar la salud y condición de tejidos mucosales (piel, branquias e intestino)	100
TOTAL objetivos generales	100
E: Tarea A1. Mejora a la resistencia al estrés mediante el uso de aditivos en la dieta (triptófano y aspartato)	100
E: Tareas A1 y A2. Evaluación de las características del mucus epidérmico como biomarcador no invasivo para medir la salud y bienestar en peces	100
E: Tarea A2. Evaluar de aditivos derivados de materias primas como la sangre porcina (hidrolizado de plasma y plasma secado por sprayación) o plantas medicinales (ácidos verbascósido y ursólico) en piensos funcionales.	100
E: Tarea A2. Evaluación de aditivos con capacidad inmunomoduladora (β -glucanos, MOS, vitamina C, extracto de <i>Echinacea purpurea</i>) y su capacidad promotora de la función inmune frente infecciones bacterianas	100
E: Tarea A2. Evaluación distintos aditivos con actividades vermícidas (aceites esenciales) para el tratamiento de ectoparásitos	100
E: Formación y capacitación de grupos de investigación y formación de jóvenes investigadores.	100
E: Fortalecimiento del tejido productivo nacional a través de la interacción de la industria con la academia en temas de acuicultura	100
E: Transferencia de conocimiento entre miembros del consorcio, sector privado y sociedad	100
TOTAL objetivos específicos	100

4.2. ACTIVIDADES

Justificación

La alimentación humana en sus aspectos conceptuales ha sufrido importantes modificaciones a lo largo de las últimas décadas. La necesidad de atender a nuevas exigencias sociales y de salud ha motivado la aparición de los alimentos funcionales y nutracéuticos, que, además de sus funciones nutritivas generales, presentan determinadas propiedades para el mantenimiento de la salud del organismo. Esta tendencia no sólo se ha visto reflejada en la industria relacionada con la nutrición humana sino también en la ganadería y sector avícola, donde los esfuerzos combinados de investigación de los productores, los fabricantes de alimentos y proveedores de aditivos, e instituciones académicas han dado lugar a una gran base de conocimientos y una amplia gama de aditivos para aliviar el aumento de costos de alimentar a las formulaciones para las aves de corral y cerdos. En el ámbito de la acuicultura es importante mencionar que durante las últimas tres décadas el crecimiento de la producción acuícola ha estado básicamente centrado en la mejora de los procesos de alimentación a través de la mejora de la formulación de la dieta, primando el crecimiento del animal sobre otros factores importancia. Sin embargo, el desarrollo de la industria e intensificación de los sistemas de producción, sumado a la fuerte y creciente competencia entre distintos productores, ha forzado a la industria acuícola a reducir los costes de producción y dotar de valor añadido a su producto. En este contexto, el mantenimiento de la salud y bienestar de los animales en cultivo es en la actualidad uno de las principales preocupaciones del sector en vista a la intensificación de los sistemas de producción y desarrollo de un modelo de negocio sostenible y socialmente aceptado por el consumidor, siendo necesario, tal y como ha propuesto la industria, el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas para garantizar el buen crecimiento, salud y bienestar de los animales en cultivo.

En el escenario descrito, la salud animal y la gestión de las enfermedades son dos de los mayores problemas del sector y retos para su desarrollo sostenible, pues tal y como se puso en evidencia en la pasada conferencia del Global Aquaculture Alliance's en París en el 2013, la inversión en gestión sanitaria y control de patologías ha sido crónicamente subestimada por las empresas acuícolas, primando por norma general el crecimiento a la salud, bienestar y calidad de los animales. Estas limitaciones han hecho que la acuicultura dependa en gran parte del uso de productos químicos en una proporción creciente a medida que se intensifica el cultivo. Sin embargo, es bien conocido que la mayoría de estos productos acaban impactando de forma negativa en el medio ambiente y en la salud animal/ humana por su toxicidad. Recientemente la UE ha prohibido el uso de medicamentos veterinarios, incluidos los antibióticos, por lo que hay especial interés en buscar métodos naturales alternativos para prevención y tratamiento de patologías y disfunciones fisiológicas de los peces en cultivo, situaciones que afectan el crecimiento y bienestar de los animales, los parámetros de eficiencia alimentaria relacionados con el uso del pienso, y el rendimiento productivo de toda instalación acuícola (hay que tener en cuenta que los costes asociados a la alimentación pueden representar cerca del 50% del total de los costes de producción). En este contexto, el uso de dietas salud y piensos funcionales está entre las opciones más prometedoras para mejorar la condición, salud y bienestar de los animales, así como para solventar episodios críticos relacionados con su ciclo biológico y de cultivo, tal y como ha sido reflejado por distintas organizaciones de ámbito internacional (EATIP en el caso de Europa y la NOAA en los Estados Unidos) y reducir el uso de agentes antimicrobianos en pro de la sostenibilidad ambiental.

Las dietas salud no sólo están basadas en una formulación equilibrada y adaptada a los requerimientos nutricionales de la especie y estadio de desarrollo, sino también en la inclusión de ingredientes/aditivos con propiedades funcionales sobre el organismo. Existe una amplia variedad de aditivos con las propiedades anteriormente citadas en la industria agroalimentaria para su uso en nutrición animal, mayoritariamente éstos se usan en el ámbito de la ganadería, si bien algunos pocos ya están siendo usados de forma limitada por la industria acuícola. En este contexto, la tendencia de la industria acuícola destinada a la fabricación de piensos no es la de buscar nuevos aditivos para piensos para peces, sino el de aprovechar el gran conocimiento ya existente de dichos compuestos funcionales en el sector ganadero y avícola y evaluar su uso en peces, existiendo un gran número de empresas en el sector con una amplia cartera de productos por evaluar. Sin embargo, la aplicación directa en la acuicultura de los principios nutricionales y/o aditivos para piensos funcionales desarrollados para el sector avícola y ganadero no es trivial, siendo necesario su validación y estandarización para su uso en peces bajo distintas situaciones del ciclo productivo (fase juvenil, pre-engorde, engorde), además de profundizar y caracterizar su efecto sobre el animal y su modo de acción, tal y como pretende abordar DIETApplus. Esta información es crítica para estimular a las empresas fabricantes de pienso - usuarios finales de la investigación propuesta por DIETApplus- sobre la inclusión de dichos aditivos en sus fórmulas diseñadas para distintas fases de la producción.

En relación al carácter innovador de la propuesta, tal como indica el informe de APROMAR en el informe "La Acuicultura en España 2016", el pienso utilizado en las granjas de acuicultura localizadas en España es elaborado en su mayor parte en el país, completándose con importaciones desde otros Estados Miembros de la UE, principalmente Francia y Portugal. La localización en España de las fábricas de pienso facilita la realización de una importante actividad de investigación e innovación en el campo de la nutrición y la alimentación de los peces. Esta innovación es promovida desde las propias empresas fabricantes del pienso y por las empresas de acuicultura, pero también juegan un papel crucial los centros públicos de investigación y las universidades.

Teniendo en cuenta este contexto socio-económico, el proyecto DIETApplus se ha planteado para dar una respuesta innovadora a las necesidades del sector, tal y como se describe a continuación: el carácter innovador de la propuesta subyace en el desarrollo de una aproximación integrada sobre la mejora de las formulaciones existentes de dietas para peces basadas en una estimulación del sistema inmune del animal, en la mejora de la condición e integridad de las mucosas (branquias, piel e intestino), así como un aumento de la producción de mucus en branquias y piel. Todo ello, buscando mejorar los procesos productivos a través de una mejora en la salud, bienestar y condición general del animal que repercuta directamente sobre una disminución de la prevalencia de las infecciones.

Dicha aproximación está basada en el uso de aditivos ya validados por el sector ganadero y avícola, pero todavía no incorporados en las fórmulas de pienso para peces. En este sentido, todos los aditivos serán evaluados de forma completa, tanto a nivel de rendimiento productivo (crecimiento, calidad del filete) como en relación a la respuesta inmune del animal y su exposición frente a agentes infecciosos (bacterias) y ectoparásitos (monogenea), además de profundizar en el modo de acción de los mismos. Así, el establecimiento de la dosis adecuada de inclusión de los aditivos evaluados junto al conocimiento de su modo de acción permitirá avanzar mucho más rápido en el uso de aditivos con propiedades y/o características similares a los testados en DIETApplus. Otro aspecto innovador de la propuesta es el desarrollo de fórmulas

combinadas de aditivos que permitan alcanzar el anteriormente citado objetivo, pues por norma general, la mayor parte de estudios relacionados con aditivos sólo se centran en un producto y no en el uso combinado y sinérgico de varios de ellos. En este sentido, DIETApplus se alinea con la tendencia actual existente en la industria y en particular en los fabricantes de pienso, los cuales están orientado su investigación e innovación hacia el desarrollo de dietas funcionales o dietas salud que permitan reducir el uso de productos antimicrobianos en el sector, tal y como recientemente ha sido planteado por Knut Nesse, CEO de Nutreco uno de los principales productores de pienso a nivel mundial, indicando el extraordinario desafío que supone para la industria producir más con menos recursos.

La aproximación experimental presentada en DIETApplus basada en la realización de ensayos nutricionales dosis-respuesta, seguidos de retos bacterianos, exposición a ectoparásitos o situaciones de estrés agudo y crónico, sumado a la integración holística del amplio rango de variables que se analizarán, pretende dar respuesta a una de las mayores limitaciones existentes en la actualidad sobre los trabajos científicos relacionados con el uso de aditivos promotores de la salud del animal, tal y como se ha puesto en evidencia en un reciente informe de la EFSA (Brufau et al., 2015, OC/EFSA/FEED/2014/01 – “*Review of immune stimulator substances/agents that are susceptible of being used as feed additives: mode of action and identification of end-points for efficacy assessment*”) liderado por el IRTA, donde se ha visto que en la mayor parte de estos estudios no se considera el evaluar la respuesta del animal frente a un agente estresante, reto bacteriano o exposición a un patógeno tras la administración del aditivo, siendo esta la mejor variable para realmente validar la funcionalidad de este tipo de alimentos.

Objetivos

El objetivo general del proyecto DIETApplus (Estrategias nutricionales para mejora en el rendimiento productivo: uso de piensos funcionales y dietas salud en acuicultura) que se presentó a los Planes Nacionales de Acuicultura en su convocatoria 2016 fue el de mejorar la competitividad del sector acuícola español mediante el desarrollo, estandarización e implementación de dietas funcionales y dietas salud que mejoren la condición general del animal, su resistencia frente a episodios de estrés y potenciales agentes infecciosos a lo largo de las distintas fases del ciclo de cultivo, así como también la mejora de la calidad del producto final, más allá de sus efectos promotores sobre el crecimiento.

DIETApplus pretendió fomentar la colaboración horizontal a nivel nacional entre los distintos agentes implicados (universidades y centros públicos de I+D, y profesionales del sector), estableciendo un marco de colaboración multilateral y transdisciplinar. Todo ello redundando en la generación y transferencia de conocimiento, capacidades y habilidades sobre el desarrollo y mejora de las dietas que se usan actualmente en acuicultura, aplicándose las técnicas más novedosas de nutrición, inmunología, biología molecular y celular, bioquímica y microbiología con el fin de buscar no sólo el crecimiento de los animales, sino también la mejora de su condición general, su bienestar y salud, así como reforzar su respuesta inmunológica. De este modo, DIETApplus ha posibilitado el intercambio de conocimientos y experiencias en pro del desarrollo de la acuicultura española, lo que esperamos que se traduzca en un impulso científico-tecnológico a la competitividad empresarial, en un acercamiento al crecimiento sostenible y responsable del sector, así como en una transferencia real al sector industrial, a

través de la participación de los departamentos de I+D de las empresas en el diseño de las pruebas e interpretación de los resultados de acuerdo con los estándares de la industria.

El objetivo general anteriormente descrito se desglosa en dos objetivos específicos destinados a dar respuesta a necesidades concretas de distintas etapas del ciclo de producción para una especie consolidada en el mercado acuícola como la dorada y una emergente como la corvina:

- Fase juvenil: desarrollo de dietas de alevinaje para mejorar la calidad y resistencia al estrés de alevines durante su manejo y transporte desde el criadero a jaulas donde se llevará a cabo su engorde intensivo.
- Fase de pre-engorde y engorde: desarrollo de dietas funcionales que mejoren la salud y bienestar del animal mediante la promoción de la integridad y respuesta inmune del intestino (GALT), piel (SALT) y branquias (GIALT), teniendo en cuenta que estos órganos son unas de las principales vías de entrada de agentes infecciosos en el animal, además de su potencial beneficio sobre la condición general del animal y crecimiento al proteger y potenciar el desarrollo de la mucosa intestinal, y regular su microbiota.

Teniendo en cuenta la información anterior y con el fin de promover el uso de aditivos y compuestos funcionales en nutrición animal, ya sea como elementos terapéuticos, profilácticos y/o promotores de una mejor condición general del animal, es necesario conocer los procesos que regulan el funcionamiento, homeostasis de las mucosas del organismo y su interacción con la microbiota. Asimismo, es importante saber cómo éstas se ven afectadas por distintas situaciones que se dan durante el cultivo de los animales (p.ej. disfunciones nutricionales, cambios de dieta, transporte, infecciones bacterianas y parasitarias, estrés, etc.) y que pueden afectar de forma negativa la salud y bienestar de los peces. Como consecuencia, el estudio de las distintas mucosas de los animales, terrestres y acuáticos, es uno de los focos más actuales de mejora en la producción animal. En este contexto, a continuación se enumeran y describen las distintas actividades llevadas a cabo dentro del proyecto DIETApplus, actividades que están asociadas a los citados objetivos particulares:

➤ **Actividad 1. Determinación de una estrategia de alimentación con aditivos que mejoren la resistencia al estrés en peces cultivados.**

Presupuesto de la Actividad 1: 208.968,91 €

Grado de ejecución: 100%

Entidades participantes: IFAPA (responsable); Universidad de Murcia; Universitat Autònoma de Barcelona; IRTA; Universidad de Cádiz (subcontratado) y Universidad de Barcelona (subcontratado).

El objetivo de esta actividad es desarrollar específicamente un método de alimentación, considerando el tiempo de alimentación y la concentración del aditivo, para aplicar sobre corvinas antes de ser sometidas a situaciones de estrés típicas en granjas, con el fin de atenuar la respuesta de estrés de los peces y, por tanto, mejorar el bienestar animal.

➤ **Actividad 2. Uso de dietas para la mejora de la integridad y salud de mucosas (intestino, piel y branquia).**

Presupuesto de la Actividad 2: 606.859,54 €

Grado de ejecución: 100%

Entidades participantes: IRTA (responsable); Universidad de Murcia – Universidad de Málaga; Universitat Autònoma de Barcelona; Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía – CSIC (subcontratado); Universidad de Cádiz (subcontratado) y Universidad de Barcelona (subcontratado).

El objetivo general de esta actividad es evaluar un conjunto de aditivos y compuestos bioactivos propuestos por la industria como promotores de la salud y condición del animal, con el fin de validar su potencial uso comercial en dietas para peces y conocer sus mecanismos de acción sobre el organismo. Los distintos ensayos nutricionales van acompañados de pruebas de validación diseñadas para evaluar la eficiencia de los aditivos evaluados en situaciones similares de cultivo industrial.

➤ **Actividad 3. Coordinación y seguimiento del proyecto**

Presupuesto de la Actividad 3: 32.374,76 €

Grado de ejecución: 100%

Entidades participantes: IRTA (responsable) y todos los miembros del consorcio.

El objetivo de esta actividad es monitorizar y seguir el desarrollo del proyecto durante su ejecución mediante la realización de reuniones de coordinación entre todos los socios del proyecto, reuniones en la que se planifique el intercambio de muestras entre los miembros del consorcio, seguimiento y planificación de las tareas. Además, otra de las tareas asignadas es la de valorar y asignar los distintos planes de contingencia en función de la evolución y dificultades que acontecieran durante el desarrollo. Igualmente, esta actividad contempla toda la gestión administrativa relacionada con la correcta ejecución presupuestaria de la actividad por parte de cada uno de los socios, así como también la tramitación de los contratos de subcontratación a terceros dentro del proyecto.

➤ **Actividad 4. Difusión de los resultados de DIETApplus: estrategia comunicativa y Jornada de transferencia al sector**

Presupuesto de la Actividad 4: 4.549,39 €

Grado de ejecución: 100%

Entidades participantes: IRTA e IFAPA (responsables) y todos los miembros del consorcio.

El objetivo de esta actividad es la de establecer estrategia de difusión y comunicación de los resultados obtenidos con las distintas tareas que forman el proyecto con el fin de mantener a la comunidad científica informada de los resultados más relevantes del proyecto, así como también transferir estos resultados y su aplicabilidad a los socios privados que apoyan y acompañan la propuesta. La estrategia de comunicación está basada en la publicación de noticias en las redes sociales, artículos de divulgación, artículos científicos en revistas con índice de impacto y comunicaciones en congresos científicos.

4.3. RESULTADOS

ACTIVIDAD 1. DETERMINACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE ALIMENTACIÓN CON ADITIVOS QUE MEJOREN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS EN PECES CULTIVADOS

Dentro de esta actividad se han llevado a cabo las siguientes tareas previstas en el proyecto:

Tarea A.1.1. Detección del aditivo más eficaz que mejore la resistencia al estrés

El bienestar y atenuación del estrés en peces cultivados suele ser abordado desde una perspectiva zootécnica, profundizándose con frecuencia en el desarrollo de técnicas y sistemas de cultivo que maximicen el bienestar, tales como mejora de la calidad del agua con sistemas de filtración y captación adecuados, y disminución de la densidad de carga en los tanques (Branson, 2008). Sin embargo, la disminución del estrés mediante la alimentación con piensos enriquecidos en aminoácidos no es una estrategia muy usada en granjas comerciales de peces.

Está descrito que las condiciones de cultivo de los peces afectan el metabolismo de los aminoácidos (Aragão et al., 2008, Costas et al., 2008) y bajo ciertas situaciones de estrés aumenta el requerimiento de algunos aminoácidos esenciales y no esenciales, aspecto probablemente relacionado con la síntesis de proteínas y otros compuestos implicados en la respuesta al estrés (Conceição et al., 2012). El papel de algunos aminoácidos específicos y sus metabolitos en rutas metabólicas claves implicadas en el crecimiento, inmunidad o resistencia a agentes estresantes y patógenos ambientales ya ha sido demostrada en peces (Li et al., 2009; Conceição et al., 2012; Hoseini et al., 2019). Por tanto, los aminoácidos no solo participan en la constitución de las proteínas y provisión de reservas energéticas, sino que también pueden convertirse en sustancias bioquímicamente activas con un papel fundamental en la fisiología de los peces.

El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial con importantes funciones en la regulación de la respuesta al estrés. Puede convertirse en serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y melatonina (Lepage et al., 2003). La serotonina es un neurotransmisor implicado en los mecanismos reguladores del apetito, el comportamiento y la agresión en varias especies de vertebrados superiores, incluyendo humanos (Yao et al., 2011), mientras que la melatonina es una hormona ubicua involucrada en múltiples procesos tales como la reproducción y los ritmos biológicos (Falcón et al., 2017; Maitra y Hasan, 2018). La 5-HT en cerebro está involucrada en el control del eje HPI en peces y existe una correlación entre su actividad y los niveles de cortisol en plasma. Por tanto, se ha descrito que el Trp en la dieta reduce la agresividad y mejora la recuperación post-estrés en mamíferos y, en peces y crustáceos, reduce el canibalismo y la agresividad, y aumenta el crecimiento (Hseu et al., 2003; Höglund et al., 2005;).

Sin embargo, alrededor del 95% del triptófano ingerido se cataboliza inicialmente en el hígado mediante la ruta de la kinurenina, produciendo niacina, piruvato y acetil coenzima A como productos finales. Estos productos pueden entrar en el ciclo de Krebs y en la glucólisis para producir energía, por lo que el estudio de las actividades enzimáticas del metabolismo energético puede aportar bastante información sobre los efectos de los suplementos de Trp en la dieta (Yao et al., 2011).

Aunque parece evidente el efecto del Trp como atenuador de la respuesta al estrés, recientes experimentos indican que el efecto se debe principalmente a un retardo en la respuesta más que a una disminución de ésta en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), por lo que, sumado a lo expuesto en el párrafo anterior, los mecanismos de metabolización del Trp podrían variar entre especies (Herrera et al., 2019). Esta ausencia de efectos ya quedó previamente constatada en algunas especies de peces de agua dulce como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Lepage et al., 2003; Martins et al., 2013), por lo que se hace necesaria una aproximación específica para el estudio de los efectos de suplementos alimenticios de Trp.

Ciertamente, el triptófano, ya sea de manera directa o indirecta, participa en un amplio abanico de procesos fisiológicos, tal como describe Hoseini et al. (2019). De hecho, los peces en condiciones estresantes de cultivo bajan sus niveles de triptófano en plasma comparados con otros en mejores situaciones (Aragão et al. 2008; Costas et al. 2008). Esta multifuncionalidad del triptófano hace necesaria una aproximación multidisciplinar al estudio de los efectos fisiológicos de estos aditivos aminoacídicos, considerando tanto parámetros clásicos de estrés (cortisol, glucosa, lactato) como otros relacionados con la respuesta inmune o el metabolismo energético.

Algunos autores sugieren que otros aminoácidos como la prolina y el aspartato pueden tener efectos sedativos en animales (Erwan et al., 2014). Concretamente, el aspartato actúa como neurotransmisor y/o neuromodulador y también está involucrado en la regulación de la síntesis y liberación de hormonas, algunas de ellas relacionadas con el estrés, como la prolactina (D'Aniello, 2007). Sin embargo, en peces sólo el Trp ha sido suplementado a la dieta para estudiar sus efectos fisiológicos sobre el estrés, por lo que la aplicación de los otros aminoácidos mencionados supone un aspecto innovador en el proyecto DIETApplus. Una leve aproximación a esta temática con aminoácidos diferentes al Trp está descrita por Saavedra et al. (2010), que concluyeron que una dieta alta en fenilalanina y tirosina disminuyen los casos de deformidad ósea y la mortalidad en larvas de sargo (*Diplodus sargus*).

Por otra parte, el bienestar en peces es habitualmente evaluado mediante indicadores de estrés tales como cortisol, glucosa y lactato plasmáticos (Pottinger, 2008). Sin embargo, la necesaria extracción de sangre puede ser difícil y dañina para los peces ya que requiere personal muy experimentado y puede provocar heridas internas y externas y hemorragias a los animales. Por tanto, la búsqueda de nuevos métodos para determinar el bienestar animal en peces cultivados es un objetivo común en trabajos sobre estrés y bienestar (Ellis et al., 2013; Lupica y Turner, 2009; Kittilsen et al., 2009; Herrera et al., 2016).

En este sentido, se ha constatado que una de las respuestas de estrés a nivel de organismo en peces es el aumento la producción de moco dérmico (Shephard, 1994; Vatsos et al., 2010). El moco dérmico se considera una primera línea de defensa contra una gran variedad de factores ambientales, actuando como una barrera dinámica y semipermeable que desarrolla múltiples funciones en peces como osmoregulación, respiración, nutrición o locomoción (Jia et al., 2016; Subramanian et al., 2007; Esteban, 2012; Sanahuja and Ibarz, 2015). Debido a la importancia de esta sustancia y a la posibilidad de su extracción sin provocar daños a los peces (técnica no invasiva), es de especial interés el estudio de su viabilidad como matriz para la medición de biomoléculas relacionadas con el estrés, tales como glucosa, lactato y cortisol.

Objetivos

Esta tarea se realizó con el fin de encontrar un aditivo aminoacídico en el alimento que redujese los marcadores de respuesta al estrés en la corvina. Como aminoácidos se seleccionaron triptófano y aspartato, ya ensayados con algunas especies de animales y relacionados con el estrés tanto por su papel de precursor de neurotransmisores como de sustrato para el metabolismo energético.

En el plan original del proyecto se contemplaba un completo estudio de la respuesta al estrés de peces alimentados con estos piensos experimentales, abarcando tanto marcadores clásicos (plasma) como otros innovadores (composición del mucus epidérmico) y moleculares. No obstante, gracias a la estrecha colaboración de los grupos participantes en el proyecto, se desarrollaron otras analíticas relacionadas con la respuesta inmune que permitieron obtener una visión más integradora a nivel fisiológico de los efectos de esos aditivos.

Metodología

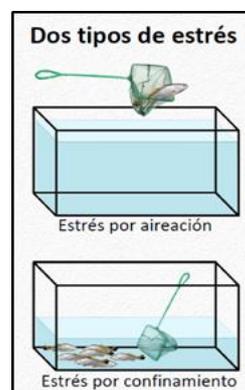
Cultivos experimentales y muestreos

Seis lotes de corvinas ($105,0 \pm 2,6$ g) fueron estabulados en circuito abierto, con una temperatura de $19,0 \pm 1,0$ °C y manteniendo el oxígeno disuelto por encima de la saturación. La densidad de cultivo fue 3 Kg m^{-3} y el período de aclimatación en estas condiciones duró 21 días, siendo alimentadas con piensos comerciales (Skretting L-4 Alterna) hasta la saciedad (ración aproximada de un 1% diario de la biomasa estabulada). Se fabricaron piensos experimentales a partir de pienso igual al ya mencionado anteriormente, que fue triturado, amasado, añadido un 1% (en peso seco) de aminoácido (Asp o Trp), y luego secado y peletizado (2-3 mm). El pienso control se procesó de la misma forma, pero sin añadir aminoácidos.

Tras el período de aclimatación de los peces se procedió a su alimentación con los piensos experimentales durante 7 días, manteniendo las condiciones de cultivo señaladas anteriormente. Al finalizar este período, se sometieron a dos tipos de estrés: 1) exposición al aire (3 min) y 2) confinamiento y persecución durante 1 h (cada 10 min). Tras esto fueron muestreados para extraerles tejidos y sangre 1h y 6h post-estrés. Los grupos basales no fueron sometidos a ningún tipo de estrés.



Figura 1. Tanques experimentales del IFAPA.



Durante todo el cultivo se tomaron periódicamente los valores de concentración de amonio, nitrato y nitrito, y carga microbiana en el agua de cultivo, así como registro e identificación, en su caso, de patologías existentes.



Las muestras de sangre tomadas en animales sedados y por medio de punción caudal fueron centrifugadas a 3.600 rpm y 4 °C durante 10 min para la separación y extracción de plasma. Los tejidos fueron rápidamente extraídos por disección y congelados con o sin RNAlater (para los análisis moleculares posteriores).

Figura 2. Ejemplo de extracción de sangre en corvinas por medio de punción caudal.

Durante el muestreo se extrajeron muestras para todos los socios implicados en el proyecto, consiguiendo así un estudio integrado de los efectos sobre bienestar animal de los piensos experimentales en los sistemas de estrés, inmune y digestivo, entre otros. Concretamente las muestras fueron repartidas entre los diferentes centros de investigación para los siguientes estudios:

Muestra	Centro	Estudios/temas
Hígado	IFAPA-UCA	Acumulación metabolitos Trp/Asp y derivados (kinurenina y otros aminoácidos, ...)
		Enzimas del metabolismo energético
Riñón	IFAPA-UCA	Marcadores moleculares de estrés (CRH)
Riñón	IRTA	Marcadores moleculares sistema inmune
Intestino	IRTA	Marcadores moleculares sistema digestivo
Intestino	IFAPA	Acumulación metabolitos y derivados aminoácidos (serotonina)
Intestino	UMU-UMA	Caracterización microbiota intestinal
Cerebro e hipófisis	IFAPA-UCA	Marcadores moleculares de estrés (POMC, TRH)
Sangre (plasma)	UMU	Parámetros del sistema inmune
Sangre (plasma)	IFAPA	Marcadores metabólicos y hormonales de estrés (cortisol, glucosa,...)
Piel y músculo	IRTA-ICMAN	Histología/histoquímica de piel y músculo
Mucus epidérmico	UAB-UB	Marcadores estrés y sistema inmune – actividad proteásica

Fabricación y análisis del pienso experimental

Como dieta control fue usado un pienso comercial (Skretting L-4 Alterna). Este pienso fue triturado y mezclado con agua (400 mL Kg^{-1} pienso seco) y triptófano (Trp) o aspartato (Asp). La cantidad de Trp y Asp varió en cada dieta (0% y 1% para el pienso control y enriquecido). La mezcla fue posteriormente moldeada en tiras de 2 mm de diámetro y 20-25 cm de longitud que se secaron a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Tras el secado éstas fueron cortadas en pellets de 2-3 mm que se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Los piensos experimentales fueron posteriormente analizados por CG-EM para determinar el contenido final en aminoácidos. La homogenización del alimento se realizó mediante hidrólisis básica según Dai et al. (2014). Para la derivatización, 100 μL de solución de muestra homogenizada fueron vertidos a un vial de 2 mL, añadiendo 200 μL de una solución de agua:metanol:piridina (6:3,2:0,8) y 40 μL de isobutil cloroformiato, fue agitada intensamente en un vortex durante 30 s a temperatura ambiente. Luego fueron añadidos 200 μL de cloroformo (1% ECF) y los compuestos derivatizados fueron extraídos de la fase orgánica tras vortear el tubo durante 20 segundos. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y luego transferida a un nuevo vial con una inserción fijada de 200 μL . Las alícuotas de los extractos derivatizados se inyectaron en un Shimadzu GC-MS (GCMS-TQ8030) equipado con una columna de capilaridad de sílica Agilent HP-5MS (30m x 0,25mm i.d., 0,25 mm grosor). El sistema de cromatografía de gases estaba equipado con un Puerto de inyección *split/splitless* funcionando en modo *splitless*. La temperatura fue programada de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min) a $270 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 min) incrementando la temperatura a $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. La línea de transferencia se calentó a $280 \text{ }^\circ\text{C}$, El gas transportador fue helio con un flujo constante de 1 mL min^{-1} (velocidad media 36 cm s^{-1}). El espectrómetro de masas funcionó con ionización de electrones (EI) a 70 eV, en modo *scan* (75-500 amu). La identificación de los aminoácidos derivatizados se realizó comparando los tiempos de retención del cromatógrafo de gases y espectros de masas con los de compuestos puros. Todos los espectros de masas fueron también comparados con la biblioteca NIST 11. La cuantificación de las muestras se realizó mediante un método externo estándar siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras.

Análisis de marcadores plasmáticos de estrés

Los parámetros plasmáticos medidos para evaluar el estrés en peces fueron: glucosa, lactato y cortisol. Para medir los niveles de glucosa y lactato se usaron kits comerciales del fabricante Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida) y Spinreact (Lactate Ref. 1001330), respectivamente, protocolos adaptados a microplacas de 96 pocillos. La concentración de cortisol en plasma fue cuantificada mediante un kit de ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2014). Para la extracción del mismo, el plasma fue diluido con dietil éter (1:10). Tras decantar, el sobrenadante fue traspasado a otro tubo y el dietil éter evaporado mediante nitrógeno gaseoso. Luego, la sustancia remanente se diluyó (1:6) con un tampón de extracción suministrado por el fabricante, y la muestra a analizar. El límite inferior de detección para este ensayo ELISA es $0,1 \text{ ng/mL}$ (81 % de unión). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo son 9,8 y 4,6 % respectivamente, con un porcentaje de recuperación medio de 90%. Las principales reactividades cruzadas son con prednisolona (47,4 %), cortisona (15,8 %), 11-deoxicortisol (15 %), prednisona (7,8 %), corticosterona (4,81%), 6- β -hidroxicortisol (1,37 %), y 17-hidroxiprogesterona (1,36 %). Para todas las medidas

espectrofotométricas fue usado un lector de microplacas Tecan™ Sunrise, utilizando el software v2.5 Magellan para Windows (Tecan Austria, Salzburgo, Austria).

Metabolismo del triptófano y derivados

Las concentraciones plasmáticas de triptófano y serotonina fueron determinadas mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, según Sano et al. (2014). El plasma fue homogenizado mediante disrupción ultrasónica con 10 volúmenes de solución fría conteniendo 50 μL HClO_4 (12%) y 100 μL de agua Milli-Q. Para la derivatización, 100 μL de solución estándar o plasma homogenizado fueron vertidos a un vial de 2 mL, añadiendo 200 μL de una solución de agua:metanol:piridina (6:3,2:0,8) y 40 μL de isobutil cloroformiato, fue agitada intensamente en un vortex durante 30 s a temperatura ambiente. Luego se le añadieron 5 mL de una solución de NaCl (5%) y un twister (1x1 cm, 0,063 mL) y fue agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla final se analizó con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo y un sistema de termodesorción. Las muestras de hígado y cerebro fueron homogenizadas y analizadas como las de plasma. Las concentraciones de triptófano y kinurenina, y de serotonina y triptófano fueron analizadas en hígado y cerebro, respectivamente.

Análisis de marcadores del metabolismo energético

La actividad de enzimas del metabolismo energético fue medida mediante espectrofotometría en el tejido hepático homogeneizado de los peces. Para ello, los hígados fueron homogenizados en frío con un sonicador en 10 volúmenes de solución tampón compuesta de 50 mmol L^{-1} HCl (pH 7.5), 15 mmol L^{-1} 2-mercaptoethanol, 100 mmol L^{-1} KF, 5 mmol L^{-1} EDTA, 5 mmol L^{-1} EGTA, y un inhibidor de proteasas. Este homogenizado fue centrifugado (30 min a 10,000 \times g) y el sobrenadante extraído para su análisis. Las tasas enzimáticas se determinaron en función de las variaciones de absorbancia de NAD(P)H a $\lambda = 340$ nm. Las reacciones comenzaron por adición de los homogeneizados (15 μL) a la solución proteínica pre-establecida, omitiendo el sustrato en los controles (volumen final de 275-295 μL) y permitiendo que las reacciones sucediesen a 15 °C durante los tiempos establecidos (5-15 min). Las enzimas que se midieron son aquellas relacionadas con el metabolismo energético, tales como alanina aminotransferasa (AlaT), aspartato aminotransferasa (AspA), fructosa-1,6-bifosfatasa (FBP), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK). Para las condiciones específicas de cada enzima se aplicaron los protocolos descritos por Polakof et al. (2006).

Análisis de marcadores moleculares de estrés

Inicialmente se secuenciaron los siguientes genes en corvina a partir de muestras de tejido obtenidas en las actividades experimentales del proyecto: hormona liberadora de tirotrópina (TRH); hormona liberadora de corticotropina (CRH-BP); y proopiomelanocortina (POMC A y POMC B). Se llevó a cabo la búsqueda de secuencias en bases de datos (NCBI), construcción del árbol filogenético y alineamiento de secuencias seleccionadas.

Las secuencias seleccionadas a partir del árbol se alinearon mediante Clustal Omega. Posteriormente se diseñaron varias parejas de cebadores degenerados, en sentido directo y reverso, con la herramienta PrimaClade Primer Visualization. Se seleccionaron las que presentaban menor diferencia de temperatura de melting (Tm) y mayor porcentaje de GC en la región 3', y estos fueron validados por PCR. La purificación del ADNc se llevó a cabo mediante el kit NZYTech, NZYGelpure. La preparación de los vectores de propagación se realizó con el kit Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (Life Technologies), mediante el protocolo "Sticky-End Cloning Protocol". Para el estudio de homología entre secuencias y su purificación se usó el software Chromas (Technelysium) y las herramientas Clustal Omega y Nucleotide BLAST (NCBI).

Se llevó a cabo la cuantificación de la expresión génica de los siguientes compuestos involucrados en el eje de estrés: hormona liberadora de corticotropina (CRH, CRH-BP), proopiomelanocortina (POMC A, POMC B), hormona liberadora de tirotrópina (TRH), hormona del crecimiento (GH) y factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Inicialmente se aisló el ARN total mediante el kit comercial RNeasy® Plus MiniKit (QIAGEN, Cat. #74134). A continuación, se comprobó el ARN extraído mediante el Bioanalyzer 2100, utilizando Agilent RNA 6000 Nano kit (Cat. #5067-1511), válido para un rango de 25-5000 ng/μL de ARN total. La cantidad total de ARN se midió espectrofotométricamente con el BioPhotometer Plus de Eppendorf, utilizando 1 μL de la muestra y una cubeta TrayCell con 0,2 mm de paso de luz. La retrotranscripción a ADNc se realizó utilizando el qScript™ cDNA Síntesis Kit, a partir de cantidades de ARN entre 10 pg y 1 μg, para posteriormente desarrollar las PCRs mediante el Mastercycler®ep Realplex2 S. Finalmente, la cuantificación de la expresión génica se determinó mediante el kit PerferCTa™ SYBR®Green FastMix™. Las secuencias para los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 (v.0.4.0) disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Como gen control ("housekeeping") se usó la β-actina.

Para la medición de estos parámetros se usaron los tratamientos de estrés por confinamiento debido a su mejor adecuación para la detección de este tipo de respuesta. En la Tabla 1 se muestran los datos relativos a los cebadores específicos diseñados para evaluar el efecto de las dietas y condiciones experimentales sobre el estrés en juveniles de corvina.

Tabla 1. Número de registro en GenBank, tamaño ADNc clonado y secuencia de los cebadores diseñados para PCR cuantitativa usados para evaluar el efecto de las dietas en marcadores moleculares relacionados con el estrés en corvina.

Gen	Genbank Número acceso	Tamaño (pb)	Cebadores qPCR
<i>crh</i>	MK132771	408	Fwd.: AACAGCAGTCTGGTCCCATC Rev.: CTTATGAGCGCCCTGATGTT
<i>crh-bp</i>	MK132769	481	Fwd.: GGCAGGGGACTTCATCAC Rev.: CATATCGCTCGTACAGAGGCA
<i>pomc-a</i>	MF565481	378	Fwd.: CCAGCAACATCATAGCGACA Rev.: GTGCCGTCCTTCTTCTCGT
<i>pomc-b</i>	MF565482	563	Fwd.: CAGCGGAAGTGCTCCATG Rev.: CTCTGTCGCTCCGACCTC

Análisis de parámetros relacionados con el estrés en mucus epidérmico

Para todos los animales la obtención de las muestras de mucus epidérmico, previa anestesia ligera con MS-222, fue no invasiva colectando el mucus exudado con portaobjetos estériles evitando contaminaciones hemorrágicas y fecales (Figura 3).

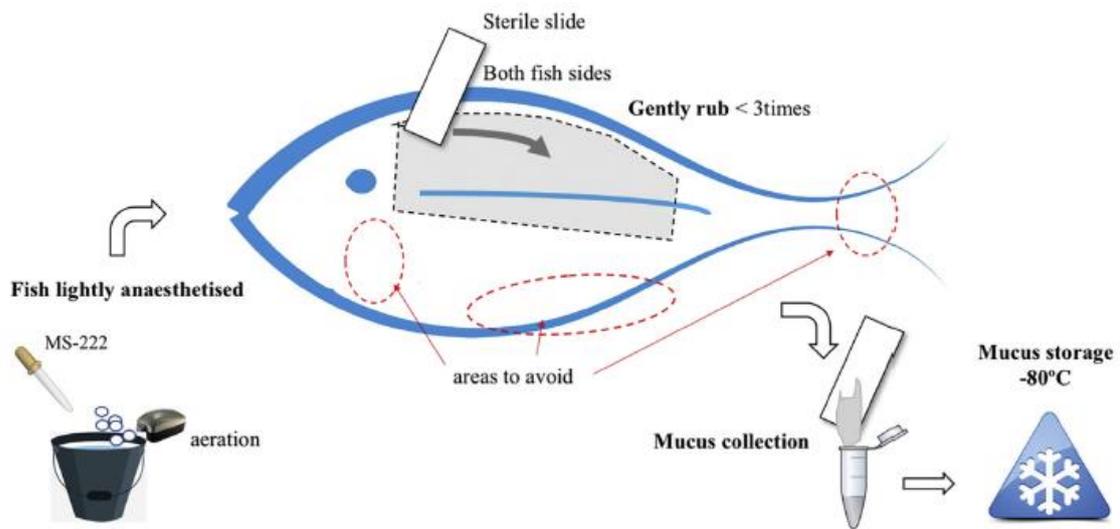


Figura 3. Esquema visual del procedimiento empleado para la colección de mucus epidérmico, según Fernández-Alacid et al. (2018).

Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización en el laboratorio. Las proteínas solubles del mucus se obtuvieron como se propone en Sanahuja y Ibarz (2015) y Fernández-Alacid et al. (2018) y la actividad proteasa se estudió mediante zimogramas de caseína. El tipo específico de actividad proteolítica se analizó con la aplicación de inhibidores específicos (TLCK para inhibir actividad tripsina; TPCK, ZPCK, para inhibir actividad quimotripsina; SBTI para inhibir ambas; y PMSF para inhibir actividades genéricas serin-peptidasa). Además, se analizó el índice glucosa-proteína del mucus, la actividad proteasa total y la actividad esterasa.

Análisis de parámetros plasmáticos del sistema inmune

La concentración total de proteínas se midió usando el método Coomassie Brilliant Blue G-250 con el reactivo de Bradford. Resumiendo, $5\ \mu\text{L}$ de suero se incubaron con $250\ \mu\text{L}$ de reactivo de Bradford en placas de 96 pocillos y fondo plano, y volúmenes similares de diluciones seriadas de albúmina de suero bovino se usaron como estándar. Tras incubar 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad fue medida la absorbancia en un lector de placas a $\lambda = 500\ \text{nm}$. La concentración total de proteínas fue expresada en mg mL^{-1} .

La actividad proteasa fue cuantificada con el ensayo de hidrólisis de la azocaseína. Para ello, fueron incubados a volúmenes iguales plasma con buffer de bicarbonato de amonio 100 mM con 0,7% de azocaseína durante 19 h a 25 °C. La reacción fue interrumpida añadiendo ácido tricloroacético 4,6% y la mezcla centrifugada a 130.000 x g durante 5 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a placas de 96 pocillos que contenían 100 µL de NaOH 0,5N. Posteriormente fue medida la densidad óptica a $\lambda = 450$ nm con un lector de placas. El plasma fue sustituido por solución de tripsina (5 mg mL⁻¹) como control positivo (100% de actividad proteasa) o por búfer, control negativo (0% actividad).

La actividad antiproteasa fue medida como se ha descrito mediante la capacidad del mucus de la piel de inhibir la actividad tripsina. Alícuotas de 10 µL de plasma se incubaron con 10 µL de solución de tripsina estándar (5 mg mL⁻¹) durante 10 min a 25°C. Luego 100 mM buffer de bicarbonato de amonio con 0,7% de azocaseína fueron añadidos e incubados a 25 °C durante 2 h. La reacción fue interrumpida añadiendo ácido tricloroacético 4,6 %, incubada durante 20 min a 25 °C y la mezcla centrifugada a 130.000 x g durante 5 min. Los sobrenadantes (100 µL) fueron transferidos a placas de 96 pocillos que contenían 100 µL de NaOH 1N. Posteriormente fue medida la densidad óptica (DO) a $\lambda = 450$ nm con un lector de placas. El plasma fue sustituido por PBS como control positivo (100% de actividad proteasa), o tanto mucus como tripsina fueron sustituidos por PBS para control negativo (0% actividad). La actividad antiproteasa fue expresada en términos de porcentaje de inhibición de tripsina según la fórmula: % inhibición de tripsina = $100 \times (\text{DO tripsina} - \text{DO muestra}) / \text{DO tripsina}$.

La actividad peroxidasa en suero se midió según Quade y Roth (1997) con modificaciones. Las muestras de plasma se disolvieron 1:4 en solución salina de Hank sin Ca⁺² ni Mg⁺² y dispensada en una placa de 96 pocillos. Luego, se añadieron tetrametilbencidina 20 mM y H₂O₂ 5 mM. La reacción fue interrumpida añadiendo 50 µl 2 M H₂SO₄ y medida la DO a $\lambda = 450$ nm. Las muestras de plasma fueron usadas como blancos. Una unidad fue definida como la cantidad para producir un cambio de absorbancia de 1 y la actividad se expresó en U mg⁻¹ proteínas del plasma.

La actividad lisozima se midió según el método turbidimétrico descrito por Parry et al. (1965) modificado. Volúmenes iguales de muestras de plasma y PBS (pH 6,2) fueron vertidos en pocillos de una placa de 96. A cada pocillo fue vertido 100 µL de *Micrococcus lysodeikticus* (0,3 mg mL⁻¹) secado y congelado. La reducción en DO a $\lambda = 450$ nm entre 0 y 15 min fue medida a 22 °C con un lector de placas. Una unidad de actividad lisozima fue definida como una reducción en absorbancia de 0,001 min⁻¹. Las unidades de lisozima presentes en el plasma se obtuvieron de una curva estándar hecha con lisozima blanca de huevo de gallina y los resultados expresados como U mg⁻¹ proteínas del plasma.

Se usaron 3 bacterias patógenas de peces marinos (*Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum* y *Photobacterium damsela*) para el reto bacteriano. Todas las cepas se dejaron crecer desde 1 mL de cultivo stock previamente congelado a -80 °C. Las tres bacterias fueron cultivadas durante 48 h a 25 °C en Tryptic Soy Agar y luego inoculadas en Tryptic Soy Broth (TSB), suplementado ambos con NaCl para una concentración final de 1% (w/v). Las bacterias en medio TSB fueron luego cultivadas a la misma temperatura con agitación (100 rpm) continua durante 24 h. Las bacterias en crecimiento exponencial fueron resuspendidas en PBS estéril y ajustadas a 10⁸ unidades formadoras de colonias (cfu mL⁻¹).

La actividad bactericida se terminó siguiendo el método de Stevens et al. (1991). Las muestras de 20 μL de plasma fueron añadidas a una placa de 96 pocillos. Fue añadido PBS a los controles en vez del plasma, sirviendo como controles positivos. Alícuotas de 20 μL de bacterias previamente cultivadas se añadieron a la placa y fueron incubadas 5 h a 25 °C. Posteriormente 25 μL de MTT (1 mg mL^{-1}) fueron añadidos y las placas incubadas a 25 °C durante 10 min para permitir la formación de formazán. Las placas fueron después centrifugadas (2.000 g, 10 min), disolviendo los precipitados en 200 μL de DMSO y transferidos a una placa de 96 pocillos. La DO del formazán disuelto fue medida a $\lambda = 570 \text{ nm}$. La actividad bactericida se expresó como porcentaje de bacterias no viables, calculada como la diferencia entre la absorbancia de las bacterias supervivientes comparada con la absorbancia de las bacterias de los controles positivos (100%).

Análisis de marcadores moleculares relacionados con la respuesta inmunitaria local

El RNA total de muestras de intestino anterior fue extraído usando el kit RNeasy Mini® (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA fue determinada por espectrofotometría midiendo DO a $\lambda = 260$ y 280 nm. La integridad del RNA extraído fue verificada mediante la visualización de las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S por separación electroforética con gel de agarosa 1,2%. Para la síntesis de cDNA, RNA fue transcrito reverso en un volumen de reacción de 20 μL conteniendo 2 μg de total RNA usando SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR con oligo (dT) (0,5 $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$), cebadores de hexámeros aleatorios (50 ng μL^{-1}) y una mezcla de dNTP 10 mmol L^{-1} , búfer 10X RT (200 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH = 8,4), 500 mmol L^{-1} KCl) 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , 0,1 mol L^{-1} DTT, RNaseOUT (40 U μL^{-1}), SuperScript™ II RT, seguido por un tratamiento H RNasa. El cDNA resultante se diluyó 1:20 en agua tratada DEPC y esta mezcla fue usada para el análisis de la expresión génica.

Fueron llevadas a cabo reacciones qPCR de seis muestras por tratamiento por duplicado en un sistema de detección de PCR a tiempo real CFX96 Touch™. Cada reacción (20 μL) contenía 10 μL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 0,5 μL de cebador directo, 0,50 μL de cebador reverso, 2 μL de muestra de cDNA y 7 μL de agua libre de RNasa/DNasa. El protocolo qPCR a tiempo real comenzó a 95 °C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C tras 30 s a la temperatura específica de hibridación de cada par de cebadores seguido por 30 s a 72 °C con una curva de fusión final que dio paso al establecimiento de los perfiles de curva de fusión estándar para cada amplicón. Las expresiones relativas fueron calculadas usando el software CFX Manager 3.0 con *ef1 α* (Elongation factor 1 alfa) y *hprt* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) como controles endógenos, mientras que las muestras basales (pre-estrés) de los grupos fueron usadas para normalizar la cuantificación relativa dentro de cada grupo experimental. Todas las muestras se analizaron por duplicado con un control negativo (sin enzima ET) para confirmar la ausencia de contaminación de DNA y un control adicional negativo en cada placa sin contener patrón cDNA.

Los marcadores de inmunidad intestinal (respuesta inmune local) medidos en juveniles de corvina alimentados con las dietas experimentales, expuestos a distintos estresores y analizados en distintos periodos post-estrés (1 y 6 h) fueron los siguientes:

- 1) marcadores de inmunidad innata: c3 complemento [*c3*], lisozima [*lys*], defensina [*def*], hepcidina, [*hep*], piscidina [*pis*] y ciclooxigenasa [*cox2*],

2) inmunidad humoral: interferon tipo 1 [*ifn1*], proteína Mx [*mxp*], interleucina 1b [*il-1b*], tumor necrosis factor 1a [*tnf1a*] e interleucina 10 [*il-10*],

y 3) respiración celular: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [*gapdh*].

La información relativa sobre el tamaño del amplicón de ADNc, las secuencias de los cebadores y número de acceso de la secuencia registrada en GenBank se encuentran descritos en el trabajo de Campoverde et al. (2017).

Análisis estadístico

Excepto cuando se expresa lo contrario, todos los valores en tablas y gráficas están representados como media \pm ES (error estándar de la media) y en todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. La normalidad y homocedasticidad de las variables de análisis fueron comprobadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de un factor y un posterior test de Duncan para identificar grupos homogéneos; en el caso de comparaciones entre solo dos grupos fue usada una t de Student. Las pruebas de correlación entre variables independientes se realizaron mediante el test de Pearson.

Para los análisis de expresión génica a nivel de respuesta inmune local, éstos fueron analizados con una ANOVA de dos vías, considerándose el tiempo y la dieta como factores. Para este tipo de resultados también se realizó un *heatmap* para visualizar diferentes patrones en la expresión génica por medio de GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software, La Jolla California, EE. UU.). Para evaluar si ambos factores estresantes probados tuvieron un impacto en la inmunidad intestinal local en peces alimentados con la dieta C, los niveles de expresión génica en muestras intestinales de peces antes de estrés y muestras tomadas 1 h después de ambos tratamientos de estrés se compararon mediante el análisis de la herramienta de software de expresión relativa (REST) 2009 (v2.0.13). Finalmente, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para discriminar la expresión génica, identificar los tratamientos asociados con el 1% de Trp y los factores estresantes, y minimizar la influencia de las variaciones interindividuales. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el programa Statistica 7 (StatSoft, Inc.).

Resultados

Composición del pienso experimental

Como la composición aminoacídica de las dietas experimentales fue modificada al tener que añadir el triptófano y el aspartato en los piensos, fue necesario proceder al análisis de su composición y determinar el perfil de aminoácidos en la dieta. Así, la composición proximal y el contenido en los principales aminoácidos del pienso diseñado se muestran en la Tabla 2, confirmándose la mayor cantidad de los aminoácidos objetivos, Asp y Trp, en sus respectivos piensos.

Tabla 2. Composición de los piensos experimentales usados en la Tarea A1.1. Unidades en % sobre peso seco (media \pm SD; n = 3; SD < 0,01 en todos los casos).

	Control	Trp	Asp
Proteína bruta*	46,5	46,5	46,5
Grasa bruta *	20	20	20
Contenido en aminoácidos			
Trp	0,07	0,11	0,07
Asp	1,06	1,06	1,78
Phe	0,3	0,3	0,3
Tyr	0,18	0,18	0,18
Met	0,06	0,06	0,06
Iso	0,04	0,04	0,04
Val	0,31	0,31	0,31

* Datos proporcionados por el fabricante, el resto de datos corresponden a datos propios.

Marcadores plasmáticos de estrés

En la Figura 4 se muestran las concentraciones de los marcadores plasmáticos de estrés registradas para los distintos tratamientos experimentales en juveniles de corvina alimentados con distintas dietas experimentales (control, suplementada con triptófano y suplementada con aspartato) y expuestos a distintos estresores (confinamiento y exposición al aire).

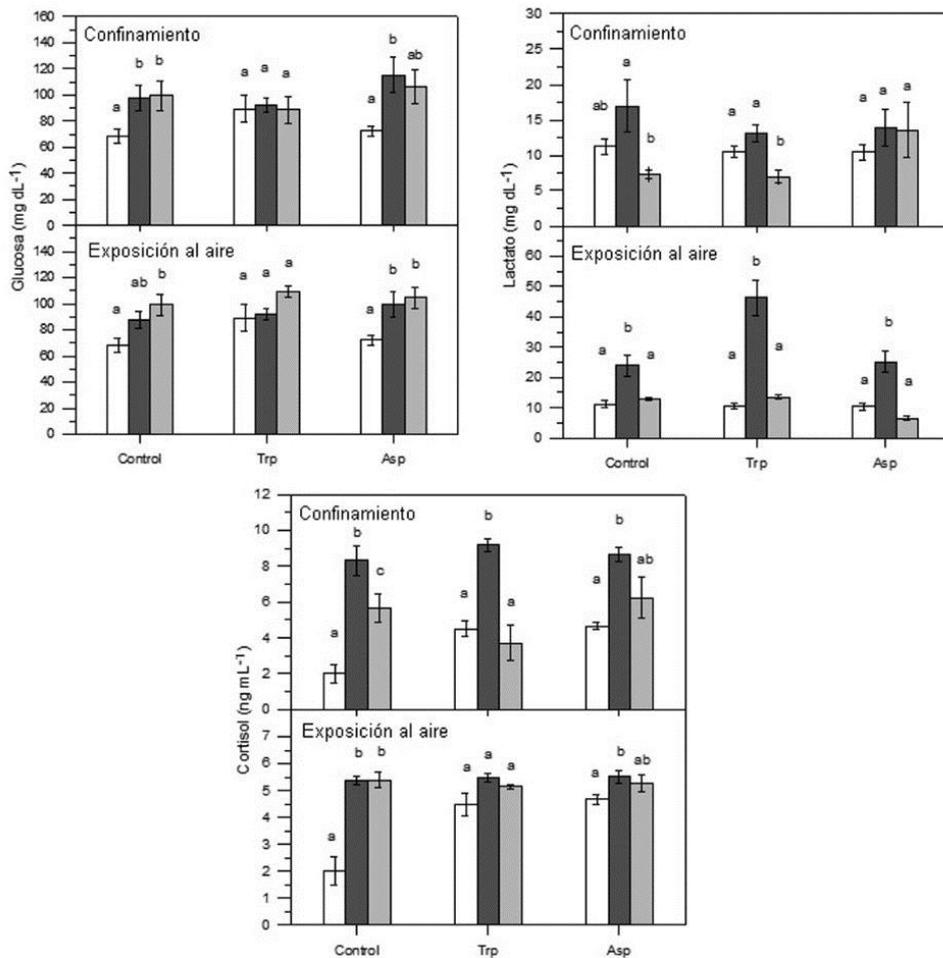


Figura 4. Concentración plasmática de glucosa, lactato y cortisol para los diferentes tratamientos del experimento. Las barras blancas, gris oscuras y gris claras corresponden a los muestreos basal, post-estrés 1h y post-estrés 6h. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos.

En el caso de los juveniles de corvina expuestos a un estrés por aire, el pienso con Trp adicionado disminuyó las variaciones de glucosa y cortisol tras estrés, no existiendo diferencias significativas entre ambos estados, y manteniéndolos constantes incluso 6 horas tras la exposición al agente estresante. Sin embargo, el lactato plasmático sí aumentó significativamente, lo que pudo ser debido a un incremento del metabolismo anaerobio al ser sometidos los peces a un estrés por exposición al aire. En los piensos suplementados con Asp, los marcadores no mostraron patrones muy diferentes a los del grupo control.

En relación a los peces sometidos a un estrés por confinamiento, la glucosa y el lactato no variaron significativamente para el tratamiento con Trp, produciéndose incluso un descenso del segundo a las 6 horas post-estrés. Respecto al grupo alimentado con una dieta suplementada con Asp, aunque las variaciones fueron menores respecto al grupo control en algunos casos, sólo se registró un patrón estable en el caso del lactato.

La síntesis de los resultados obtenidos en relación a los marcadores de estrés medidos en plasma, indican que los piensos suplementados con triptófano reducen las variaciones de los marcadores de estrés, por lo que se podría diseñar una estrategia de alimentación para atenuar la respuesta al estrés frente a situaciones estresantes predecibles y así mejorar el bienestar de peces cultivados. Sin embargo, los resultados obtenidos con las dietas suplementadas con aspartato no fueron tan positivos como los anteriores.

Metabolismo del triptófano y derivados

En función de los resultados obtenidos en relación a los marcadores de estrés plasmáticos, sólo se tuvieron en cuenta los tratamientos de estrés por aire con el aditivo Trp, que fue el que mejores resultados mostró en términos de reducción del estrés en los juveniles de corvina. En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran los resultados de concentración de Trp y sus derivados en varios tejidos.

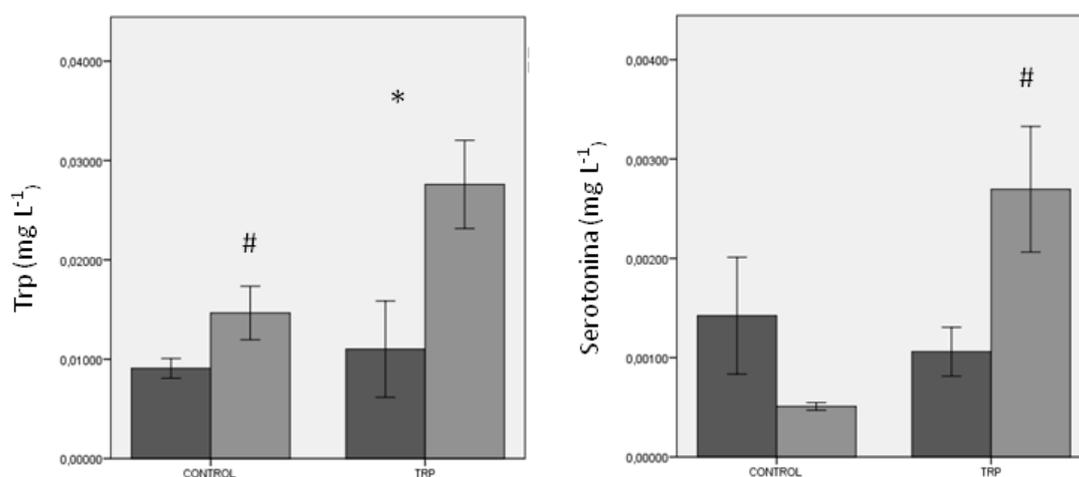


Figura 5. Concentración (media \pm error estándar) de Trp y serotonina en plasma según cada alimentación (control y Trp). Las barras gris oscuras y gris claras corresponden a los muestreos basal, y 1h post-estrés, respectivamente. Asteriscos (*) indican diferencias significativas entre estados dentro del mismo alimento; y almohadillas (#) indican diferencias significativas entre alimentos dentro del mismo estado (basal o 1h post-estrés).

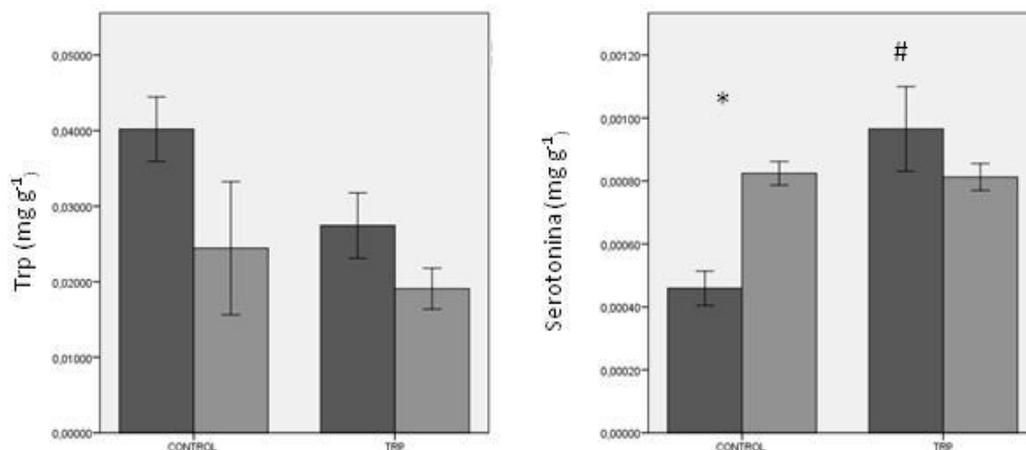


Figura 6. Concentración (media \pm error estándar) de Trp y serotonina en cerebro según cada alimentación (control y Trp). La codificación de colores y significación de los mismos se corresponde a los presentados en la Figura 5.

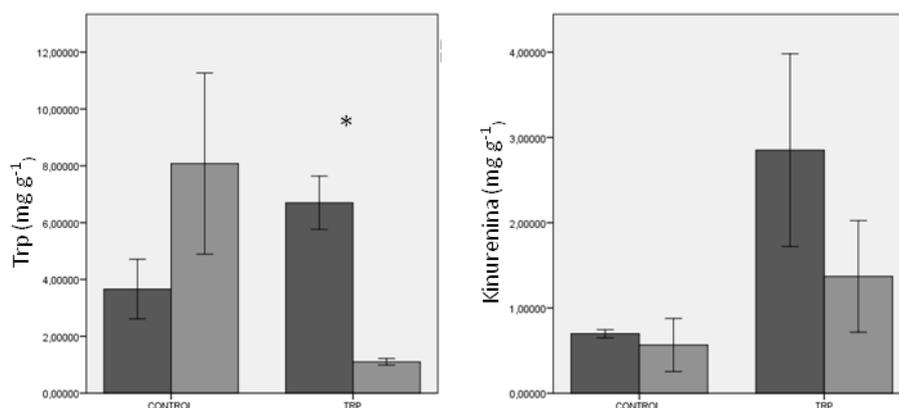


Figura 7. Concentración (media \pm error estándar) de Trp y kinurenina en hígado según cada alimentación (control y Trp). La codificación de colores y significación de los mismos se corresponde a los presentados en la Figura 5.

La inclusión del Trp en el alimento produjo cambios significativos en el metabolismo de este aminoácido, variando las concentraciones en tejidos de sus derivados, la serotonina y la kinurenina. En plasma, los peces estresados mostraron un aumento significativo de su contenido de Trp en las dietas suplementadas con este aminoácido, lo que indicaría una movilización de este aminoácido más intensa para intentar combatir la situación de estrés. Para peces estresados, la serotonina fue mucho mayor en el tratamiento con el aditivo, lo que indica que la mayor disponibilidad de éste en la dieta obligaría a una mayor circulación y transformación de Trp en serotonina durante situaciones adversas, tal como ocurría con el Trp.

La concentración de Trp en cerebro no varió significativamente entre tratamientos. Sin embargo, la de serotonina sí fue mayor en peces alimentados con Trp. De igual forma, la serotonina aumentó significativamente en el grupo alimentados con el pienso control tras someter a estrés a los peces.

En el hígado no se registró una acumulación significativa de kinurenina en la dieta suplementada, aun siendo mayor tanto para peces no estresado como en aquellos estresados. Para el Trp se detectaron diferencias significativas entre animales estresados y no estresados (condición basal) alimentados con la dieta suplementada con triptófano, lo que podría indicar que en situación de estrés el Trp se usa como reserva energética para su uso en otros tejidos. Estos resultados explicarían el aumento de Trp en plasma en esas condiciones adversas para el organismo.

Metabolismo energético

Para este estudio sólo fueron usados los tratamientos con estrés agudo (exposición al aire), ya que éstos podrían provocar unos cambios fisiológicos y metabólicos más evidentes entre los grupos experimentales. Los resultados que se muestran en las Figuras 8 y 9 mostraron una amplia variabilidad en la actividad de los enzimas relacionados con el metabolismo energético, aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para la mayoría de los enzimas analizados, excepto para: a) estado basal vs. estrés: las dietas control y Trp originaron diferencias significativas entre peces basales y estresados, y solo para la actividad AspA, siendo menor para los peces estresados; y b) alimento control vs. experimental (Trp/Asp): en estado basal, la actividad PFK en peces alimentados con Asp fue la más baja.

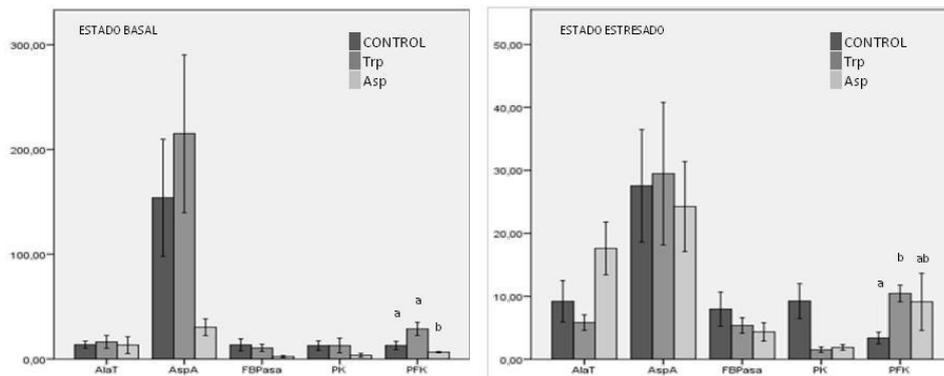


Figura 8. Actividad enzimática (mU mL^{-1}) en hígado para los alimentos experimentales. Loas asteriscos indican diferencias significativas entre estados basal y estrés para cada enzima.

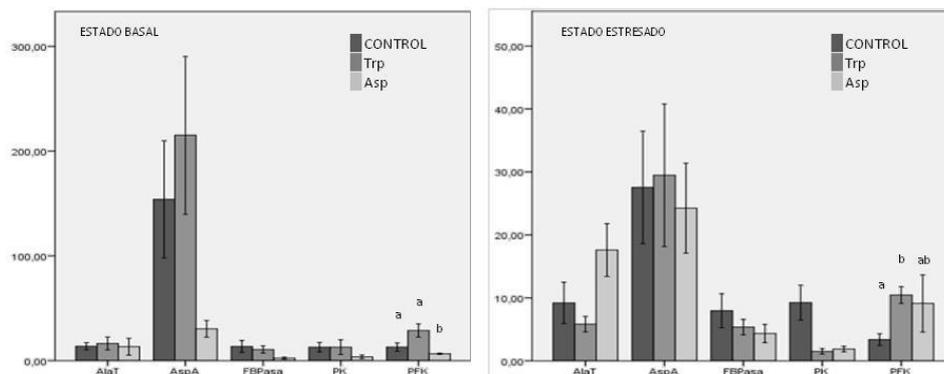


Figura 9. Actividad enzimática (mU mL^{-1}) en hígado para cada estado según los alimentos experimentales (control, Trp y Asp). Las letras indican grupos significativamente diferentes dentro de cada enzima.

Marcadores moleculares de estrés

El tipo de alimentación, especialmente la dieta con Trp, modificó significativamente el tipo de respuesta molecular al estrés, tal y como se indica en las Figuras 9 y 10.

Adicionalmente, coincidiendo con los resultados publicados por Martos-Sitcha et al. (2014), la liberación de cortisol producida por un estrés crónico podría estar regulada por otros factores diferentes a la CRH en el caso de los peces alimentados con la dieta suplementada con Asp. De igual forma, la variación de cortisol en los peces alimentados con Trp no parece estar relacionada con la expresión de *pomc*.

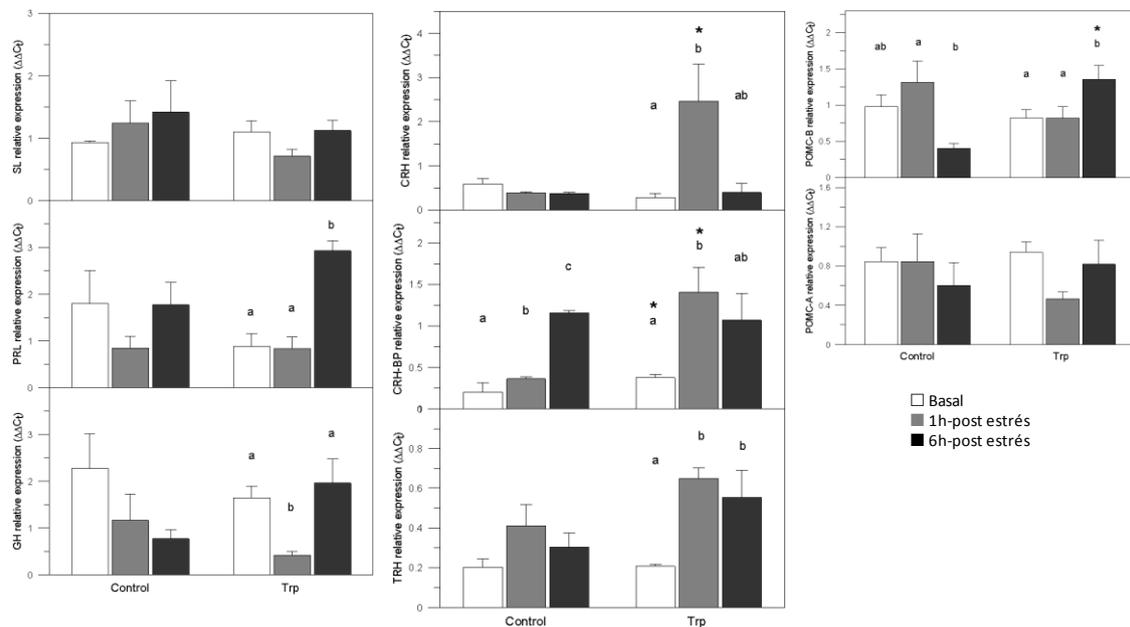


Figura 9. Expresión relativa frente a β -act. ($\Delta\Delta C_t$) de los genes analizados para la dieta enriquecida con triptófano (Trp). Las letras indican diferencias significativas dentro de un grupo de alimento (control, Trp), mientras que los asteriscos señalan diferencias significativas entre alimentos dentro de un mismo estado (basal, 1h- o 6h-post estrés).

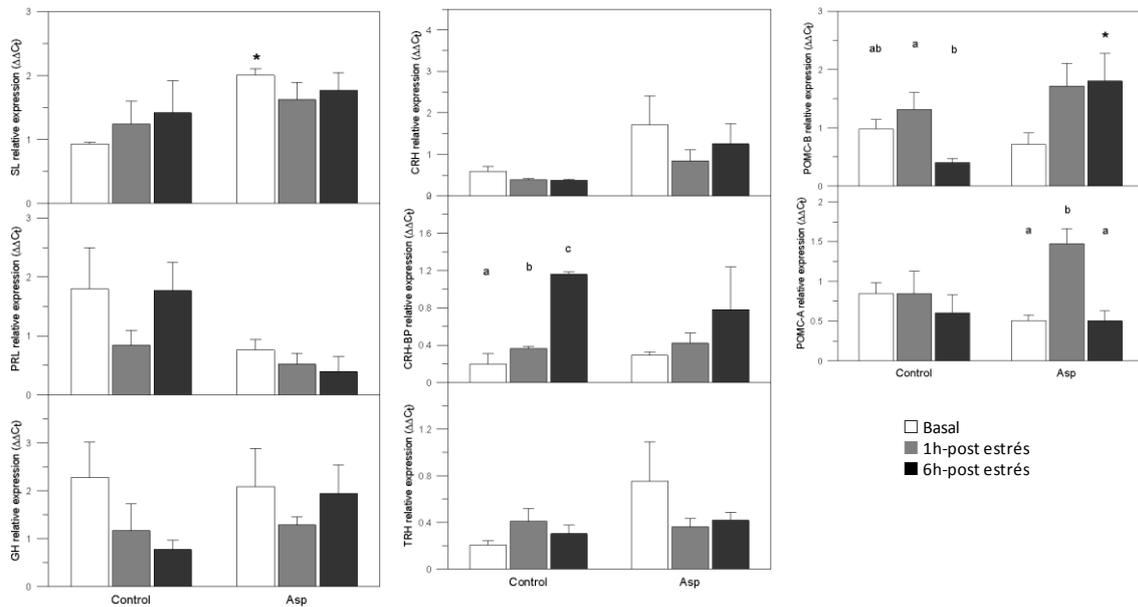


Figura 10. Expresión relativa frente a β -act. ($\Delta\Delta C_t$) de los genes analizados para la dieta enriquecida con aspartato (Asp). Las letras indican diferencias significativas dentro de un grupo de alimento (control, Asp), mientras que los asteriscos señalan diferencias significativas entre alimentos dentro de un mismo estado (basal, 1h- o 6h-post estrés).

Caracterización y análisis del mucus epidérmico

Antes de proceder a evaluar los efectos del estrés y las dietas suministradas sobre las propiedades del mucus epidérmico, es preciso proceder a describir las propiedades de éste en condiciones basales. Para este trabajo se procedió a comparar las características del mucus de la corvina con las de dos especies cultivadas en el ámbito nacional, la dorada y la lubina.

En la Figura 11 se muestran los zimogramas obtenidos del mucus epidérmico de la corvina, observándose diferencias con el mucus de la dorada y lubina. En cada uno de ellos se detecta la presencia de distintas bandas con actividad caseinolítica. En el mucus epidérmico de corvina se observan dos bandas de peso molecular alrededor de 75kDa (I-bands). Finalmente, el zimograma muestra diversas bandas de bajo peso molecular (L-bands) de entre 14 y 30 kDa, siendo muy evidente la banda equivalente al control positivo de tripsina (tamaño molecular de 14 kDa) y otras posibles bandas de digestión marcadas en la figura con flechas discontinuas. Para revelar las actividades específicas de cada banda caseinolítica se pre-incubaron las muestras de mucus con inhibidores específicos y posteriormente se analizaron los zimogramas obtenidos. En corvina, parece que la elevada presencia de actividad proteolítica de la banda L no resulta inhibida por la concentración usada de SBTI. La banda I no mostró inhibición aparente por el conjunto de inhibidores ensayados. Su peso molecular (MW = 76 kDa) sugeriría la coincidencia con la actividad de las metaloproteasas, sin embargo, será necesario el estudio con inhibidores más específicos para confirmar esta hipótesis.

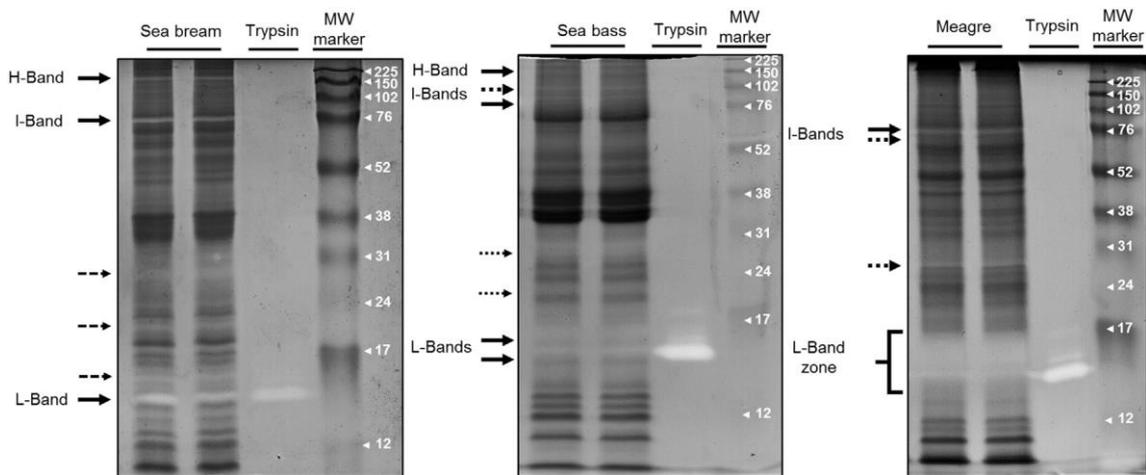


Figura 11. Zimogramas de las actividades de la proteasa mucosa de la piel de dorada (A), lubina (B) y corvina (C). Zimografía de gel: la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (12% de acrilamida) utilizando tripsina (10 ng) como control positivo (detalles en M&M). Para determinar el peso molecular de las fracciones de proteasa, se usó un marcador de peso comercial (carril de marcador MW) según Sanahuja et al. (2019).

Además, se midió la viscosidad del mucus para determinar su reología. El mucus se ha mostrado como un fluido viscoso que exhibe un comportamiento claramente no newtoniano (Figura 12), y su viscosidad depende de la velocidad de cizallamiento. La mayor viscosidad ($P < 0,05$) se observó para la dorada y fue muy similar para la lubina y la corvina.

Por otro lado, se analizaron los efectos del estrés por confinamiento y persecución en las distintas bandas caseinolíticas del zimograma. Se analizaron las propiedades y los niveles de metabolitos relacionados con el estrés del mucus (glucosa, lactato, proteína y cortisol) para establecer su idoneidad como biomarcadores potenciales no invasivos. Aunque la actividad proteasa total (APT) medida en el mucus (Tabla 3) no presenta diferencias por los distintos tipos de estrés, las bandas individuales si resultan modificadas, principalmente las bandas H e I, incrementando en las corvinas sometidas a persecución. Es de destacar la elevada actividad APT en el mucus de corvina con respecto a otras especies. Otro parámetro que se manifiesta interesante de analizar en el mucus epidérmico es la relación glucosa/proteína permitiéndonos normalizar el mucus obtenido en cada experimento (más o menos diluido).

Tabla 3. Parámetros analizados en el moco dérmico de corvinas en estados basal y 1h post-estrés: relación entre la concentración de glucosa y proteínas, actividad proteasa total (APT) y actividad esterasa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre basal y estrés. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos.

Tratamiento	Ratio Glucosa : Proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	APT (UI/mg proteína)	Actividad Esterasa (mUI/mg proteína)
Basal	$7,7 \pm 0,5$ a	$18,3 \pm 2,2$	$1,4 \pm 0,1$ a
Estrés	$12,7 \pm 3,4$ b	$20,1 \pm 2,2$	$0,9 \pm 0,1$ b

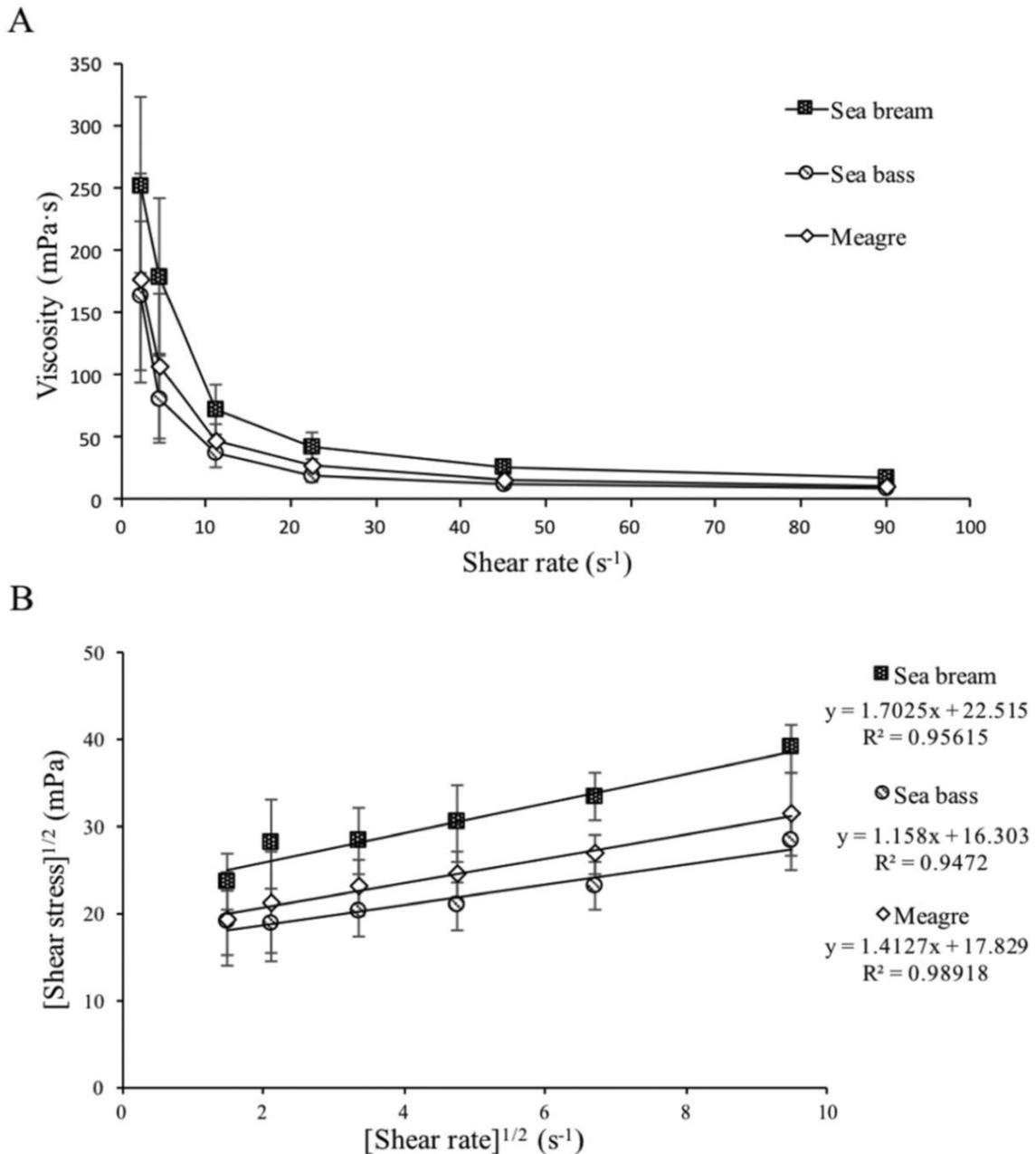


Figura 12. Análisis de la viscosidad del mucus en dorada, lubina y escasa. Reogramas (A) y diagramas de transformación del modelo de Casson (B). Los valores son la media \pm DE de los análisis de peces individuales. Las letras minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre las especies (Fernández-Alacid et al., 2018).

Respecto a los marcadores de estrés medidos en el mucus epidérmico, la Figura 13 muestra los niveles de metabolitos en esa matriz expresado por unidad de volumen (mL) de mucus epidérmico, y la Figura 14 la relación glucosa/proteína, lactato/proteína y cortisol/proteína. Como respuesta al estrés por aire la exudación de glucosa creció, como ocurrió con sus valores en plasma (ver apartado “Parámetros plasmáticos”).

El grupo Asp mostró los valores más altos de glucosa, mientras que los valores mínimos de lactato fueron en el grupo Trp. Los niveles de cortisol en mucus crecieron más que en plasma, unas 3-4 veces más, independientemente de la dieta. Además, los aumentos en estos parámetros no volvieron a sus niveles originales a las 6h post-estrés. Contrariamente, tras el estrés por confinamiento, la exudación de estos metabolitos y del cortisol fue significativamente menor que durante el episodio de estrés por aire, excepto para la glucosa en el tratamiento con Asp. Mientras que los niveles de lactato no respondieron al estrés por confinamiento, el cortisol aumentó a 1h post-estrés para los grupos Asp y Trp, pero no en el grupo control (dieta no suplementada con los aditivos evaluados en el presente estudio). Únicamente la glucosa en el grupo Asp continuó mostrando respuestas al estrés.

Curiosamente, mientras las diferencias en proteínas en el mucus fueron menos evidentes que las de otros metabolitos, el estrés por confinamiento redujo los niveles de proteínas solubles en el mucus del grupo control respecto a los valores obtenidos antes del estrés. Si estos valores de metabolitos y cortisol son referidos al nivel de proteínas (Figura 14), la respuesta al estrés en mucus fue dependiente de la dieta. El grupo Asp mostró niveles más altos que otros grupos (Tabla 4) de glucosa y cortisol 6h post-estrés por aire. El grupo Trp mostró menores valores de lactato a 1h post-estrés y consecuentemente mantuvo la relación glucosa/lactato, evidenciando la activación diferente del metabolismo entre los grupos.

Comparando los dos tipos de estrés (aire y confinamiento), las mejores ratios de metabolitos en mucus evidenciaron un efecto menos intenso del confinamiento sobre el mucus, como también muestran los marcadores plasmáticos (ver apartado “Parámetros plasmáticos”). Las ratios glucosa/lactato, consecuentemente, indicaron una inducción del metabolismo anaeróbico bajo estrés. El grupo alimentado con la dieta con Trp mostró una respuesta anaeróbica más baja a ambos agentes estresantes en animales pre- y 1h post-estrés (Tabla 4).

Para validar la relación entre las medidas obtenidas en plasma y mucus epidérmico fueron realizadas correlaciones de Pearson para cada metabolito analizado y cortisol, tal y como se muestra en la Figura 15.

Los análisis estadísticos mostraron una correlación positiva entre todos los indicadores de estrés. La glucosa en mucus frente a plasma mostró una fuerte correlación positiva, al igual que las proteínas. Tanto para la glucosa como para la proteína, los valores del índice de correlación de Pearson se mantuvieron cuando los agentes estresantes se analizaron individualmente y la correlación entre glucosa en mucus y plasma creció cuando los peces fueron estresados mediante su exposición al aire. La relación entre los niveles de lactato en plasma y mucus mostró una correlación débil pero positiva y significativa para todas las condiciones juntas, así como también por separado. Finalmente, la relación entre los niveles de cortisol en mucus epidérmico y en plasma fue dependiente del tipo de estrés. Se obtuvo una correlación débil pero significativa y positiva agrupando todas las condiciones, mientras que fue mayor cuando los agentes estresantes se estudiaron por separado.

Tabla 4. Efectos de las dietas experimentales sobre los parámetros en plasma y en mucus epidérmico de juveniles de corvina alimentados con dietas experimentales suplementadas con triptófano y aspartato y sometidas a distintos agentes estresores (exposición al aire y confinamiento).

	Efecto dieta	Estrés aire			Estrés confinamiento		
		0 h	1h	6h	0 h	1h	6h
Plasma	Glucosa						
	Lactato		+ Trp				
	Cortisol	+ Asp + Trp			+ Asp + Trp		
	Proteínas						
Mucus	Glucosa					+ Asp	
	Lactato	- Asp - Trp	- Trp		- Asp - Trp		
	Cortisol						
	Proteínas						
	Gluc / Pr			+ Asp			- Trp
	Lact / Pr	- Asp - Trp	- Trp		- Asp - Trp	- Trp	+ Asp
	Cort / Pr						
Gluc / Lact	+ Trp	+ Trp	+ Asp	+ Trp	+ Trp	- Asp - Trp	

NOTA: Los símbolos +Asp/+Trp y -Asp/-Trp indican valores significativos mayores o menores, respectivamente, de dietas suplementadas con Trp y Asp con respecto a la dieta control .

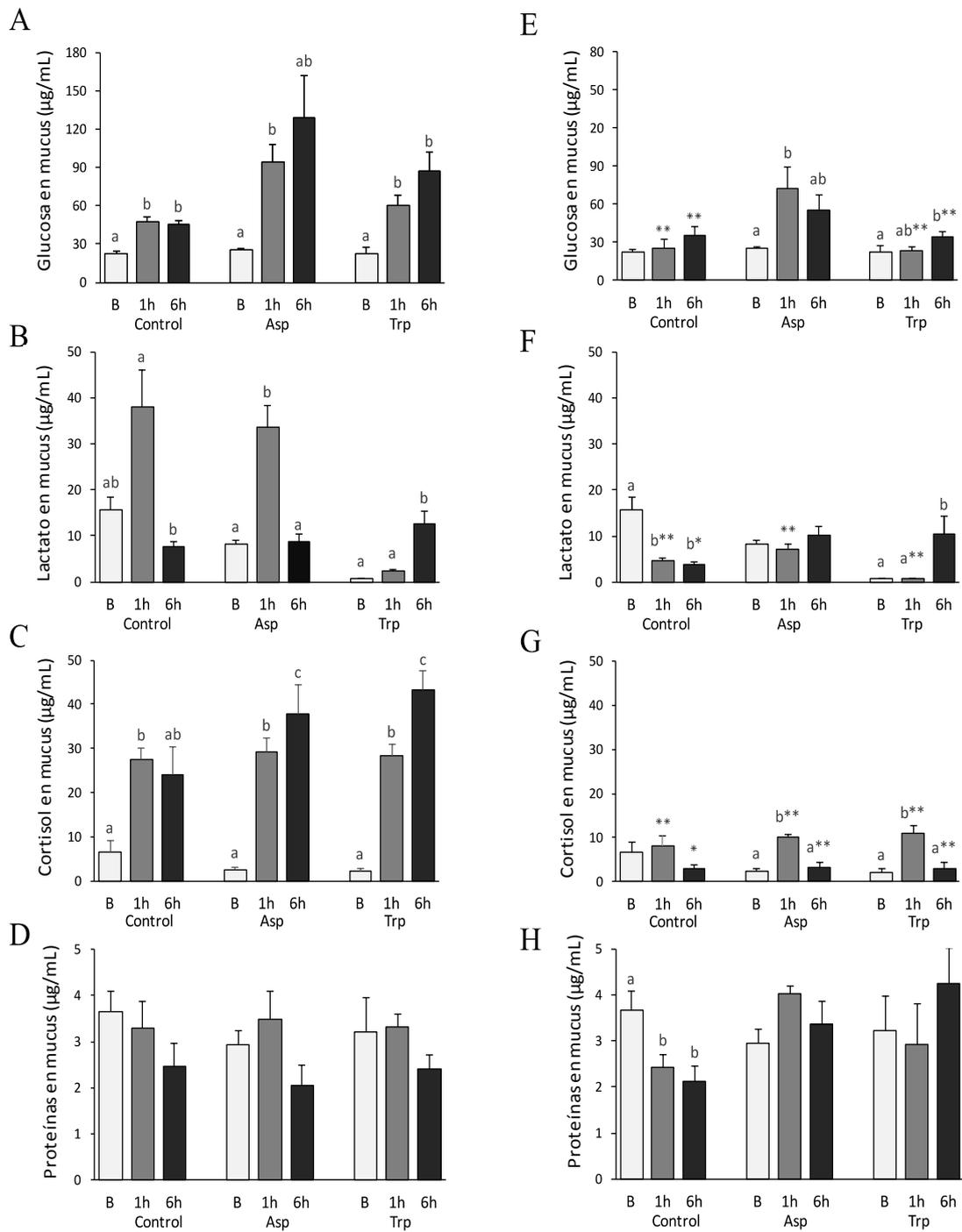


Figura 13. Respuesta de metabolitos y cortisol en mucus epidérmico como respuesta a estrés por exposición al aire y por confinamiento. Exposición al aire: glucosa (A), lactato (B), cortisol (C) y proteínas (D); confinamiento: glucosa (E), lactato (F), cortisol (G) and proteínas (H). Valores como media \pm SE. Letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre basal, 1h- y 6h-postestrés. Asteriscos indican diferencias significativas entre exposición al aire y confinamiento.

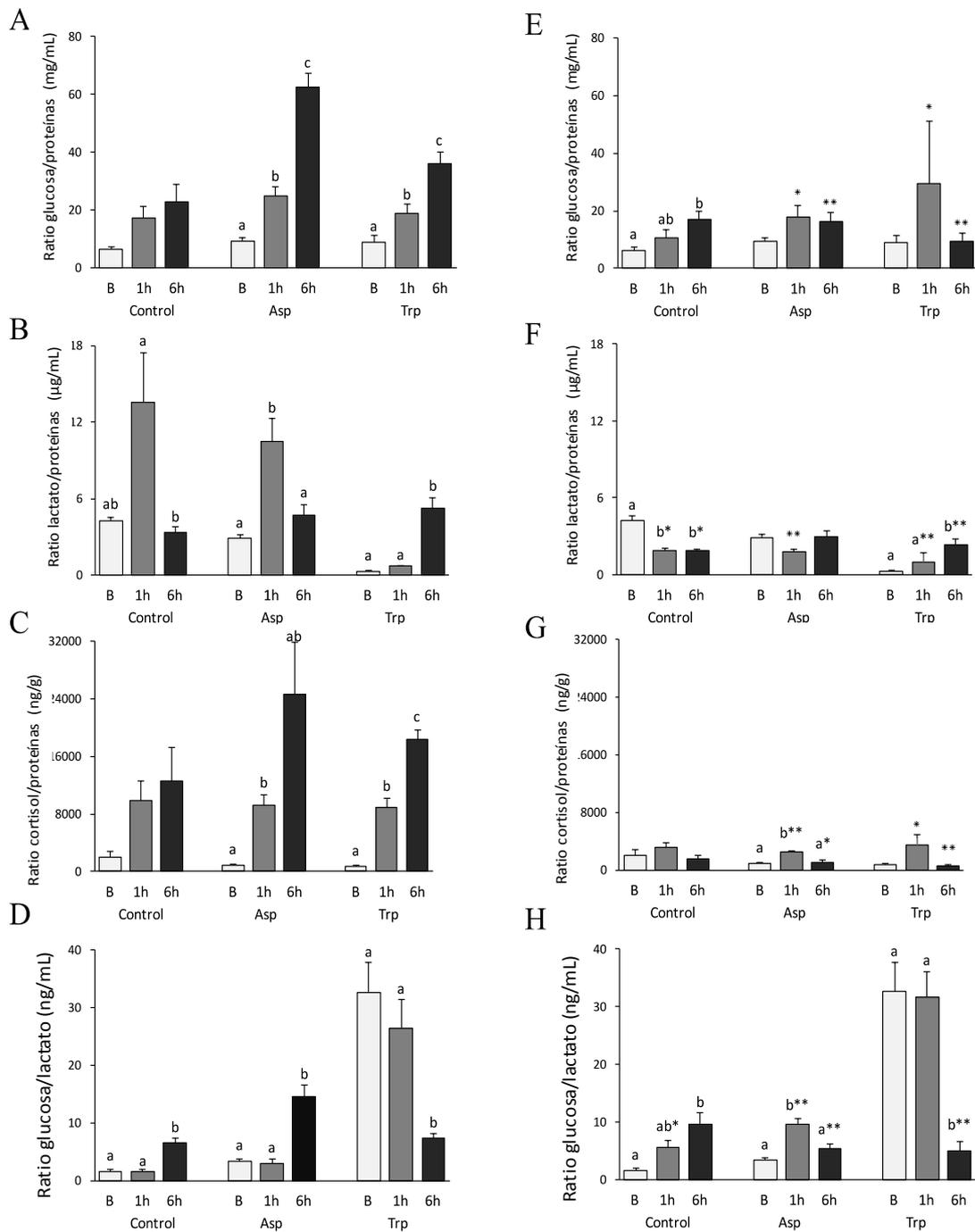


Figura 14. Respuesta de metabolitos y cortisol en mucus epidérmico como respuesta a estrés por exposición al aire y por confinamiento. Exposición al aire: ratio glucosa/proteínas (A), ratio lactato/proteínas (B), ratio cortisol/proteínas (C) y ratio glucosa/lactato (D); confinamiento: ratio glucosa/proteínas (E), ratio lactato/proteínas (F), ratio cortisol/proteínas (G) y ratio glucosa/lactato (H). Valores como media \pm SE. Letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre basal, 1h- y 6h-postestrés. Asteriscos indican diferencias significativas entre exposición al aire y confinamiento.

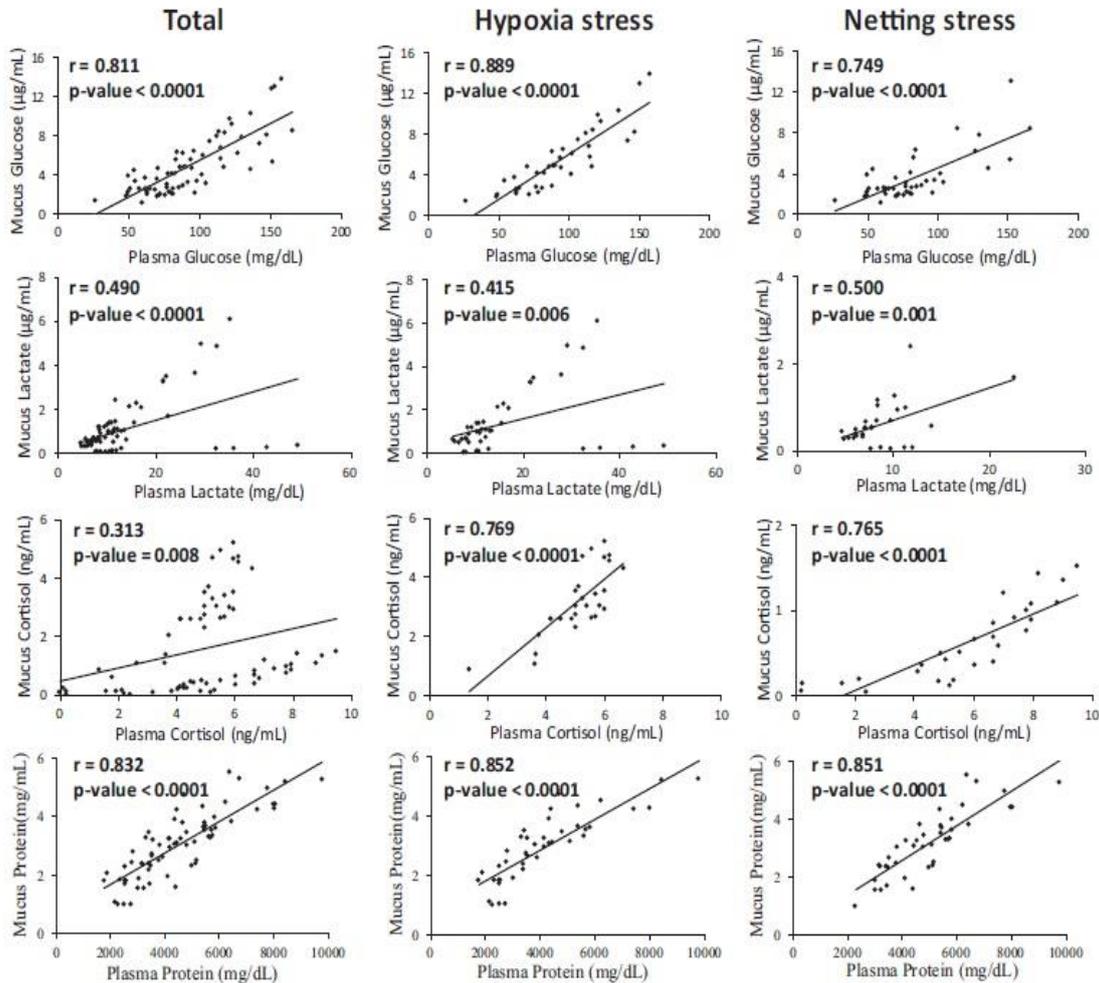


Figura 15. Matriz de correlaciones entre los indicadores de estrés estudiados. La correlación entre plasma y mucus para cada compuesto fue analizada mediante la prueba de correlación de Pearson (r), indicándose el valor del estadístico r y el nivel de significancia en cada gráfica (Fernández-Alacid et al., 2019).

Parámetros plasmáticos del sistema inmune

Tal como se muestra en las Figuras 16 y 17, los peces del grupo control presentaron, para las actividades antiproteasa, peroxidasa, y bactericida contra *V. angillarum*, *V. harveyi* y *P. damselae*, diferencias post-estrés en comparación con los valores basales, mientras que estas diferencias no se encontraron en las dietas suplementadas con aminoácidos, por lo que se concluye que estas últimas provocan una atenuación de la respuesta de esas actividades al estrés, principalmente a la exposición al aire. Contrariamente, la actividad proteasa respondió con diferencias post-estrés en las dietas suplementadas. Por otra parte, la exposición al aire afectó significativamente a los valores post-estrés de las actividades proteasa y antiproteasa. La

actividad bactericida contra *P. damsela* en los peces control a 1 h post-estrés presentó un incremento significativo respecto a los valores basales (78% frente a 24% respectivamente), mientras que los grupos suplementados con Asp o Trp presentaron valores mucho menores que los controles a ese mismo tiempo (35% en grupo Asp y 28% en grupo Trp). Los resultados de la actividad antimicrobiana en el mucus epidérmico de la corvina en comparación con los de la dorada se presentan en la Figura 18.

Por lo tanto, se puede concluir que la suplementación de una dieta comercial con aspartato o con triptófano ejerce una modulación de la respuesta inmunitaria humoral de la corvina, principalmente cuando estos son sometidos a estrés por exposición al aire. A nivel general destacar que no hay efectos negativos en la suplementación de la dieta con Asp o Trp en corvina, tal y como era de esperar.

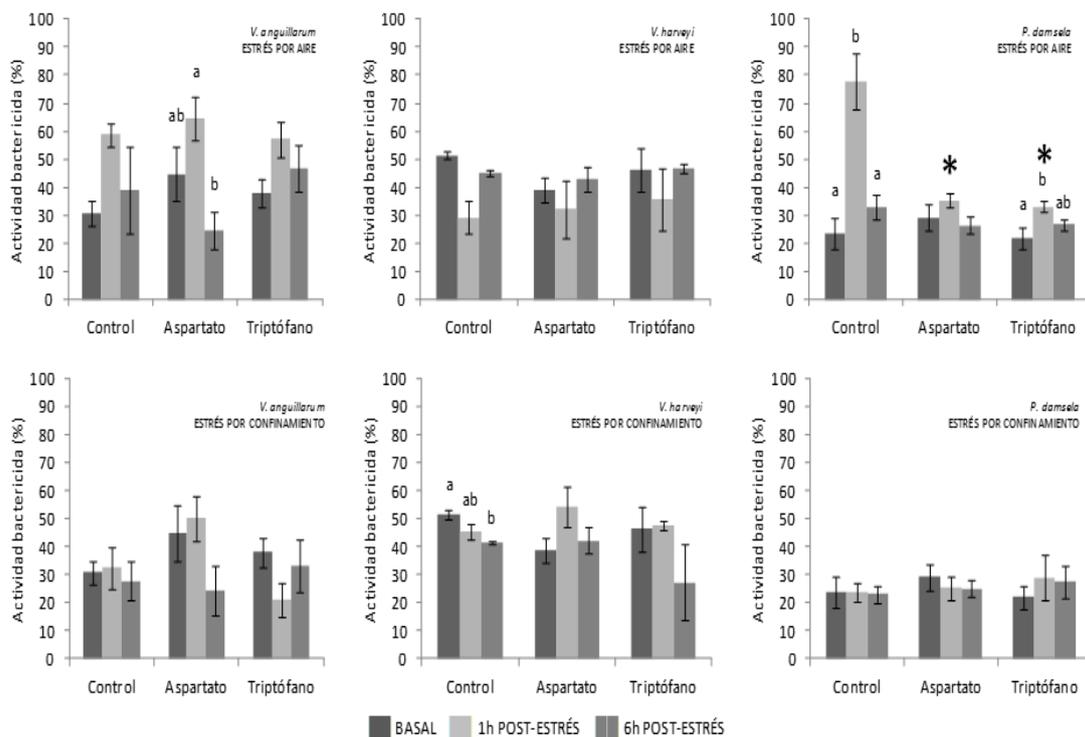


Figura 16. Actividad bactericida contra *V. anguillarum*, *V. harveyi* y *P. damsela* detectadas en cada tratamiento. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Asteriscos indican diferencias significativas entre tipos de estrés para una misma dieta y tiempo.

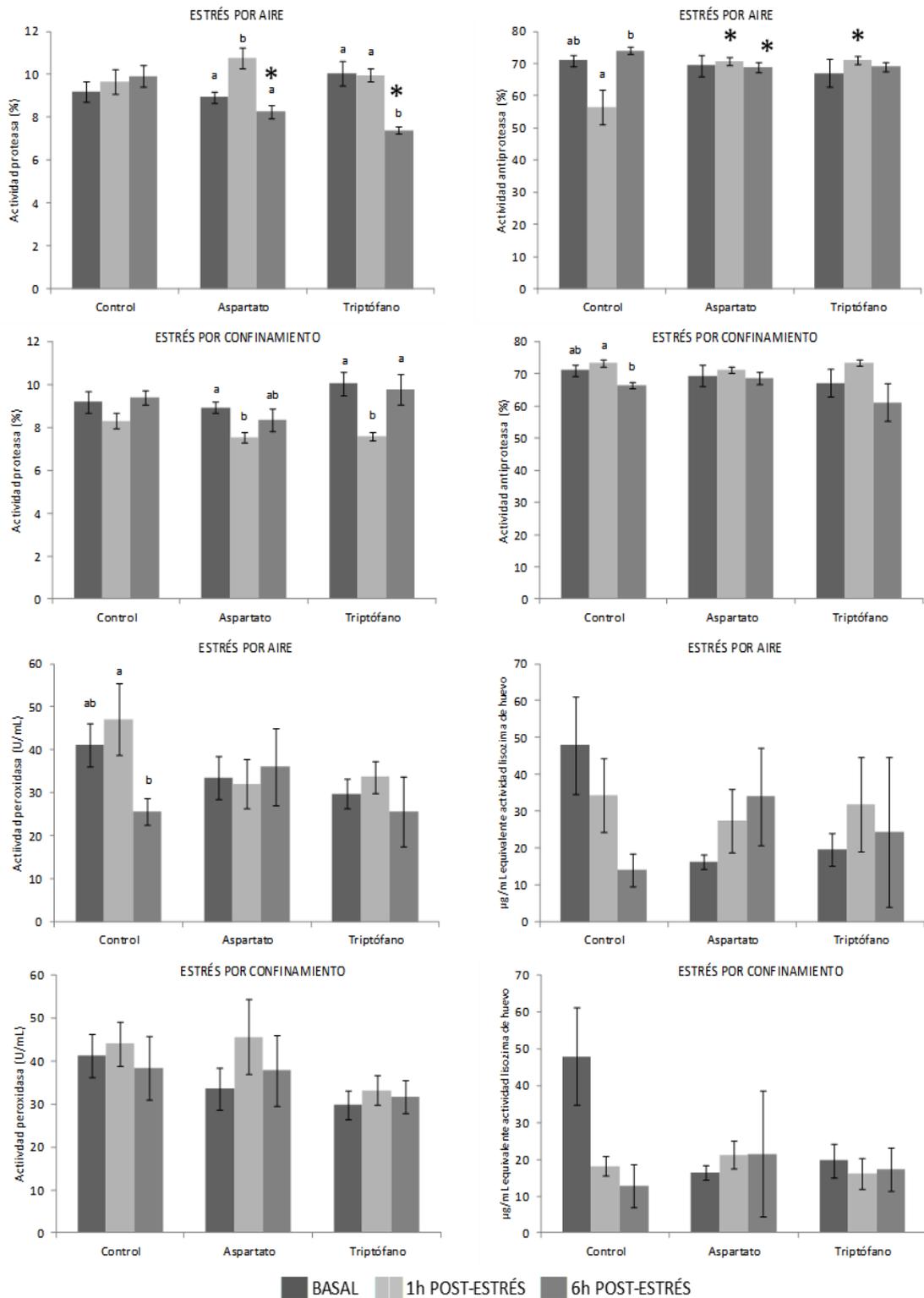


Figura 17. Actividades proteasa, antiproteasa, peroxidasa y lisozima para cada tratamiento. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Asteriscos indican diferencias significativas entre tipos de estrés para una misma dieta y tiempo.

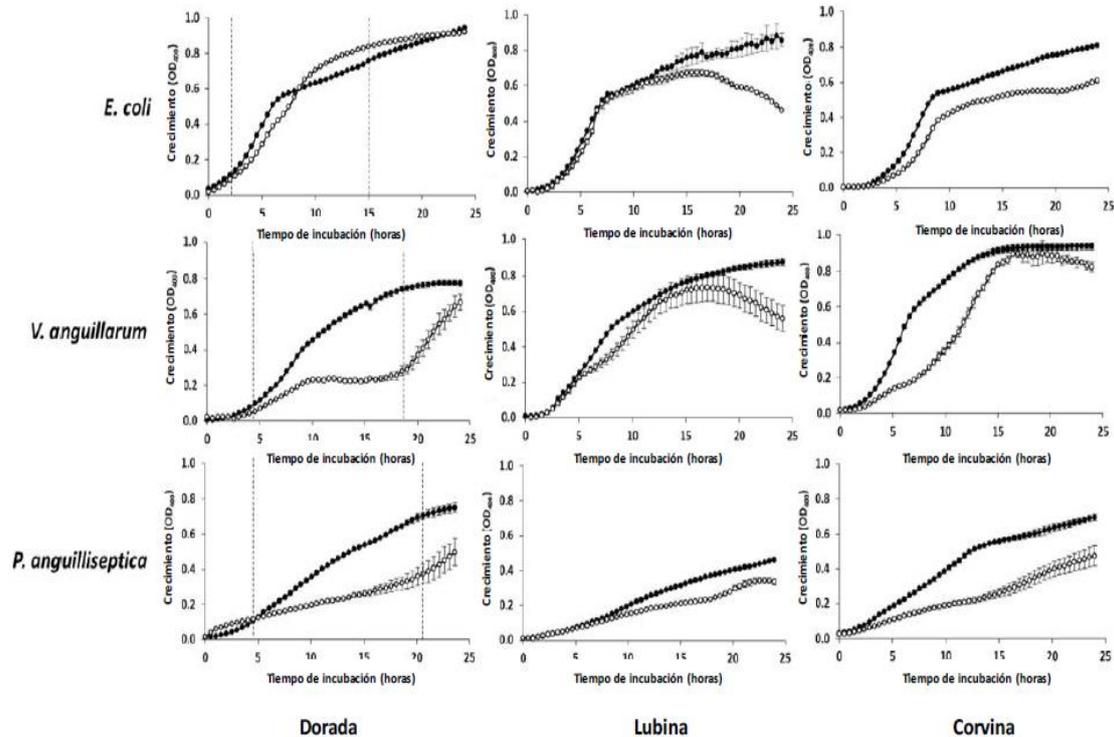


Figura 18. Estudio de actividad antibacteriana del mucus epidérmico. Los datos corresponden a la media \pm SE de las curvas de crecimiento libre por triplicado (sin mucus presente, círculos negros) y del crecimiento “en mucus” (con volúmenes iguales de mucus, círculos blancos). Las muestras de mucus provinieron de 3 grupos de 6 peces individuales. Las líneas de puntos verticales sirven para orientar las fases de retraso, registro y crecimiento estacionario de cada bacteria (Sanahuja et al. 2019).

Marcadores moleculares de la respuesta inmune

En el presente estudio, se evaluó la expresión génica de varios genes clave del sistema inmunitario innato y humoral en juveniles de corvina alimentados con dietas C y T (triptófano) antes y después de la exposición al aire (A) y los factores estresantes de confinamiento (N del inglés “netting”). Con respecto al estrés por exposición al aire, se encontró una regulación al alza en la expresión génica (asteriscos) entre las muestras intestinales tomadas antes del episodio de estrés ya 1 hps para los genes *c3*, *lys*, *cox2*, *il-10*, *def* y *hep* en peces alimentados con C dieta (análisis REST, $P < 0,05$). Con respecto a los resultados de los peces alimentados con la dieta T, varios genes (*lys*, *cox2*, *def* y *hep*) no mostraron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) en los patrones de expresión génica cuando los peces estaban estresados por la exposición al aire. Sin embargo, *gapdh*, *complemento c3*, *ifn1*, *mxp*, *tnf1a* e *il-10* mostraron la mayor expresión debida a la exposición al aire ($P < 0,05$) a 1 hps (TA1H) y la menor expresión a 6 hps (TA6H) en peces alimentados con La suplementación con 1% de Trp, mientras que *il-1b* y *pis* mostraron la mayor

expresión debido a la exposición al aire ($p < 0,05$) a 6 hrs (TA6H) cuando los peces fueron alimentados con la dieta Trp (Figuras 19 y 20).

El estrés por confinamiento produjo un alto nivel de expresión génica (asteriscos) en los genes *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *il-10*, *pis*, *def* y *hep* en peces alimentados con la dieta C (análisis REST, $p < 0,05$). Al considerar los resultados de la expresión génica de los peces alimentados con la dieta T, los resultados de la expresión génica para el estrés por confinamiento mostraron diferencias estadísticas a 1 hrs ($P < 0,05$), con los valores de expresión más altos y más bajos, en TN1H y TN6H respectivamente, para *gapdh*, complemento *c3*, *cox2* y *mxp*. Por otro lado, la expresión génica de *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *il-10*, *pis* y *hep* se elevó cuando los escasos fueron expuestos al estrés por confinamiento, pero solo con la dieta de control a 1 hrs (CN1H), mientras que para El grupo CN6H (6 hrs) *il-1b* mostró una expresión reducida y una expresión más alta.

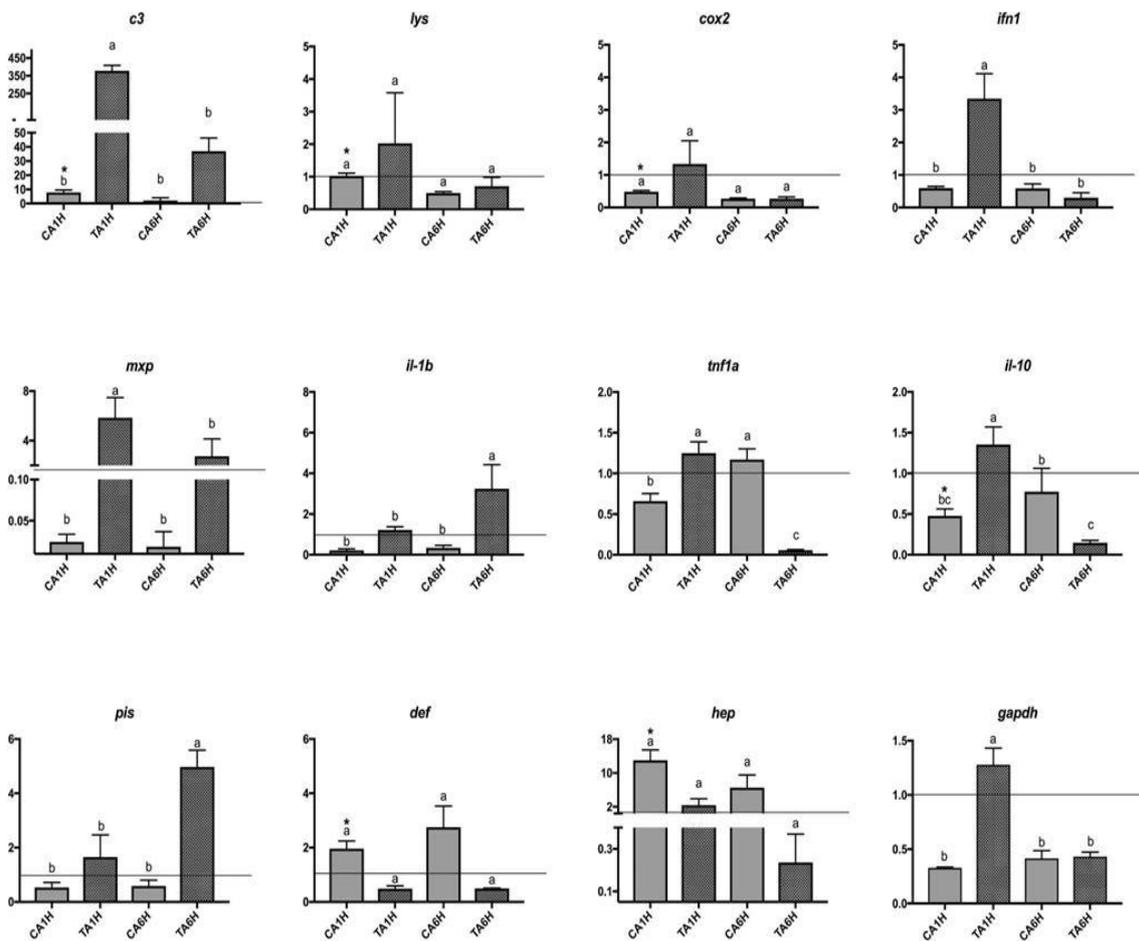


Figura 19. Niveles de expresión génica en tejido linfóide asociado al tracto intestinal 1h y 6h tras estrés por exposición al aire. La PCR cuantitativa de marcadores mRNA específicos de los procesos de respuesta inmune innata (complemento proteína *c3*, lisozima, *cox2*, *mxo*, piscidin, defensin y hepcidin), las citoquinas inumnes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* y *il-10*) y *gapdh*. Los asteriscos indican diferencias entre basal y 1h-post estrés en el alimento control, mientras que diferentes letras marcan diferencias significativas entre grupos experimentales. Leyenda: C=alimento control; T=alimento Trp; A=exposición al aire; 1H/6H= 1/6 h post estrés.

Los resultados de la PCA (Figura 21) mostraron dos grupos diferentes de genes (*cox2*, *c3* complemento, *mxp* y *gadph*), que estaban completamente separados del segundo (*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*); mientras que otros genes como *ifn1*, *il-1b* y *def* no explicaron las relaciones entre ningún grupo dietético para ninguno de los tratamientos.

Los resultados de PCA indicaron que los primeros cinco componentes explicaron el 99,5% de la varianza acumulada; así, los genes que mejor explicaron la asociación con los tratamientos fueron *gadph* (44,6%), *cox2* (28,7%), *ifn1* (15,4%), *il-1b* (8,6%) y *tnf1a* (2,0%). Por otro lado, la PCA entre tratamientos también mostró dos grupos, el primer grupo incluyó CA1H, TA6H, TN6H, CA6H y CN6H, que se separó del segundo grupo (TN1H y TA1H). Finalmente, los peces del tratamiento CN1H se separaron totalmente de ambos grupos. De acuerdo con este análisis, los tratamientos que incluían 1% de Trp (dieta T) incluían un mayor número de genes sobre-expresados del segundo grupo (*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*) y no mostraron ninguna relación con esos genes del primer grupo (*gadph*, *cox2*, *c3* complemento y *mxp*). Además, los peces alimentados con la dieta C y expuestos a estrés por confinamiento (CN1H) tuvieron una mayor expresión de genes del segundo grupo (*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*).

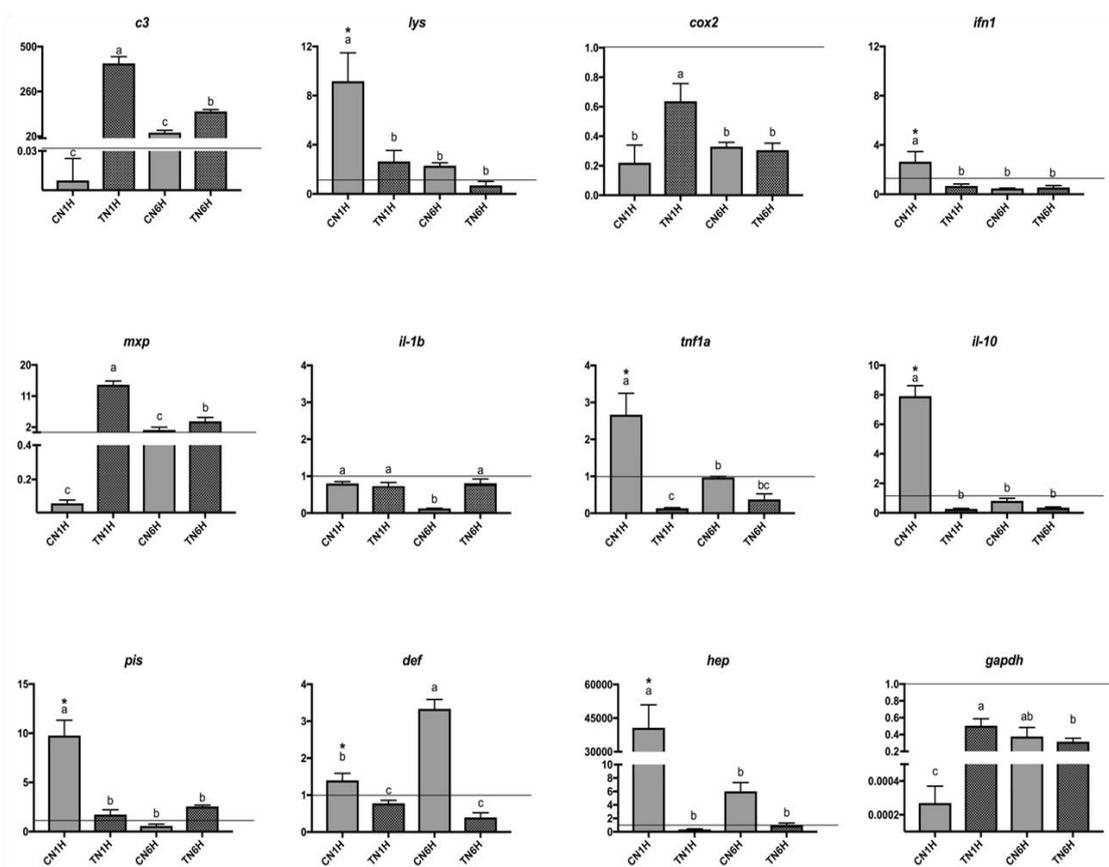


Figura 20. Niveles de expresión génica en tejido linfóide asociado al tracto intestinal 1h y 6h tras estrés por confinamiento. La PCR cuantitativa de marcadores mRNA específicos de los procesos de respuesta inmune innata (complemento proteína *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidin, defensin y hepcidin), las citoquinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* y *il-10*) y *gadph*. Los asteriscos indican diferencias entre basal y 1h-post estrés en el alimento control, mientras que diferentes letras marcan diferencias significativas entre grupos experimentales. Leyenda: C=alimento control; T=alimento Trp; N=confinamiento; 1H/6H= 1/6 h post estrés.

La expresión génica después del tratamiento de estrés por confinamiento mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) a 1 hps y a 6 hps para *gapdh*, complemento *c3*, *cox2* y *mxp*. La expresión génica de *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *il-10*, *pis* y *hep*, se elevó por el estrés por confinamiento sólo en grupo control a 1 hps, mostrando una expresión decreciente a 6 hps en *il-1b* para la dieta de control y una mayor expresión para *def*.

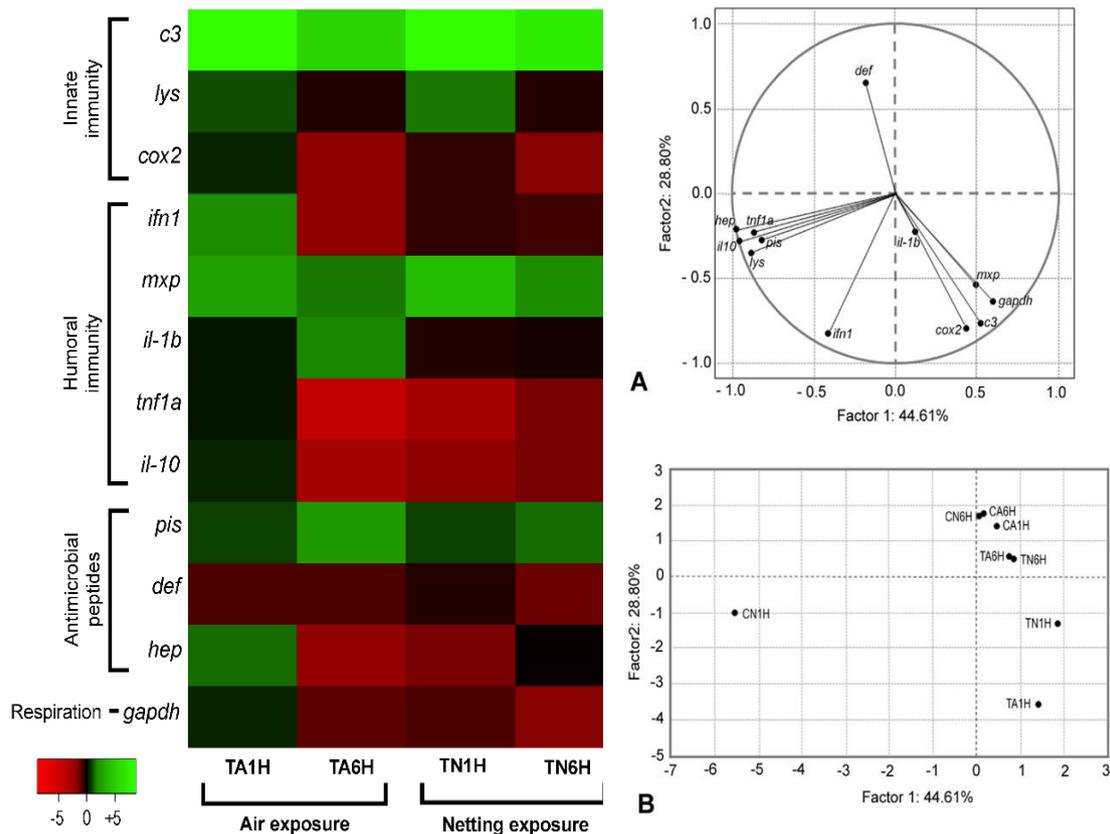


Figura 21. Representación gráfica por medio de un *heatmap* de los cambios en expresión génica de los marcadores moleculares evaluados en el tejido intestinal de corvina alimentada con distintas dietas y sometida a distintos agentes estresores, y resultados del análisis de componentes principales. Más detalles en Asencio-Alcudia et al. (2019).

Los dos factores estresantes de manejo probados en este estudio, que son bastante comunes en las prácticas de acuicultura estándar, dieron como resultado algunas respuestas de expresión génica muy diferentes dependiendo del tipo de estrés, la suplementación dietética de Trp y el tiempo de recuperación (tiempo posterior al estrés). Algunas de las diferencias observadas en la expresión génica pueden estar relacionadas con mecanismos de retroalimentación positiva o negativa, como la señalización de IL-10 de péptidos antimicrobianos. La exposición al aire puede tener un efecto importante al distinguir las dos respuestas. Las diferencias entre las dos respuestas al estrés pueden estar relacionadas con vías reguladoras de la transcripción específicas de los genes inmunes locales del intestino. La inclusión de 1% de triptófano en las dietas para juveniles de corvina tuvo efectos claros y pronunciados en las funciones fisiológicas,

como es de esperar, ya que este suplemento en particular implica el eje simpático del HPI y del sistema triptófano, que influyen en las funciones fisiológicas vitales. El efecto general de la dieta suplementada con triptófano sobre la inmunidad de la mucosa del intestino pareció permitir una respuesta más equilibrada, aliviando algunos de los aspectos más dañinos de la respuesta al estrés, como la expresión elevada de AMP que podría cambiar la microbiota. Además, se observó un aumento significativo en las moléculas inmunes innatas inespecíficas de *mnp*, *mnp* y *c3* que deberían ayudar a promover al sistema inmunitario de manera inespecífica contra las infecciones y combatiendo así infecciones oportunistas que pudieran derivarse de un mal manejo de los animales. Por último, el balance de energía parece beneficiarse de un aumento en la expresión en *gapdh* que está relacionado con el requisito de triptófano como sustrato para la síntesis de NAD⁺.

Conclusiones

Los resultados de este primer estudio muestran como los efectos sobre el sistema regulador del estrés del organismo, tanto a nivel molecular como fisiológico, fueron más patentes en los peces alimentados con la dieta suplementada con 1% en triptófano. Sin embargo, el uso del aspartato como aditivo también produjo variaciones, aunque no significativas de los marcadores de estrés en algunos casos (especialmente en estrés por confinamiento), por lo que no se descarta su posible uso como atenuante del estrés para determinados estresores y situaciones puntuales del ciclo de producción. De igual forma, los parámetros inmunes mejoraron con las dietas suplementadas, especialmente con las de triptófano. En este sentido, y teniendo además en cuenta los resultados obtenidos de los marcadores plasmáticos, la expresión de efectores de respuesta inmune innata y humorales, y péptidos antimicrobianos revelaron que la suplementación dietética con 1% de triptófano puede ser considerada como una estrategia nutricional adecuada para prevenir y/o aliviar el estrés manipulación. Estos resultados que fueron posteriormente corroborados con estudios de expresión génica de marcadores moleculares del sistema inmune en el intestino anterior y, por lo tanto, demostrando que una dieta suplementada en triptófano también puede tener un efecto positivo no solo en la respuesta inmune sistémica, sino también local.

Igualmente, dentro de esta actividad se han llevado a cabo los primeros trabajos sobre evaluación de estrés en corvina mediante una técnica no invasiva, el análisis del mucus epidérmico. Los resultados obtenidos demuestran que los metabolitos del mucus epidérmico pueden considerarse buenos biomarcadores no invasivos para evaluar las respuestas fisiológicas de los peces; siendo la relación glucosa / proteína la más valiosa y fiable de las variables analizadas.

A nivel de marcadores de mucus epidérmico, la suplementación dietética con triptófano parece ser protectora, mitigando el estrés agudo provocado por la exposición al aire; en contraste, el aspartato adicional produce un exceso de exudación de los metabolitos del mucus y el cortisol, y una pérdida de energía indeseable. Este patrón fue similar al obtenido para los parámetros plasmáticos y, consecuentemente, se ha demostrado mostró una relación positiva para los marcadores de estrés entre el plasma y el mucus de la piel.

Tarea A.1.2. Optimización de la concentración de aditivo y tiempo de administración

En este caso, tras comprobar que el triptófano (Trp) muestra los mejores resultados en cuanto a atenuación del estrés (ver resultados Tarea A.1.1), se llevaron a cabo varios cultivos experimentales para optimizar la concentración de Trp en la dieta y el tiempo de administración del mismo antes de someter a los peces a situaciones de estrés.

Adicionalmente, con las relaciones concentración-tiempo más adecuadas para la reducción del estrés (tres días de alimentación con Trp, ver apartado Resultados) se llevó a cabo un análisis transcriptómico masivo mediante RNA-Seq. Aunque esta tarea no estaba prevista en el proyecto, la continua colaboración entre grupos e intercambio actualizado de resultados favorecieron esta actividad con el fin de dilucidar los mecanismos diferenciales entre grupos que pudiesen dar luz respecto de los procesos que explicarían las variaciones de los marcadores de estrés en función de la dieta.

Metodología

Cultivos experimentales

Se diseñaron varios cultivos experimentales con dos factores: la concentración del aditivo en la dieta (Trp) y el período de alimentación. Varios lotes de corvinas ($40,8 \pm 3,3$ g de peso, media \pm desviación estándar) fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, pero alimentándolas con diferentes dietas: 0 (control); 0,25; 0,5 y 1% de Trp añadido. Cada dieta fue suministrada durante diferentes tiempos antes de someter a los peces a un estrés por exposición al aire durante 3 min a los 1, 3 y 5 días de alimentación con las dietas experimentales. Tras cada estrategia diferente de alimentación, los peces fueron muestreados y analizados siguiendo los procedimientos descritos en la Tarea A.1.1. Para todos los tratamientos, también se extrajeron muestras de peces en condiciones basales, antes de estresarlos, con el fin de comparar esos datos con los obtenidos de los grupos sometidos a estrés.

Parámetros plasmáticos

Tal y como se ha indicado, los peces en esta tarea fueron muestreados y analizados siguiendo los procedimientos descritos en la Tarea A.1.1, por lo que la información que se detalla en este apartado es reducida, si bien la aproximación analítica en esta tarea ha sido mucho más reduccionista que en la anterior. En particular, los parámetros plasmáticos de estrés medidos fueron la glucosa, el lactato, las proteínas solubles y el cortisol. Para medir los niveles de glucosa, lactato y proteínas se usaron kits comerciales de Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida) y Spinreact (Lactate Ref. 1001330) adaptados a microplacas de 96 pocillos. La concentración de cortisol en plasma fue cuantificada mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2014). Para la extracción del mismo, el plasma era diluido con dietil éter (1:10). Tras decantar, el sobrenadante era traspasado a otro tubo y el dietil éter era evaporado mediante nitrógeno gaseoso. Luego, la sustancia remanente se diluía (1:6) con un tampón de extracción suministrado por el fabricante, y constituía la muestra a analizar. El límite inferior de detección para este ensayo ELISA es 0,1

ng/mL (81 % de unión). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo son 9,8 y 4,6 % respectivamente, con un porcentaje de recuperación medio de 90%. Las principales reactividades cruzadas son con prednisolona (47,4 %), cortisona (15,8 %), 11-deoxicortisol (15 %), prednisona (7,8 %), corticosterona (4,81%), 6- β -hidroxicortisol (1,37 %), y 17-hidroxiprogesterona (1,36 %). Para todas las medidas espectrofotométricas fue usado un lector de microplacas Tecan Sunrise, utilizando el software v2.5 Magellan para Windows (Tecan Austria, Salzburgo, Austria).

Análisis transcriptómico masivo por RNA-Seq

El análisis de RNA-Seq se centró en la alimentación durante tres días. Los grupos incluidos en el análisis fueron el grupo control (C), grupo 0,25 Trp (L), grupo 0,5 Trp (M), y grupo 1 Trp (H). Dada su relevancia en el análisis del nivel plasmático de cortisol, en el análisis de RNA-Seq se incluyó tanto el nivel basal de cortisol plasmático (B) así como también el grupo al cabo de 1 hora post estrés (P1) por exposición al aire.

El RNA total fue extraído de acuerdo a la metodología descrita previamente utilizando TRI Reagent (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y la integridad del RNA fue chequeada mediante Bioanalyzer 2100, y fueron seleccionadas las muestras con un número de integridad superior a 7 para la construcción de la librería de RNA. La primera (por medio de random primer y transcriptasa reversa M-MLV (RNasa H) y segunda hebra de cDNA (DNA polimerasa I y RNasa H) fueron sintetizadas. El secuenciamiento de la librería fue preparada por la fragmentación al azar del cDNA, seguido del ligamiento del adaptador en 5' y 3'. El secuenciamiento fue realizado en la plataforma Illumina NovaSeq6000™ (2x100bp paired-end raw reads; con al menos 30M reads/muestra). El control de calidad sobre los reads crudos fue realizado con el software libre FastQC (Andrews, 2010) y las secuencias del adaptador fueron eliminadas con la herramienta Cutadapt (Martin, 2013). Los *reads* crudos fueron mapeados utilizando el software Tophat2 (Kim et al., 2013). Para el ensamblaje de los reads en transcritos se utilizó el paquete Cufflinks2 (Trapnell et al., 2013), y luego la información fue fusionada con Cuffmerge en archivos de gen único. Los datos de expresión fueron normalizados mediante la media de los promedios geométricos del total de los transcritos expresados en todas las muestras y expresadas como fragmentos por kilobases de exón por millón de lecturas ("*reads*") mapeadas (FPKM). Para realizar el análisis de expresión diferencial, se utilizó el paquete DESeq2 (Love et al., 2014) y ajustado para corregir el valor de P (ajustado por FDR) < 0,05.

Análisis estadístico

Excepto cuando se expresa lo contrario, todos los valores en tablas y gráficas están representados como media \pm ES (error estándar de la media) y en todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se estableció en $P < 0.05$. La normalidad y homocedasticidad de las variables de análisis fueron comprobadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de un factor y un posterior test de Duncan para identificar grupos homogéneos; en el caso de comparaciones entre solo dos grupos fue usada una t de Student.

Resultados

Parámetros plasmáticos

Los mejores resultados (Figuras 22 y 23) en términos de minimización de las diferencias entre estados estrés y condición basal fueron obtenidos para los 3 días de administración con la dieta suplementada con 0,5-1% Trp. Los resultados obtenidos parecen indicar que períodos de administración y/o concentraciones de triptófano mayores se podría reducir la respuesta secundaria al estrés (aumento de metabolitos plasmáticos), aunque el cortisol plasmático (respuesta primaria) se mantendría estable solo para el tratamiento de 0,5% Trp administrado a corto plazo.

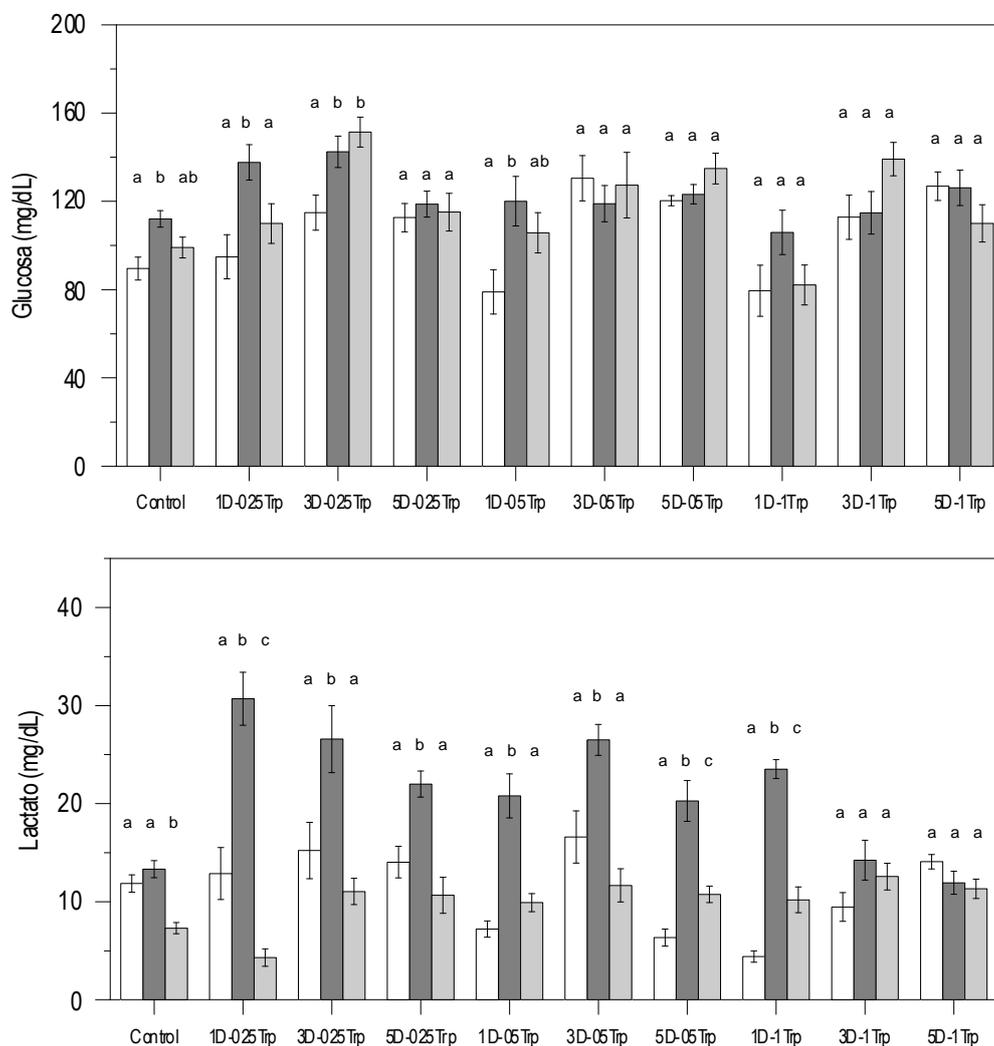


Figura 22. Glucosa y lactato plasmáticos (mg/dL, media \pm SE) en corvinas sometidas a los tratamientos experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre basal (\square), 1h (\blacksquare) y 6h (\blacksquare) post-estrés. Leyenda: 1D/3D/5D = alimentación con piensos experimentales durante 1, 3 y 5 días antes de estrés; 025Trp/ 050Trp/1Trp = pienso suplementado con triptófano al 0,25; 0,5 y 1 %.

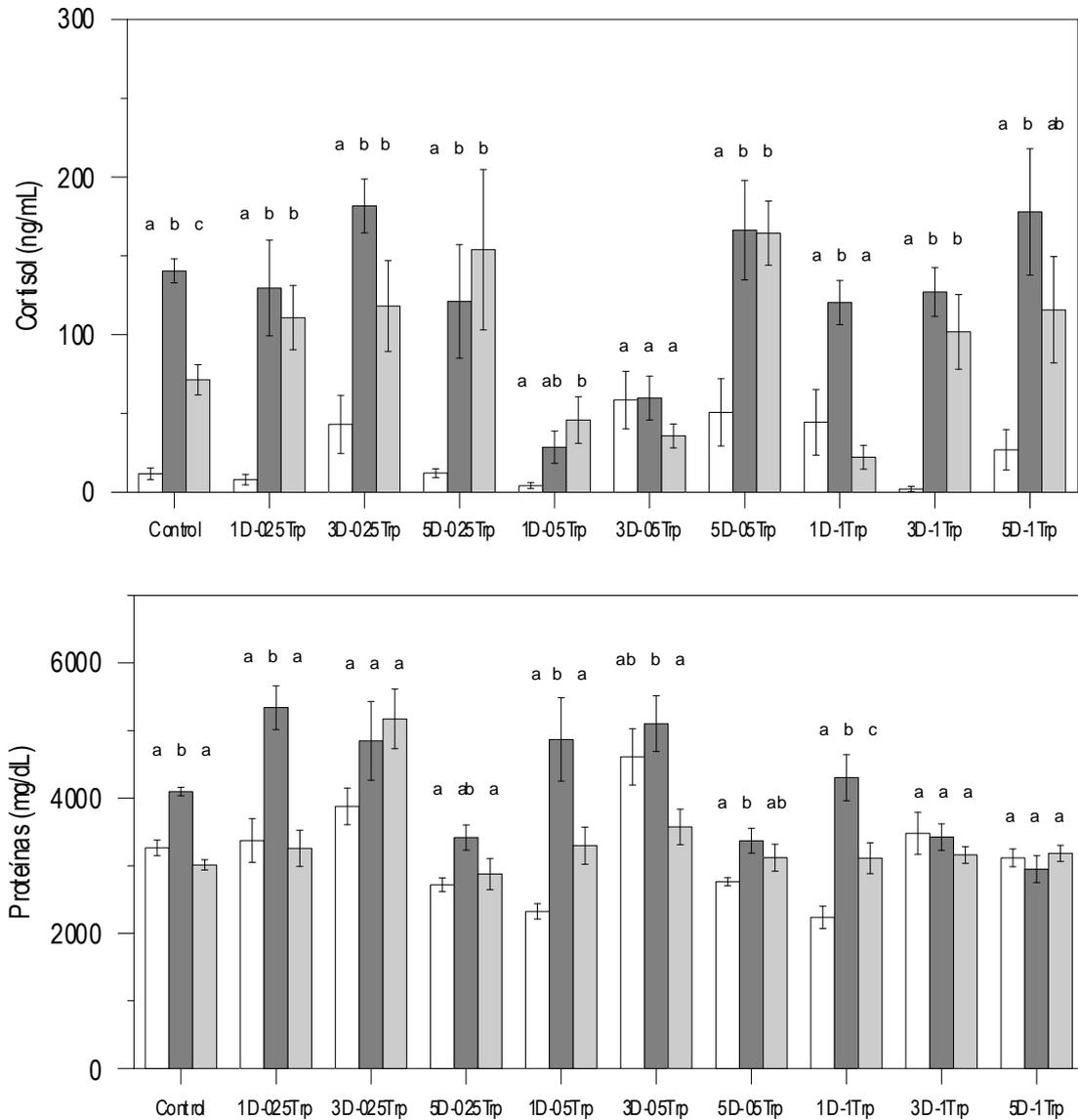


Figura 23. Niveles de cortisol (ng/mL) y proteínas (mg/dL) plasmáticos (media \pm SE) en corvinas sometidas a los tratamientos experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre basal (\square), 1h (\blacksquare) y 6h (\blacksquare) post-estrés. Leyenda: 1D/3D/5D = alimentación con piensos experimentales durante 1, 3 y 5 días antes de estrés; 0.25Trp/0.50Trp/1Trp = pienso suplementado con triptófano al 0,25; 0,5 y 1 %.

Análisis transcriptómico masivo por RNA-Seq

La lectura de la secuenciación masiva por RNA-Seq muestra un total de lecturas entre 30 y 40 millones con un total de 30 a 41.5G de pares de bases. La lectura de GC (%) fue alrededor del 50% y bastante similar entre el total de muestras. Tanto el Q20 (*phred quality score* sobre 20) como el Q30 (*phred quality score* sobre 30) mostraron valores sobre 90, lo que indicó la alta calidad de las secuencias obtenidas (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los datos crudos obtenidos mediante RNA-Seq. Se representa el nombre identificador para cada muestra (Sample ID), el número total de lecturas (contabilizadas tanto en sentido forward y reverse), número total de pares de base (bp) contabilizados, porcentaje de guaninas y citosinas (GC), adeninas y timinas (AT), phred quality score sobre 20 (Q20) y 30 (Q30). La columna simple ID indica el tejido (HK: riñón cefálico; HP: cerebro + pituitaria), grupo experimental (C: control; L: 0,25 Trp; M: 0,5 Trp; H: 1 Trp), y condición (B: basal; P1: 1 hora post-stress)

Sample ID	Total reads	Total read bases (bp)	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
HK_CB	41,590,468	4,200,637,268	51.336	48.66	97.764	93.609
HK_CP1	32,938,098	3,326,747,898	51.402	48.6	97.849	93.828
HK_LB	35,004,808	3,535,485,608	50.34	49.66	97.967	94.066
HK_LP1	38,867,646	3,925,632,246	50.588	49.41	97.796	93.68
HK_MB	39,549,218	3,994,471,018	50.88	49.12	97.784	93.662
HK_MP1	32,906,776	3,323,584,376	50.407	49.59	97.786	93.633
HK_HB	35,850,874	3,620,938,274	50.217	49.78	97.923	93.945
HK_HP1	41,008,230	4,141,831,230	50.633	49.37	97.797	93.653
HP_CB	32,165,670	3,248,732,670	50.12	49.88	97.862	93.795
HP_CP1	39,337,928	3,973,130,728	51.105	48.9	98.12	94.342
HP_LB	34,914,078	3,526,321,878	50.405	49.59	97.673	93.447
HP_LP1	41,763,064	4,218,069,464	51.071	48.93	97.93	93.963
HP_MB	40,442,366	4,084,678,966	49.922	50.08	98.133	94.362
HP_MP1	34,554,192	3,489,973,392	50.511	49.49	97.683	93.434
HP_HB	33,337,956	3,367,133,556	50.734	49.27	97.854	93.802
HP_HP1	30,358,698	3,066,228,498	50.188	49.81	98.033	94.182

Al realizar el análisis sobre el conjunto de datos obtenidos de muestras secuenciadas masivamente por RNAseq en la corvina, se observó que los genes con mayor representación para el riñón cefálico fueron la hemoglobina alfa y hemoglobina beta para un amplio rango de especies (*Oreochromis niloticus*, *Seriola lalandi dorsalis*, entre otras). A nivel de cerebro y pituitaria se detectó con sobre-representación los genes citocromo c oxidasa, somatotropina, proopiomelanocortina B, somatotropina, y hormona del crecimiento.

La anotación de los transcritos se realizó sobre datos previamente publicados a partir de un estudio realizado por el grupo del Dr. Costas Tsigenopoulos (Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Grecia). Al comparar nuestros transcritos con esta base de datos, se obtuvo entre un 40-60% de anotación. Esto indica que un alto porcentaje de las muestras secuenciadas (40-60%) no dieron un “match” (emparejamiento) positivo con la base de datos, por lo que tal información no podría ser utilizada basándonos exclusivamente en ella. Para evitar perder información que pudiese contener una relevante información biológica que entregue pistas de los procesos modulados debido a la alimentación con Trp, actualmente se está trabajando sobre tales datos en una estrategia de secuenciación *de novo*, si bien los resultados obtenidos mediante esta aproximación se consideran de gran interés científico.

Conclusiones

La alimentación a corto plazo (menos de 5 días) a concentraciones de 0,5-1% Trp en la dieta es la estrategia alimenticia que mejores resultados ofrece en cuanto a la atenuación del estrés por exposición al aire en la corvina. Esto coincide con lo descrito con otra especie cultivada en España como es el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), especie de pez plano en la que 2 días de alimentación con una dieta con 1% de suplementación con Trp son suficientes para mejorar la respuesta al estrés (Herrera et al., 2019).

Tarea A.1.3. Ensayos bajo condiciones crónicas de estrés

Objetivo

Según los resultados de los experimentos anteriores se decidió usar el triptófano como aditivo atenuante del estrés para probar su eficacia en situaciones de estrés crónico durante 4 meses de cultivo. Debido a la larga duración del experimento la concentración de triptófano en el pienso fue la mínima (0,25%) e inferior a la evaluada en actividades anteriores.

Metodología

Fabricación y análisis del pienso

Como dieta control fue usado un pienso comercial (Skretting L-4 Alterna). Este pienso fue triturado y mezclado con agua (400 mL Kg-1 pienso seco) y triptófano. La cantidad de Trp fue 0% y 0,25% para el pienso control y dieta enriquecida con Trp, respectivamente. La mezcla fue posteriormente moldeada en tiras de 2 mm de diámetro y 20-25 cm de longitud que se secaron a 60 °C durante 24 h. Tras el secado éstas fueron cortadas en pellets de 2-3 mm que se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Los piensos experimentales fueron posteriormente analizados por CG-EM para determinar el contenido final en aminoácidos. La homogenización del alimento se realizó mediante hidrólisis básica según Dai et al. (2014). Para la derivatización, 100 µl de solución de muestra homogenizada fueron vertidos a un vial de 2 mL, añadiendo 200 µL de una solución de agua:metanol:piridina (6:3.2:0,8) y 40 µL de isobutil cloroformiato, fue agitada intensamente en un vortex durante 30 s a temperatura ambiente. Luego fueron añadidos 200 µL de cloroformo (1% ECF) y los compuestos derivatizados fueron extraídos de la fase orgánica tras vortear el tubo durante 20 segundos. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y luego transferida a un nuevo vial con una inserción fijada de 200 µL. Las alícuotas de los extractos derivatizados se inyectaron en un Shimadzu GC-MS (GCMS-TQ8030) equipado con una columna de capilaridad de sílica Agilent HP-5MS (30m x 0.25mm i.d., 0,25 mm grosor).

El sistema de cromatografía de gases estaba equipado con un Puerto de inyección *split/splitless* funcionando en modo *splitless*. La temperatura fue programada de 40 °C (5 min) a 270 °C (20 min) incrementando la temperatura a 5 °C/min. La línea de transferencia se calentó a 280 °C, El gas transportador fue helio con un flujo constante de 1 mL min⁻¹ (velocidad media 36 cm s⁻¹). El espectrómetro de masas funcionó con ionización de electrones (EI) a 70eV, en modo scan (75-500 amu). La identificación de los aminoácidos derivatizados se realizó comparando los tiempos de retención del cromatógrafo de gases y espectros de masas con los de compuestos puros. Todos los espectros de masas fueron también comparados con la biblioteca NIST 11. La cuantificación de las muestras se realizó mediante un método externo estándar siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras.

Cultivos experimentales y muestreos

Los juveniles de corvina ($n = 150$) fueron adquiridos en MARESA (Ayamonte, España) y mantenidos en el IFAPA Centro Agua del Pino en un sistema de flujo abierto a $19\text{ °C} \pm 0.04\text{ °C}$, a una densidad de cultivo de 3 Kg m^{-3} , manteniendo el oxígeno disuelto en el agua por encima de la saturación. Tras el período de aclimatación de 3 semanas se muestrearon 8 lotes y se distribuyeron al azar en 8 tanques circulares (250 L; 0.5 m^2 ; 30 peces por tanque). La longitud total y peso totales fueron $14,5 \pm 0,2\text{ cm}$ y $28,5 \pm 1,2\text{ g}$, respectivamente.

Se llevaron a cabo cuatro tratamientos por duplicado: alimento control + basal (CB); alimento control + estrés (CE); alimento suplementado con Trp + basal (TB); y alimento suplementado con Trp + estrés (TE). La densidad de cultivo inicial fue diferente para cada tratamiento: $4,3\text{ Kg m}^{-3}$ y $8,6\text{ Kg m}^{-3}$ para tanques CB/TB y CE/TE, respectivamente. Todos los tanques fueron alimentados “*ad libitum*” con comedores automáticos de cinta deslizante (aproximadamente 1% de la biomasa a diario) durante 120 días. Las condiciones físico-químicas del agua fueron las mismas que las del periodo de aclimatación. Los tanques CB y TB no se sometieron a ningún procedimiento estresante (excepto la limpieza y supervisión normales). Sin embargo, los peces de los tratamientos CE y TE fueron sometidos a procesos de persecución y captura con red (sin exponer al aire) diariamente durante 5 minutos, cinco veces al día.



Figura 24. Corvinas en los tanques experimentales

Tras los 120 días de cultivo, diez peces de cada tratamiento (CB, CE, TB, TE) se muestrearon para evaluar distintos parámetros biométricos y fisiológicos. Los peces fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestésico (1mL/L de fenoxietanol), y pesados y medidos. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal con jeringas de 1 mL heparinizadas. Posteriormente esta sangre fue centrifugada (1.200 g durante 10 min a 4 °C) para la extracción de plasma y éste almacenado a -80 °C hasta su uso. Los peces fueron también diseccionados para obtener muestras de hígado, intestino y cerebro, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso.



Figura 25. Ejemplo de muestreo de corvinas para medir su talla.

Análisis de marcadores plasmáticos de estrés

Los parámetros plasmáticos medidos fueron la glucosa, el lactato, proteínas totales solubles y el cortisol. Para medir los niveles de glucosa, lactato y proteínas se usaron kits comerciales de Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida) y Spinreact (Lactate Ref. 1001330) adaptados a microplacas de 96 pocillos. La concentración de cortisol en plasma fue cuantificada mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2014). Para la extracción del mismo, el plasma era diluido con dietil éter (1:10). Tras decantar, el sobrenadante era traspasado a otro tubo y el dietil éter era evaporado mediante nitrógeno gaseoso. Luego, la sustancia remanente se diluía (1:6) con un tampón de extracción suministrado por el fabricante, y constituía la muestra a analizar. El límite inferior de detección para este ensayo ELISA es 0,1 ng/mL (81 % de unión). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo son 9,8 y 4,6 % respectivamente, con un porcentaje de recuperación medio de 90%. Las principales reactividades cruzadas son con prednisolona (47,4 %), cortisona (15,8 %), 11-deoxicortisol (15 %), prednisona (7,8 %), corticosterona (4,81%), 6- β -hidroxicortisol (1,37 %), y 17-hidroxiprogesterona (1,36 %). Para todas las medidas espectrofotométricas fue usado un lector de microplacas Tecan Sunrise (Tecan Austria, Salzburgo, Austria).

Análisis del metabolismo del triptófano y derivados

Las concentraciones de triptófano y serotonina en cerebro e intestino, y ácido quinolínico, kinurenina y triptófano en hígado fueron determinadas mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, según Sano et al. (2014). El tejido fue homogenizado mediante disrupción ultrasónica con 10 volúmenes de solución fría conteniendo 50 μ L HClO₄ (12%) y 100 μ L de agua Milli-Q. Para la derivatización, 100 μ l de solución estándar o plasma homogenizado fueron vertidos a un vial de 2 mL, añadiendo 200 μ L de una solución de agua:metanol:piridina (6:3.2:0,8) y 40 μ L de isobutil cloroformiato, fue agitada intensamente en un vortex durante 30 s a temperatura ambiente. Luego se le añadieron 5 mL de una solución de NaCl (5%) y un twister (1x1 cm, 0,063 mL) y fue agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla final se analizó con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo y un sistema de termodesorción.

Análisis de marcadores de metabolismo energético

La actividad de enzimas del metabolismo energético fue medida mediante espectrofotometría en el tejido hepático de los peces homogeneizado. Para ello, los hígados fueron homogenizados en frío con un sonicador en 10 volúmenes de solución tampón compuesta de 50 mmol L⁻¹ HCl (pH 7.5), 15 mmol L⁻¹ 2-mercaptoethanol, 100 mmol L⁻¹ KF, 5 mmol L⁻¹ EDTA, 5 mmol L⁻¹ EGTA, y un inhibidor de proteasas. Este homogenado fue centrifugado (30 min a 10.000 \times g) y el sobrenadante extraído para su análisis. Las tasas enzimáticas se determinaron en función de las variaciones de absorbancia de NAD(P)H a $\lambda = 340$ nm. Las reacciones comenzaron por adición de los homogeneizados (15 μ L) a la solución proteínica pre-establecida, omitiendo el sustrato en los controles (volumen final de 275-295 μ L) y permitiendo que las reacciones sucediesen a 15 °C durante los tiempos establecidos (5-15 min). Las enzimas que se midieron son aquellas relacionadas con el metabolismo energético, tales como alanina aminotransferasa (AlaT),

aspartato aminotransferasa (AspA), fructosa-1,6-bifosfatasa (FBP), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK). Para las condiciones específicas de cada enzima se aplicaron los protocolos descritos por Polakof et al. (2006).

Análisis de parámetros relacionados con el estrés en mucus epidérmico

Las muestras de mucus epidérmico fueron recogidas de forma no invasiva según lo descrito por Fernández-Alacid et al. (2018). Brevemente, el mucus de la piel de los peces anestesiados fue arrastrado con un portaobjetos de cristal estéril a lo largo de la línea lateral en sentido hacia la aleta caudal y acumulado en un tubo estéril. Para asegurar un volumen adecuado para el análisis se realizaron 10 pools de 2-3 animales para cada tratamiento. Antes de procesar el mucus, las escamas presentes en las muestras fueron retiradas individualmente. Se realizó posteriormente una homogenización mecánica usando un agitador estéril Teflon y las muestras se centrifugaron a 14.000 x g y 4 °C durante 15 min. El sobrenadante resultante fue extraído y almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis.

La concentración de proteínas solubles en la muestra de mucus homogenizada se determinó según el método Bradford con albúmina de suero bovino (BSA; Sigma) como estándar. La densidad óptica (DO) fue terminada a $\lambda = 596$ nm con un lector de microplacas (Infinity Pro200, Tecan). Los valores de proteínas se expresaron como mg de proteínas por mL de mucus epidérmico. Las concentraciones de glucosa y lactato fueron determinadas con kits colorimétricos comerciales (Spinreact) siguiendo las instrucciones del fabricante. La DO se midió a $\lambda = 505$ nm con un lector de microplacas (ver arriba). Los valores de glucosa y lactato se expresaron en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína en mucus. La concentración de cortisol se midió con un kit ELISA comercial (IBL International) según lo descrito por Fernández-Alacid et al. (2018, 2019). La DO fue medida a $\lambda = 450$ nm con un lector de microplacas (ver arriba). Las concentraciones de cortisol se expresaron como ng/g de proteína en mucus. El poder antioxidante férrico (FRAP) se determinó mediante un kit colorimétrico comercial (Ferric Antioxidant Status Detection Kit, Invitrogen) según lo descrito por Sanahuja et al. (2019), expresando las unidades como nmol FRAP por mg de proteína.

Para medir la actividad bactericida del mucus epidérmico fueron usadas una bacteria no patógena para peces, *Escherichia coli*, del Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona, y otra bacteria patógena, *Pseudomonas anguilliseptica* (número CECT 899T) de la Colección de Cultivos Tipo Española (CECT, Universidad de Valencia). Esta actividad fue medida por absorbancia en placas de 96 pocillos de fondo plano. Alícuotas de 100 μL previamente cultivadas con bacterias más 100 μL de medio fueron incubadas en paralelo con alícuotas de 100 μL de bacterias cultivadas con 100 μL de mucus a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína de mucus. La absorbancia de las bacterias se midió a $\lambda = 400$ nm cada 30 min durante 14 h en placas con 96 pocillos. Como controles se usaron triplicados de mucus epidérmico (100 μL) a la concentración de proteínas arriba señalada más 100 μL de medio.

Análisis estadístico

Excepto cuando se indique lo contrario, todos los valores en tablas y gráficas están representados como media \pm ES (error estándar de la media) y en todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. La normalidad y homocedasticidad de las variables de análisis fueron comprobadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de un factor y un posterior test de Duncan para identificar grupos homogéneos; en el caso de comparaciones entre solo dos grupos fue usada una t de Student.

Resultados

Fabricación y análisis del pienso

En la Tabla 6 se muestra la composición en aminoácidos de los dos piensos experimentales usados, observándose una mayor concentración de triptófano en uno de ellos, tal y como se buscaba con el diseño experimental planteado y la suplementación de este aminoácido esencial en el pienso comercial.

Tabla 6. Composición en aminoácidos de los piensos experimentales (mg g^{-1}) usados en el estudio de estrés crónico en juveniles de corvina.

Aminoácido	Dieta Control	Dieta Trp
Asparagina	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02
Ácido aspártico	13,2 \pm 2,53	13,2 \pm 2,53
Cisteína	0,06 \pm 0,06	0,06 \pm 0,06
Ácido glutámico	20,7 \pm 1,38	20,7 \pm 1,38
Glutamina	0,19 \pm 0,06	0,19 \pm 0,06
Histidina	1,01 \pm 0,21	1,01 \pm 0,21
Isoleucina	1,35 \pm 0,33	1,35 \pm 0,33
Leucina	3,85 \pm 0,56	3,85 \pm 0,56
Lisina	2,49 \pm 0,42	2,49 \pm 0,42
Metionina	0,31 \pm 0,15	0,31 \pm 0,15
Fenil alanina	2,45 \pm 0,35	2,45 \pm 0,35
Prolina	4,62 \pm 0,60	4,62 \pm 0,60
Serina	62,2 \pm 20,7	62,2 \pm 20,7
Treonina	4,54 \pm 0,67	4,54 \pm 0,67
Triptófano	0,53 \pm 0,04	0,76 \pm 0,01
Tirosina	0,92 \pm 0,18	0,92 \pm 0,18
Valina	3,34 \pm 0,49	3,34 \pm 0,49

Crecimiento y marcadores plasmáticos de estrés

En la Tabla 7 se resumen los datos biométricos y de marcadores plasmáticos obtenidos en el experimento. Ni la alimentación ni el estrés crónico afectaron al crecimiento de los peces cultivados bajo distintas condiciones. Los niveles de cortisol variaron para el alimento control entre peces estresados y no estresados, pero fueron constantes en los peces alimentados con suplemento de triptófano, indicando que estos suplementos atenúan la respuesta de estrés crónico, hecho también apoyado por la disminución de los niveles de lactato en plasma.

Tabla 7. Datos biométricos y concentraciones de marcadores plasmáticos (media±SE) obtenidos en el experimento. Glucosa, lactato y proteínas expresados en mg/dL, y cortisol en ng/mL. Letras minúsculas indican diferencias entre estados en un mismo alimento, y mayúsculas entre alimentos en un mismo estado (CB/CE=alimento control basal/estresado; TB/TE=suplementado Trp basal/estresado).

Grupo	Longitud (cm)		Peso (g)		SGR (día ⁻¹)	Marcadores plasmáticos			
	Inicial	Final	Inicial	Final		Glucosa	Lactato	Proteínas	Cortisol
CB		18,5±0,34		59,1±3,54	0,58±0,05	120±4,21	30,9±4,16	4132±217	1,45±0,4 ^{a,A}
CE	14,5±0,2	18,2±0,29	28,5±1,18	55,9±2,87	0,54±0,04	119±7,73	30,6±4,00 ^A	4225±213	4,88±0,98 ^b
TB		18,6±0,25		59,1±2,33	0,60±0,03	125±6,61	37,9±4,43 ^a	4507±250	3,33±0,7 ^b
TE		18,5±0,34		60,3±3,03	0,60±0,05	120±9,43	13,6±1,9 ^{b,A}	3844±252	4,30±0,8

Respecto a la acumulación de Trp, serotonina, kinurenina y ácido quinolínico (Figuras 26 y 27), la presencia en el cerebro de Trp y serotonina no varió entre tratamientos; sin embargo, la concentración en intestino, resultados descritos por primera vez en peces, fue mayor en peces suplementados con Trp, por lo que podemos concluir que el intestino, como ocurre en mamíferos, es un tejido clave en la acumulación de triptófano y de sus metabolitos.

La concentración de serotonina en cerebro en peces no estresados fue mayor en la dieta Trp. Este parámetro no varió significativamente para la dieta control entre peces estresados y no estresados, aunque la dieta Trp mostró diferencias significativas entre estados, siendo el valor más alto el de los peces no estresados. La concentración de Trp en cerebro no cambió entre los peces alimentados con los diferentes alimentos, aunque fue mayor en peces alimentados con Trp en los tratamientos basales.

La concentración de ácido quinolínico en hígado creció solo significativamente en peces estresados del alimento control, aunque el patrón fue similar entre tipos de alimentos, mostrando los peces estresados mayores valores que los basales. Algo similar ocurrió para la concentración de kinurenina. Sin embargo, en ese caso, las diferencias fueron detectadas para el grupo de Trp. El triptófano en hígado varió entre tratamientos. En el alimento control, los peces estresados mostraron valores más altos que los basales. Además, la dieta Trp incrementó la concentración de Trp en hígado en el estado basal. Finalmente mencionar que las concentraciones en el intestino, tanto de serotonina como de triptófano, no variaron entre tratamientos significativamente.

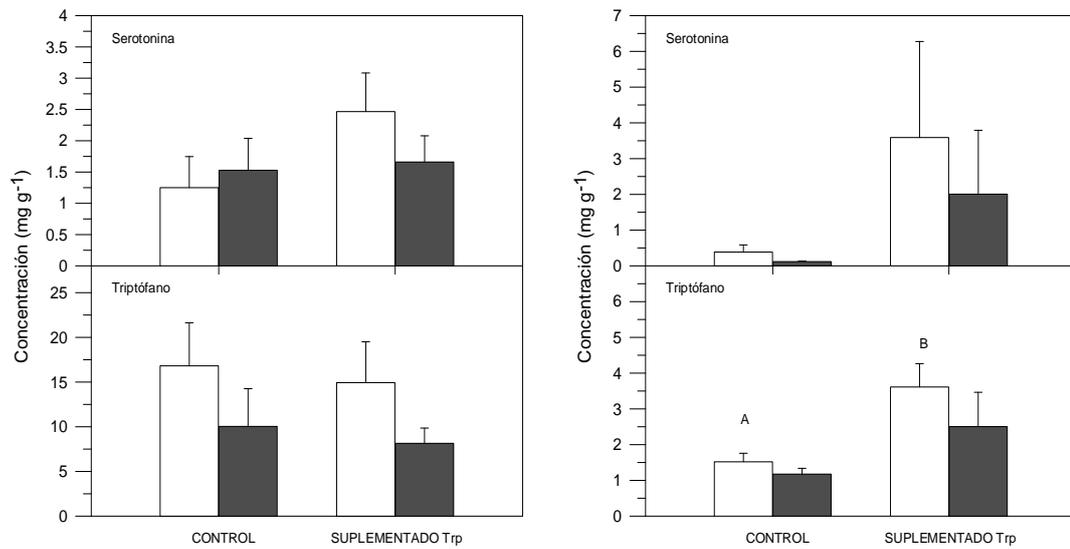


Figura 26. Concentración de Trp y serotonina en intestino (izquierda) y cerebro (derecha) para cada tratamiento (media \pm SE). Las barras blancas y negras corresponden a estado basal y estresado, respectivamente. Diferentes letras indican diferencias significativas entre alimentos para el estado basal.

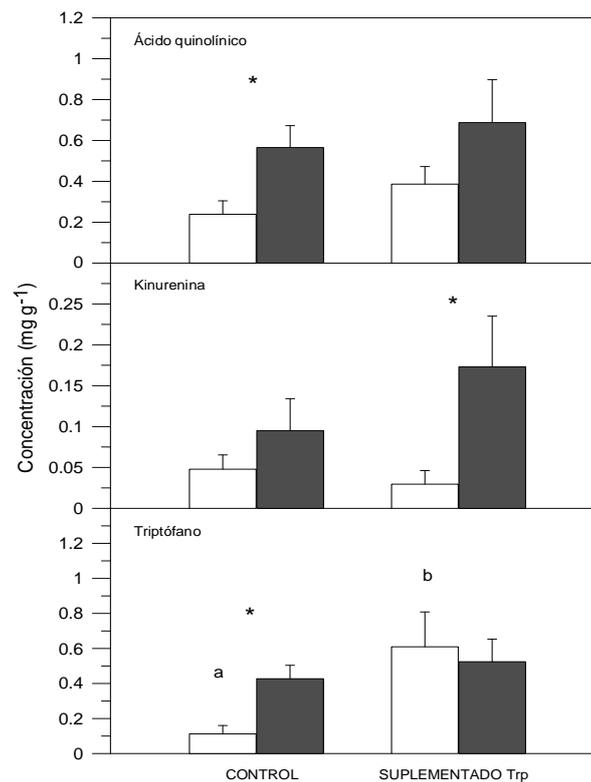


Figura 27. Concentración de ácido quinolínico, kinurenina y triptófano en hígado para cada tratamiento. Las barras blancas y negras corresponden a estado basal y estresado, respectivamente. Diferentes letras indican diferencias significativas entre alimentos para el estado basal, y los asteriscos indican diferencias significativas entre estado basal y estresado para un mismo alimento.

Metabolismo energético

Los valores de GDH en el tratamiento con alimento control fueron mayores que en el alimento Trp para los peces estresados (Tabla 8). Además, esta actividad disminuyó significativamente en peces estresados dentro de los alimentados con Trp. Sin embargo, la actividad FBP aumentó significativamente en peces estresados dentro del grupo alimentado con la dieta suplementada con Trp. Por último, la PFK también varió significativamente entre estados en los peces alimentados con Trp para los tratamientos, tanto basal como estresado.

Tabla 8. Actividades enzimáticas en hígado (mU g^{-1}) medidas en el experimento, ordenadas por la ruta metabólica a la que corresponden (CB = alimento control+basal; CE = alimento control+estrés; TB = alimento Trp+basal; TE = alimento Trp+estrés). Los sostenidos (“#”) indican diferencias significativas entre estados para un mismo alimento (control o Trp), y asteriscos (“*”) diferencias significativas entre alimentos dentro de cada estado (basal o estresado).

	Metabolismo de aminoácidos			Gluconeogénesis	Glucolisis		
	AlaT	AspA	GDH	FBP	G6PDH	PK	PFK
CB	0,46±0,13	1,41±0,67	0,44±0,11	0,25±0,07	0,26±0,09	0,13±0,03	0,40±0,18
CS	0,92±0,29	0,93±0,25	0,67±0,09 *	0,33±0,09	0,32±0,13	0,23±0,05	0,40±0,19
TB	0,36±0,09	0,80±0,25	0,28±0,01 #	0,31±0,02 #	0,10±0,06	0,06±0,01	0,03±0,01 #
TS	0,72±0,01	0,87±0,31	0,10±0,05	0,61±0,14	0,08±0,02	0,16±0,08	0,17±0,05

Parámetros del mucus epidérmico

Se ha demostrado que en la corvina el análisis de la composición del mucus epidérmico puede ser una útil herramienta para valorar el nivel de estrés, existiendo una significativa correlación con los marcadores de estrés clásicos (Fernández-Alacid et al., 2018, 2019). En nuestro trabajo, la dieta con Trp favoreció el mantenimiento de los niveles de cortisol entre peces estresados y no estresados (TB y TS), por lo que la respuesta primaria al estrés no se vio afectada gracias a estos suplementos (Tabla 9). Adicionalmente, los valores de glucosa para los peces estresados y alimentados con Trp fueron los menores, indicando un bajo nivel de la respuesta secundaria al estrés en dicho tratamiento.

La actividad antibacteriana frente a *E. coli* para los tratamientos con suplementos de Trp fue significativamente más alta, especialmente en los peces no estresados (Figura 28). De hecho, los mayores porcentajes de inhibición en todos los tiempos medidos siempre correspondieron al tratamiento TB. Para el tratamiento TE esa inhibición disminuyó debido al estado de estrés crónico, pero nunca fue inferior a las de los peces alimentados con alimento control.

Tabla 9. Relaciones entre las concentraciones de metabolitos y cortisol (Glu = glucosa; Pr = proteínas; Lac = lactato; Cort = cortisol) medidos en el mucus epidérmico, así como poder antioxidante férrico (FRAP) hallados para cada tratamiento (CB = alimento control+basal; CE = alimento control+estrés; TB = alimento Trp+basal; TE = alimento Trp+estrés). Diferentes letras indican diferencias significativas.

	Glu/Pr ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Lac/Pr ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	FRAP/Pr (nmol/mg)	Cort/Pr (ng/g)	Glu/Lac ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)
CB	$3,58 \pm 0,52$ ^{ab}	$0,89 \pm 0,06$	$69,17 \pm 3,55$	$4426,36 \pm 360,67$ ^a	$3,96 \pm 0,51$
CS	$3,62 \pm 0,30$ ^{ab}	$0,94 \pm 0,04$	$69,22 \pm 4,25$	$5996,12 \pm 808,48$ ^b	$5,82 \pm 1,63$
TB	$3,83 \pm 0,09$ ^a	$1,03 \pm 0,19$	$60,50 \pm 2,55$	$3313,33 \pm 256,18$ ^a	$3,08 \pm 0,81$
TS	$3,11 \pm 0,13$ ^b	$0,84 \pm 0,06$	$59,11 \pm 2,92$	$3603,95 \pm 215,32$ ^a	$3,49 \pm 0,50$

En el caso de *P. anguilliseptica* (Figura 29), los resultados fueron parecidos a los de *E. coli* aunque manteniéndose más evidente la mayor inhibición del tratamiento de suplementos de Trp en los peces basales. Estos resultados obtenidos para ambas bacterias indican que el Trp, además de atenuar marcadores de estrés, puede reforzar el sistema inmune de manera significativa.

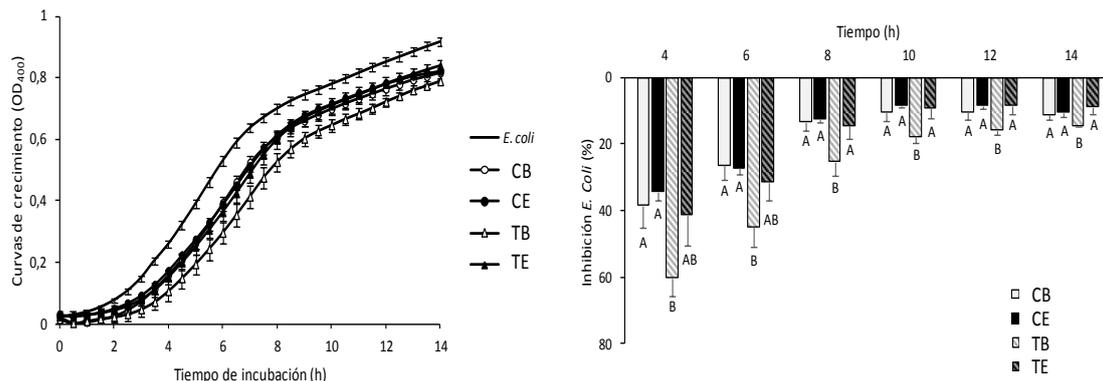


Figura 28. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (izquierda) y porcentaje de inhibición de esa bacteria en función del tiempo (derecha) en muestras de mucus epidérmico para los diferentes tratamientos (CB=alimento control+basal; CE = alimento control+estrés; TB = alimento Trp+basal; TE = alimento Trp+estrés). Diferentes letras indican valores significativamente diferentes dentro de cada tiempo.

El mucus epidérmico juega un papel fundamental ya que constituye una barrera semipermeable para llevar a cabo muchas funciones fisiológicas y actúa como primera línea de protección frente a factores ambientales (Fernández-Alacid et al., 2018). En nuestro caso, los peces alimentados con suplementos produjeron un mayor volumen de mucus que los controles, por lo que este papel fisiológico y protector se vería reforzado, constatando, una vez, los efectos beneficiosos del Trp sobre el bienestar animal (Figura 30).

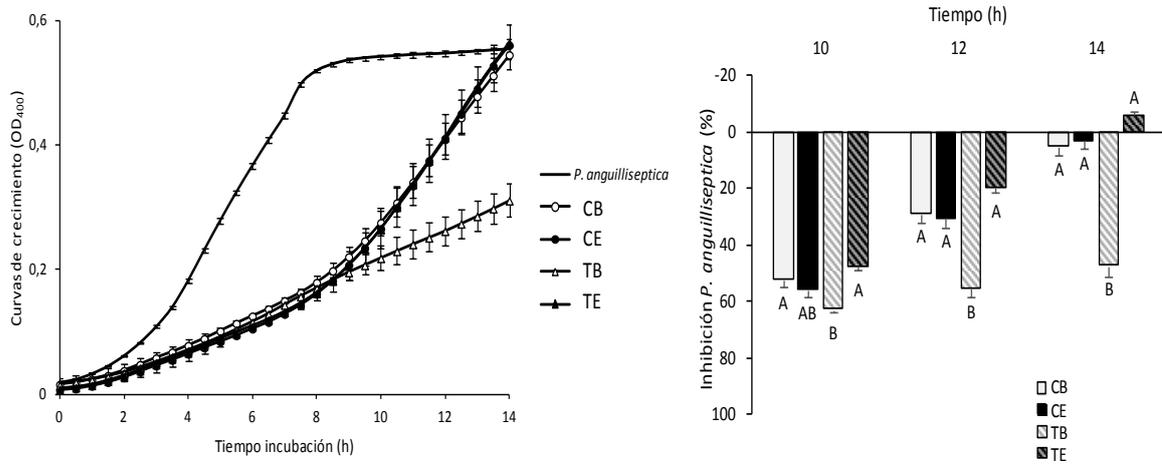


Figura 29. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas anguilliseptica* (izquierda) y porcentaje de inhibición de esa bacteria en función del tiempo (derecha) en muestras de mucus epidérmico para los diferentes tratamientos (CB = alimento control+basal; CE = alimento control+estrés; TB = alimento Trp+basal; TE = alimento Trp+estrés). Diferentes letras indican valores significativamente diferentes dentro de cada tiempo ($P < 0,05$).

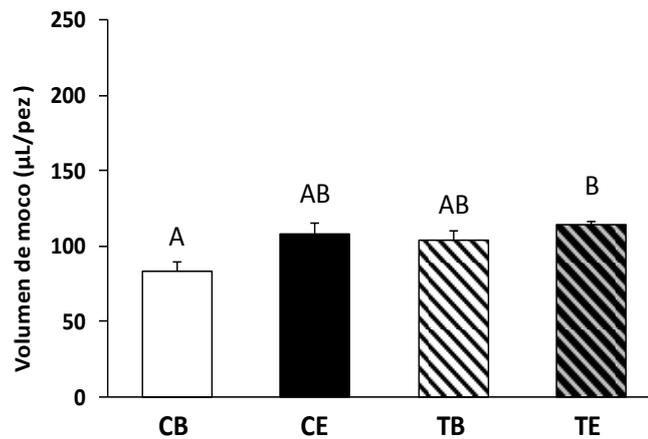


Figura 30. Volumen de mucus epidérmico extraído para cada tratamiento (CB = alimento control+basal; CE = alimento control+estrés; TB = alimento Trp+basal; TE = alimento Trp+estrés). Diferentes letras indican valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Conclusiones

Estos resultados muestran por primera vez la posibilidad de atenuar los efectos derivados del estrés crónico mediante el uso de aditivos alimentarios como el triptófano, y los efectos de este amino ácido sobre el metabolismo energético y del triptófano en la corvina. Adicionalmente se ha demostrado por primera vez la acumulación de kinurenina, un metabolito derivado de la degradación del triptófano, en hígado de peces.

Los parámetros biométricos no se ven afectados por el uso de dietas atenuantes, por lo que es una opción factible en instalaciones intensivas que no repercutiría en la productividad del sistema, si bien es importante destacar que la suplementación de triptófano en la dieta no tuvo un efecto promotor sobre el crecimiento somático del animal.

Sin embargo, los efectos de los suplementos sobre la respuesta al estrés, tal como sucedía en estrés agudo, son positivos, constatados por una disminución del lactato en peces estresados respecto a los alimentados convencionalmente, y por un mantenimiento constante del cortisol plasmático en peces estresados respecto a los no estresados.

Estos efectos positivos también se reflejan en el análisis del mucus epidérmico. A nivel de marcadores de estrés, tal como ocurría en plasma, la dieta con Trp mantuvo constante la concentración relativa de cortisol en mucus, al contrario que lo registrado en el tratamiento con alimentación control, que fue lo esperable en condiciones de estrés. Además, a nivel inmunológico, la actividad antibacteriana del mucus en peces alimentados con Trp fue significativamente mayor que en el resto, especialmente en los peces no estresados. Por tanto, se deduce que la alimentación con suplementos de Trp también favorece a peces no estresados fortaleciendo su sistema inmune.

Este estudio ha permitido ver que las dietas suplementadas con triptófano modulan el metabolismo de este aminoácido esencial, mostrando la acumulación de kinurenina en el hígado, acumulación debida al exceso de triptófano en la dieta y la intensificación de su metabolismo por la situación de estrés. A su vez, el metabolismo energético varió en función de la dieta. En términos generales, los suplementos de Trp disminuyeron la actividad de la mayoría de los enzimas analizados, especialmente de GDH y PFK.

Tarea A.1.4. Prueba de validación de dietas con aditivos que mejoren la resistencia al estrés en peces

Objetivos

Según el plan inicial del proyecto, esta actividad debía desarrollarse en alguna instalación comercial de cultivo de corvina, siendo en principio la empresa seleccionada MARESA (Ayamonte, Huelva). Sin embargo, debido a la falta de disponibilidad de alevines esta especie en el mercado nacional en la época de realización de la prueba, como plan de contingencia se decidió optar por realizar este ensayo de validación con alevines de dorada (*Sparus aurata*), especie en la que hay una gran disponibilidad y no hay problemas de abastecimiento.

Metodología

Para reproducir un cultivo real a nivel industrial se utilizaron las instalaciones de MARESA (Ayamonte, Huelva), empresa que fue subcontratada por el IFAPA para que se pudiera llevar a cabo dicho ensayo en sus instalaciones. Para ello, se emplearon tanques de cultivo intensivo de dorada y peces con un peso medio de $5,60 \pm 0,10$ g (media \pm desviación estándar) y mantenidos a una densidad inicial de 9 Kg m^{-3} (20.000 peces por tanque de 12 m^3). El fotoperiodo y la temperatura fueron naturales, siendo la media $25,7 \pm 0,32$ °C.

Los peces fueron alimentados con una dieta control y una dieta enriquecida con Trp al 1% del peso seco durante 35 días (tratamientos por duplicado). Los piensos fueron fabricados por la empresa española Life Bioencapsulation S.L. (Almería), partiendo de la misma formulación



básica adecuada a los requerimientos de la especie, pero aumentando la concentración de Trp en 1% (sobre peso seco de alimento) en uno de ellos. Por tanto, se dispuso de un pienso control y otro enriquecido con Trp.

Figura 31. Tanques de cultivo industrial usados en MARESA (Huelva) para la prueba de validación con dorada.

Se realizaron dos muestreos ($n = 20$) de sangre, intermedio y final (14 y 35 días), en los cuales se anestesiaron a los peces mediante 2-fenoxietanol ($0,2 \text{ mL L}^{-1}$); en el muestro final, los peces también fueron medidos y pesados. La extracción de sangre se realizó mediante punción de la

vena caudal con jeringas heparinizadas. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.600 rpm y 4 °C durante 10 min para la separación y extracción de plasma.

Los parámetros plasmáticos medidos fueron la glucosa, el lactato, las proteínas totales solubles y el cortisol. Para medir los niveles de glucosa, lactato y proteínas se usaron kits comerciales de Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida) y Spinreact (Lactate Ref. 1001330) adaptados a microplacas de 96 pocillos. La concentración de cortisol en plasma fue cuantificada mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2014). Para la extracción del mismo, el plasma era diluido con dietil éter (1:10). Tras decantar, el sobrenadante era traspasado a otro tubo y el dietil éter era evaporado mediante nitrógeno gaseoso. Luego, la sustancia remanente se diluía (1:6) con un tampón de extracción suministrado por el fabricante, y constituía la muestra a analizar. El límite inferior de detección para este ensayo ELISA es 0,1 ng/mL (81 % de unión). Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayo son 9,8 y 4,6 % respectivamente, con un porcentaje de recuperación medio de 90%. Las principales reactividades cruzadas son con prednisolona (47,4 %), cortisona (15,8 %), 11-deoxicortisol (15 %), prednisona (7,8 %), corticosterona (4,81%), 6- β -hidroxicortisol (1,37 %), y 17-hidroxiprogesterona (1,36 %). Para todas las medidas espectrofotométricas fue usado un lector de microplacas Tecan Sunrise, utilizando el software v2.5 Magellan para Windows (Tecan Austria, Salzburgo, Austria).

Al igual que en las otras tareas dentro de esta actividad, a excepción que se indique lo contrario, todos los valores en tablas y gráficas están representados como media \pm ES (error estándar de la media) y en todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. La normalidad y homocedasticidad de las variables de análisis fueron comprobadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de un factor y un posterior test de Duncan para identificar grupos homogéneos; en el caso de comparaciones entre solo dos grupos fue usada una t de Student.

Resultados

Durante el ensayo no se registraron mortalidades en ninguno de los tanques en los que se desarrolló la prueba de validación. A nivel de crecimiento somático en peso, tras los 35 días de alimentación no existieron diferencias significativas entre el pienso control y el pienso suplementado con Trp para ninguno de parámetros biométricos analizados, a excepción del factor de condición de Fulton (Tabla 10).

Esta diferencia puede interpretarse como un menor peso de los peces con Trp que de los controles para la misma longitud o, en otras palabras, unos peces con morfología más alargada en el tratamiento con Trp, pero con un mismo peso corporal. Si estos resultados fueran extrapolables a la corvina, teniendo en cuenta la forma fusiforme de esta especie, un índice de condición como el encontrado en los peces alimentados con la dieta suplementada con Trp podría estar asociado a una mejor apariencia externa del animal, y por tanto, una posible mejor calidad desde el punto de vista del consumidor.

Por otra parte, el resto de los resultados parecen indicarnos que el Trp suplementado en la dieta no afectó al crecimiento, en contraposición a lo descrito por algunos autores (Laranja et al., 2010; Tang et al., 2013), si bien los resultados no son del todo comparables debido a las diferencias entre especies y condiciones de cultivo. En este sentido, para el rohu (*Labeo rohita*) una dieta enriquecida con Trp aumentó significativamente el crecimiento en 45 días de cultivo (Kumar et al., 2014); probablemente, en nuestro caso, se podrían haber obtenidos resultados similares si el experimento se hubiese alargado hasta ese tiempo, hecho que no fue posible por las necesidades operacionales de la empresa.

Tabla 10. Parámetros biométricos al finalizar el ensayo. Los valores se presentan como la media \pm error estándar (n = 20). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos analizados para cada uno de los parámetros.

	Control	Triptófano
Peso final (g)	21,21 \pm 1,57 ^a	21,21 \pm 1,36 ^a
Longitud final (cm)	9,97 \pm 0,24 ^a	10,29 \pm 0,23 ^a
Ganancia en peso (%)	279,04 \pm 28,14 ^a	279,01 \pm 24,31 ^a
Factor de conversión	1,04 \pm 0,14 ^a	1,07 \pm 0,19 ^a
Tasa específica de crecimiento (%/día)	3,64 \pm 0,23 ^a	3,67 \pm 0,22 ^a
Factor de condición	2,07 \pm 0,06 ^a	1,90 \pm 0,06 ^b

Si bien no existieron diferencias significativas en cuanto al crecimiento somático de las corvinas alimentadas con las distintas dietas experimentales, sí se apreciaron diferencias significativas en el cortisol y lactato plasmático al final del ensayo (Figura 32), produciéndose una reducción en los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con triptófano, resultados similares fueron observados por Kumar et al. (2014) con una alimentación durante más de 35 días.

Lactato y cortisol plasmáticos son considerados marcadores de estrés clásicos, por lo que podría afirmarse que los peces alimentados con Trp presentaban menores síntomas de estrés fisiológico que los controles. No se encontraron diferencias significativas para glucosa plasmática, aunque la concentración de proteínas en plasma fue superior en la dieta suplementada lo que parece indicarnos que se produjo una intensificación del metabolismo proteico debido al mayor contenido de Trp en la dieta (Figura 32).

Aunque pocos, existen algunos trabajos sobre los efectos a largo plazo de la una alimentación rica en Trp en peces. Sin embargo, no existen estudios en condiciones comerciales de cultivo, en la que los peces están sometidos a una alta densidad que puede ser estresante. De hecho, la densidad de carga final usada en esta experiencia (18 Kg/m³) supera a la máxima encontrada en la literatura para experiencias similares, 14 Kg/m³, en un trabajo llevado a cabo con la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) a una densidad considerada alta y estresante en cultivos experimentales de esa especie (Azeredo et al., 2017).

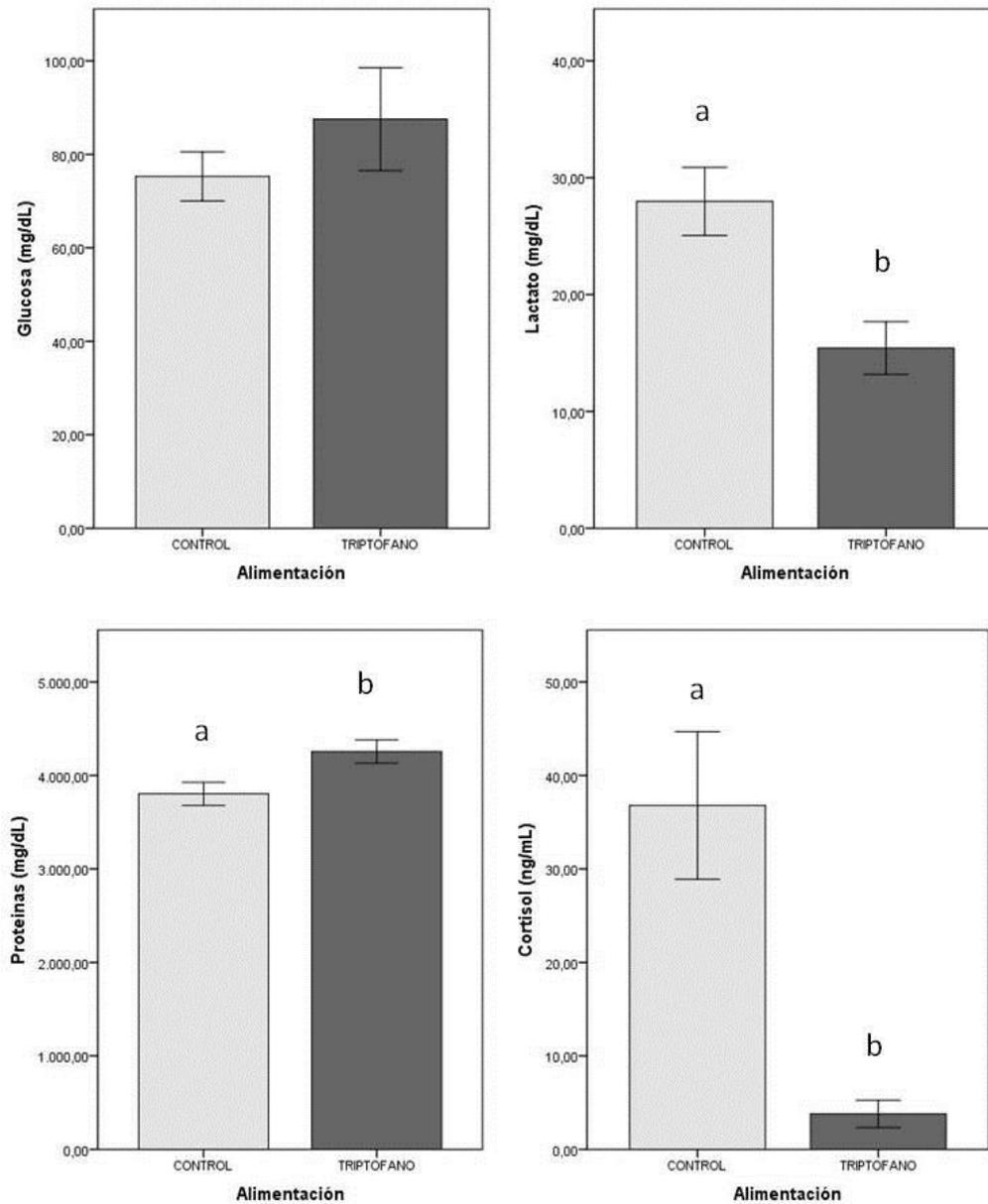


Figura 32. Niveles de cortisol y proteínas en plasma de ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) alimentados con la dieta suplementada con Trp y el respectivo control tras los 35 días del experimento. Los valores se presentan como media \pm SE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos analizados.

Además de las altas densidades en estas instalaciones comerciales, existen otros agentes estresantes que normalmente van asociadas a trabajos de limpieza y mantenimiento de las instalaciones, muestreo y seguimiento de los cultivos por parte de los trabajadores, la calidad del agua, ruidos, luz, etc. Por tanto, según nuestros resultados, la dieta rica en Trp podría reducir el estrés al que están sometidos estos peces, sin afectar negativamente al crecimiento.

Conclusiones

Estos datos representan los primeros resultados provenientes de una experiencia en condiciones comerciales reales sobre el uso de piensos atenuantes del estrés en especies de la acuicultura española.

Tal como se ha demostrado en condiciones experimentales con otras especies, el pienso suplementado con triptófano al 1% redujo la concentración de cortisol en sangre, uno de los principales marcadores de estrés; adicionalmente, su inclusión en la formulación del pienso no originó problemas en el crecimiento o supervivencia de los individuos, consecuentemente no afectando al rendimiento productivo. Sin embargo, se prevé que una aplicación de estos suplementos en las mismas condiciones a más largo plazo podría tener efectos positivos sobre el crecimiento, según lo consultado en la bibliografía con otras especies.

Teniendo en cuenta estos resultados, se recomienda el uso de dietas suplementadas con triptófano en el cultivo intensivo de especies piscícolas, siendo de especial interés su uso en aquellas etapas del ciclo productivo donde los peces pueden estar sujetos a un mayor estrés, como, por ejemplo, durante su manejo, transporte, cambio de alimentación y/o condiciones ambientales extremas.

Referencias bibliográficas Actividad 1

Andrews, A. 2010. FASTQC: A quality control tool for high throughput sequence data. [Http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc](http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc).

Aragão, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids*, 34: 143-148.

Asencio-Alcudia, G., Andree, K. B., Tovar-Ramirez, D., Alvarez-González, A., Herrera, M., Gisbert, E., Giraldez, I. 2019. Stressors due to handling impair gut immunity in meagre (*Argyrosomus regius*): the compensatory role of dietary L-tryptophan. *Frontiers in Physiology*, 10: 547.

Azeredo, R., Machado, M., Afonso, A., Fierro-Castro, C., Reyes-López, F.E., Tort, L., Gesto, M., Conde-Sieira, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Kreuz, E., Wuertz, S., Peres, H., Oliva-Teles, A., Costas, B., 2017. Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: Tales from a teleost model. *Frontiers in Immunology*, 8: 1226.

Branson, E.B., 2008. *Fish welfare*. Blackwell Publishing, Oxford (UK), 316 pp.

Conceição, L.E.C., Aragão, C., Dias, J., Costas, B., Terova, G., Martins C., et al., 2012. Dietary nitrogen and fish welfare. *Fish Physiology Biochemistry*, 38: 119-141.

Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research* 39: 1–9.

D’Aniello, A., 2007. D-Aspartic acid: An endogenous amino acid with an important neuroendocrine role. *Brain Research Reviews*, 53: 215–234.

Dai, Z., Wu, Z., Ji, S., Wu, G., 2014. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 964: 116-127.

Ellis T., Sanders M.B., Scott, A.P., 2013. Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Veterinary Medicine Austria* 100: 255-269.

Erwan, E., Chowdhury, V.S., Nagasawa, M., Goda, R., Otsuka, T., Yasuo, S., Furuso, M., 2014. Central injection of L- and D-aspartate attenuates isolation-induced stress behavior in chicks possibly through different mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 736: 138–42.

Esteban, M., 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunol.* 2012, 1–29.

Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 469-482

Fanouraki, E., C.C. Mylonas, N. Papandroulakis, M. Pavlidis. 2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, 173: 313-322.

Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., Ibarz, A., 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A

valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of the Total Environment*, 644: 1323-1335.

Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., y Ibarz, A. 2019. Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture*, 499: 185-194.

Graham, S., A.H. Jeffries y C.J. Secombes. 1988. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 11: 389-396

Guardiola, F.A., A. Cuesta, E. Abellán, J. Meseguer y M.A. Esteban. 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 40: 24-31.

Herrera, M., Castanheira, M.F., Conceição, L., Martins, C.I.M., 2014. Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied Animal Behaviour Science* 155: 101-108.

Herrera, M., Miró, J.M., Giráldez, I., Salamanca, N., Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., López, J.R., 2019. Metabolic and Stress Responses in Senegalese Soles (*Solea senegalensis* Kaup) Fed Tryptophan Supplements: Effects of Concentration and Feeding Period. *Animals*, 9: 320.

Herrera, M., Rodiles, A., Sánchez, B., López, J. M., y De la Roca, E. 2014. Physiological stress responses to captivity in early developmental stages of the wedge sole *Dicologoglossa cuneata* (Moreau). *Aquaculture Research*, 47: 732-740.

Herrera, M., López, J., Herves, A., 2016. A preliminary approach on the stress assessment through harmless procedures in farmed seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Welfare*, 25: 423-427.

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

Hoseini, S.M., Perez-Jimenez, A., Costas, B., Azeredo, R., Gesto, M., 2019. Physiological roles of tryptophan in teleosts: Current knowledge and perspectives for future studies. *Reviews in Aquaculture*, 11: 3-24

Hseu, J.R., Lu, F.I., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L., Hwang, P.P., 2003. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218: 251–263.

Jia, R., Liu, B., Feng, W., Han, C., Huang, B., Lei, J., 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 131–139.

Kim, D., G. Perteau, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, S.L. Salzberg. 2013. TopHat2 accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, 14: R36.

Kittilsen S., Ellis T., Schjolden J., Braastad B.O., Øverli Ø., 2009. Determining stress-responsiveness in family groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using non-invasive measures. *Aquaculture*, 298: 146–152.

- Kumar, P., Saurabh, S., Pal, A. K., Sahu, N. P. y Arasu, A. R. T., 2014. Stress mitigating and growth enhancing effect of dietary tryptophan in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) fingerlings. *Fish Physiol. Biochem.*, 40: 1325–1338.
- Lepage, O., Vílchez, I.M., Pottinger, T.G., Winberg, S., 2003. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, 206: 3589–3599.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37: 43–53.
- Love, M.I., W. Huber, S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15: 550.
- Lupica, S.J., Turner, J.W., 2009. Validation of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of faecal cortisol in fish. *Aquaculture Research*, 40: 437-441.
- Maitra, S. K., Hasan, K. N., 2016. The Role of Melatonin as a Hormone and an Antioxidant in the Control of Fish Reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 7: 38.
- Martin, M. 2013. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads kenkyuhojokin gan rinsho kenkyu jigyo. *EMBnet Journal*, 17: 10–12.
- Martins, C. I. M., Silva, P. I. M., Costas, B., Larsen, B. K., Santos, G. a., Conceição, L. E. C., Dias, J., Øverli Ø., Höglund, E., Schrama, J. W., 2013. The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 400-401: 129–134.
- Martos-Sitcha, J.A., Wunderink, Y.S., Straatjes, J., Skrzynska, A.K., Mancera, J.M., Martínez-Rodríguez, G., 2014. Different stressors induce differential responses of the CRH-stress system in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 177, 49–61
- Observatorio Español de Acuicultura (OESA): (http://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/acuicultura_en_esp2016.pdf), fecha de acceso 13/06/2017.
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology*, 176B: 441-452.
- Pottinger, T.G., 2008. The Stress Response in Fish – Mechanisms, Effects and Measurements. In: Branson E (ed) *Fish Welfare*. Blackwell Publishing, Oxford (UK), 316 pp.
- Saavedra, M., Conceição, L.E.C., Barr, Y., Helland, S., Pousao-Ferreira, P., Yúfera, M., Dinis, M.T., 2010. Tyrosine and phenylalanine supplementation on *Diplodus sargus* larvae: effect on growth and quality. *Aquaculture Research*, 41: 1523-1532.
- Sanahuja, I., Ibarz, A., 2015. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish Shellfish Immunology*, 46: 426–35.
- Shephard, K., 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 401–429.
- Subramanian, S., MacKinnon, S., Ross, N., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 148: 256–63.

Ross, N.W., K.J. Firth, A. Wang, J.F. Burka, and S.C. Johnson. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms* 41: 43-51.

Salles C.M.C, P. Gagliano, S.A.T. Leitao, J.B Salles, H.L.M. Guedes. V.P.F. Cassano, and S. Giovanne De-Simone. 2007. Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a Neotropical hybrid fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 33: 173–179

Sanahuja I. and A. Ibarz. 2015. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish and Shellfish Immunology* 46: 426-435.

Sanahuja, I., Ibarz, A., 2015. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish & Shellfish Immunology* 46: 426–435

Sanahuja, I., Fernández-Alacid, L., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Ramos, A., Araujo, R. M. y Ibarz, A. 2019. Comparison of several non-specific skin mucus immune defences in three piscine species of aquaculture interest. *Fish & Shellfish Immunology* 89: 428-436

Sano, M., Ferchaud-Roucher, V., Nael, C., Aguesse, A., Poupeau, G., Castellano, B. y Darmaun, D. 2014. Simultaneous detection of stable isotope-labeled and unlabeled l-tryptophan and of its main metabolites, l-kynurenine, serotonin and quinolinic acid, by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 49: 128-135.

Tang, L., Feng, L., Sun, C. Y., Chen, G. F., Jiang, W. D., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Li, S.H., Kuang, S. Y. y Zhou, X. Q., 2013. Effect of tryptophan on growth, intestinal enzyme activities and TOR gene expression in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Studies in vivo and in vitro. *Aquaculture*, 412: 23-33.

Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D.R. Kelley, H. Pimentel, S.L. Salzberg, J.L. Rinn, L. Patcher. 2013. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.*, 7: 562–578.

Vatsos, I.N., Kotzamanis, Y., Henry, M., Angelidis, P., Alexis, M., 2010. Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells. *Eur. J. Histochem.*, 54: e22.

Wen, H., W. Jiang, Y. Liu, J. Jiang, S. Li, L. Tang, Y. Zhang, S. Kuang y X. Zhou. 2014. Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 40: 275-287.

Yao, K., Fang, J., Yin, Y-L., Feng, Z-M., Tang, Z-R., Wu, G., 2011. Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Frontiers in Bioscience* S3, 286-297.



ACTIVIDAD 2. USO DE DIETAS PARA LA MEJORA DE LA INTEGRIDAD Y SALUD DE MUCOSAS (INTESTINO, PIEL Y BRANQUIA).

El concepto de **mantenimiento de la salud** de los peces a través de la mejor **nutrición** posible se encuentra bien aceptado en la acuicultura moderna. Con el fin de mantener la salud de los peces y mejorar el rendimiento productivo, una amplia gama de productos han sido utilizados como aditivos dietéticos para mejorar la ganancia de peso, eficiencia de la alimentación, y/o resistencia a enfermedades en peces cultivados. Muchos estudios se centran en la respuesta inmunitaria innata a nivel celular y humoral, pero no en sus consecuencias en otros sitios en contacto directo con dichos compuestos, tales como la mucosa intestinal. En este proyecto se han contemplado ambas aproximaciones.

Tarea A.2.1. Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de distintos niveles de inclusión en la dieta de un extracto de aceite de oliva enriquecido en compuestos bioactivos combinado con hidrolizado de proteína en dorada

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de hidrolizado de proteína (plasma de sangre porcina secado por spray y proteína hidrolizada de sangre de cerdo) y los ácidos ursólico y verbascósido (UA-VB) obtenidos de dos plantas medicinales como la salvia (*Salvia officinalis*) y hierba luisa (*Lippia citriodora*), sobre el rendimiento productivo y salud y respuesta inmunitaria de las mucosas de la dorada alimentadas con dietas con un bajo contenido de harina de pescado (7%).

Metodología

Dietas experimentales y características del ensayo

Se diseñaron y fabricaron un total de 5 dietas experimentales (48% proteína; 17% grasa; energía: 21.7 MJ/Kg; Tabla 2.1.), tal y como se indica a continuación:

- dieta control (Dieta 1);
- dieta con 5% APPETEIN GS® APC-Europe (Dieta 2; “spray-dried plasma”);
- dieta con 5% PEPTEIVA® APC- Europe (Dieta 3; sangre porcina hidrolizada);
- dieta con 0,1% de UA-VB12 (compuestos activos: ácido ursólico 10% + verbascósido 2%) NATAC SL Madrid (Dieta 4);
- dieta con 0.2% de UA-VB12 (Dieta 5) y dieta con una mezcla de APPETEIN GS® al 5% y UA-VB12 al 0,1% (Dieta 6).

Los niveles de harina de pescado en la dieta control fue sólo del 7%, dieta experimental donde cerca del 75% de la harina de pescado es sustituida por ingredientes proteicos de origen vegetal (Tabla 2.1). Sin embargo, es importante destacar que en aquellas dietas que contenían derivados de sangre de porcino (Dietas 2, 3 y 6), el nivel de inclusión de estos ingredientes se hizo

sustituyendo la harina de pescado. Por consiguiente, las Dietas 2, 3 y 6 sólo contenían un 2% de proteína de pescado. El objetivo de la Dieta 6 fue el de valorar si existía un efecto adicional positivo derivado de combinar los ingredientes usados en las dietas con hemoderivados del porcino y extractos de plantas medicinales.

Todas las dietas (40 kg por dieta) fueron fabricadas por SPAROS Lda (Portugal), la descripción de la fabricación de dichas dietas puede encontrarse en Gisbert et al. (2015). Las dietas fueron proporcionadas al 3.5% en función de la biomasa establecida; la ración alimentaria fue ajustada por medio de muestreos intermedios de periodicidad mensual, la duración del ensayo fue de 92 días. La ración alimentaria fue distribuida 8 veces al día mediante alimentadores automáticos (ARVO-TEC T Drum 2000; Arvotec, Finland).

Los tanques fueron diariamente inspeccionados por el personal técnico del IRTA con el fin de supervisar el correcto funcionamiento de una unidad de recirculación del agua, comprobar el buen estado de salud de los animales, su normal comportamiento y alimentación y retirar las bajas que pudieran acontecer durante el ensayo.

El experimento nutricional fue llevado a cabo en una unidad de 24 tanques de 500 L de volumen conectados a un sistema de recirculación del agua IRTAmar® (Figura 33). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura del agua entre 22 y 27 °C, oxígeno disuelto de $6.3 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, salinidad 35-36 ppt y fotoperíodo de 14 horas de Luz y 8 horas de Oscuridad.



Figura 33. Unidad experimental (24 tanques) conectada a un sistema IRTAmar® donde se ha realizado la Tarea A.2.1.

Al final del ensayo, todos los peces fueron medidos (longitud estándar, cm) y pesados (g) previa anestesia con MS-222 (Sigma-Aldrich, España) y se procedió a tomar muestras de distintos tejidos corporales, y éstas fueron distribuidas entre los miembros del consorcio para su análisis. Con el fin de tomar muestras de distintos tejidos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico. En el siguiente esquema se pueden observar las distintas muestras tomadas y su destino analítico final (Figura 34).

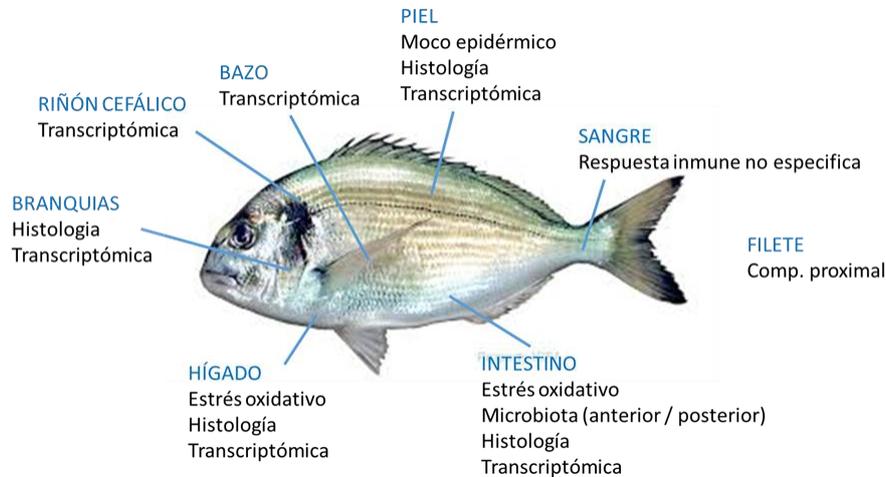


Figura 34. Tipo de muestras recogidas en los distintos ensayos de la Actividad 2 y destino analítico de las mismas.

Tabla 11. Formulación de las dietas para dorada usadas en el ensayo de la Tarea 2.1 (productos derivados de sangre porcina y compuestos vegetales de plantas medicinales).

Ingredientes, %	CTRL	D2	D3	D4	D5	D6
	%	%	%	%	%	%
Fishmeal LT70 (NORVIK)	7,000	2,000	2,000	7,000	7,000	2,000
Appetein GS (APC)		5,000				5,000
PEPTEIVA (APC)			5,000			
Soy protein concentrate (Soycomil)	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000
Pea protein concentrate	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Wheat gluten	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Corn gluten	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Soybean meal 48	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Wheat meal	10,400	10,400	10,400	10,400	10,400	10,400
Fish oil - SAVINOR	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Vit & Min Premix PV01	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Soy lecithin - Powder	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Binder (guar gum)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
L-Lysine	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
L-Tryptophan	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
DL-Methionine	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
UA-VB 12 (NATAC)				0,100	0,200	0,100
Total	100,000	100,000	100,000	100,100	100,200	100,100

Composición proximal	CTRL	D2	D3	D4	D5	D6
Crude protein, % feed	48,37	48,67	48,50	48,37	48,37	48,67
Crude fat, % feed	17,19	16,98	17,11	17,21	17,21	16,98
Fiber, % feed	1,52	1,53	1,52	1,52	1,52	1,53
Ash, % feed	5,88	5,53	5,81	5,88	5,88	5,53
Gross Energy, MJ/kg	21,62	21,77	21,77	21,62	21,62	21,77

Análisis de composición proximal y perfil de ácidos grasos

Para determinar la composición proximal de las dietas, de los animales y evaluar el efecto de la dieta sobre los mismos, se homogeneizaron las muestras de alimento y de peces y con el fin de determinar su contenido en agua, las muestras se secaron hasta alcanzar un peso estable (120 °C durante 24 h). El contenido de grasa de la muestra fue determinado gravimétricamente según el método de Folch et al. (1957), después de la extracción en cloroformo/metanol (2:1) y evaporación del solvente bajo una corriente de N seguido de desecación al vacío durante la noche). El contenido de proteínas se determinó de acuerdo con el método de Lowry et al. (1951). Los contenidos de ceniza se determinaron manteniendo la muestra a 500 a 600 °C durante 24 h en una mufla según la AOAC (1990). Todos los análisis químicos fueron realizados por triplicado por pez y muestras de pienso.

La determinación del contenido en ácidos grasos se realizó según el método de Christie (1982) descrito en Boglino et al. (2013). Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces con isohexano: éter dietílico (1: 1, v: v), purificados en placas de TLC (sílice gel 60, VWR, Lutterworth, Reino Unido) y analizados por cromatografía de gases líquidos en un Termo Instrument ElectronTraceGC (Winsford, Reino Unido) equipado con una columna capilar BPX70 (30 m × 0,25mm id; SGE, Reino Unido), utilizando un dispositivo térmico de dos etapas de gradiente de 50 °C (temperatura de inyección) a 150 °C después de la rampa a 40 °C min⁻¹ y manteniendo a 250 °C después de la rampa a 2 °C min⁻¹ de helio (1,2 mL min⁻¹ a caudal constante) como el gas portador y la columna inyección y detección de ionización de llama a 250 °C. Los picos de cada ácido graso fueron identificados por comparación con los estándares conocidos (Supelco Inc., España) y un aceite de pescado bien caracterizado, y cuantificado (Chrom-card para Windows; TraceGC, Thermo Finnigan, Italia) por medio del factor de respuesta al estándar interno (21:0) añadido antes de la transmetilación.

Análisis de marcadores relacionados con el estrés oxidativo

La cuantificación de la peroxidación lipídica en tejidos seleccionados se realizó utilizando el método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) según Solé et al. (2004). En breve, la peroxidación lipídica se midió utilizando 200 µL de homogeneizado del tejido que se mezcló con 650 µL de metanol y 1-metil-2-fenilindol (solución de solución de 10.3 mM) en acetoneitrilo: metanol (1: 3; vol / vol) y 150 µL de 37% HCl. Esta mezcla se incubó durante 40 minutos a 45 °C, se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 21.000 × g durante 10 min a 4 °C para eliminar los precipitados de proteínas. La absorbancia se leyó a $\lambda = 586$ nm, y la cantidad de lípidos peroxidados (en nmol malondialdehído / 100 g de tejido) se evaluó mediante una curva de calibración hecha de una solución estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (10 mM). Muestras homogeneizadas, preparadas para la determinación de los niveles de peroxidación lipídica también se usaron para medir la actividad de los enzimas relacionados con el estrés oxidativo.

Los protocolos utilizados para el análisis de los enzimas relacionados con el estrés oxidativo se encuentran descritos en el trabajo de Boglino et al. (2013). Así, la actividad de la catalasa (CAT) se midió en tejidos por medio de la medida de la disminución de la absorbancia a $\lambda = 240$ nm (coeficiente de extinción $[e] = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando H₂O₂ 50 mM como sustrato. La actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) se ensayó por la formación de glutatión

clorodinitrobenzeno a $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando 1 mM 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno y 1 mM de glutatión como sustratos. Los niveles de glutatión reductasa (GR) se determinaron midiendo la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) a $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando 20 mM de disulfuro de glutatión y 2 mM de NADPH como sustratos. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) fue medida midiendo el consumo de NADPH a $\lambda = 340 \text{ nm}$ ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando glutatión 75 mM y NADPH 8,75 mM como sustratos.

Las actividades enzimáticas del estrés oxidativo fueron expresadas como actividades enzimáticas específicas ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), mientras que se determinó la proteína soluble por el método de Bradford (Bradford, 1976). Todos los ensayos se realizaron por triplicado a 25 °C, y la absorbancia se leyó utilizando un espectrofotómetro (Tecan Infinite M200; Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza).

Análisis de marcadores inmunológicos no específicos en suero

La actividad de la lisozima se midió de acuerdo con el método turbidimétrico descrito por Swain et al. (2007) con algunas modificaciones. Brevemente, se colocaron 20 μL de suero en placas de 96 pocillos de fondo plano. A cada pocillo, se añadieron 180 μl de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (0,2 mg/ml, Sigma) en fosfato de sodio 40 mM (pH 6'2) como sustrato de la lisozima. Como muestras blanco se añadieron 20 μL de suero y 180 μL de tampón de fosfato de sodio. La absorbancia a $\lambda = 450 \text{ nm}$ se midió después de 20 min a 35 °C en un lector de placas (Synergy HT, TECAN®, Suiza). Las cantidades de lisozima presentes en el suero se obtuvieron a partir de una curva estándar hecha con lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) a través de diluciones seriadas de la misma en el tampón mencionado. Los valores de lisozima en el suero se expresaron como $\mu\text{g/mL}$ equivalente de actividad de lisozima de clara de huevo y los valores se expresan como unidades (U)/mg de proteína de suero. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La actividad hemolítica de la ruta del complemento se ensayó en suero utilizando eritrocitos de carnero (SRBC, Biomedics) como células diana (Ortuño et al., 1998). Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión de SRBC (6 %) en tampón de Hank libre de rojo de fenol (HBSS) que contenía Mg^{+2} y EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol) con muestras de suero diluidas en serie para obtener al final concentraciones séricas finales de 10 % a 0,078 % en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Después de la incubación durante 90 min a 22 °C, las muestras se centrifugaron (400 x g, 5 min, 4°C) para evitar eritrocitos sin lisar. El contenido de hemoglobina relativa de los sobrenadantes se evaluó midiendo su densidad óptica a $\lambda = 550 \text{ nm}$ en un lector de placas (BMG Labtech). Los valores de hemólisis máxima (100%) y mínima (espontánea) se obtuvieron mediante la adición de 100 μL de agua destilada o HBSS a muestras de 100 μL de SRBC, respectivamente.

El grado de hemólisis (Y) se estimó y la curva de lisis para cada ejemplar se obtuvo representando Y/1-Y contra el volumen de suero agregado (ml) en un gráfico a escala logarítmica. Se determinó el volumen de suero que produce hemólisis del 50% (ACH50) y se obtuvo el número de unidades de ACH50/ml para cada ejemplar.

Los niveles séricos totales de IgM se analizaron mediante ELISA (Cuesta et al., 2004). Para esto, se colocaron 20 μL por pocillo de 1/500 de suero diluido en placas de 96 pocillos de fondo plano por triplicado y las proteínas se bloquearon mediante incubación durante la noche a 4°C con 200 μL de tampón carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 35 mM y Na_2CO_3 15 mM, pH 9'6). Después de tres lavados con PBT (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05%, pH 7'3), las placas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo que contenía un 3 % de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) en PBT, tras lo que se volvieron a dar otros tres lavados con PBT. Las placas se incubaron durante 1 h con 100 μL por pocillo de anticuerpo monoclonal IgM anti-platillo de ratón (Aquatic Diagnostics Ltd.) (1/100 en tampón de bloqueo), se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón-HRP (1/1000 en tampón de bloqueo, Sigma). Después de un nuevo lavado exhaustivo con PBT, las placas se revelaron usando 100 μL de una solución de TMB 0'42 mM, preparada inmediatamente en un tampón de ácido cítrico/acetato de sodio 100 mM (pH 5'4), que contenía H_2O_2 al 0,01%. La reacción se dejó transcurrir durante 10 min y tras ellos se detuvo mediante la adición de 50 μL de H_2SO_4 2M y las placas se leyeron a $\lambda = 450 \text{ nm}$. Los controles negativos consistieron en muestras sin suero o sin anticuerpo primario, cuyos valores de densidad óptica (DO) se restaron de cada valor de muestra.

Para la determinación de la actividad bactericida se utilizó la bacteria patógena para peces *Vibrio anguillarum* para determinar la capacidad bactericida presente en suero de las doradas estudiadas. La bacteria se cultivó a partir de 1 mL de cultivo madre que se había congelado previamente a -80°C, durante 48 horas a 25 °C en Tryptic Soy Agar (TSA, Difco Laboratories), y luego se inocularon en Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories), ambos suplementados con NaCl a una concentración final del 1% (peso/volumen). Las bacterias en medio TSB se cultivaron luego a la misma temperatura, con agitación continua (100 rpm) durante 24 h. Las bacterias en crecimiento exponencial se resuspendieron en PBS estéril y se ajustaron a 10^8 unidades formadoras de colonias (cfu)/mL.

La actividad bactericida se determinó siguiendo el método de Andrews (2001) con algunas modificaciones. Se agregaron muestras de 20 μL de suero en pocillos cuadruplicados de una placa de 96 pocillos (Nunc). La solución equilibrada de Hank se agregó a algunos pozos en lugar de los extractos y sirvió como control positivo. Se añadieron alícuotas de 20 μL de las bacterias cultivadas previamente y las placas se incubaron durante 2,5 horas a 25°C. Después se agregaron 25 μL de MTT (1 mg/mL) a cada pocillo y las placas se incubaron nuevamente durante 2 h a 25°C para permitir la formación de formazán. Las placas se centrifugaron (2000 x g, 10 min), los precipitados se disolvieron en 200 μL de DMSO y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano. La absorbancia del formazán disuelto se midió a $\lambda = 560 \text{ nm}$. La actividad bactericida se expresó como porcentaje de bacterias no viables, calculada como la diferencia entre la absorbancia de las bacterias supervivientes en comparación con la absorbancia de las bacterias de los controles positivos (100%).

Estudio histológico de tejidos diana

Para el procesamiento de las muestras histológicas, se siguió el siguiente esquema: las muestras que presentaron tejido óseo, como branquias y piel, fueron descalcificadas previamente a su inclusión en parafina mediante una solución de EDTA 10% y formol 18 %, durante un mes.

Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una gradación creciente de alcohol y aclaradas en un disolvente orgánico (xileno) para posteriormente infiltrarlas en parafina según métodos convencionales, usando para ello un procesador automático de tejidos (Shanon Citadel 1000, Thermo Scientific).

Las muestras se colocaron en moldes cúbicos para la infiltración en parafina, y se dejaron enfriar hasta su completa solidificación. A continuación, se cortaron en un micrótopo Leica RM 2125RT, efectuándose cortes seriados de 6 μm de grosor, que fueron recogidos y estirados en un baño termostático para evitar la formación de pliegues en las secciones y se montaron en portas. Tras desparafinar y rehidratar algunos cortes se tiñeron usando técnicas histomorfológicas convencionales para la identificación de las distintas estructuras normales y alteraciones (hipertrofia, hiperplasia, necrosis, inflamación, etc.) tales como Hematoxilina/Eosina y Hematoxilina /VOF (verde luz-orange G-fuchsina acida) usando un teñidor automático (LEICA AUTOSTAINER XL). De cada uno de estos órganos-tejidos se seleccionan las células y/o estructuras relevantes, señaladas en la Figura 35.

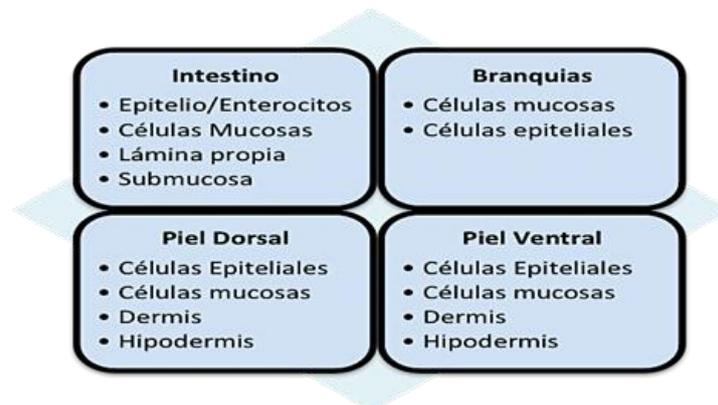


Figura 35. Estructuras y células diana analizadas por medio de herramientas histológicas.

Las secciones preparadas, una vez desparafinadas y rehidratadas se trataron con ácido-periódico de Schiff (PAS) (glicoproteínas neutras), y Azul Alcían (AA) pH: 2,5, 1,0 y 0,5 (glicoproteínas ácidas) según Arellano y Sarasquete, 2005; Sarasquete, 2005 entr otras) y se listan en la Figura 36.

Los métodos histoquímicos usados para la detección y estudio de glucoconjugados en las glicoproteínas producidas por las células mucosas de la branquia, piel e intestino, se realizaron mediante la detección de lectinas como marcadores de residuos glucídicos (Figura 36). Las lectinas (Sigma-Aldrich) conjugadas con peroxidasa (Con A, WGA, UEA 1, SBA) y la SNA (conjugada con biotina) fueron identificadas siguiendo las especificaciones de los trabajos de Ortiz-Delgado et al. (2008), y adaptadas y optimizadas en este trabajo, siguiéndose el siguiente protocolo: 1) desparafinar y rehidratar las secciones de tejido; 2) bloquear la actividad peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3,0% durante 10 minutos; 3) saturación de los cortes con albúmina (BCA)–disuelta en tampón salino fosfato pH 7,4 + Tritón (PBS+T) para las lectinas (Con A y SNA) y (TBS) pH 7,6 para lectinas (WGA, UEA1, SBA), durante 30 minutos para evitar las uniones no específicas; 5) incubar con las soluciones de lectinas a las diluciones apropiadas

(durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda; 6) revelado de la actividad peroxidasa en una solución que contiene 50 mg de diaminobenzidina (DAB), 100 μL H_2O_2 y 100 mL de TBS o PBS según la lectina, a temperatura ambiente y oscuridad. El tiempo de revelado varió en función de la intensidad de color deseada, realizando una visualización periódica al microscopio para evitar el ruido de fondo (Figura 37). Una vez optimizado el tiempo de revelado para cada lectina, se usó el mismo tiempo en todas las muestras con el fin de poder realizar comparaciones entre los tratamientos; y 7) montaje en Aquatex y observación al microscopio óptico.

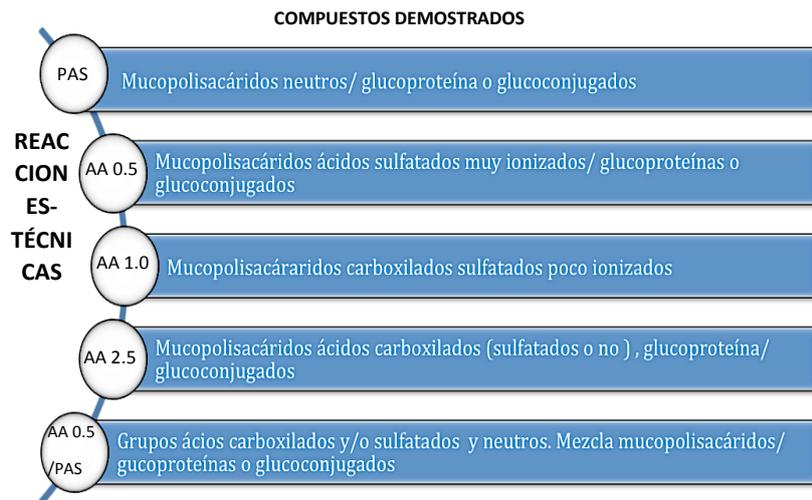


Figura 36. Tipo de tinción histoquímica usada para evaluar la naturaleza ácida y/o neutra de los mucopolisacáridos producidos por las células mucosas de las branquias, piel e intestino. PAS, ácido-periódico de Schiff; AA, azul alcian.

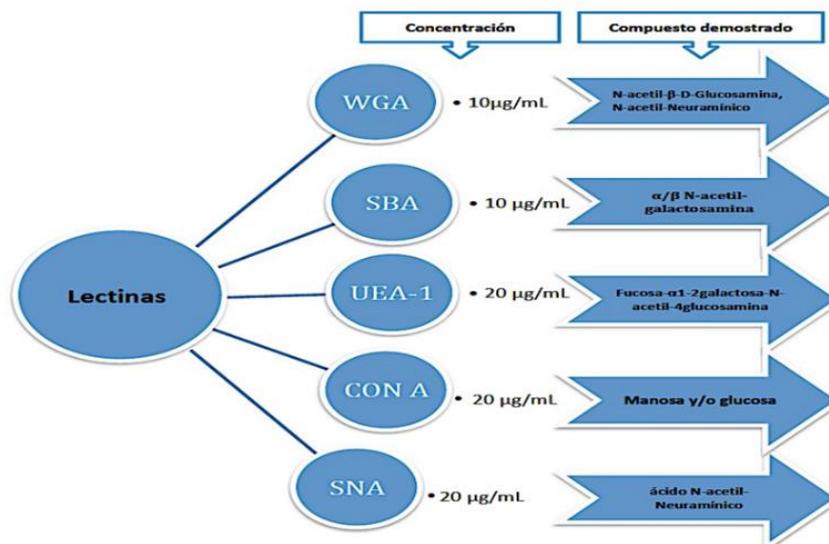


Figura 37. Tipo de lectinas usadas y su especificidad para caracterizar la secreción de los mucopolisacáridos producidos por las células mucosas de las branquias, piel e intestino.

La realización de estas técnicas permitió evidenciar cambios tanto en células (e.j. piel, branquias, sistema digestivo) como en la matriz extracelular, poniendo de manifiesto la presencia y riqueza en diferentes residuos azucarados (afinidad por lectinas) presentes en las glucoproteínas (glucosa, manosa, galactosa, fucosa N-acetil-glucosamida/o galactosamida, ácido siálico etc.).

Análisis de la microbiota intestinal

En la Figura 38 se sintetiza el sistema llevado a cabo para el procesado y análisis de las muestras intestinales para la caracterización de su microbiota.

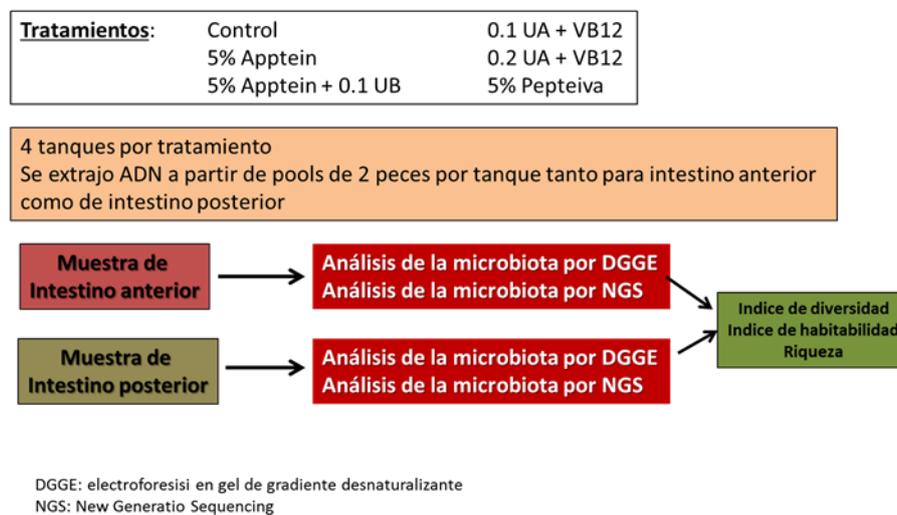


Figura 38. Resumen del proceso seguido para el análisis de las muestras intestinales para el estudio de la microbiota intestinal.

La comparación de la microbiota intestinal se realizó mediante Electroforesis en gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) a través del estudio del patrón diferencial de bandas amplificadas obtenidas usando el programa informático Quantity One (BioRad) empleando matrices de similitud a partir de los coeficientes de similitud para obtener dendrogramas de similitud entre grupos a partir de algoritmos como UPGMA o Neighbor Joining, según la siguiente metodología:

Extracción de ADN: las secciones intestinales, anteriores y posteriores, conservadas a -20 °C se descongelaron paulatinamente en hielo y se extrajo el contenido intestinal presionando hacia los extremos con un objeto estéril. Tras homogeneizar el contenido se tomó una muestra de 50 mg para la extracción de ADN. El ADN se extrajo en todos los casos siguiendo el protocolo descrito por Martínez et al. (1998) basado en una precipitación salina, con pequeñas modificaciones (Tapia-Paniagua et al., 2010) como se detallan a continuación:

Depositamos las muestras intestinales en tubos de 1,5 ml que contenían 300 µL de tampón de resuspensión (10 mM de HCL pH 7,5 y 1 mM de EDTA pH 7,5), éstas fueron homogeneizadas con

un objeto estéril para facilitar la extracción de ADN. Después, para comenzar a lisar la célula, se añadieron 300 μL de tampón de lisis (50 mM de Tris HCL, 50 mM de EDTA a pH = 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl). Se procedió a la mezcla de todo usando un vórtex y para conseguir la precipitación del ADN se añadieron 32 μL de NaCl.

Por último, se adicionaron 15 μL de Proteínasa K, para degradar las proteínas e ir así descartando las moléculas que se alejaban de nuestro interés. Las muestras quedaron incubadas a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, se volvió a añadir solución de precipitación, esta vez 160 μL y se dejaron reposar las muestras durante 10 min en frío y posteriormente se llevaron a cabo una serie de centrifugaciones. La primera se realizó a 13.000 rpm durante seis min. Cuando se obtuvo el sobrenadante, se añadió a viales de 1,5 ml, los cuáles contenían 600 μL de isopropanol, para que así pudiera precipitarse el ADN. A continuación, se dejó incubar durante 10 min, y se centrifugó como se hizo previamente. Tras finalizar la centrifugación, el sobrenadante se desechó con cuidado de no perder el ADN precipitado. Se añadieron 500 μL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar, esta vez durante 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos a los que, una vez secos, se adicionó PCR- H_2O .

La cuantificación del ADN se llevó a cabo por métodos fluorimétricos mediante el Qubit (ThermoScientific, Alemania) y por métodos espectrofotométricos y electroforéticos para estudiar el grado de pureza, la calidad e integridad del ADN.

Realización de PCR: La concentración tanto de ADN como de ADNc se ajustó a 5 ng/ μL y se llevó a cabo una PCR para la amplificación de 400 pb aproximadamente, de las regiones V1-V3 del gen ARNr 16S. Para ello se emplearon los cebadores universales (677-GC-R (5'-CGGGGCGGGGGC ACGGGGGATMTCTACGCATTCACCGCTAC-3') y 309-F (5'-ATCCCTACGGGAGGCWGCAG-3') descritos por Steinum et al. (2009). El cebador 677-GC-R lleva una cola de 20 nucleótidos CG incorporada. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 μL . La mezcla de PCR contenía 12,5 μL de AccuStart II PCR ToughMix 1,25 mL (Quantabio, EEUU), 1 μL de cada uno de los cebadores mencionados anteriormente, 5,5 μL de agua pura, estéril y libre de ADNasa y ARNasa y 5 μL de la muestra de ADN o ADNc, a amplificar.

Los ciclos tuvieron lugar en un termociclador CFX96 de BioRad (Alemania) y fueron los siguientes: un ciclo de 94 °C durante dos minutos, 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos para la desnaturalización, un ciclo de 56 °C durante 40 segundos para el anillamiento, 72 °C durante un minuto para la extensión y un ciclo final de 72°C durante cinco minutos. La obtención de amplicones tras la reacción se comprobó en un gel de agarosa al 1% en TAE utilizando como patrón de peso molecular eGeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (ThermoScientific), tal y como se comentó en el apartado anterior.

Realización de DGGE: Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante DGGE según las especificaciones de Muyzer y col. (1993) utilizando un equipo Dcode™System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). La electroforesis se llevó a cabo en dos geles de poliacrilamida al 8% (37:5:1 acrilamida-bisacrilamida) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) de dimensiones 16x10x0,01 cm usando un gradiente creciente desnaturalizante del 30 al 55% de urea y formamida, en la dirección de la electroforesis. En los geles se cargaron 10 μL de producto de PCR junto con 5 μL de tampón de carga y se sometieron a un voltaje de 200 V durante 10 minutos y 85 V durante 16 horas (Sambrook y col., 1989) a una temperatura constante de 60 °C. A continuación, los geles se tiñeron con nitrato de plata según el protocolo de Sanguinetti et al. (1994).

Análisis de los patrones de DGGE: Para el análisis del patrón de bandas, los geles de DGGE fueron digitalizados a una resolución de 300 dpi y se analizaron con el programa informático FPQuest 4.5 (AppliedMaths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). De este modo, se determinó el número de bandas (R), la intensidad de cada una (n_i) y la suma de todas las intensidades (N) de las bandas presentes en cada una de las muestras (N) (Fromin et al., 2002). Esto permitió el posterior cálculo de los siguientes índices ecológicos:

- 1) Riqueza de especies (R), estimada como el número total de bandas. $R = \sum b$, donde b es el número de bandas presentes en cada muestra.
- 2) Índice de diversidad de Shannon (H') (Shannon y Weaver, 1949), con expresión: $H' = -\sum p_i \ln p_i$, donde $p_i = n_i/N_i = \text{intensidad de cada banda}$ y $N = \text{sumatorio de las intensidades de todas las bandas en esa muestra}$.
- 3) Habitabilidad (R_r), calculada como sigue (Marzorati et al., 2008): $R_r = R^2 \times D_g$, donde R = número total de bandas en cada calle y $D_g = \text{gradiente desnaturalizante comprendido entre la primera y la última banda de dicha calle}$.

Además, la similitud entre los diferentes tipos de muestras, se llevó a cabo mediante el análisis de imagen del patrón de bandas obtenido en la DGGE. Con este patrón de bandas se realizó un dendograma con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) y el coeficiente de Dice.

Análisis transcriptómico en tejidos diana

En este apartado sólo se han analizado las muestras de la Dieta 1 (control) y la Dieta 4 (0,1% de UA-VB12), dado que el impacto de hemoderivados porcinos similares sobre el perfil transcriptómico en dorada ya ha sido evaluado en otro trabajo del mismo grupo investigador (Reyes-López et al., en preparación) y, por tanto, el equipo investigador de DIETApplus ha optado por centrar sus esfuerzos analíticos en otros tejidos y ensayos que potencialmente podían aportar nueva información. En cuanto a las dietas formuladas con aditivos con extractos de plantas medicinales, sólo se ha analizado la Dieta 4 al ser ésta la que ha presentado un mejor rendimiento productivo en términos de crecimiento somático en comparación con la Dieta 5.

El ARN total se extrajo individualmente de cada órgano utilizando 1 mL de Tri Reactivo R (Sigma-Aldrich) por muestra, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el protocolo. La concentración de ARN se cuantificó utilizando un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) y se verificó la integridad y la calidad del ARN con Experion (Estación de electroforesis automatizada, Bio-Rad) utilizando el chip Experion Standard Sens RNA (Bio-Rad). Sólo se utilizaron las muestras con un número de integridad de ARN (RIN) > 7. El análisis transcripcional se llevó a cabo utilizando la plataforma de microarray de oligo-nucleótido AquaGenomic *Sparus aurata* (SAQ), de acuerdo con Teles et al. (2019). La información completa sobre esta plataforma y diseño experimental está disponible a través del repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO) (números de acceso GPL13442 y GSE93930) en el Centro Nacional de Información de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI).

Se realizó un análisis transcriptómico para determinar las diferencias en el nivel de expresión entre las diferentes dietas. Las muestras de ARN total se agruparon para la misma concentración

en tres grupos de tres peces, obteniendo un total de tres grupos por condición. El microarray de un color se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos del fabricante. En resumen, se revirtieron 200 ng de ARN total transcrito junto con el pico de entrada (kit Agilent Spike-In de ARN de un color, Agilent Technologies, Estados Unidos). La solución se usó luego como plantilla para la síntesis y amplificación de ARNc marcado con Cyanine-3 (Cy3) con el kit de etiquetado Quick Amp. Las muestras de ARNc se purificaron utilizando el micro kit RNeasy (Qiagen). La incorporación de colorante y el rendimiento de ARNc se verificaron con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000. 1,5 mg de cRNA marcado con Cy3 con actividad específica >6,0 pmol Cy3 / mg cRNA luego se fragmentaron a 60 °C durante 30 min, y luego las muestras se mezclaron con tampón de hibridación y se hibridaron con la matriz (ID 025603, Agilent Technologies, United States) a 65 °C durante 17 h, utilizando el kit de hibridación de expresión génica. Los lavados se realizaron según lo recomendado por el fabricante, utilizando tampones de lavado de expresión génica y una solución de estabilización y secado (Agilent Technologies, Estados Unidos). Las diapositivas de microarrays se escanearon con el escáner de Agilent Technologies modelo G2505B. Las intensidades de puntos y otras funciones de control de calidad se extrajeron con el software Feature Extraction versión 10.4.0.0 de Agilent (Agilent Technologies, Estados Unidos). Se revisaron los informes de calidad para cada matriz. Los datos sin procesar extraídos se importaron y analizaron con GeneSpring (software de la versión 14.5 GX, Agilent Technologies, Estados Unidos). La normalización del percentil del 75% se usó para estandarizar las matrices para las comparaciones, y los datos se filtraron por expresión. El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para describir las diferencias entre los grupos. Todas las muestras también se analizaron a nivel genético mediante un enfoque de diseño de micromatrices de referencia, para comparar la respuesta de expresión génica en los diferentes tejidos analizados, entre el control y las dietas suplementadas. Los valores de expresión con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La interpretación biológica de los datos de micromatrices se llevó a cabo utilizando las bases de datos de acceso libre GeneCards y UniProt.

Con el fin de maximizar la información obtenida de los resultados de microarrays, se realizó un interactoma (mapa completo de las interacciones que pueden ocurrir en un organismo vivo). Con este enfoque, los genes expresados diferencialmente de manera significativa se agrupan en diferentes grupos (según los términos de ontología de genes enriquecidos [GO] a los que pertenecen) y se consideran sus interacciones pronosticadas computacionalmente (minería de textos científicos; interacciones calculadas a partir de características genómicas; interacciones transferidas desde organismos modelos basados en la ortología). Debido a la magnitud de la información y al grado de conocimiento profundo requerido para este tipo de análisis, y teniendo en cuenta las limitaciones en la información disponible para peces, se utilizó la información disponible sobre humanos (*Homo sapiens*) sobre la última versión actualizada del repositorio público de STRING (análisis comparativo basado en biología). Todos los análisis se llevaron a cabo con una puntuación de interacción de alta confianza (0,9). Se realizó un análisis GO enriquecido utilizando la herramienta DAVID web tool (<https://david.ncicfcrf.gov>). Los resultados proporcionan la representación de cada grupo de genes expresados diferencialmente (que forman un clúster) y su interacción con el resto de genes diferencialmente expresados comparando las dietas funcionales respecto a la dieta control.

Evaluación *in vivo* (reto bacteriano) de las competencias inmunológicas en peces alimentados con las dietas experimentales

Al final del ensayo nutricional, se procedió a establecer la Dosis Letal 50 (DL₅₀) para *Vibrio anguillarum* con un lote de doradas hermano al usado en el ensayo; sin embargo, después de probar distintas vías de administración del patógeno (oral, intraperitoneal y anal) y altas concentraciones del patógeno (10⁹⁻¹⁰ UFC/mL), no fuimos capaces de inducir un cuadro patológico en dichos animales y por tanto, someterlos a un reto bacteriano con el fin de valorar su capacidad de respuesta inmune frente a un agente microbiano. A la vista de los resultados, se probaron otros dos agentes patógenos como *Aeromonas salmonicida* y *Photobacterium damselae subsp. piscicida* con resultados similares. Después de comentarlo internamente entre el equipo de trabajo, se determinó que el gran tamaño de los peces en el momento de realizar el reto bacteriano (200-250 g) supuso que éstos tuvieran un sistema inmune muy robusto que les protegió de la carga bacteriana inoculada.

La citada desviación del plan de trabajo original fue corregida según el plan de contingencia establecido en el proyecto. Así, el reto bacteriano con animales vivos fue sustituido por un ensayo *ex vivo* en el que se realizó un cultivo primario del bazo de los peces de cada grupo experimental que fueron sometidos a lipopolisacárido (LPS) bacteriano con el fin de valorar la respuesta inmunológica de dichas células, respuesta que vendría modulada por la inclusión de los aditivos incluidos en la dieta. La metodología seguida para este ensayo *ex vivo* se describe como sigue:

Al final del ensayo nutricional, se sacrificaron 6 peces de cada grupo experimental (réplicas biológicas) con una sobredosis de anestésico, y se procedió a la extirpación de sus bazos. El protocolo *ex vivo* utilizado fue similar al descrito por Campoverde et al. (2017). En resumen, el bazo de cada pez se pasó a través de un filtro celular de malla de nylon de 100 µm (SefarNytal PA-13xxx/100, España) en medio Leibovitz L15 (Gibco) que contiene una mezcla de antibióticos como la penicilina y la estreptomina (Gibco, 15140-122) a 1: 1000 y 2% de suero de ternera fetal (Gibco, 10270-098). La suspensión celular resultante se recogió y se centrifugó a 400 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, el sobrenadante se descartó y se reemplazó con 10 mL de medio Leibovitz L15. La suspensión celular se centrifugó nuevamente y los sobrenadantes se eliminaron y se reemplazaron con 30 mL de medio. Las células se distribuyeron en placas de microtitulación de 12 pocillos en alícuotas de 5 mL (2 pocillos por pez; réplicas metodológicas). Para evaluar la respuesta inmunitaria de las células del bazo estimuladas por un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) de tipo bacteriano, usándose en este caso LPS (Sigma, #L3129-100 mg) a cada pocillo de la placa de microtitulación (Greiner Bio-One España). Las muestras control incluyeron 250 µL de PBS.

Para evaluar la respuesta inmune de las células cultivadas, los esplenocitos se recogieron a las 4, 12 y 24 h después de la estimulación con LPS, se centrifugaron a 400xg durante 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Después de la centrifugación celular, el sedimento se suspendió en RNAlater® (Sigma-Aldrich, España) para su posterior procesado. El ARN total de las células de los bazos se extrajo utilizando el kit QIAGEN RNeasy® Mini Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de ARN aislado se determinó por espectrofotometría con un ND-2000 NanoDrop (Thermo Scientific™) y la calidad se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa (2 %). Una vez comprobada la calidad del ARN extraído se procedió a sintetizar ADN de cadena sencilla (cDNA) con el fin de poder cuantificar la expresión de los genes objeto de estudio. Para la síntesis de cDNA, se transcribieron 1 µg de ARN

total usando un kit de transcripción inversa de cDNA (QuantiTect® Reverse Transcription Kit) en un volumen final de reacción de 20 µL de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

La expresión génica de diversos marcadores inmunitarios en esplenocitos de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales y tratados con PBS y LPS se analizaron mediante qPCR. La selección de genes incluyó el análisis de respuesta innata humoral (lisozima [lys], inmunoglobulina M [igM]), citoquinas pro- (il-1 β , tnf α) y anti-inflamatorias (il-10, tgf β 1), el marcador de células de superficie cd4, y enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa de manganeso [mn-sod] y catalasa [cat]). La β -actina se incluyó en nuestro análisis como gen de referencia para el análisis de expresión. Todas las reacciones se realizaron por duplicado utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384 Touch (Bio-Rad Laboratorios).

La cuantificación se realizó según el método de Pfaffl corregido para la eficiencia de cada conjunto de cebadores obtenido. Los resultados se expresaron como valores medios \pm desviación estándar de expresión a las 0, 4, 12 y 24 horas de incubación con PBS o LPS (n = 6 peces por dieta, condición experimental y tiempo evaluado).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar a no ser que se indique lo contrario. La normalidad de las variables se confirmó por Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Levene. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis de ANOVA de una vía, seguidos de la prueba de Tukey o de tests Games Howell, según la homogeneidad de las variables. El nivel de significación fue del 95% en todos los casos ($P < 0,05$). En el caso de los análisis de expresión génica en el ensayo *ex vivo* se usó una ANOVA de dos vías, considerándose la dieta y el tiempo post-incubación como factores. Todos los datos fueron analizados por la aplicación informática SPSS para Windows® (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago).

Resultados

Crecimiento

La inclusión de los aditivos seleccionados afectó significativamente el rendimiento productivo en términos de peso y factor de condición de Fulton (K) de las doradas (Tabla 12). En particular, los peces con un mayor crecimiento somático en peso fueron los alimentados con Dietas 4 y 5 que contenían la mezcla de ácido ursólico 10% + verbascósido 2% (Aditivo UA-VB12, NATAC SA), y las Dietas 2 y 3 que contenían hidrolizados de proteína derivados de sangre porcina (Appetein® y Pepteiva®, APC Europe SA).

Tabla 12. Crecimiento en peso (g), longitud estándar (cm) y factor de condición de Fulton de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

	Peso (g)	Talla (LS, cm)	K
Diet 1 (control)	173,8 ± 6,0 c	18,7 ± 0,2	2,65 ± 0,1 b
Diet 2 (5% Appetein)	180,0 ± 4,4 b	19,0 ± 0,3	2,64 ± 0,2 b
Diet 3 (5% Pepteiva)	182,2 ± 8,4 ab	19,0 ± 0,1	2,67 ± 0,3 b
Diet 4 (0,1% UA-VB12)	189,6 ± 2,6 a	19,2 ± 0,2	2,69 ± 0,2 ab
Diet 5 (0,2% UA-VB12)	180,7 ± 5,1 b	18,8 ± 0,3	2,72 ± 0,3 a
Diet 6 (5% Peptein + 0,1% UA-VB12)	177,0 ± 5,8 cb	18,9 ± 0,2	2,63 ± 0,2 b

Sin embargo, la combinación de dos de estos ingredientes en la Dieta 6 (5% Appetein + 0,1% UA-VB12) no supuso ningún beneficio en términos de crecimiento de los peces, y por lo tanto no se encontró un efecto sumatorio derivado del uso combinado de ambos aditivos.

A título particular, los peces alimentados con la Dieta 2 fueron un 3,8% más pesados que los de la Dieta 1 (control), mientras que los de la Dieta 3 fueron un 4,6% más pesados que los de la Dieta 1 ($P < 0,05$). En relación a los peces alimentados con las dietas que contenían los compuestos bioactivos de plantas medicinales, los peces alimentados con la Dieta 4 fueron un 8,8% más pesados que los de la dieta control, mientras que aquellos alimentados con la Dieta 5 presentaron un peso 3.8% superior que los del grupo control ($P < 0,05$).

El índice de condición de Fulton también se vio afectado como consecuencia de las diferencias de peso encontradas entre tratamientos ($P < 0,05$), así los peces alimentados con la Dieta 5 presentaron un valor de K superior al del resto de tratamientos, mientras que los valores de K de la Dieta 4 fueron intermedios entre la Dieta 5 y la Dieta 1 (control).

Los resultados relativos a la distribución de tallas en peso se encuentran reflejados en la siguiente figura, observándose que las dietas que resultaron un mejor crecimiento presentaron una distribución de tallas sesgada hacia la derecha (tallas mayores) en comparación con la dieta control. A nivel de distribución de tallas, las Dietas 4 y 5 son las que presentaron una mayor homogeneidad (valores de Kurtosis más elevados, 2,6 y 2,3, respectivamente), mientras que los valores para las Dietas 2 y 3 fueron bastante similares entre ellos (Kurtosis = 0,6 y 0,3, respectivamente) y ligeramente inferiores a los peces alimentados con la dieta control (Kurtosis = 0,8). En relación a la Dieta 6, dieta con la mezcla de ambos aditivos de origen animal y vegetal, los valores de Kurtosis fueron muy bajos (0,1) y distintos a los del resto de dietas evaluadas.

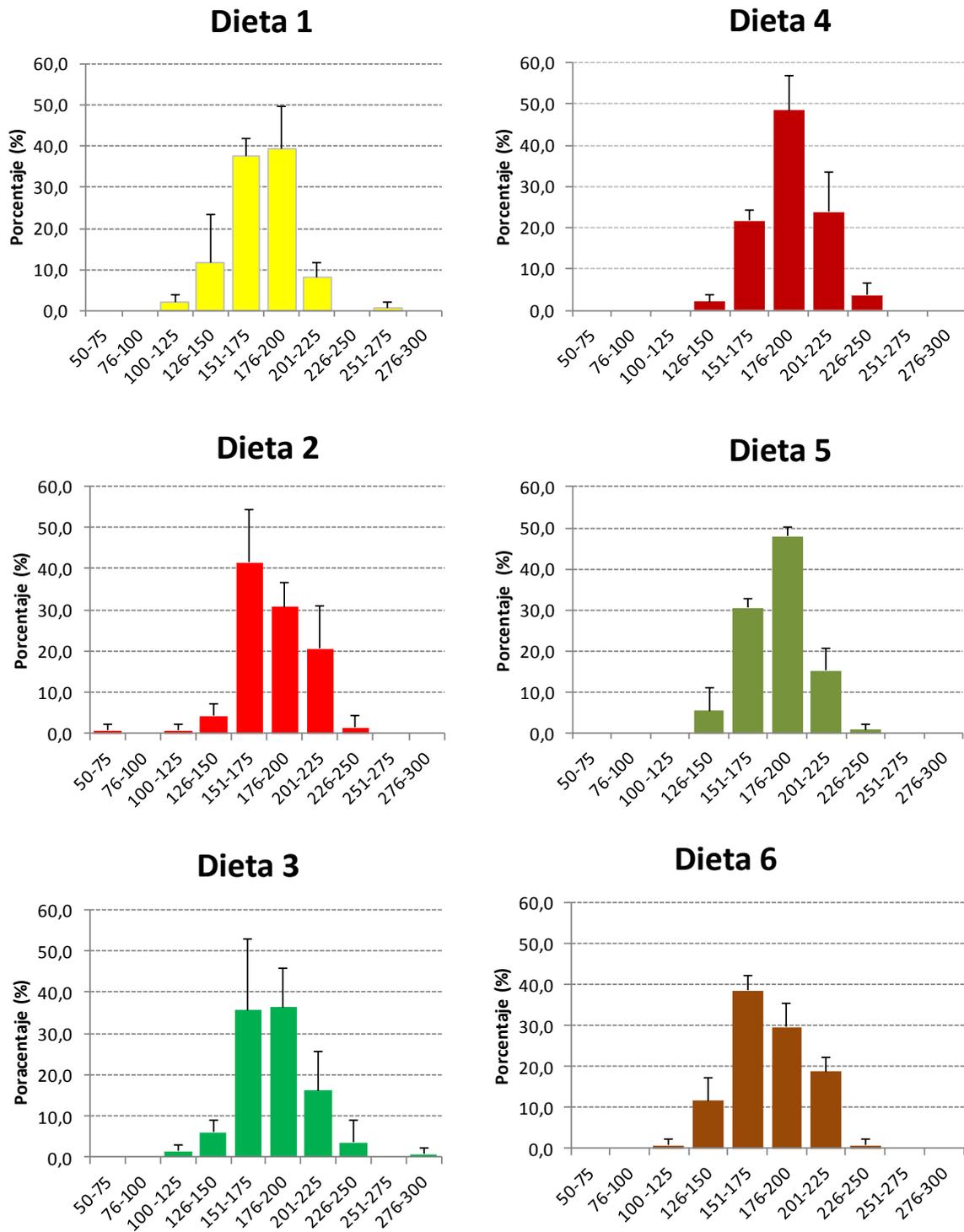


Figura 39. Distribución de tallas en peso de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales. Los gráficos en colores rojizos representan las dietas en las que se usaron derivados de la sangre del cerdo, mientras que los colores de la gama de verdes representan las dietas en las que se usaron aditivos de origen vegetal.

Composición proximal y perfil de ácidos grasos

La composición proximal del filete de los peces alimentados con las 6 dietas experimentales se presenta en la Tabla 13. Destacar que el filete de los peces alimentados con las Dietas 3 y 5 presentaron valores significativamente más altos que los del grupo control (Dieta 1) ($P < 0,05$), mientras que los peces alimentados con el resto de dietas experimentales presentó valores intermedios en contenido proteico. Estos resultados pueden ser debidos en parte a una mayor deposición proteica derivada por un mayor crecimiento en estos grupos, si bien es importante destacar que dicho aumento de proteína en el filete no fue acompañado de cambios en el contenido de materia grasa.

Tabla 13. Composición proximal en peso seco del filete de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre dietas ($P < 0,05$).

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
Proteína (%)	62.0 ± 3.0 b	61.4 ± 2.5 b	69.3 ± 2.8 a	63.7 ± 7.9 b	68.2 ± 4.2 a	67.2 ± 4.4 b
Grasa (%)	12.7 ± 1.3	13.9 ± 2.3	12.3 ± 1.8	13.7 ± 0.9	11.8 ± 1.8	13.3 ± 0.4
Cenizas	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.6	2.6 ± 0.6	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.7
Humedad (%)	70.9 ± 0.5	70.2 ± 0.9	71.7 ± 0.5	71.1 ± 0.3	72.2 ± 1.1	70.9 ± 0.9

En cuanto al perfil de ácidos grasos del filete (mg/g de lípidos), éstos se encuentran representados en la Tabla 14. Los resultados muestran que independientemente del aditivo usado, no se encuentran diferencias en comparación con los peces alimentados con la Dieta 1 (control) en relación al perfil de ácidos grasos del filete, tanto a nivel de EPA y DHA, ni a nivel de ácidos grasos poliinsaturados de la serie 3 (PUFA n-3) como tampoco los de la serie 6 (PUFA n-6); y, por lo tanto, la inclusión de los aditivos evaluados no afecta a la calidad nutricional del filete en términos de su perfil de ácidos grasos. Por consiguiente, podemos concluir que el uso de los aditivos evaluados no afecta la calidad nutricional del filete de cara al consumidor.

Tabla 14. Perfil de ácidos grasos (mg/g grasa) en filetes de dorada alimentados con las dietas experimentales. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (n = 3 por dieta). Cada muestra analizada (replicado biológico) representa un pool de 5 animales de un mismo tanque.

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
Total Lípidos (mg DW)	126,9 \pm 13,2	139,1 \pm 22,9	122,7 \pm 17,8	136,9 \pm 9,3	118,0 \pm 18,0	132,7 \pm 4,3
Total ácidos grasos (mg/g lípidos)	735,1 \pm 72,7	665,8 \pm 13,0	693,3 \pm 84,1	630,9 \pm 58,2	680,1 \pm 34,6	684,5 \pm 71,5
Ácido graso (mg/g lípidos)						
14:0	18,9 \pm 5,0	14,0 \pm 1,9	14,7 \pm 2,3	16,8 \pm 5,0	14,3 \pm 2,1	14,3 \pm 2,7
16:0	132,0 \pm 11,3	122,3 \pm 1,9	119,0 \pm 17,4	136,2 \pm 10,6	118,0 \pm 6,5	120,2 \pm 16,0
18:0	30,8 \pm 1,6	31,1 \pm 0,8	29,7 \pm 3,8	33,1 \pm 2,6	30,6 \pm 2,0	31,1 \pm 3,0
24:0	0,7 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
Total saturados	186,3 \pm 18,9	170,5 \pm 3,1	166,9 \pm 21,4	189,5 \pm 17,2	165,9 \pm 9,5	168,4 \pm 19,9
16:1	42,4 \pm 3,7	39,4 \pm 2,6	36,5 \pm 6,9	44,6 \pm 5,8	38,2 \pm 3,6	39,4 \pm 5,9
18:1n-9	161,6 \pm 11,0	154,2 \pm 8,2	147,4 \pm 19,5	171,9 \pm 9,8	149,7 \pm 8,2	156,4 \pm 17,3
20:1	19,1 \pm 1,1	16,6 \pm 1,7	15,0 \pm 3,0	20,7 \pm 2,1	18,7 \pm 1,4	15,9 \pm 2,0
Total monoinsaturados	223,1 \pm 14,1	210,1 \pm 11,8	198,8 \pm 28,8	237,2 \pm 15,0	206,6 \pm 12,7	211,7 \pm 23,6
18:2n-6	67,8 \pm 6,0	66,0 \pm 1,4	66,2 \pm 8,4	72,6 \pm 4,7	65,1 \pm 4,9	67,1 \pm 7,0
20:4n-6	6,0 \pm 0,5	5,8 \pm 1,0	5,1 \pm 2,2	6,1 \pm 0,4	6,3 \pm 1,0	5,9 \pm 0,6
22:5n-6	3,4 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2	2,6 \pm 1,2	3,4 \pm 0,3	3,5 \pm 0,3	3,3 \pm 0,4
Total n-6 PUFA	77,2 \pm 6,4	74,9 \pm 1,3	74,0 \pm 11,1	82,1 \pm 5,0	83,9 \pm 6,1	76,3 \pm 7,9
18:3n-3	7,0 \pm 2,8	8,1 \pm 0,4	8,1 \pm 4,2	8,9 \pm 0,4	8,1 \pm 0,8	7,7 \pm 0,7
20:5n-3	58,6 \pm 3,5	54,0 \pm 1,5	50,1 \pm 8,0	60,2 \pm 3,2	56,3 \pm 3,7	55,4 \pm 6,9
22:5n-3	20,1 \pm 1,0	19,3 \pm 2,0	17,5 \pm 4,4	20,9 \pm 0,9	19,9 \pm 1,6	17,6 \pm 2,3
22:6n-3	99,9 \pm 7,7	94,1 \pm 5,0	87,4 \pm 16,4	100,0 \pm 5,2	103,4 \pm 9,2	94,6 \pm 11,2
Total n-3 PUFA	190,0 \pm 9,8	175,5 \pm 4,9	165,3 \pm 27,3	190,0 \pm 9,4	187,7 \pm 14,5	175,3 \pm 20,6
Total PUFA	267,2 \pm 15,9	250,5 \pm 5,9	239,3 \pm 38,2	272,1 \pm 14,2	271,5 \pm 19,0	251,6 \pm 28,4

Estrés oxidativo

En la Tabla 16 se muestran los resultados relativos a los niveles de peroxidación lipídica en filete de dorada alimentada con las distintas dietas experimentales y la actividad de distintos enzimas relacionados con el estrés oxidativo. Los resultados indican que la inclusión del ácido ursólico y verbascósido resulta en una ligera pero significativa reducción de los niveles de peroxidación lipídica (TBARs) en el filete de dorada ($P < 0,05$), resultados que podrían venir asociados a las propiedades antioxidantes de dichos compuestos fenólicos. En este sentido, la reducción de los niveles de TBARs fue acompañada de niveles más bajos de CAT, SOD, GR y GST ($P < 0,05$) en los filetes de las doradas alimentadas con las Dietas 4 y 5, mientras que los de la Dieta 6 mostraron valores intermedios en relación al grupo control (Dieta 1).

Tabla 16. Niveles de peroxidación lipídica (TBARs) y actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX) en el filete de doradas alimentadas con las dietas experimentales. Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos experimentales ($P < 0,05$).

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6
TBARs (mmol MDA/100 g)	1,120 ± 0,05 b	1,02 ± 0,11 b	1,11 ± 0,08 b	0,879 ± 0,11 a	0,855 ± 0,09 a	0,981 ± 0,14 b
CAT (nmol/ min/mg prot)	1,99 ± 0,21 b	1,78 ± 0,15 b	1,85 ± 0,19 b	1,58 ± 0,21 a	1,51 ± 0,15 a	1,81 ± 0,10 b
GR (nmol/ min/mg prot)	1,71 ± 0,08 b	1,61 ± 0,11 b	1,63 ± 0,15 b	1,01 ± 0,21 a	1,11 ± 0,14 a	1,59 ± 0,11 ab
GST (nmol/ min/mg prot)	450,1 ± 11,2 b	435,3 ± 18,2 b	440,2 ± 21,5 b	341,8 ± 19,8 a	351,3 ± 18,7 a	397,1 ± 15,7 ab
GPX (nmol/ min/mg prot)	3,84 ± 0,43 b	3,61 ± 0,59 b	3,12 ± 0,71 b	2,11 ± 0,22 a	2,32 ± 0,14 a	2,87 ± 1,11 ab

Respuesta inmune no específica en suero

No se observaron diferencias significativas en los niveles de **lisozima** de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales enriquecidas con extractos de plantas, subproductos porcinos o combinaciones de ambos (Figura 40). Llama la atención la gran variación en los niveles de lisozima que se detectaron entre los peces del grupo alimentado con la dieta 5, que por otra parte fueron los que presentaron un menor nivel de esta sustancia en suero.

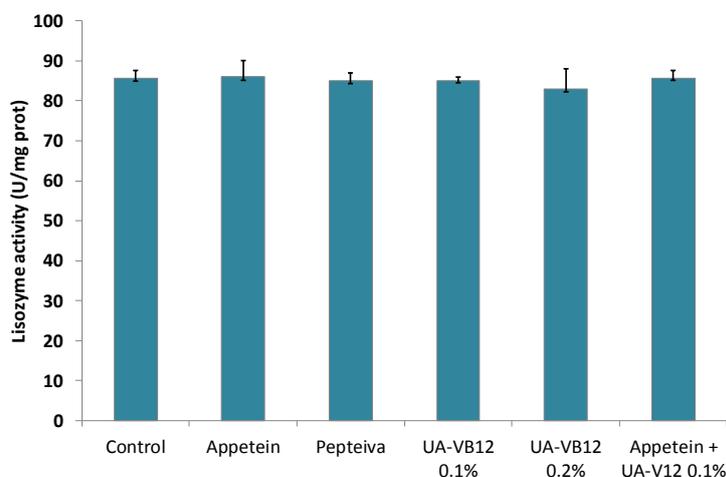


Figura 40. Niveles de lisozima (U/mg de proteína) presentes en suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales (1 control, 2, 3, 4, 5 y 6).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad del **complemento** presente en el suero de doradas de los diferentes grupos experimentales (Figura 41). Solo señalar que los niveles más altos se registraron en doradas alimentadas con la Dieta 2 (plasma atomizado de cerdo 5% inclusión) si bien no existieron diferencias significativas en comparación con la Dieta 1 (control) debido a la elevada variabilidad interindividual. El mismo patrón se observa con la Dieta 6, dieta que presenta el mismo ingrediente que la Dieta 2 pero combinado con los extractos de plantas medicinales.

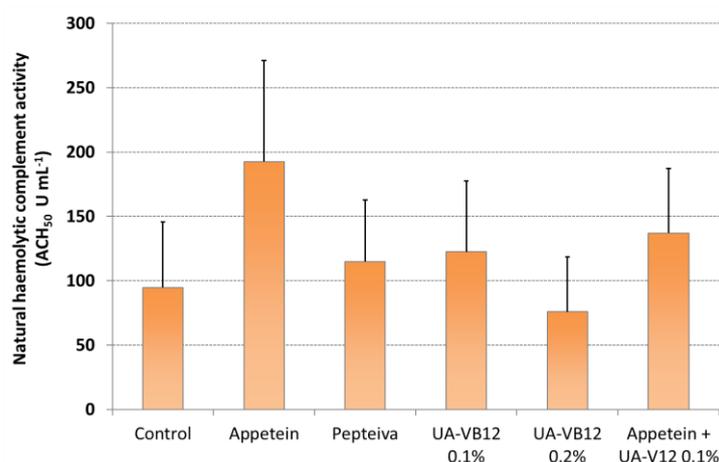


Figura 41. Niveles de complemento (ACH₅₀ U/mL) presentes en suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales (1 control, 2, 3, 4, 5 y 6).

No se registraron variaciones significativas en la **actividad bactericida** del suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas, siendo siempre mayores los valores registrados en el suero de doradas alimentadas con dieta control y lo menores en las doradas alimentadas con la Dieta 2 (Figura 42).

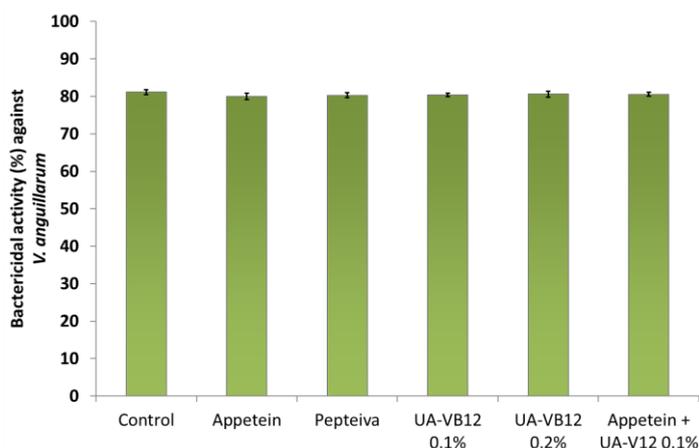


Figura 42. Actividad bactericida (porcentaje) frente a la bacteria *Vibrio anguillarum* presente en suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales (1 control, 2, 3, 4, 5 y 6).

A nivel de inmunoglobulina M en el suero de doradas alimentadas con las seis dietas experimentales enriquecidas con extractos de plantas, subproductos porcinos o combinaciones de ambos, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de IgM entre ellos (Figura 43). En este caso solo llamó la atención los ligeros incrementos observados en la variación en los niveles de IgM encontrados en las muestras de los ejemplares de las Dietas 3 y 4.

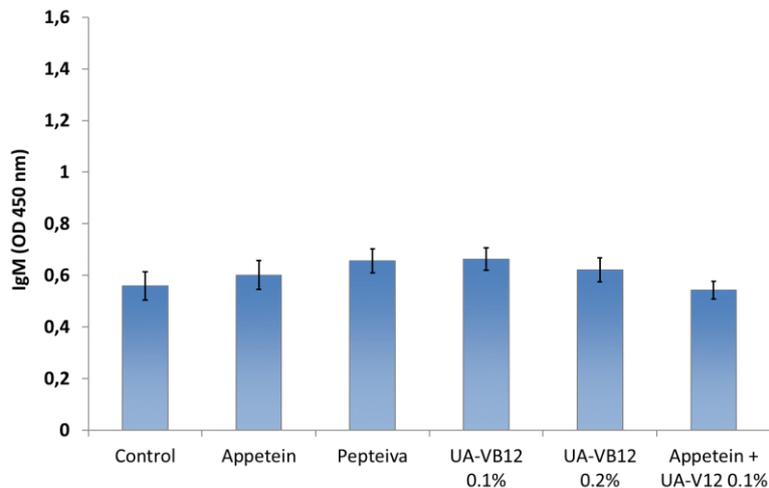


Figura 43. Niveles de IgM ($DO \lambda = 450 \text{ nm}$) presentes en suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales (1 control, 2, 3, 4, 5 y 6).

En el presente estudio, la inclusión de hemoderivados porcinos no afectó significativamente los niveles de lisozima, actividad bacteriolítica, IgM y actividad del complemento en doradas, resultados que difieren con los anteriormente reportados por Gisbert et al. (2015), donde la inclusión de plasma seco por esprayado (*spray-dried plasma*; APPETEIN G[®]) incrementó significativamente los niveles de lisozima, actividad bacteriolítica y del complemento en suero, tal y como también ha sido reportado en otras especies animales (Torrellardona et al., 2003; Che et al., 2012).

Las diferencias encontradas en este estudio con el anterior usando la dorada como modelo, pueden ser debidas al tipo de formulación de la dieta empleada, pues en el primer estudio llevado a cabo con este compuesto (Gisbert et al., 2015) los niveles de harina de pescado eran del 49,4%, mientras que en el presente ensayo llevado a cabo dentro de DIETApplus, los niveles de harina de pescado sólo fueron del 5%. Estas diferencias en la formulación, y la baja presencia de harina de pescado, puede haber afectado la capacidad inmunomoduladora del organismo y la significancia de las diferencias entre grupos, tal y como se intuye con los resultados del complemento, que sí que están en línea con los reportados por Gisbert et al. (2015).

Si bien son conocidas las funciones del ácido verbascósido y ursólico como agentes antiespasmódicos, antimicrobianos, antiinflamatorios y mucolíticos, entre otras (Pascuala et al., 2001; Albano y Miguel, 2011; Khan y Abourashed, 2010), estos extractos de plantas medicinales usados no han sido probados en peces y por tanto se desconoce su potencial efecto inmunomodulador sobre el organismo, aunque los resultados obtenidos parecen indicar que los niveles evaluados a las dosis y tiempos de administración ensayados no han sido capaces de cambiar los niveles de los marcadores de la respuesta inmune sistema en dorada. Estos resultados podrían ser debidos al alto porcentaje de inclusión de proteínas de origen vegetal en todas las dietas ensayas, niveles de inclusión que podrían haber afectado la respuesta inmune no específica basal en todos los tratamientos, al igual que se ha observado con los dos hemoderivados de cerdo evaluados en este ensayo.

Microbiota intestinal

El análisis de la similitud de los patrones de las bandas de DGGE obtenidas de peces alimentados con las diferentes dietas muestra que la microbiota intestinal de los ejemplares que recibieron las distintas dietas no mostraron un agrupamiento claro con respecto a la dieta analizada, las dosis de suplemento aplicadas o la sección intestinal estudiada, variando los porcentajes de similitud entre el 30% y el 43% (Figura 44 en el caso del intestino anterior y Figura 45 para el intestino posterior), lo que indicaría una variabilidad en la microbiota de los especímenes de cada uno de los tratamientos.

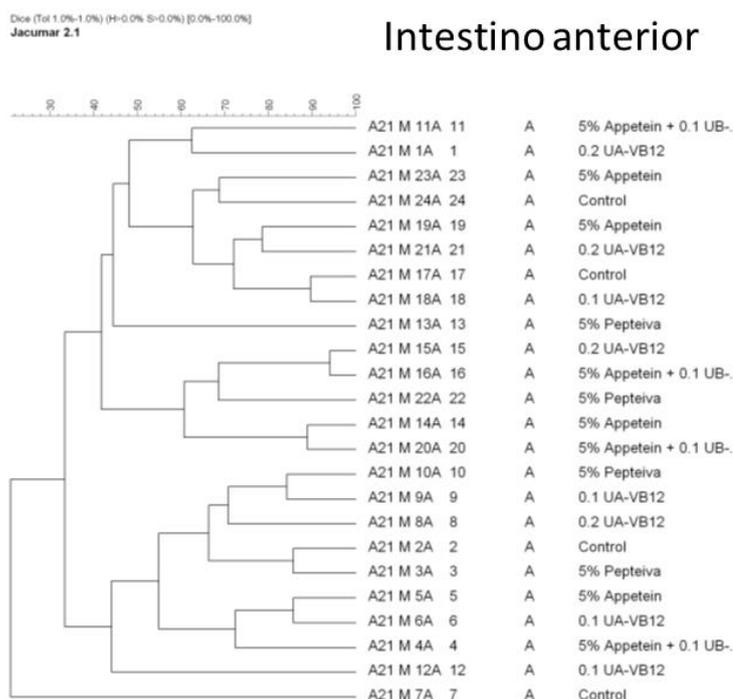


Figura 44. Análisis de los patrones de bandas de DGGE obtenidas a partir de las muestras de intestino anterior de ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) alimentadas con una dieta control (Dieta 1), así como con otras que incorporan 5% APPETEIN® (Dieta 2), 5% PEPTEIVA® (Dieta 3), 0,1% UA-VB12 (Dieta 4), 0,2% UB-VB12 (Dieta 5) y 5% APPETEIN® + 0,1 UB-VB12 (Dieta 6).

Por otro lado, no se observaron variaciones significativas en los valores de los parámetros ecológicos analizados independientemente de la sección intestinal estudiada y tratamientos (Tabla 17). Los valores de riqueza (R) oscilaron entre 14 y 42 bandas de DGGE, mientras que los valores de H' y Rr fueron superiores a 2 y 30 en todos los casos, respectivamente (Tabla 17).

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
Jacumar 2.1

Intestino posterior

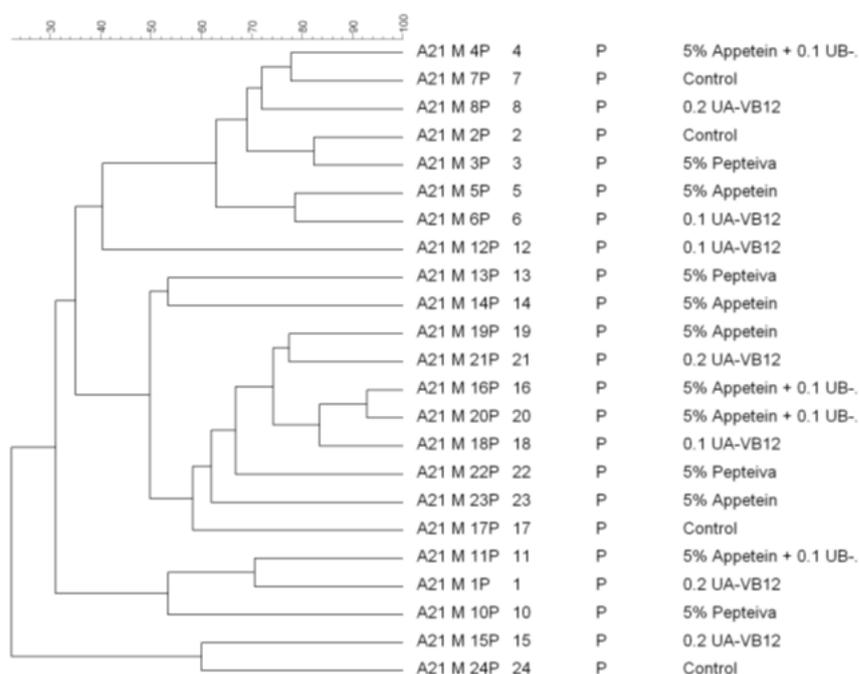


Figura 45. Análisis de los patrones de bandas de DGGE obtenidas a partir de las muestras de intestino posterior de ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) alimentadas con una dieta control (Dieta 1), así como con otras que incorporan 5% APPETEIN® (Dieta 2), 5% PEPTEIVA® (Dieta 3), 0,1% UA-VB12 (Dieta 4), 0,2% UB-VB12 (Dieta 5) y 5% APPETEIN® + 0,1 UB-VB12 (Dieta 6).

A partir de estos resultados presentados en la Tabla 17 podemos concluir, que la incorporación de hemoderivados porcinos (plasma secado por esprayación) y compuestos bioactivos como el ácido ursólico y verbascósido, derivados de plantas medicinales como la salvia y la marialuisa, no modifican ni la abundancia ni la diversidad de las poblaciones bacterianas que colonizan el intestino de la dorada, pese a su reportada actividad antimicrobiana y, por tanto su administración en dietas para peces puede considerarse como inocua, si bien tampoco se ha observado un efecto positivo sobre la comunidad bacteriana intestinal.

Tabla 17. Valores medios de los parámetros ecológicos de riqueza (R), índice de diversidad de Shannon (Ho) y de habitabilidad (Rr), obtenidos a partir de las muestras de intestino anterior y posterior de ejemplares de dorada alimentadas con una dieta control (Dieta 1), así como con otras que incorporan 5% APPETEIN® (Dieta 2), 5% PEPEIVA® (Dieta 3), 0,1% UA-VB12 (Dieta 4), 0,2% UB-VB12 (Dieta 5) y 5% APPETEIN® + 0,1 UB-VB12 (Dieta 6).

		TRATAMIENTOS					
		Controles	5% Pepteiva	5% Appetein	0.1 UA VB 12	0.2 UA VB 12	5% Appetein+ 0.1 UA VB 12
Diversidad	A	2,41±0,58	2,58±0,22	2,50±0,58	2,64±0,28	2,51±0,46	2,30±0,28
	P	2,705±0,11	2,66±0,18	2,63±0,35	2,36±0,34	2,14±0,51	2,23±0,37
Habitabilidad	A	56,25±36,11	76,87±42,51	63,56±51,34	75,81±23,46	62,25±36,98	41,18±23,79
	P	71,00±26,21	70,81±15,11	67,87±38,79	45,87±28,74	33,81±27,19	46,18±19,72
Riqueza	A	14,00±6,21	17±4,96	14,75±6,99	17,25±2,75	15±5,65	42,25±3,86
	P	16,66±3,05	16,75±1,79	16±4,54	13±4,39	11±5,12	12,25±3,03

El análisis de la similitud de los patrones de las bandas de DGGE obtenidas de peces alimentados con las diferentes dietas muestra que la microbiota intestinal de los ejemplares que recibieron las distintas dietas no mostraron un agrupamiento claro con respecto a la dieta analizada, lo que indicaría una variabilidad en la microbiota de los especímenes de cada uno de los tratamientos. Además, independientemente de la sección intestinal estudiada y tratamientos no se observaron variaciones significativas en los valores de riqueza, diversidad u habitabilidad analizados. Estos resultados coinciden con los informados por (Moutinho et al., 2017), quienes comprobaron que los valores de riqueza y diversidad en muestras de dorada de intestino anterior y posterior no eran significativamente diferentes.

Los resultados de riqueza y diversidad observados en este estudio son muy similares a los calculados en otros estudios que analizaron la microbiota intestinal de *Sparus aurata* sometidos a distintas dietas (Cerezuela et al., 2013; Moutinho et al., 2017) e incluso los valores de diversidad son parecidos a otros en los que en lugar de la metodología basada en la DGGE se aplicó la secuenciación masiva. Teniendo en cuenta que el valor del índice de Shannon varía entre 0 y 5, donde 0 es la mínima diversidad y 5 la máxima, la diversidad de la microbiota intestinal de los ejemplares analizados en esta actividad corresponde a una comunidad con una diversidad media, donde existe unos grupos bacterianos que manifiestan una cierta dominancia. Por lo que se refiere a la habitabilidad, los valores calculados en todos los casos fueron superiores a 30, lo que según Marzorati et al. (2008) se corresponde con comunidades con una alta capacidad para soportar el desarrollo de diferentes grupos bacterianos.

En resumen, se puede decir que el uso de las dietas funcionales ensayadas en esta actividad A2.1. no implicarían cambios significativos en lo que se refiere a la estructura de las comunidades microbianas intestinales de las doradas que las recibieron.

Histología de tejidos diana

A continuación, se presentan los resultados de los análisis histoquímicos clásicos para los distintos tejidos diana sobre los cuales los aditivos evaluados podían tener un efecto, éstos son: piel dorsal y ventral, branquias e intestino.

Las reacciones histoquímicas en la **piel dorsal** en los ejemplares control (Dieta 1) se caracterizan, principalmente, por la presencia moderada de mucinas neutras/glicoproteínas y débil de ácidas carboxiladas en el epitelio, células mucosas, dermis e hipodermis (Tabla 18). No se observa reacción para la presencia de grupos sulfatados (débil y fuertemente ionizados) en el epitelio (negatividad al Azul Alcían pH: 1,0 y 0,5). Sin embargo, en células mucosas, la señal es débil para mucosustancias sulfatadas poco ionizadas (AA pH 1,0). En los peces alimentados con las dietas experimentales, observamos la presencia moderada de mucosustancias neutras (PAS positivo) en el epitelio e intensa para células mucosas. Las mucosustancias carboxiladas presentan una reacción débil y moderada para el epitelio y células mucosas en general. Se destaca la presencia de mucosustancias sulfatadas (débil y muy ionizadas), sobre células mucosas en ejemplares de las dietas experimentales. Los valores comparativos semicuantitativos de las características histoquímicas de las secreciones mucosas se encierran resumidas en la Tabla 18.

Tabla 18. Carbohidratos en piel dorsal de *S. aurata*. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa. GP, glicoproteínas; MN, mucosustancias neutras; M, mucosustancias; MS, mucosustancias sulfatadas.

Dieta 1(control)				Dieta 2 (5 % Appetein)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	1-2/2-3	1-2	0-1	MN/GP	1-2/2-3	2-3	0-2
M Carboxiladas	0-1/0-1	0-1	0-1	M Carboxiladas	0-2/0-1	0-1	0
MS poco ionizadas	0/0-1	0	0	MS poco ionizadas	0/0-1	0	0
MS muy ionizadas	0/0	0	0	MS muy ionizadas	0/0-1	0	0

Dieta 3 (5 % Pepteiva)				Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	1-2/2-3	2-3	0	MN/GP	1-2/2-3	1-2	0
M Carboxiladas	0-1/0-1	1	0	M Carboxiladas	0-2/0-1	0-2	0
MS poco ionizadas	0/0-1	0	0	MS poco ionizadas	0/0-1	0	0
MS muy ionizadas	0/0-1	0	0	MS muy ionizadas	0/0-1	0	0

Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)				Dieta 6 (5 % Peptein + 0.1 % UA-VB12)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	1-2/2-3	2	0	MN/GP	1-2/2-3	2-3	0
M Carboxiladas	0-1/0-1	0-1	0	M Carboxiladas	0-2/0-1	1-2	0
MS poco ionizadas	0/0-1	0	0	MS poco ionizadas	0/0-1	0	0
MS muy ionizadas	0/0	0	0	MS muy ionizadas	0/0-1	0	0

En relación a la **piel dorsal**, para los ejemplares control, se observa un contenido moderado de mucosustancias neutras en el epitelio y dermis, seguida de una reacción débil para mucinas ácidas carboxiladas (Tabla 19), no conteniendo grupos sulfatados (Azul Alcían pH 0,5 y 1,0). Las células mucosas se tiñen intensamente con PAS y débilmente para mucinas carboxiladas y

sulfatadas. En lo que respecta a las dietas experimentales, el epitelio destaca por su contenido moderado de mucosustancias neutras (PAS positivo), una reacción débil para mucosustancias carboxiladas (AA pH 2,5), excepto las dietas 3 y 6 en las que su presencia es moderada. No se identifican grupos sulfatados (negatividad al Azul Alcían pH 0,5 y 1.0). Sin embargo, en la Dieta 3 se identifica una reacción débil al (AA pH 1,0) sugiriendo presencia de mucosustancias sulfatadas poco ionizadas. Las células mucosas se caracterizan por la presencia de mucinas neutras, que se manifiestan por una reacción intensa para la reacción del PAS. Además, se observa una reacción débil positiva en cuanto al contenido de mucosustancias carboxiladas y reacción moderada en grupos sulfatados poco ionizados (Dietas 2 y 3). El contenido de mucosustancias sulfatadas muy ionizadas es bajo para las células mucosas. Los valores comparativos semicuantitativos de las características histoquímicas de las secreciones mucosas se encuentran resumidas en la Tabla 19.

Tabla 19. Carbohidratos en piel dorsal ventral de *S. aurata*. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa. GP, glicoproteínas; MN, mucosustancias neutras; M, mucosustancias; MS, mucosustancias sulfatadas.

Dieta 1 (control)				Dieta 2 (5 % Appetin)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	1-2/1-3	2	0	MN/GP	1-2/2-3	2	0
M Carboxiladas	0-1/0-1	0	0	M Carboxiladas	0-1/0-1	0	0
MS poco ionizadas	0/0-1	0	0	MS poco ionizadas	0/0-2	0	0
MS muy ionizadas	0/0-1	0	0	MS muy ionizadas	0/0-1	0	0

Dieta 3 (5 % Pepteva)				Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	0-2/1-3	2-3	0	MN/GP	1-2/1-3	2	0
M Carboxiladas	1-2/0-2	2	0	M Carboxiladas	0-1/0-1	1-2	0
MS poco ionizadas	0-1/1-2	0	0	MS poco ionizadas	0/0-1	0	0
MS muy ionizadas	0/0-1	0	0	MS muy ionizadas	0/0	0	0

Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)				Dieta 6 (5 % Peptin + 0.1 % UA-VB12)			
Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis	Piel	Epitelio/c.mucosas	dermis	Hipodermis
MN/GP	0-2/1-3	1-3	0	MN/GP	1-2/2-3	2-3	0
M Carboxiladas	0-1/0-1	0	0	M Carboxiladas	0-2/0-1	2-3	0
MS poco ionizadas	0/0	0	0	MS poco ionizadas	0/0-1	0	0
MS muy ionizadas	0/0-1	0	0	MS muy ionizadas	0/0-1	0	0

En cuanto al análisis histoquímico de las **branquias** destacar que las células epiteliales del grupo control y las dietas experimentales presentan un bajo contenido en mucinas ácidas carboxiladas y sulfatadas, ya que se tiñen muy débilmente con Azul Alcían pH 2,5, 1,0 y 0,5. Sin embargo, se observa la presencia de mucosustancias/glicoproteínas neutras, ya que es positiva la reacción del PAS (glicoproteínas neutras y/o glucógeno). Particularmente, los grupos alimentados con las Dietas 3 y 4 por la intensidad de la reacción (Tabla 2.8). Las células mucosas destacan por la presencia de mucinas ricas en glucoproteínas neutras (PAS positivo), con algunas variaciones en cuanto a mucinas carboxiladas y/o sulfatadas (Azul Alcían pH: 2,5, 1,0, 0,5 positivo). En la dieta control se observa un bajo contenido de mucosustancias carboxiladas y/o sulfatadas, a

diferencia de las Dietas 2, 4, 5 que presentan mayor intensidad de reacción. Los valores comparativos semicuantitativos de las características histoquímicas de las secreciones mucosas se encuentran resumidas en la Tabla 20.

Tabla 20. Carbohidratos en las branquias de *S. aurata*. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa. GP, glicoproteínas; MN, mucosustancias neutras; M, mucosustancias; MS, mucosustancias sulfatadas.

Dieta 1 (control)			Dieta 2 (5 % Appetein)		
Branquias	Epitelio	C.Mucosas	Branquias	Epitelio	C.Mucosas
MN/GP	1-2	1-3	MN/GP	1-3	2-3
M Carboxiladas	0-1	0-1	M Carboxiladas	0-1	0-3
MS poco ionizadas	0	0-1	MS poco ionizadas	0	0-1
MS muy ionizadas	0	0	MS muy ionizadas	0	0

Dieta 3 (5 % Pepteiva)			Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)		
Branquias	Epitelio	C.Mucosas	Branquias	Epitelio	C.Mucosas
MN/GP	2-3	3	MN/GP	1-3	3
M Carboxiladas	0-1	0-2	M Carboxiladas	1-2	2-3
MS poco ionizadas	0	0-1	MS poco ionizadas	0-1	0-3
MS muy ionizadas	0	0	MS muy ionizadas	0	0-1

Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)			Dieta 6 (5 % Peptein + 0.1 % UA-VB12)		
Branquias	Epitelio	C.Mucosas	Branquias	Epitelio	C.Mucosas
MN/GP	1-2	3	MN/GP	1-3	3
M Carboxiladas	0-1	0-3	M Carboxiladas	1-2	0-3
MS poco ionizadas	0	0-1	MS poco ionizadas	0	0-2
MS muy ionizadas	0	0	MS muy ionizadas	0	0-1

Los resultados histoquímicos del **intestino** de los ejemplares estudiados indican una reacción negativa a las mucinas sulfatadas poco y muy ionizadas en el epitelio, con reacción muy débil en la *lamina propia* y submucosa. Sin embargo, la reacción del PAS es positiva en el epitelio y más intensa en las Dietas 2, 5 y 6; con actividad moderada en la *lamina propia* y submucosa especialmente las Dietas 5 y 6. No se detectan mucinas carboxiladas en la dieta control, aunque sí se observa un contenido débil y medio en mucinas carboxiladas del epitelio, lamina propia y submucosa del resto de las dietas. Los valores comparativos semicuantitativos de las características histoquímicas de las secreciones mucosas se encuentran resumidas en la Tabla 21.

Tabla 21. Carbohidratos en el intestino de *S. aurata*. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa. GP, glicoproteínas; MN, mucosustancias neutras; M, mucosustancias; MS, mucosustancias sulfatadas.

Dieta 1(control)					Dieta 2 (5 % Appetein)				
Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa	Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa
MN/GP	0-1	1-3	0-1	0-1	MN/GP	0-2	2-3	0-1	0-1
M Carboxiladas	0	1-3	0-1	0-1	M Carboxiladas	0-1	3	0-1	1-2
MS poco ionizadas	0	2-3	0	0	MS poco ionizadas	0	2-3	0	0-1
MS muy ionizadas	0	2-3	0	0-1	MS muy ionizadas	0	2-3	0-1	0-1

Dieta 3 (5 % Pepteiva)					Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)				
Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa	Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa
MN/GP	0-1	2-3	0-1	1	MN/GP	0-1	2-3	0-1	1
M Carboxiladas	0-1	3	0-1	0-2	M Carboxiladas	0-1	3	0-1	1-2
MS poco ionizadas	0	2-3	0	0	MS poco ionizadas	0	3	0	0
MS muy ionizadas	0	2-3	0	0-1	MS muy ionizadas	0	2-3	0	1

Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)					Dieta 6 (5 % Peptein + 0.1 % UA-VB12)				
Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa	Intestino	Epitelio	C.Mucosas	L.Propia	Submucosa
MN/GP	1-2	2-3	1	1-2	MN/GP	1-3	2-3	1-2	2-3
M Carboxiladas	0-1	3	0-2	1-2	M Carboxiladas	1	3	1-2	1-3
MS poco ionizadas	0	3	0	0	MS poco ionizadas	0	3	0	0
MS muy ionizadas	0	2-3	0	0-1	MS muy ionizadas	0	3	0-1	1-2

En las células mucosas encontramos algunas variaciones en la composición su contenido, aunque la intensidad de la reacción es bastante similar en las diferentes dietas experimentales (Tabla 21). No todas las células presentan una distribución homogénea a la reacción del PAS y/o Azul Alcían (pH 2,5, 1,0, 0,5), ya que se detectan diferencias entre ellas: algunas células se tiñen por el borde, otras en la zona central, otras por zonas, etc. Por ejemplo, la reacción AA pH2,5/PAS evidencia la presencia de mucinas ácidas (azul), mucinas neutras (rosa) y otras células se tiñen de púrpura indicando la presencia combinada de mucinas ácidas y neutras. Los valores comparativos semicuantitativos de las características histoquímicas de las secreciones mucosas se centran resumidas en la Tabla 21.

En cuanto a la **histoquímica de lectinas**, el epitelio de la **piel dorsal** en el grupo control destaca por la presencia de residuos glucídicos ricos en α/β N-acetil-galactosamina (SBA) y se observa una débil afinidad por las lectinas ConA y UEA-I, siendo negativa para las lectinas WGA y SNA, demostrando la ausencia de N-acetil- β -D-Glucosamina/N-acetil-Neuramínico respectivamente. Las células mucosas contienen N-acetil- β -D-Glucosamina y Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina, detectándose una débil reacción con α/β N-acetil-galactosamina y ausencia de manosa y/o glucosa y N-acetil-Neuramínico (Tabla 22). En las Dietas 4, 5 y 6 se observó que el epitelio tiene afinidad por las lectinas SBA, UEA-I y ConA, con una intensidad de reacción significativamente superior al grupo control. Las células mucosas también presentan intensidad de reacción significativamente mayor que las del grupo control, especialmente por los residuos de N-acetil- β -D-Glucosamina, α/β N-acetil-galactosamina y Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina.

Tabla 22. Histoquímica de lectinas en la piel dorsal y ventral de ejemplares de *S. aurata* alimentados con las distintas dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

Dieta 1 (control)					Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)				
Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal		Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal	
	Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas		Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas
Con A	0-1	0	0-1	0	Con A	0	0	1-2	0-2
WGA	0	3	0	3	WGA	0	0-3	0	3
UEA-I	0-1	1-3	0-1	0-3	UEA-I	0-1	0-3	0-3	1-3
SBA	3	0-2	2	0-1	SBA	3	0-3	1-3	0-3
SNA	0	0	0	0	SNA	0	0	0	0

Dieta 2 (5 % Appetain)					Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)				
Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal		Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal	
	Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas		Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas
Con A	0-1	0	0-1	0-1	Con A	0	0	1-2	0
WGA	0	3	0	3	WGA	0	0-2	0	3
UEA-I	0-1	1-3	0	0-3	UEA-I	0	0-3	0	1-3
SBA	3	0	0-2	0	SBA	3	0-3	3	0-2
SNA	0	0	0	0	SNA	0	0	0	0

Dieta 3 (5 % Penteiva)					Dieta 6 (5 % Peptein + 0.1 % UA-VB12)				
Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal		Piel	Piel Ventral		Piel Dorsal	
	Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas		Epitelio	C.Mucosas	Epitelio	C.Mucosas
Con A	0-1	0	1	0	Con A	0	0	2-3	0
WGA	0	3	0	3	WGA	0	3	0	3
UEA-I	0-1	0-3	0	0-3	UEA-I	0-1	0-3	0-2	0-3
SBA	3	0-3	0-3	0	SBA	3	0-1	3	0-3
SNA	0	0	0	0	SNA	0	0	0	0

Las células epiteliales de la **piel ventral** del grupo control han reaccionado débilmente con las lectinas ConA y UEA-I e intensamente con la lectina SBA, lo que indica una fuerte presencia del azúcar α/β -N-acetilgalactosamina. La afinidad por las lectinas WGA y SNA es negativa, no detectándose la presencia de los azúcares β -N-acetilglucosamina/ N-acetilneuramínico. En las células mucosas, se observa fuerte afinidad por las lectinas WGA Y UEA-I, poniendo de manifiesto la presencia de N-acetilglucosamina y Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina. Igualmente, estas células también presentan una reacción moderada por la lectina SBA y negativa para las lectinas ConA y SNA (Tabla 22). En cuanto a las dietas experimentales, se observa un patrón similar de reacción que en el epitelio de los ejemplares del grupo control, a excepción de la Dieta 5 en donde sólo la lectina SBA fue positiva. Las células mucosas en las Dietas 3, 4 y 5 tienen fuerte afinidad por las lectinas WGA, UEA-I y SBA, y la reacción es más intensa que el grupo control, lo que sugiere mayor presencia de los azúcares α/β -N-acetilgalactosamina, β -N-acetilglucosamina/N-acetilneuramínico y α -L-fucosa.

Las células mucosas de las **branquias** en los ejemplares control se caracterizan por la presencia de residuos azucarados con afinidad por la lectina WGA (N-acetilglucosamina) y SBA (α/β -N-acetilgalactosamina), con una débil intensidad de reacción por manosa y/o glucosa (ConA) y

ausencia de Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina/ N-acetilneuramínico (UEA-I y SNA). Respecto a las dietas experimentales, las células mucosas presentan afinidad similar al control en cuanto a la especificidad de las lectinas (Tabla 23). Sin embargo, no todas se tiñen homogéneamente, algunas células están teñidas en el borde, centro u otras zonas. Muestran fuerte afinidad con las lectinas WGA y SBA, con una intensidad de reacción significativamente mayor que el grupo control especialmente la Dieta 5.

Tabla 23. Histoquímica de lectinas en las branquias e intestino de ejemplares de *S. aurata* alimentados con las distintas dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

Dieta 1 (control)				Dieta 4 (0.1 % UA-VB12)			
	Branquias		Intestino		Branquias	Intestino	
	C.Mucosas	Enterocitos	Enterocitos	C.Mucosas		C.Mucosas	Enterocitos
Con A	0-1	0-1	0	0	0	0-2	0
WGA	3	0	2-3	3	3	0	3
UEA-I	0	0	0	0	0	0	0
SBA	1-3	0	1-3	1-3	0-3 (ns)	0-1	1-3
SNA	0	3	0-3 (ns)	0-3 (ns)	0	3	0

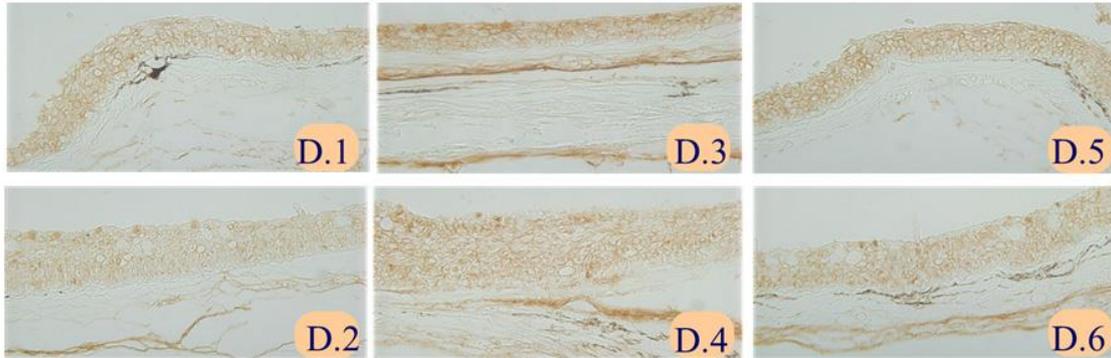
Dieta 2 (5 % Appetin)				Dieta 5 (0.2 % UA-VB12)			
	Branquias		Intestino		Branquias	Intestino	
	C.Mucosas	Enterocitos	Enterocitos	C.Mucosas		C.Mucosas	Enterocitos
Con A	0	0-2	0	0	0	0	0-3 (ns)
WGA	3	0	3	3	3	0	3
UEA-I	0	0	0	0	0	0	0
SBA	0-3 (ns)	1-3	0-3 (ns)	0-3 (ns)	3	0	0-3 (ns)
SNA	0	3	0-2 (ns)	0-2 (ns)	0	2-3	0-3 (ns)

Dieta 3 (5 % Pepteiva)				Dieta 6 (5 % Peptein + 0.1 % UA-VB12)			
	Branquias		Intestino		Branquias	Intestino	
	C.Mucosas	Enterocitos	Enterocitos	C.Mucosas		C.Mucosas	Enterocitos
Con A	0	0-1	0	0	0	0-1	0
WGA	3	2-3	3	3	3	0	3
UEA-I	0	0	0	0	0	0	0
SBA	0-3 (ns)	1	3	3	0-3 (ns)	0	1-3 (ns)
SNA	0	3	0-2 (ns)	0-2 (ns)	0	3	0-3 (ns)

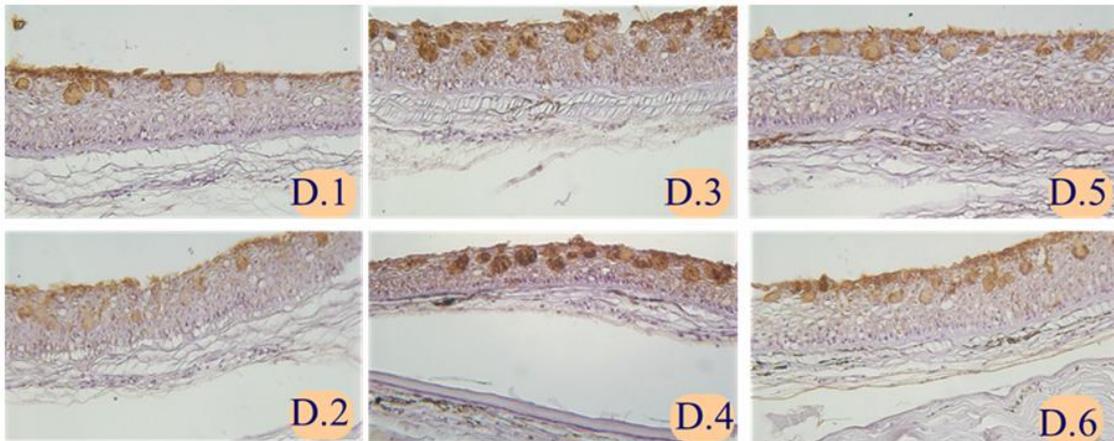
Las secreciones mucosas del **intestino** en el grupo control destacan por su secreción glucoproteica con residuos de N-acetilneuramínico (SNA) y casi inapreciable intensidad de reacción para residuos de manosa/glucosa (SBA) en los enterocitos. Las células mucosas tienen fuerte afinidad por las lectinas WGA, SBA y SNA y negativa para las lectinas UEA-I y ConA, lo que evidencia la ausencia de N-acetilneuramínico/Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina (Tabla 23).

En los grupos experimentales de las dietas, las lectinas ConA, WGA, SBA y SNA tiñen las microvellosidades de los enterocitos con una intensidad de reacción moderadamente mayor que el grupo control, sin embargo, estas células no reaccionaron con la lectina UEA-I.

SBA - Piel



WGA - Piel



WGA - Intestino

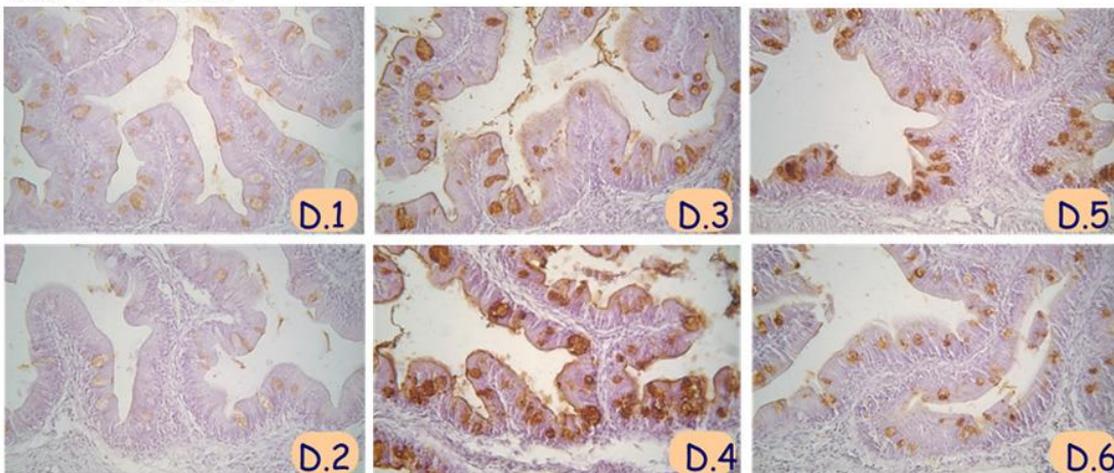


Figura 46. Algunas imágenes de la histoquímica de lectinas de cortes histológicos de piel e intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales. Obsérvese como en las dietas compuestos triterpénicos (Dietas 4-6) se detectan mayores intensidades de reacción. Los residuos azucarados de las glucoproteínas de la epidermis, se caracterizan por su riqueza en β -N-acetilglucosamina y N-acetilneuramínico (WGA); α/β -N-acetilgalactosamina (SBA); α -manosa/ α -glucosa (ConA) y Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina (UEA-1) con mayor intensidad. Las células mucosas intestinales presentan residuos glucídicos poco variables de α/β -N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico/ácido siálico y mantienen un patrón de residuos de β -N-acetilglucosamina (y NANAs) con intensidad moderadamente mayor en la Dietas 4.

En cuanto a las células mucosas del intestino, éstas presentan niveles poco variables de α/β -N-acetilgalactosamina/ácido N-acetilneuramínico (lectinas SBA, SNA) y mantienen un patrón de N-acetil- β -D-Glucosamina, con intensidad de reacción ligeramente mayor en las dietas respecto al grupo control. Por otro lado, en la dieta 5 se observó una reacción intensa para residuos de manosa /glucosa (ConA) que no se encontraron en la dieta control donde la afinidad por esta lectina fue negativa (Tabla 23).

Además de evaluar las características histoquímicas de las secreciones producidas por las células mucosas en los distintos analizados con función linfoide (piel, branquias e intestino), se procedió a cuantificar la densidad de las células mucosas con el fin de evaluar si los aditivos usados en las dietas evaluadas tenían un efecto promotor en su diferenciación. Así, los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en el número de células mucosas por unidad de longitud de tejido (mm) en la mucosa intestinal, específicamente las Dietas 4 (0,1% UA-VB12) y 5 (0,2% UA-VB12), respecto al grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias en piel dorsal, piel ventral y branquias (Figura 47).

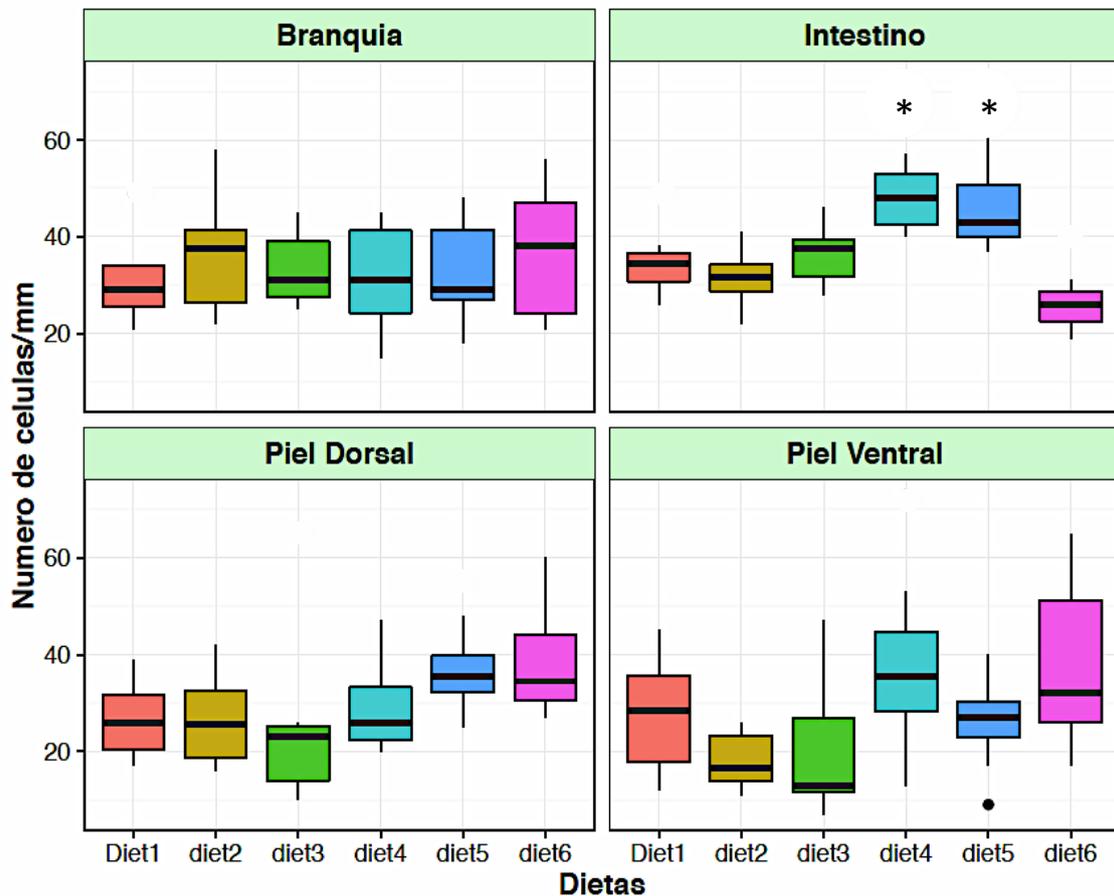


Figura 47. Representación box-plot de la densidad de células mucosas en tejido branquial, piel ventral y dorsal, e intestino en juveniles de dorado alimentados con las dietas experimentales. El asterisco indica la existencia de diferencias significativas con el resto de grupos.

Resumiendo, en relación a los resultados histoquímicos podemos concluir a nivel global que se observan diferencias en el patrón de distribución de glucoproteínas (neutras y ácidas carboxiladas y sulfatadas (débil y fuertemente ionizadas) en piel, branquias e intestino, con mayor presencia de mucinas neutras en piel (PAS, valores = 2-3) y similar intensidad en branquias e intestino (PAS, valores = 1-3). Las mucinas carboxiladas y sulfatadas (AA 2,5, 0,5 y 1) son más abundantes en las células del intestino (valores = 2-3), y las glicoproteínas ricas en B-D-Glucosa-N-acetil y ácido siálico (WGA) son muy abundantes en los y tres tejidos, mientras las glucoproteínas con residuos de α , β -Galactosa-N-acetil (SBA) son más abundantes en intestino, y moderadamente en branquias y piel. Además, se observaron diferencias en el contenido de mucinas de naturaleza glucoproteica (neutras, ácidas carboxiladas, sulfatadas y azúcares), con intensidades de reacción levemente más intensas en las dietas enriquecidas con compuestos fenólicos (ácidos ursólico y verbascósido), principalmente en los tejidos epiteliales y células mucosas de la piel, branquia e intestino, al igual que un aumento en el número de células mucosas en el intestino, respecto a los grupos controles.

Las glucoproteínas ricas en residuos glucídicos (epitelio y células mucosas) se caracterizan por la presencia de β -N-acetilglucosamina (WGA), α/β -N-acetilgalactosamina (SBA), α -manosa/ α -glucosa (ConA) y Fucosa- α 1-2galactosa-N-acetil-4glucosamina (UEA-1) con mayor intensidad de reacción en las dietas que contenían mezcla de ácido ursólico y verbascósido. Mientras que en las branquias se observó la presencia de β -N-acetilglucosamina (WGA) y α/β -N-acetilgalactosamina(SBA), con débil reacción para residuos de α -manosa/ α -glucosa (ConA). En el intestino las células epiteliales (enterocitos) se caracterizan por la presencia de residuos de ácido N-acetilneuramínico (SNA), α -manosa/ α -glucosa (ConA) y α/β -N-acetilgalactosamina (SBA). Mientras que en las células mucosas predominan los residuos de β -N-acetilglucosamina (WGA), α/β -N-acetilgalactosamina (SBA) y ácido N-acetilneuramínico (SNA).

La piel dorsal y ventral presentan diferencias en el patrón de distribución de glucoproteínas neutras y ácidas carboxiladas y sulfatadas (fuerte y débilmente ionizadas). En la piel dorsal, se han identificado más mucinas neutras que en la piel ventral. Con las dietas conteniendo compuestos polifenólicos, incrementaron las glucoproteínas sulfatadas en la piel dorsal, y disminuyeron las glucoproteínas débilmente sulfatadas en la piel ventral con dietas con compuestos polifenólicos. Las glucoproteínas ricas en manosa/glucosa (ConA), Fucosa (UEA) y N-acetil-galactosamina (SBA) incrementaron en la piel dorsal con dietas con polifenoles y triterpenos. Sin embargo, en la piel ventral se observó una disminución en general de estas glucoproteínas en la Dieta control.

Finalmente podemos concluir que, de forma general, destaca la presencia de β -N-acetilglucosamina (WGA) / α/β -N-acetilgalactosamina (SBA), como lectinas predominantes en los tejidos diana evaluados, a diferencia de las restantes lectinas (ConA, SNA, UEA-I) las cuales se encuentran en cantidades variables en las mucosas analizadas. La lectina WGA constituye un biomarcador de mucha utilidad en la evaluación de efectos nutricionales de las dietas funcionales.

Análisis transcriptómico

Tal y como se ha justificado en la sección de metodología de la presente tarea, a continuación, se presentan los resultados del análisis transcriptómico comparado entre los tejidos diana (piel, branquia e intestino) de los peces alimentados con la dieta control (Dieta 1) y los alimentados con la Dieta 3 (PEPTEIVA®) y Dieta 4 (0,1% UA-VB12).

- Dieta 1 vs Dieta 3: Efecto de la suplementación con 5% PEPTEIVA® en la respuesta del tejido asociado a mucosas (branquias, piel, intestino) e hígado

Las doradas alimentadas con la Dieta 3 muestran en **branquias** la modulación de 1.597 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 450 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la Dieta control (432 GDE $1.0 < x < 1.5$; 15 GDE $1.5 < x < 2.0$; 3 GDE $2.0 < x < 2.5$). Por otra parte, 1.147 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (252 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 314 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 191 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 128 GDE $-2.5 > x > -3.0$; 78 GDE $-3.0 > x > -3.5$; 52 GDE $-3.5 > x > -4.0$; 39 GDE $-4.0 > x > -4.5$; 25 GDE $-4.5 > x > -5.0$; 20 GDE $-5.0 > x > -5.5$; 10 GDE $-5.5 > x > -6.0$; 9 GDE $-6.0 > x > -6.5$; 5 GDE $-6.5 > x > -7.0$; 5 GDE $-7.0 > x > -7.5$; 4 GDE $-7.5 > x > -8.0$; 15 GDE $x < -8.0$).

El mapa jerárquico sobre el total de GDE muestra una clara segregación entre los grupos control (Dieta 1) y el grupo alimentado con la Dieta 3 (5% PEPTEIVA®), lo que corrobora el carácter diferencial de los GDE entre ambos tratamientos (Figura 48). Resulta relevante la considerable diferencia en el patrón de expresión observado en el mapa jerárquico: mientras en los genes sobre-expresados la magnitud de la respuesta es acotada (todos los genes tienen una expresión límite menor a 2.5 veces de cambio), en los genes sub-expresados se observa una magnitud de respuesta que incluso es inferior a 8.0 veces de cambio.

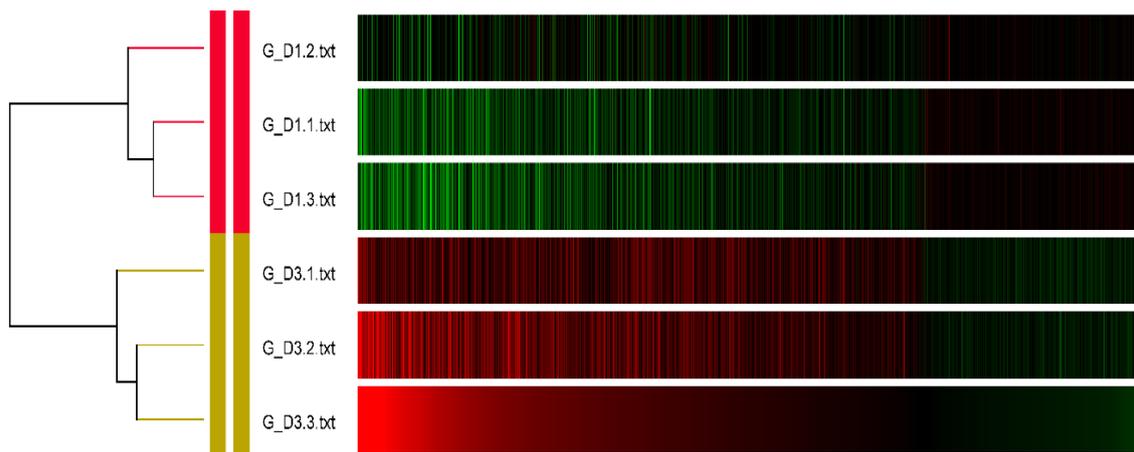


Figura 48. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en branquias de peces alimentados con la Dieta 3 (5% PEPTEIVA®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: G_D1.1-3 (grupo control); G_D3.1-3 (peces alimentados con la Dieta 3).

En el caso de la **piel**, se observó la modulación de 1.089 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 784 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (107 GDE $1.0 < x < 1.5$; 185 GDE $1.5 < x < 2.0$; 153 GDE $2.0 < x < 2.5$; 115 GDE $2.5 < x < 3.0$; 66 GDE $3.0 < x < 3.5$; 56 GDE $3.5 < x < 4.0$; 20 GDE $4.0 < x < 4.5$; 19 GDE $4.5 < x < 5.0$; 15 GDE $5.0 < x < 5.5$; 10 GDE $5.5 < x < 6.0$; 12 GDE $6.0 < x < 6.5$; 5 GDE $6.5 < x < 7.0$; 6 GDE $7.0 < x < 8.0$; 5 GDE $8.0 < x < 9.0$; 4 GDE $9.0 < x < 10.0$; 6 GDE $10.0 < x < 15.0$). Por otra parte, 305 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (219 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 56 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 12 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 6 GDE $-2.5 > x > -3.0$; 2 GDE $-3.0 > x > -4.0$; 3 GDE $-4.0 > x > -5.0$; 7 GDE $-5.0 > x > -15.0$). A diferencia que lo observado en branquias, en la piel se aprecia una importante dispersión en la magnitud de la expresión tanto para los genes sobre- como sub-expresados (Figura 49).

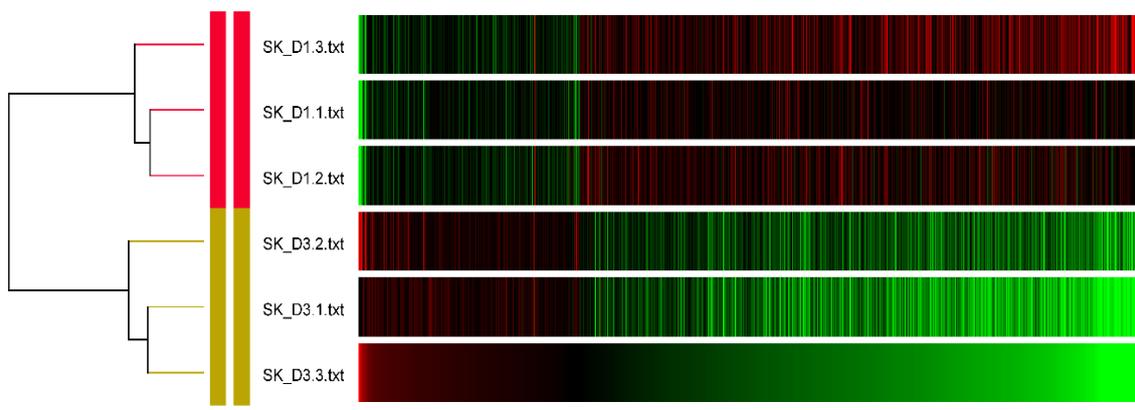


Figura 49. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en piel de peces alimentados con la dieta 3 (5% PEPTTEIVA®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: SK_D1.1-3 (grupo control); SK_D3.1-3 (peces alimentados con la Dieta 3).

En el caso del **intestino**, se observó la modulación de 693 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 452 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (202 GDE $1.0 < x < 1.5$; 139 GDE $1.5 < x < 2.0$; 51 GDE $2.0 < x < 2.5$; 22 GDE $2.5 < x < 3.0$; 23 GDE $3.0 < x < 4.0$; 10 GDE $4.0 < x < 5.0$; 5 GDE $5.0 < x < 15.5$). Por otra parte, 241 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (200 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 33 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 8 GDE $-2.0 > x > -3.5$). Al observar la dispersión de datos en el mapa jerárquico, destaca la dispersión de la sobre-expresión entre el total de los genes sobre-expresados respecto a la magnitud acotada de los genes sub-expresados (Figura 50).

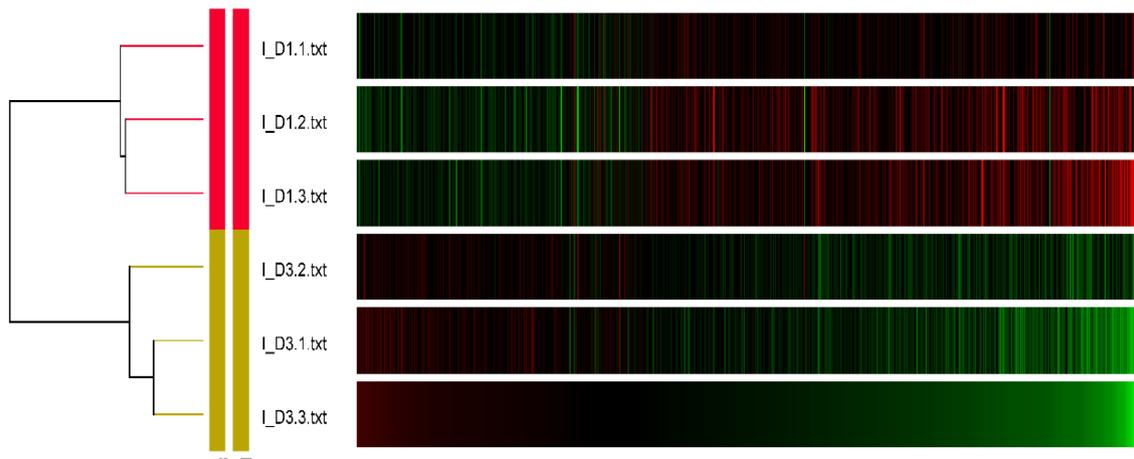


Figura 50. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en intestino de peces alimentados con la dieta 3 (5% PEPTEIVA®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: I_D1.1-3 (grupo control); I_D3.1-3 (peces alimentados con la Dieta 3).

En el caso del **hígado**, se observó la modulación de 486 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 361 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (167 GDE $1.0 < x < 1.5$; 153 GDE $1.5 < x < 2.0$; 25 GDE $2.0 < x < 2.5$; 12 GDE $2.5 < x < 3.0$; 4 GDE $3.0 < x < 4.0$). Por otra parte, 125 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (84 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 29 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 10 GDE $-2.0 > x > -3.5$; 2 GDE $-3.0 > x > -4.5$). Resulta interesante el perfil de expresión más moderado a diferencia de lo observado en los tejidos asociados a mucosa, tanto para los genes sobre- como sub-expresados (Figura 51).

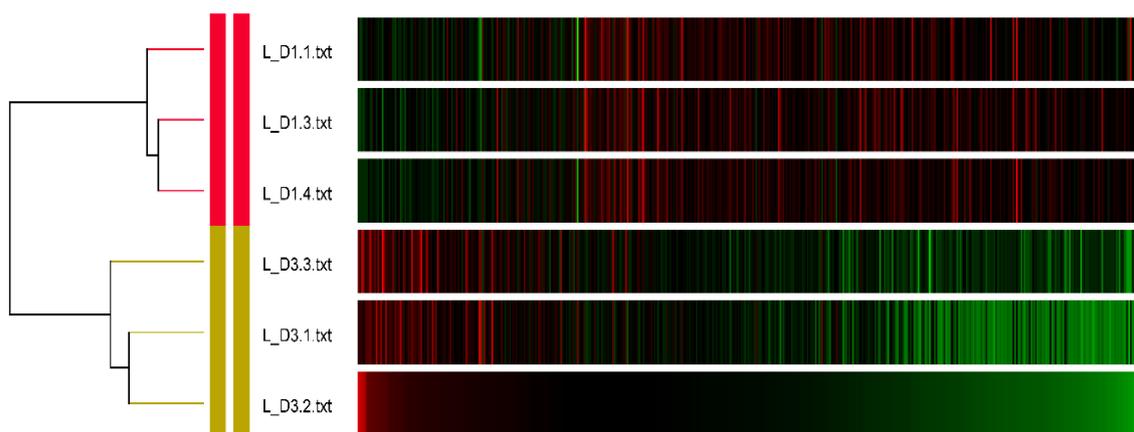


Figura 51. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en hígado de peces alimentados con la Dieta 3 (5% PEPTEIVA®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: L_D1.1-3 (grupo control); L_D3.1-3 (peces alimentados con la Dieta 3).

La respuesta fisiológica (interactoma) de los tejidos asociados a mucosa en peces alimentados con 5% Pepteiva. Con objeto de representar el grado de interacción entre el total de GDE, se ha realizado un análisis mediante interactomas (red de interacción). Básicamente, el análisis se basa sobre el grado de interacciones conocidas y predichas basados en la información disponible en bases de datos. Este análisis permite además la identificación de procesos biológicos enriquecidos que permiten la caracterización de los clusters obtenidos en la red de interacción. Es importante de mencionar que esta estrategia ha sido desarrollada durante el desarrollo del proyecto DIETApplus. Actualmente, esta estrategia está siendo utilizada por una serie de iniciativas tanto a nivel nacional (España) como internacional (Suecia, Noruega, Chile, entre otros).

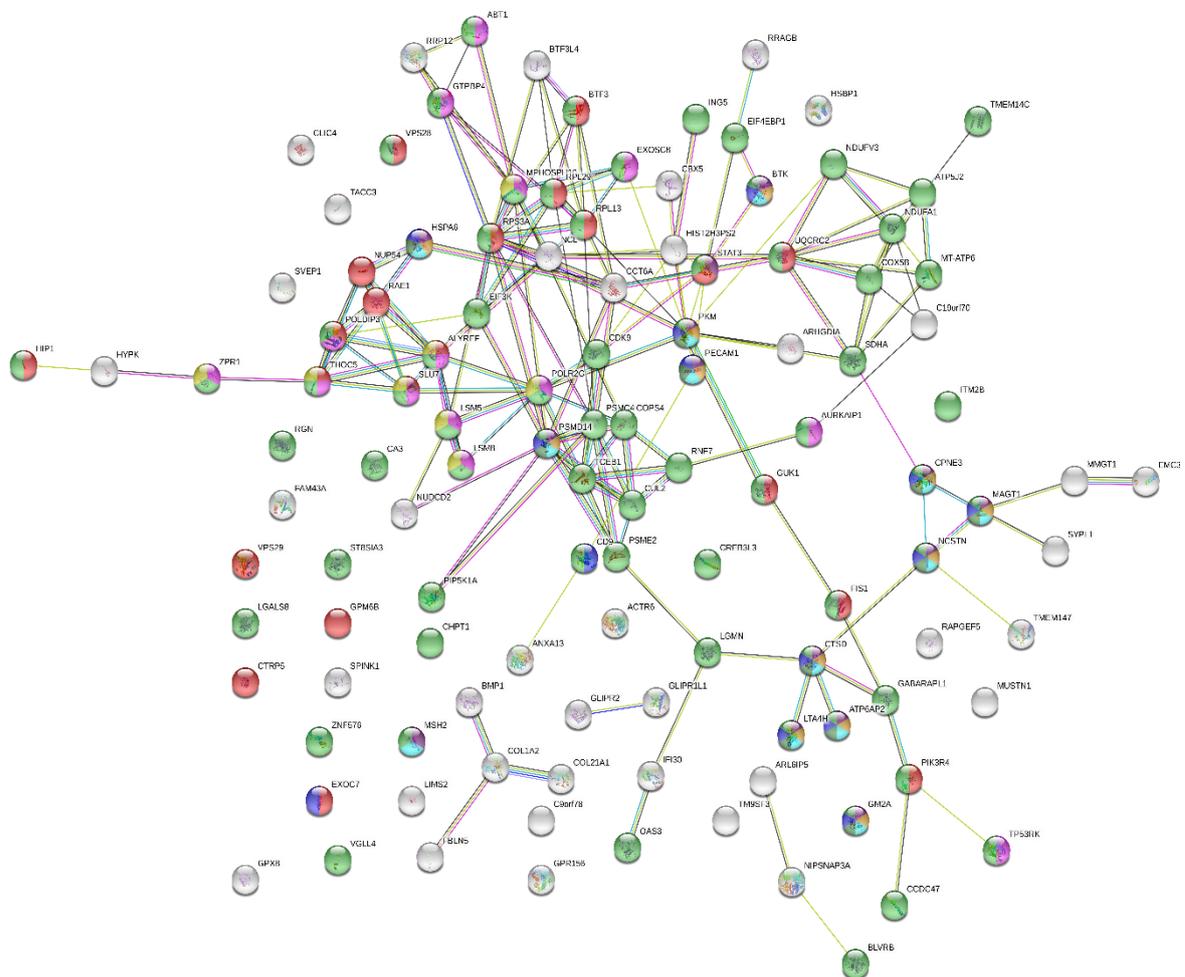


Figura 52. Interactoma de los genes diferencialmente sobre-expresados en branquias de doradas alimentadas con la Dieta 3 (5% PEPEIVA®). Cada esfera representa un gen diferencialmente expresado. El color en cada esfera representa el proceso biológico enriquecido al cual se encuentra asociado en la red de interacción: RNA splicing (amarillo); RNA processing (púrpura); celular metabolic process (verde claro); transporte de proteínas (rojo); activación de leucocitos involucrados en respuesta inmune (púrpura oscuro); inmunidad mediada por leucocitos mieloides (amarillo oscuro); inmunidad mediada por leucocitos (celestes); degranulación de neutrófilos (verde oscuro); excitosis (azul).

A pesar del menor número de genes diferencialmente sobre-expresados en **branquias** de peces alimentados con la Dieta 3 (5% Pepteiva) se observó una gran cantidad de procesos biológicos representados. Entre ellos, destacan procesos de *siplicing* de mRNA, procesamiento de RNA, procesos metabólicos, y transporte de proteínas. Interesantemente, entre ellos se encuentran representados también procesos biológicos directamente relacionados con respuesta inmune incluyendo activación de células mieloides, leucocitos, inmunidad mediada por leucocitos, y degranulación de neutrófilos. Más aún, resulta interesante que en la red de interacción se observen también procesos de exocitosis, lo que sugiere una correlación entre este proceso y la actividad inmune efectora por parte de los neutrófilos (Figura 52).

Por otra parte, a pesar de la gran cantidad de genes sub-expresados en branquias, tales genes sólo están asociados a un único proceso biológico: autoubiquitinación de proteínas. No obstante, la gran mayoría de los genes sub-expresados están asociados a procesos moleculares tales como actividad catalítica y actividad transferasa (Figura 53). En conjunto, los datos sugieren que en branquias existe una fuerte presencia de mecanismos de regulación sobre procesos asociados a respuesta inmune, lo que daría cuenta de una acción efectora de defensa de forma controlada en este tejido mucosal.

En la **piel**, la red de interacción sobre los genes diferencialmente sobre-expresados muestra la presencia de una serie de procesos biológicos incluyendo procesos metabólicos y respuesta inmune (Figura 54-55).

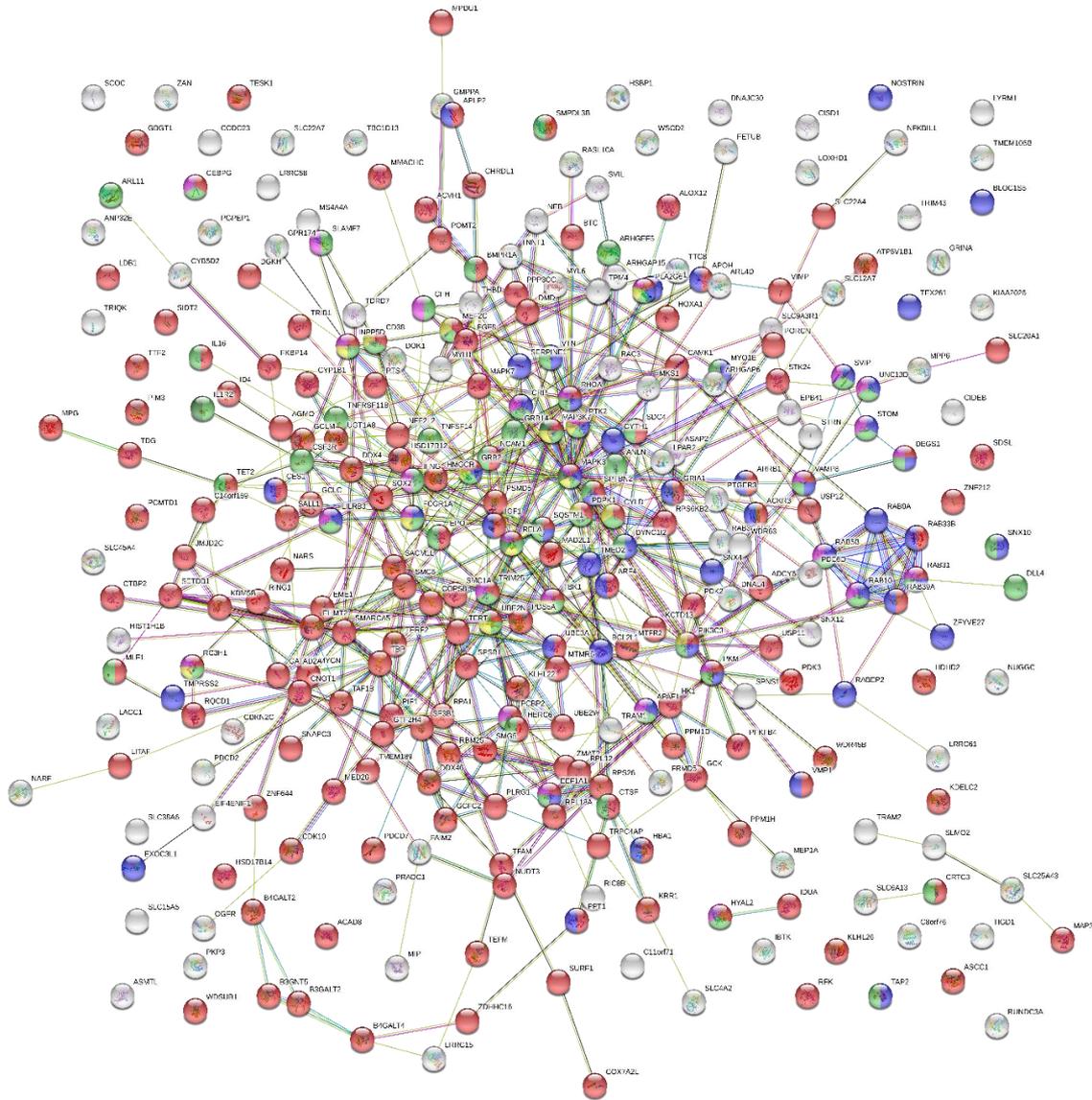


Figura 54. Interactoma de los genes diferencialmente sobre-expresados en la piel de doradas alimentadas con 5% PEPTIDEIVA®. Cada esfera representa un gen diferencialmente expresado. El color en cada esfera representa el proceso biológico enriquecido al cual se encuentra asociado en la red de interacción: celular metabolic process (rojo); transporte mediado por vesículas (azul); procesos del sistema inmune (verde claro); transducción de señal asociada a la activación de la respuesta inmune (amarillo); ruta de señalización mediada por IL-1 (verde oscuro); procesos efectores de la respuesta inmune (púrpura). Al observar la red de interacción para los genes sub-expresados se aprecia la fuerte regulación que éstos genes tienen sobre el perfil de aquellos sub-expresados. Esto debido a que entre los genes sub-expresados se observa la sub-expresión de una amplia gama de procesos biológicos incluyendo procesos metabólicos y gluconeogénesis, procesos inmunológicos (inmunidad mediada por leucocitos, procesos efectores inmunes, procesos inmunitarios, y activación de leucocitos). De forma importante, se observa la sub-expresión del proceso de óxido-reducción. Esto sugiere que, conjuntamente con la fuerte regulación de la activación de la respuesta inmune, otros procesos involucrados en la minimización del daño celular de tal respuesta (tales como los procesos de óxido-reducción) tienen lugar.

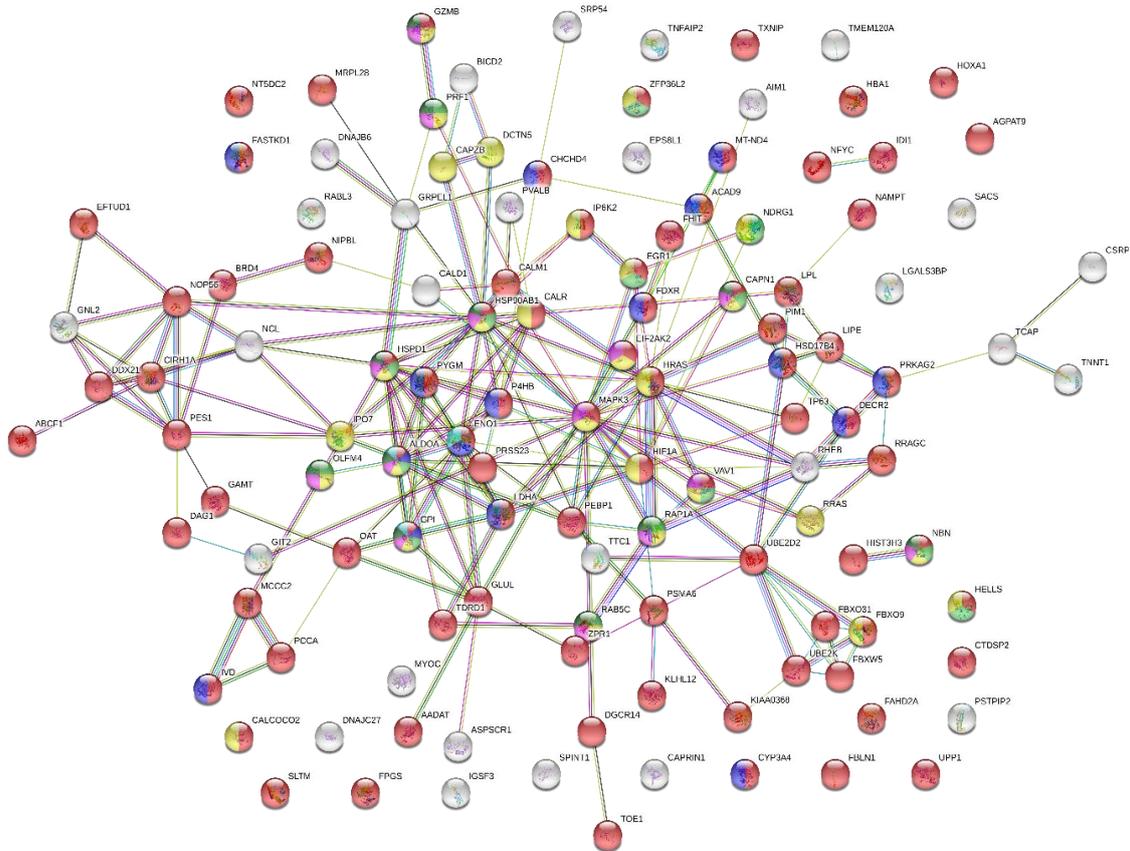


Figura 55. Interactoma de los genes diferencialmente sub-expresados en la piel de doradas alimentadas con la Dieta 3 (5% PEPEIVA®). Se representan tales genes asociados a procesos metabólicos (rojo), óxido-reducción (azul), activación de leucocitos (verde), sistema inmune (amarillo), respuesta inmune efectora (púrpura), inmunidad mediada por leucocitos (verde oscuro), gluconeogénesis (celeste).

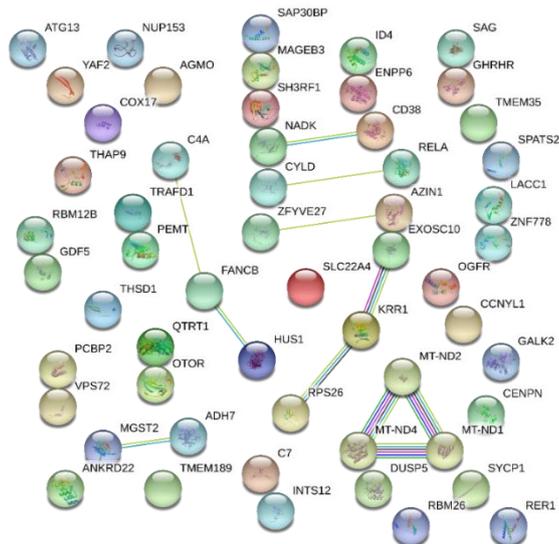


Figura 56. Red interacción de los genes diferencialmente sobre-expresados en el intestino de doradas alimentadas con 5% PEPEIVA®. Los colores de cada gene sobre-expresado es azaroso.

Para el caso del **intestino** y, a diferencia del resto de tejidos analizados, no se obtuvo un interactoma en donde se encontrasen enriquecidos procesos biológicos relevantes. Por el contrario, en los genes sub-expresados se detectan un espectro importante de procesos biológicos entre los cuales destacan procesos asociados a traducción, biogénesis en ribosomas, transporte de proteínas, y procesos metabólicos de proteínas (Figura 56).

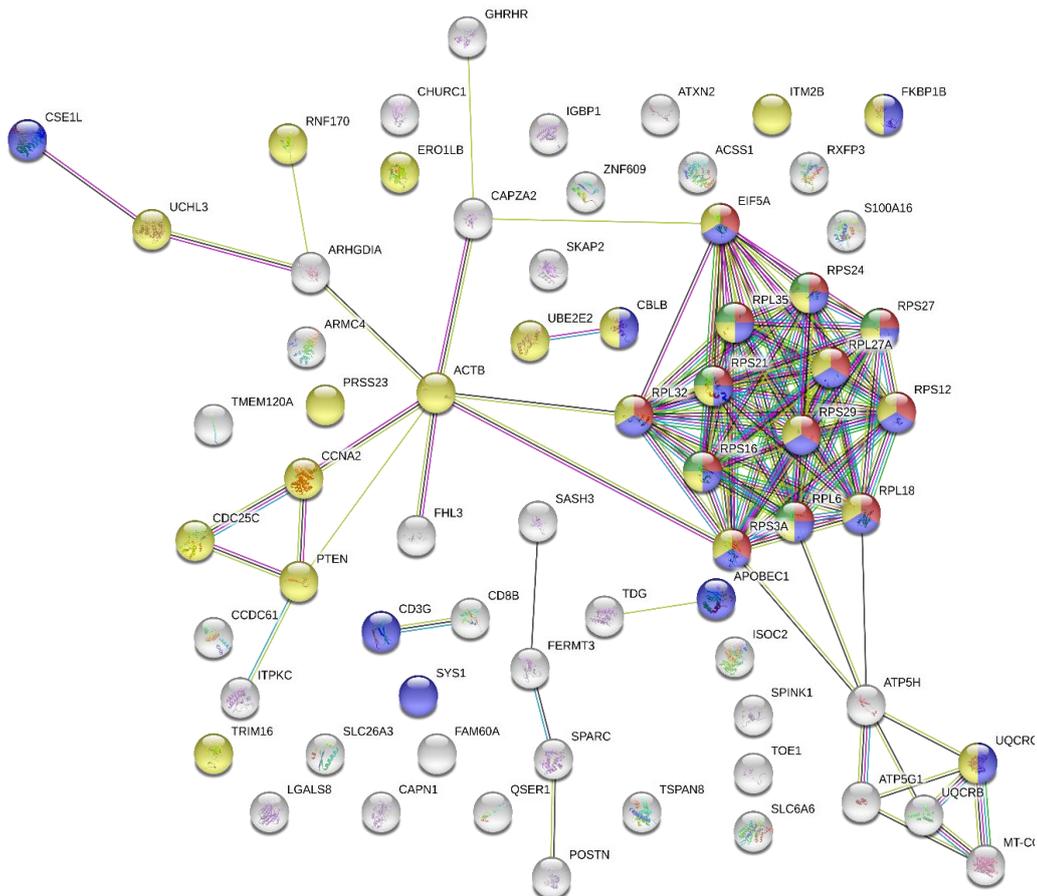


Figura 56. Interactoma de los genes diferencialmente sub-expresados en el intestino de doradas alimentadas con 5% PEPEIVA®. En color se presentan los procesos biológicos asociados a: traducción (rojo); biogénesis ribosomal (verde); transporte de proteínas (azul); metabolismo de proteínas (amarillo).

En el caso del **hígado**, principal órgano con actividad metabólica del organismo, no se obtuvo interactoma para ningún grupo de genes independientemente del sentido de expresión considerado (sobre- y sub-expresión) (Figura 57 y 58, respectivamente).

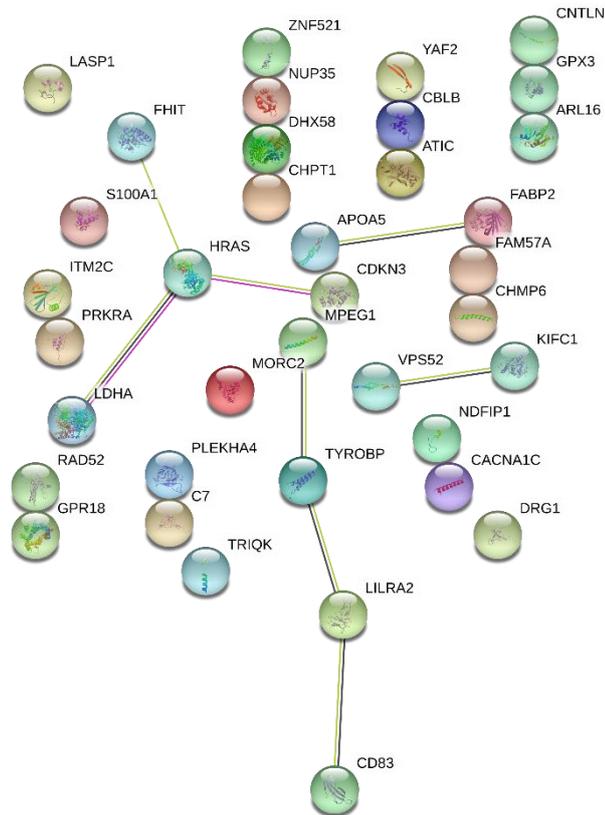


Figura 57. Red interacción de los genes diferencialmente sobre-expresados en el hígado de doradas alimentadas con 5% PEPTIVA®. Los colores de cada gene sobre-expresado es azaroso.

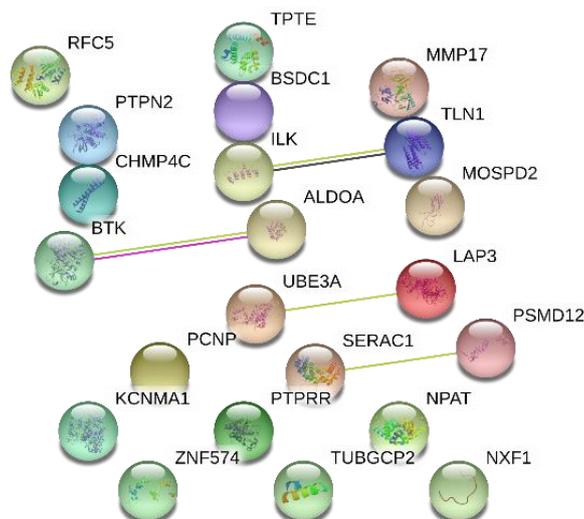


Figura 58. Red interacción de los genes diferencialmente sub-expresados en el hígado de doradas alimentadas con 5% PEPTIVA®. Los colores de cada gene sobre-expresado es azaroso.

- **Dieta 1 vs Dieta 4:** Efecto de la suplementación con 0,1% UA-VB12 (mezcla de ácidos ursólico y verbascósido) en la respuesta del tejido asociado a mucosas (branquias, piel, intestino) e hígado.

Las doradas alimentadas con la Dieta 4 muestran en **branquias** la modulación de 270 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 142 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control. En consecuencia, 128 GDE mostraron un perfil de sub-expresión. El mapa jerárquico sobre el total de GDE muestra una clara segregación entre los grupos control (Dieta 1) y el grupo alimentado con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12), lo que corrobora el carácter diferencial de los GDE entre ambos tratamientos (Figura 2.8). Un aspecto relevante del grupo alimentado con la Dieta 4 es que 98 GDE mostraron un patrón de expresión menor a 1,5 veces de cambio (37 GDE $1.5 < x < 2.0$; 5 GDE $2.0 < x < 2.5$; 2 GDE > 3.0). Este aspecto revela que el patrón de expresión observado en los peces alimentados con la Dieta 4 es, aunque sobre-expresado, de una intensidad reducida (Figura 59).

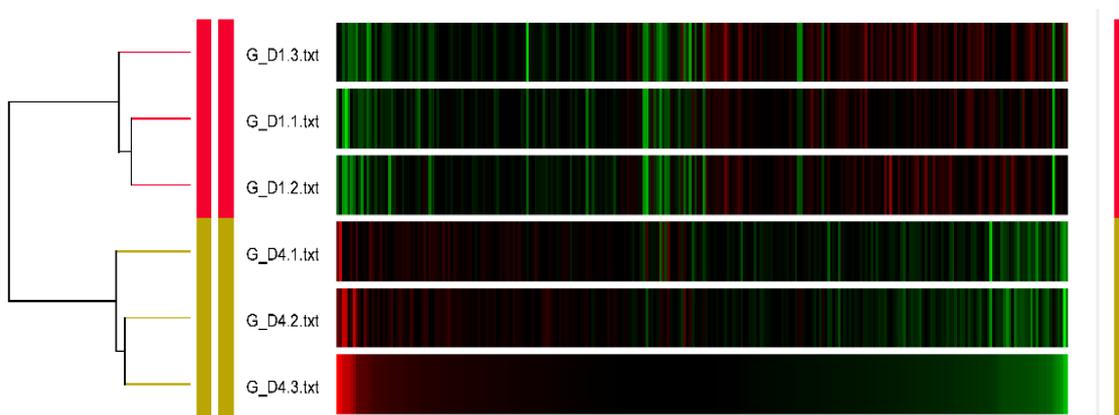


Figura 59. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en branquias (G) de peces alimentados con la dieta 4 (0,1 UA-VB12). Se representan los resultados para tres arrays (replicados biológicos) para cada una de las dietas evaluadas: G_D1.1-3 (grupo control); G_D4.1-3 (peces alimentados con dieta 4).

En el caso particular de la **piel**, se obtuvo la expresión de 289 GDE, de los cuales 170 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control. El mapa jerárquico sobre el total de GDE muestra una clara segregación entre los grupos control (Dieta 1) y el grupo alimentado con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12), lo que corrobora el carácter diferencial de los GDE entre ambos tratamientos (Figura 60). Un aspecto relevante del grupo alimentado con la dieta 4 es que 170 GDE mostraron un patrón de expresión menor a 1.5 veces de cambio (32 GDE $1.5 < x < 2.0$; 4 GDE $2.0 < x < 2.5$; 5 GDE $2.5 < x < 3.0$; 4 GDE > 3.0). Este aspecto reafirma el carácter atenuado de la expresión diferencial en la piel y ya observado en branquias (Figura 60).

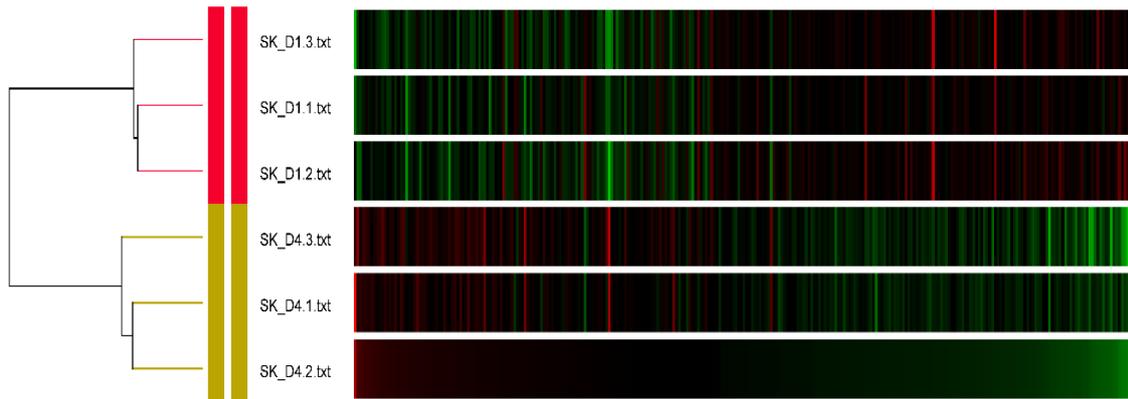


Figura 60. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en mucosa de la piel (SK) de peces alimentados con la dieta 4 (0,1 UA-VB12). Se representan los resultados para tres arrays (replicados biológicos) para cada una de las dietas evaluadas: SK_D1.1-3 (grupo control); SK_D4.1-3 (peces alimentados con dieta 4).

A diferencia de lo observado en branquias y piel, en intestino se registró una mayor modulación en la respuesta transcriptómica, lo cual podría tener relación con la naturaleza fisiológica intrínseca del intestino en la función absorbente de nutrientes y, por tanto, la exposición a la concentración total que ha llegado a este tracto para posteriormente ser distribuido mediante el torrente sanguíneo. En este sentido, se obtuvo 508 GDE, de los cuales la mayoría de ellos (286 GDE: 219 GDE $x < 1.5$; 58 GDE $1.5 < x < 2.0$; 7 GDE $2.0 < x < 2.5$; 2 GDE $x > 2.5$) mostraron un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (Figura 61).

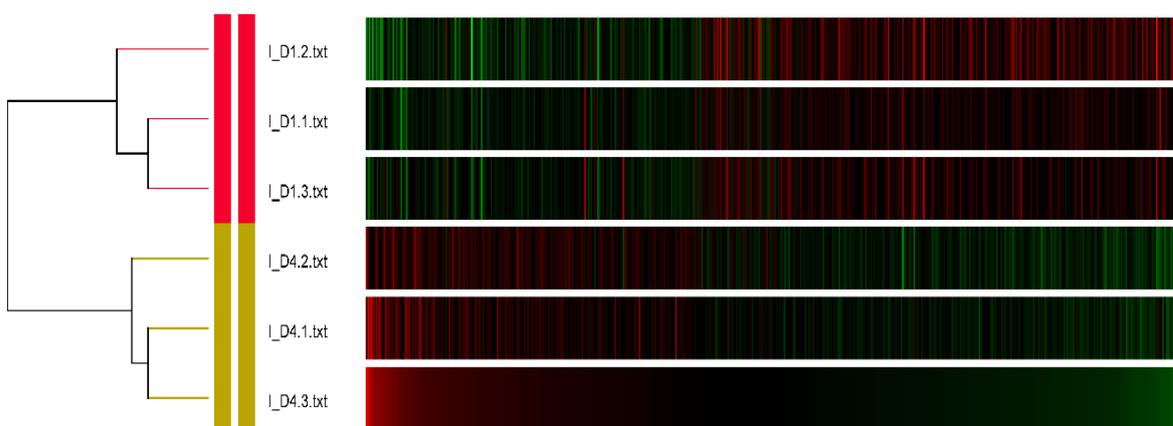


Figura 61. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en mucosa intestinal (I) de peces alimentados con la Dieta 4 (0,1 UA-VB12). Se representan los resultados para tres arrays (replicados biológicos) para cada una de las dietas evaluadas: SK_D1.1-3 (grupo control); SK_D4.1-3 (peces alimentados con la Dieta 4).

El mapa jerárquico sobre el total de GDE muestra una clara segregación entre los grupos control (Dieta 1) y el grupo alimentado con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12), lo que corrobora el carácter diferencial de los GDE entre ambos tratamientos (Figura 61). A pesar de la mayor sobre-expresión de genes observado en el intestino, un aspecto notable de los tres tejidos asociados a mucosa es la elevada similitud en la dispersión de los GDE. Dicho de otra manera, en todos estos tejidos la mayor sobre-expresión se registra en los menores intervalos de sobre-expresión ($1.0 < x < 2.0$). Este aspecto refuerza el aspecto modulador hacia la sobre-expresión en los tejidos asociados a mucosa evaluados, aunque en un rango atenuado de respuesta.

A partir de los resultados anteriores se ha procedido a evaluar la **respuesta fisiológica de los tejidos asociados a mucosa** en peces alimentados con la Dieta 4. Con objeto de representar el grado de interacción entre el total de GDE, se ha realizado un **análisis mediante interactomas** (red de interacción). Básicamente, el análisis se basa sobre el grado de interacciones conocidas y predichas basados en la información disponible en bases de datos. Este análisis permite además la identificación de procesos biológicos enriquecidos que permiten la caracterización de los clústers obtenidos en la red de interacción. Es importante de mencionar que esta estrategia ha sido desarrollada durante el desarrollo del proyecto DIETApplus. Actualmente, esta estrategia está siendo utilizada por una serie de iniciativas tanto a nivel nacional (España) como internacional (Suecia, Noruega, Chile, entre otros)

En el caso de la piel (Figura 62), se observa que dieta con la Dieta 4 favorece procesos mitocondriales (algunos de los cuales incluso con tropismo en la zona interna) (Figura 63). Es de destacar que estos procesos se encuentran fuertemente relacionados con los asociados a la cadena transportadora de electrones y de ubiquitinación (Figura 64). Estos procesos están apoyados por una maquinaria transcripcional activada (Figura 65) acompañado de procesos de acetilación (Figura 66).

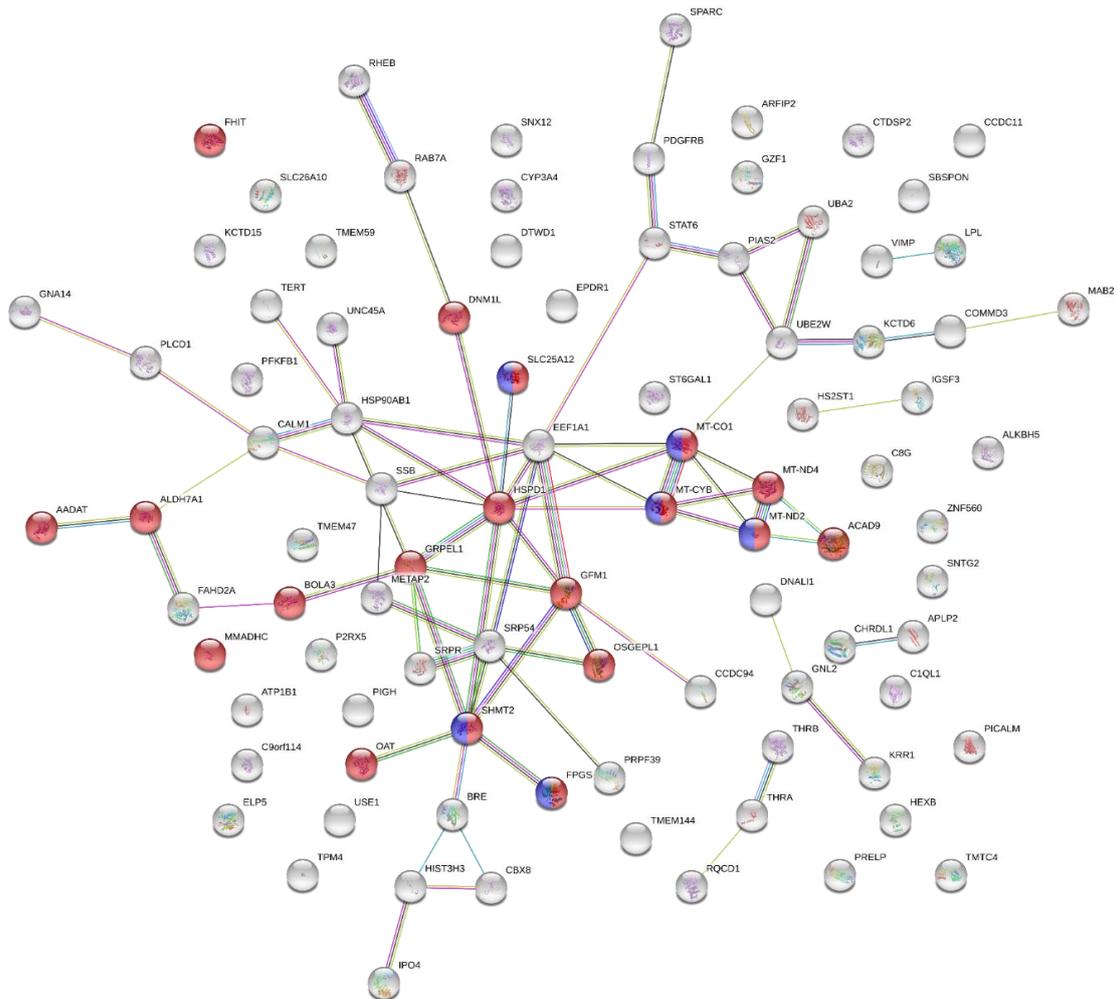


Figura 62. Interactoma de la piel de peces alimentados con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12) en relación a los GDE representativos de procesos mitocondriales (rojo) e internos en la mitocondria (azul).

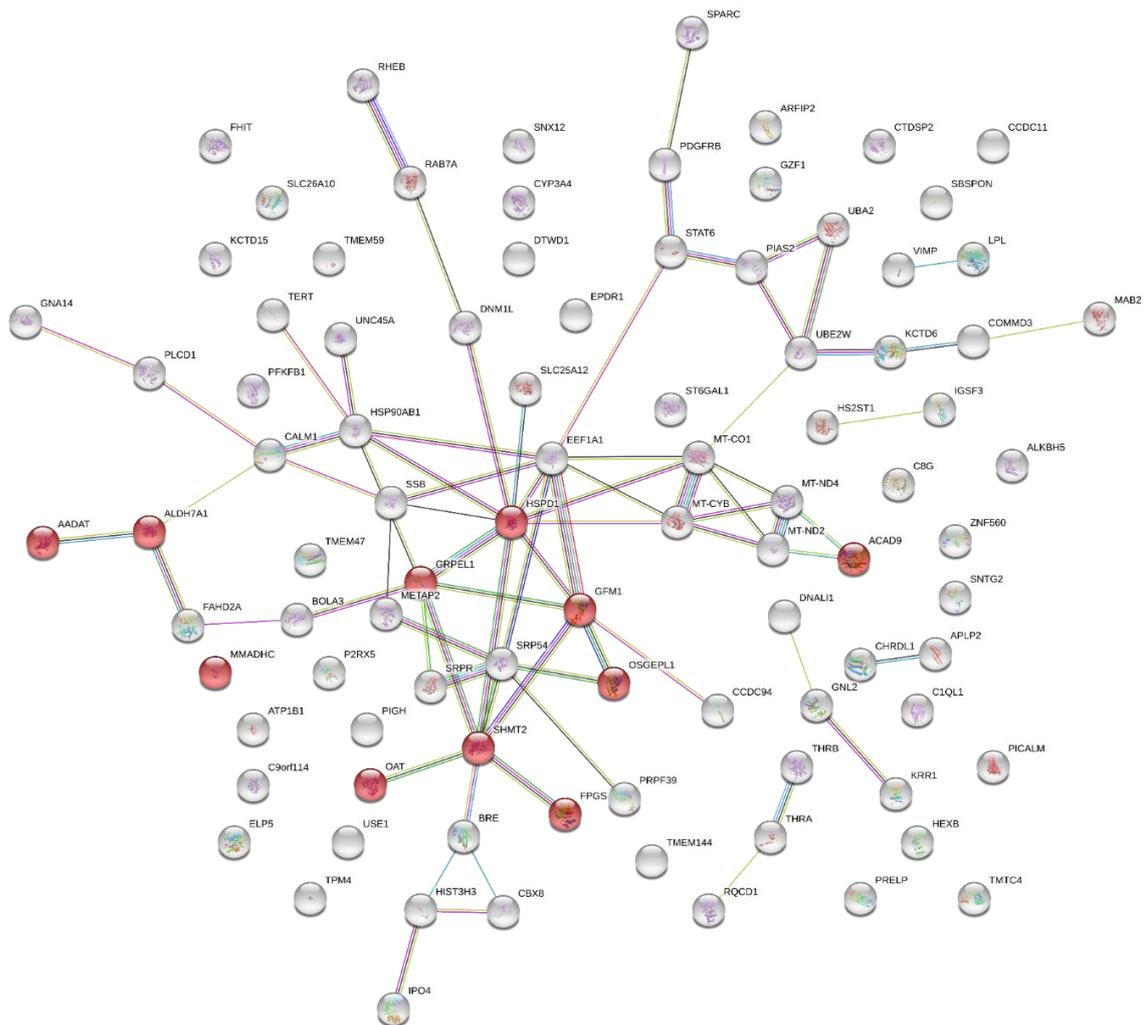


Figura 63. Interactoma de la piel de peces alimentados con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12) en relación a los genes implicados en el tránsito de péptidos (rojo).

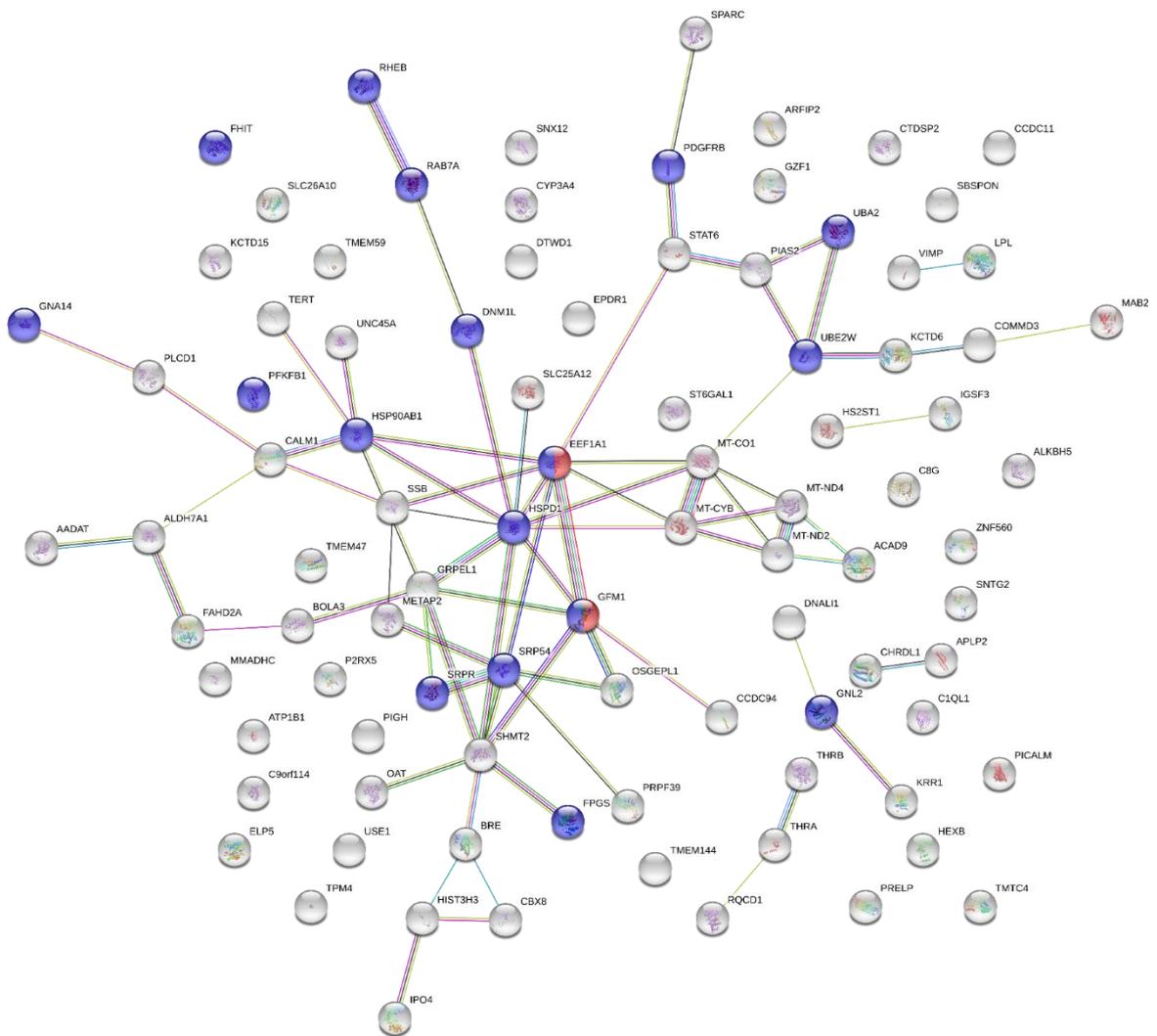


Figura 65. Interactoma de la piel de peces alimentados con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12) en relación a los genes implicados en procesos transcripcionales asociados a factores de elongación (rojo) y unión de nucleótidos (azul).

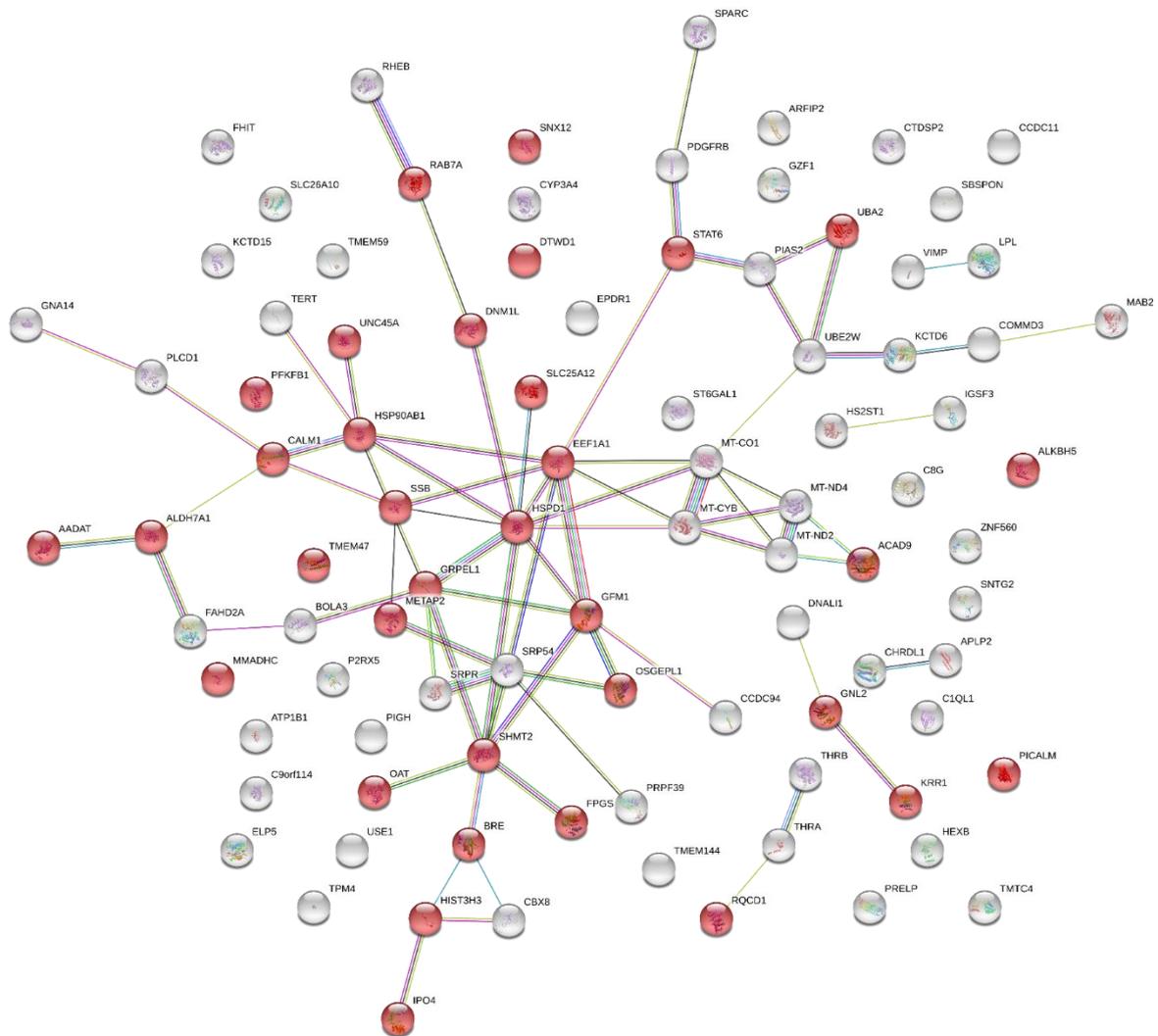


Figura 66. Interactoma de la piel de peces alimentados con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12) en relación a los genes implicados en procesos de acetilación (rojo).

Es importante mencionar, al igual que en el caso de la piel, que en el intestino existen una serie de procesos biológicos que se ven representados en el interactoma incluyendo procesos mitocondriales, transcripcionales (splisosoma, mRNA binding, mRNA splicing, mRNA processing, nucleotide-binding, y acetilaciones (Figura 67). Al mismo tiempo, se aprecia que están representados también procesos biológicos asociados a respuesta inmunitaria (Figura 68), incluyendo activación de leucocitos y linfocitos lo que sugiere una mejor capacidad inmune en comparación con el grupo control.

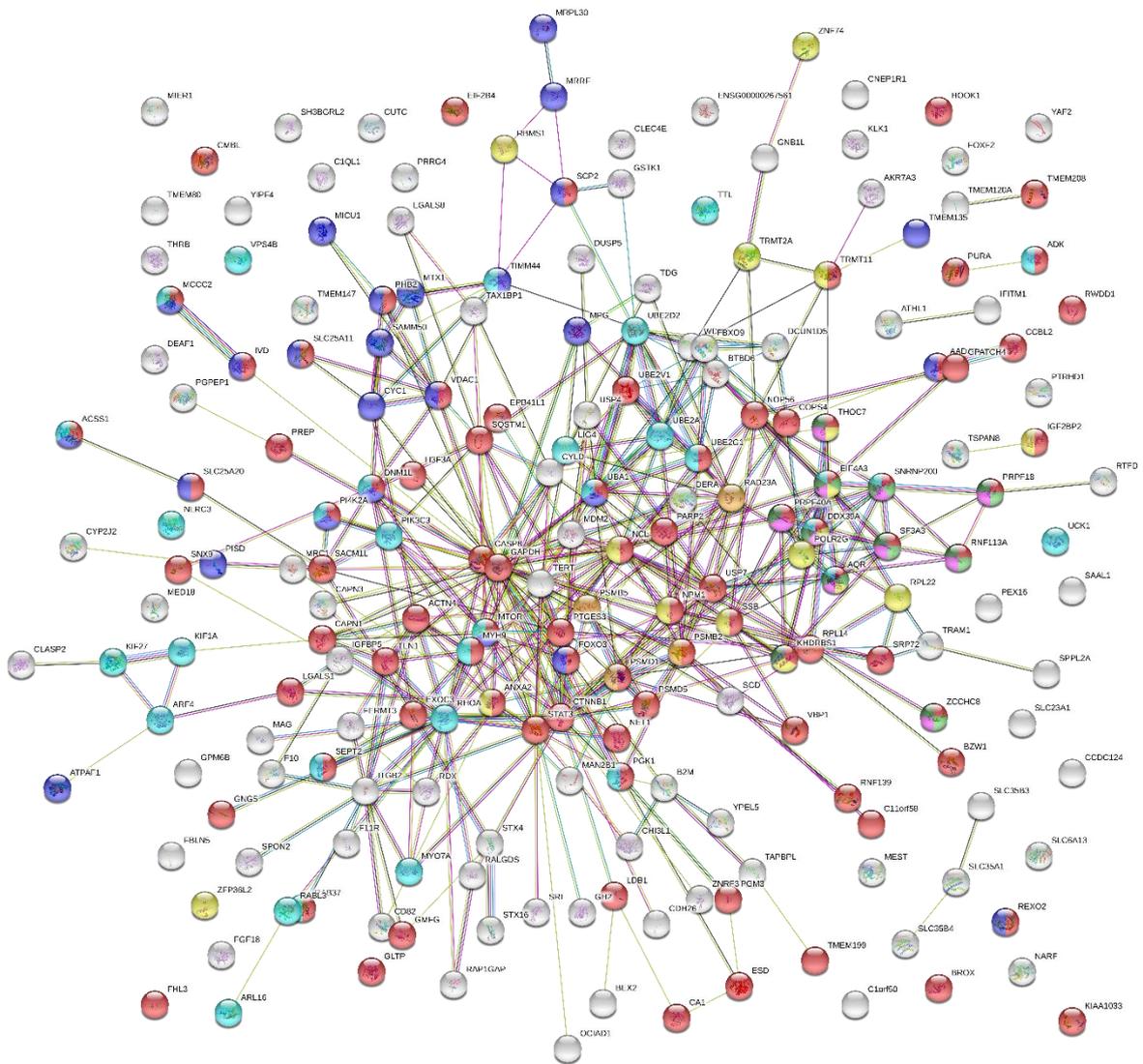


Figura 67. Interactoma del intestino de doradas alimentadas con 0,1% UA-VB12. Los genes diferencialmente expresados (GDE) en color representan los diferentes procesos biológicos en los que ellos están involucrados. Procesos asociados a acetilación(rojo); mitocondria (azul), splisosoma (verde), mRNA binding (amarillo), mRNA splicing (púrpura), mRNA processing (verde oscuro), nucleotide-binding (celeste), proteosoma (marrón).

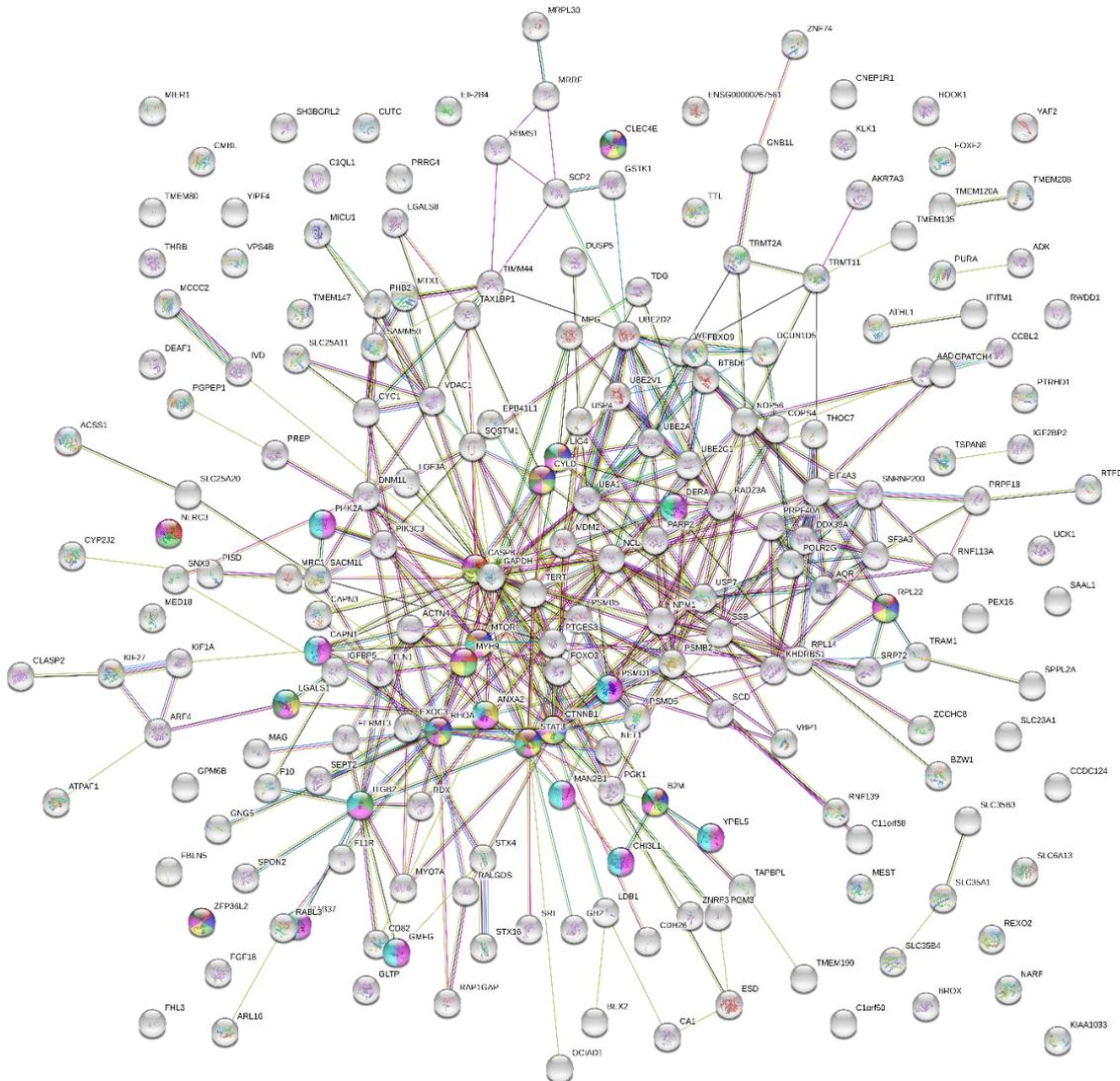


Figura 68. Interactoma del intestino de doradas alimentadas con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12). Los genes diferencialmente expresados (GDE) en color representan diferentes procesos biológicos asociados a respuesta inmune. Procesos asociados a T cell activation (rojo), T cell differentiation (azul), lymphocyte activation (verde), leukocyte differentiation (amarillo), leukocyte activation (púrpura), lymphocyte differentiation (verde oscuro), leukocyte activation involved in immune response (celeste) son representados.

Respuesta en hígado como regulador de la respuesta metabólica. En los peces alimentados con la Dieta 4 (0,1% UA-VB12) se observó una fuerte regulación a nivel transcriptómico. Las doradas alimentadas con tal dieta mostraron la regulación de 1377 GDE, de los cuales 725 genes fueron sobre-expresados (613 GDE $1.0 < x < 1.5$; 84 GDE $1.5 < x < 2.0$; 14 GDE $2.0 < x < 2.5$; 11 GDE $2.5 < x < 3.0$; 3 GDE $x > 3.0$). Por el contrario, 652 genes fueron sub-expresados (459 GDE $1.0 < x < 1.5$; 169 GDE $1.5 < x < 2.0$; 15 GDE $2.0 < x < 2.5$; 5 GDE $2.5 < x < 3.0$; 4 GDE $x > 3.5$).

El mapa jerárquico sobre estos GDE mostró una clara segregación de ambos grupos experimentales (dieta control, dieta suplementada con 0,1% UA-VB12 (Figura 69)).

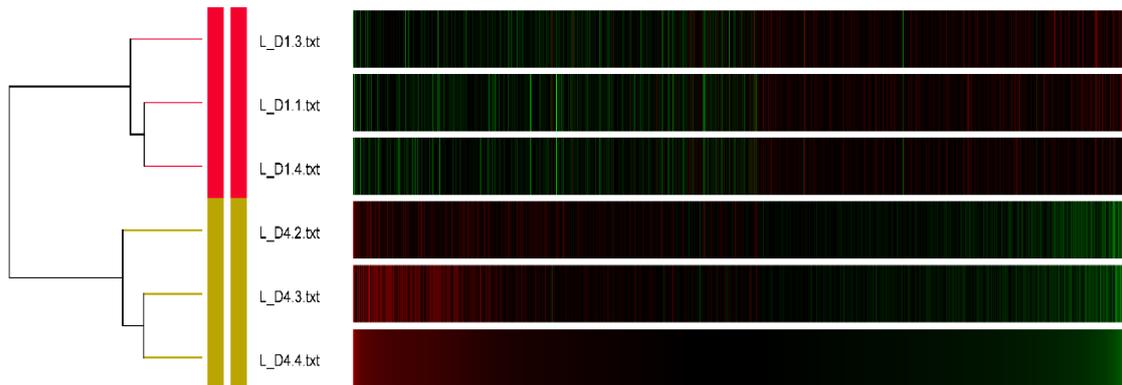


Figura 69. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en hígado de peces alimentados con la dieta 4 (0,1 UA-VB12). Se representan los resultados para tres arrays (replicados biológicos) para cada uno de las dietas: I_D1.1-3 (grupo control); I_D4.1-3 (peces alimentados con la Dieta 4).

Es notorio destacar que si bien el patrón de distribución de los GDE fue bastante similar a los tejidos asociados a mucosa (piel, branquia e intestino); sin embargo, los procesos biológicos en los que los genes que están involucrados en la red de interacción en el hígado, muestran resultados totalmente distintos a los observados a nivel mucosal (Figura 69).

En resumen, los resultados indican que la alimentación con 0,1% UA-VB12 genera una respuesta transcriptómica diferencial entre los diferentes tejidos evaluados. Mientras en los tejidos asociados a mucosa una respuesta similar fue observada, en intestino la respuesta se vio aumentada, lo que se sugiere es debido a su rol en la absorción de nutrientes, y, por lo tanto, una mayor interacción con tal compuesto. A nivel sistémico, también fue observada una elevada expresión en el hígado, en donde se promueven principalmente procesos de biogénesis y transporte de proteínas.

Resulta particularmente interesante que la magnitud de expresión diferencial en la totalidad de los tejidos es baja. Esto sugiere que la utilización del 0,1% UA-VB12 podría promover una serie de procesos biológicos, aunque en una magnitud controlada. Estos resultados resultan muy interesantes desde un punto de vista metabólico, puesto que las respuestas no controladas implican un menor consumo de energía y por tanto una mayor biodisponibilidad de la misma para procesos fisiológicos y podrían explicar en parte el mejor crecimiento de los peces observado. En conclusión, la promoción de procesos biológicos controlados favorables para la competencia del individuo a nivel mucosal es una muy interesante alternativa que debe continuar evaluándose en el futuro.

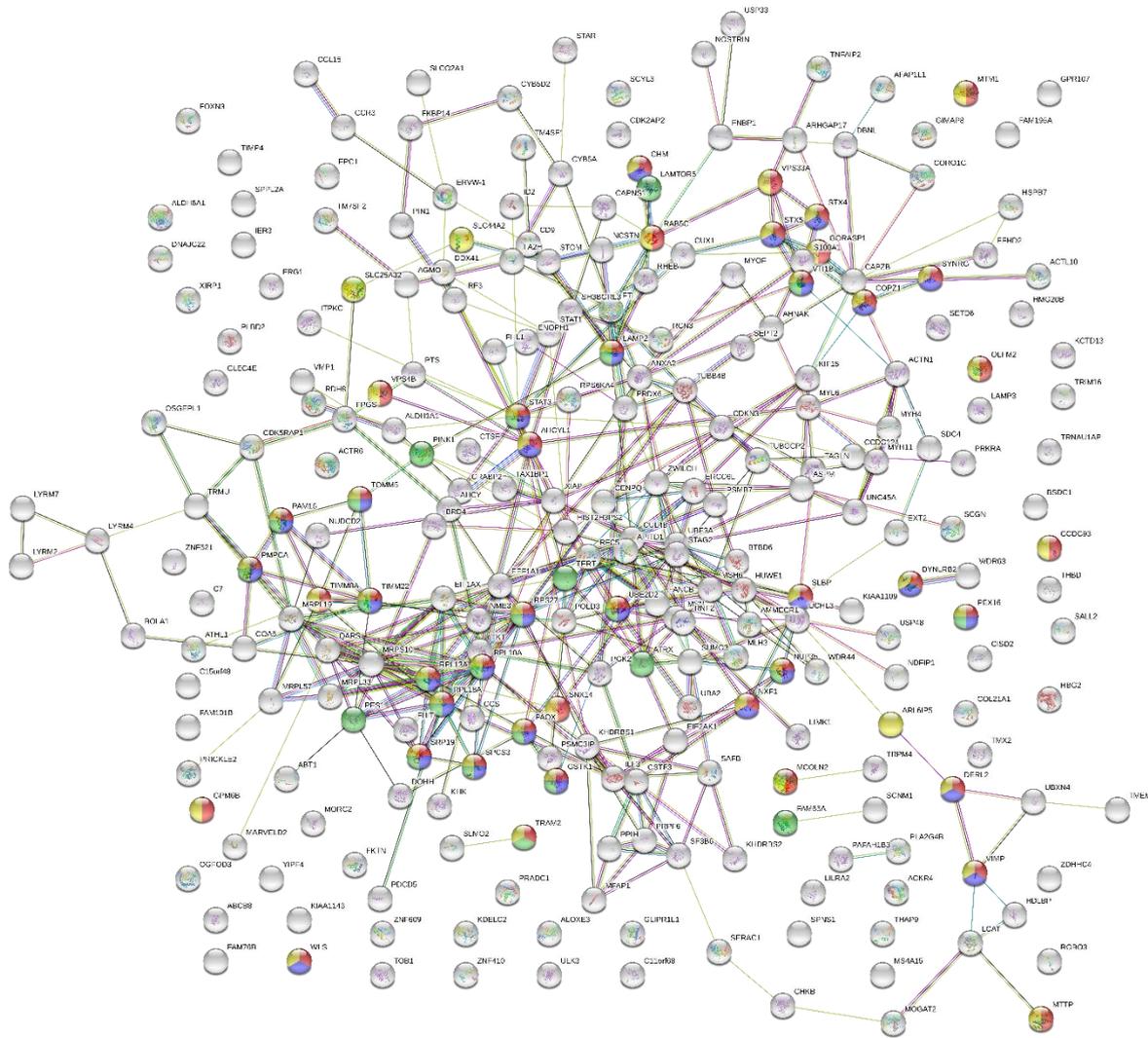


Figura 70. Interactoma del hígado de doradas alimentadas con 0,1% UA-VB12. Los genes diferencialmente expresados (GDE) en color representan diferentes procesos biológicos. Transporte de proteínas (rojo); transporte intracelular de proteínas (azul); localización de proteínas a organelos (verde); transporte de compuestos nitrogenados (amarillo)

Prueba de validación: evaluación *ex vivo* de las competencias inmunológicas

Tal y como se ha mencionado en la sección relacionada con la Metodología de la actividad, con el fin de evaluar el posible efecto beneficioso sobre la respuesta inmune de los peces alimentados con las dietas experimentales, se evaluó la modulación de los genes relacionados con el sistema inmune mediante un ensayo *ex vivo* con esplenocitos de los peces alimentados con las Dietas 2 (5% APPETEIN GS®) y 4 (0,1% UA-VB12). Ambas dietas fueron seleccionadas dados sus mejores resultados. Para este propósito, se usó el bazo debido a su papel clave como tejido linfóide secundario y, por lo tanto, su capacidad específica para activar la respuesta inmune frente a un PAMP como el LPS. Se registró una mayor expresión en los genes asociados

a la respuesta innata humoral (lisozima, inmunoglobulina M), citoquinas proinflamatoria ($il-1\beta$, $tnf\alpha$) y antiinflamatoria ($il-10$, $tgf\beta 1$), en el marcador de células de superficie $cd4$ y en las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa de manganeso [$mn-sod$] y catalasa [cat]) a las 4, 12 y 24 horas posteriores a la incubación con LPS. Los resultados relacionados con la expresión génica de los marcadores moleculares seleccionados en animales alimentados con la Dieta 2 se muestran en las Figuras 71 y 72, mientras que los relacionados con la mezcla de compuestos bioactivos derivados de plantas medicinales (Dieta 4) se presentan en las Figuras 73 y 74.

En relación a los resultados de la **Dieta 2** en comparación con la Dieta 1 (control), se destaca lo siguiente:

Los valores de expresión de lisozima (*lys*) en esplenocitos de peces alimentados con la Dieta 2 e incubados con PBS se mantuvieron estables a lo largo del período experimental de 24 h ($P > 0,05$; Figura 71). Se encontró un aumento en la expresión de *lys* a 12 h después de la estimulación con LPS en esplenocitos de peces alimentados con ambas dietas experimentales cuando se comparó con la expresión de *lys* medida en células expuestas a PBS, un aumento que se mantuvo estable hasta 24 h después de la estimulación con LPS ($P < 0,05$). La expresión de *lys* en esplenocitos de peces alimentados con la dieta de control a las 24 h fue similar entre las células expuestas a PBS y LPS ($P > 0,05$). En contraste, con respecto a los peces alimentados con la Dieta 2, los valores de expresión de *lys* en esplenocitos expuestos a LPS fueron aún más altos que los del mismo grupo expuesto a PBS ($P < 0,05$), lo que indica una expresión sostenida de este marcador genético humoral a lo largo del tiempo. De manera similar, a las 24 h, la expresión de *lys* en los esplenocitos de la Dieta 2 fue mayor que en el grupo control, aunque esta tendencia no fue significativa ($P > 0,05$; Figura 71).

Con respecto a la inmunoglobulina M (*IgM*), hubo una disminución, aunque no significativa, en la expresión de esta inmunoglobulina en esplenocitos del grupo C (Dieta 1) incubado con PBS a las 12 y 24 h ($P > 0,05$; Figura 71). Los valores de *IgM* de expresión en esplenocitos del grupo C incubado con LPS se mantuvieron constantes a lo largo del período de exposición de 24 h ($P > 0,05$). En contraste con el grupo C, los niveles de *IgM* aumentaron en los esplenocitos de dorada alimentados con la Dieta 2 a las 4 h cuando se expusieron a LPS ($P < 0,05$); un aumento en la expresión que se mantuvo a las 12 y 24 h ($P < 0,05$). Este aumento en la expresión también se observó al comparar los valores de expresión dentro de este grupo expuesto a PBS y LPS ($P < 0,05$; Figura 71).

Los valores de *tnf\alpha* en esplenocitos de ambos grupos experimentales siguieron el mismo patrón de expresión. Los valores de expresión de *tnf\alpha* en peces alimentados con dietas experimentales e incubadas con PBS se mantuvieron estables a lo largo del período experimental de 24 h ($P > 0,05$; Figura 71). En particular, los niveles de *tnf\alpha* aumentaron a las 4 h cuando se expusieron a LPS ($P < 0,05$) y luego disminuyeron, logrando niveles de expresión basales similares a los registrados a las 0 h ($P > 0,05$). Los niveles de expresión de *tnf\alpha* fueron similares entre los esplenocitos de Dietas 1 y 2 ($P > 0,05$; Figura 71).

Los valores de expresión de *il-1\beta* en esplenocitos de peces alimentados con dietas experimentales e incubadas con PBS se mantuvieron constantes a lo largo del período experimental de 24 h ($P > 0,05$; Figura 71). Los niveles de expresión de *il-1\beta* en esplenocitos de ambos grupos experimentales aumentaron a las 4 h cuando se incubaron con LPS en comparación con los valores de expresión de las muestras incubadas con PBS ($P < 0,05$), un aumento que se mantuvo entre 4 y 12 h ($P > 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias en *il-1\beta*

entre los esplenocitos de la Dieta 1 cuando se incubaron con PBS o LPS a las 24 h ($P > 0,05$), mientras que estas diferencias todavía existían en los esplenocitos de la Dieta 2 ($P < 0,05$). Además, los niveles de *il-1 β* a las 24 h fueron significativamente mayores en los peces alimentados con la dieta SDP en comparación con los de la Dieta 1 ($P > 0,05$; Figura 71).

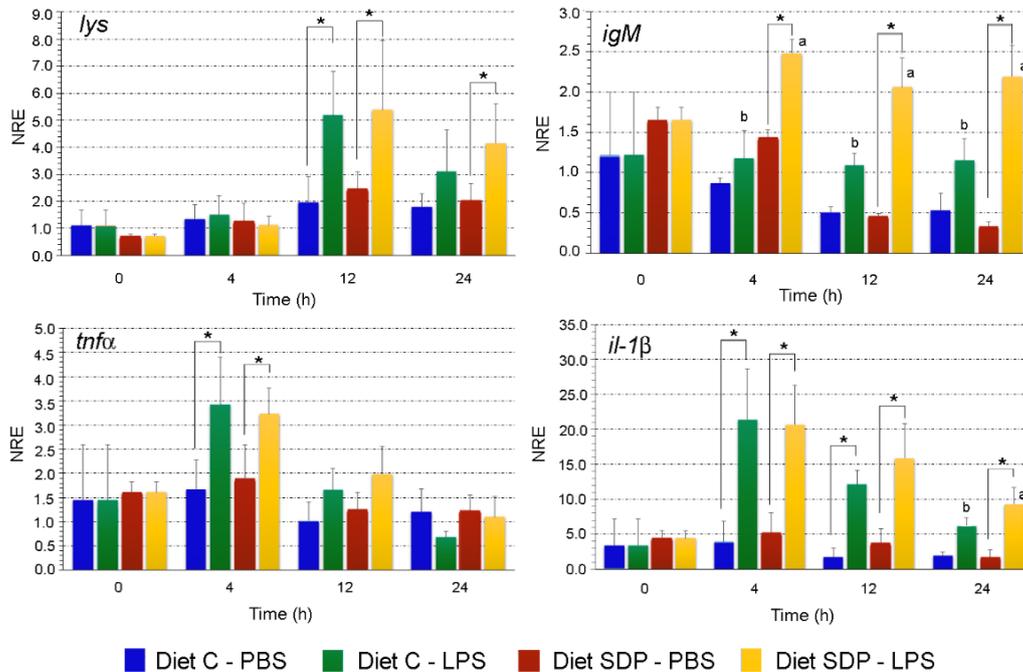


Figura 71. Expresión génica ($n = 6$) de lisozima (*lys*), inmunoglobulina M (*igM*), factor de necrosis tumoral alfa (*tnfa*) e interleucina 1 β (*il-1 β*) de esplenocitos de dorada alimentados con una Dieta 1 (control) y la Dieta 2 que el 5% de harina de pescado se reemplazó con plasma seco por pulverización de porcino (SDP). La expresión génica se midió en cultivos primarios de esplenocitos de ambos grupos expuestos a PBS y LPS en diferentes tiempos de muestreo (0, 4, 12 y 24 después de la incubación de LPS o PBS) y la expresión génica se normalizó con β -actina. Los datos se compararon mediante un ANOVA de dos vías; letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre los esplenocitos de diferentes grupos experimentales (Diets 1 y 2) en un mismo tiempo de muestreo, mientras que el asterisco indica la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los esplenocitos incubados con PBS o LPS dentro del mismo grupo experimental ($P < 0,05$).

Los valores de expresión de citoquinas antiinflamatorias (*il-10*, *tgfb*), el marcador de superficie *cd4* y las enzimas de estrés antioxidante *sod* y *cat* se muestran en la Figura 72. En particular, los niveles de transcripción de *il-10* se mantuvieron estables hasta 12 h, independientemente del grupo experimental e incubación de tejidos con PBS o LPS considerado ($P > 0,05$). En este momento de muestreo, la expresión de *il-10* aumentó en los esplenocitos incubados con LPS en ambos grupos experimentales ($P < 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($P > 0,05$). A las 24 h después de la incubación, los niveles de expresión disminuyeron y fueron similares a los registrados a las 0 h ($P > 0,05$). Con respecto a *tgfb*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ni los tiempos de muestreo hasta las 12 h, independientemente de la incubación de la muestra de tejido con PBS o LPS, aunque se registró una tendencia no significativa en todos los grupos entre

4 y 12 h ($P > 0,05$). A las 24 h, los niveles de expresión en las células procedentes de la Dieta 2 fueron más altas en los cultivos incubados con LPS que los incubados con PBS, así como también en relación a los valores de expresión de la Dieta 1 (Figura 72).

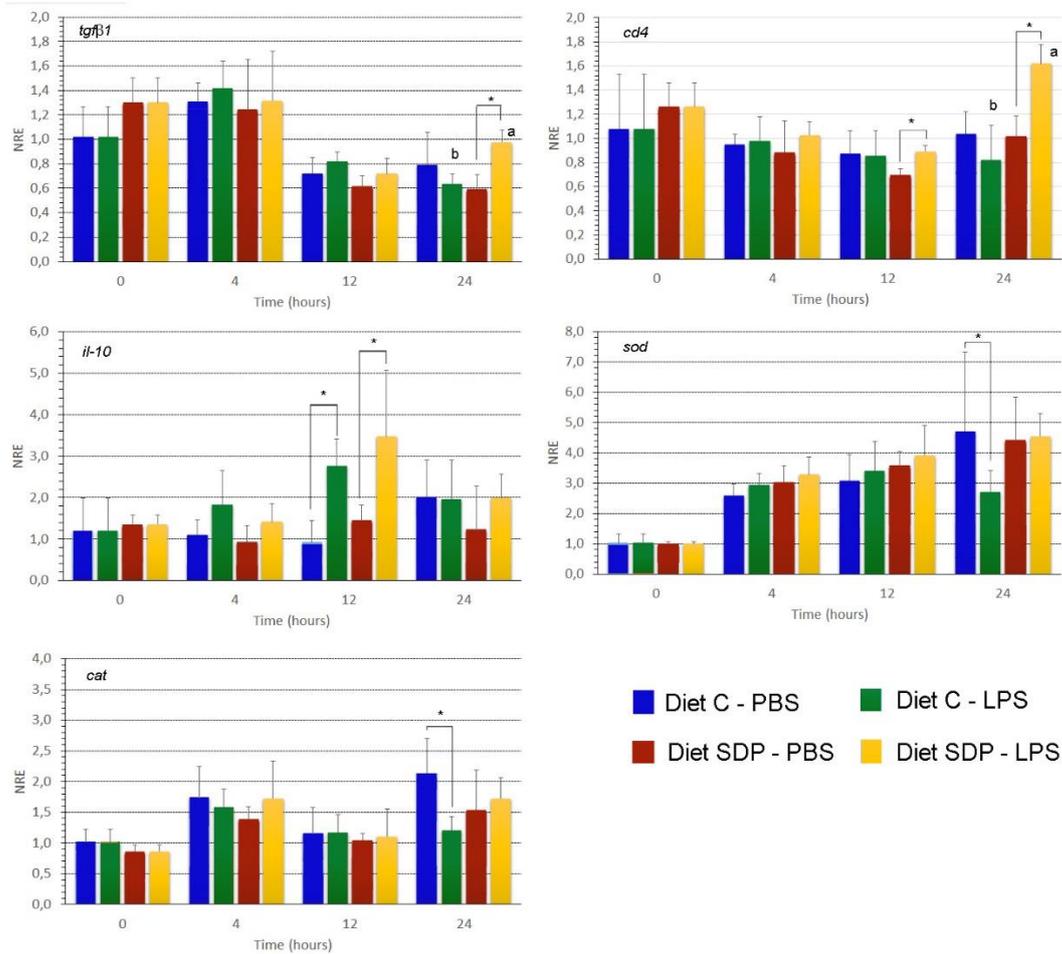


Figura 72. Expresión génica ($n = 6$) de citoquinas antiinflamatorias (*il-10*, *tgfβ*), el marcador de superficie *cd4* y las enzimas de estrés antioxidante *sod* y *cat* de esplenocitos de dorada alimentados con una Dieta 1 (control) y la Dieta 2 que el 5% de harina de pescado se reemplazó con plasma seco por pulverización de porcino (SDP). Los detalles sobre las gráficas se encuentran descritos en el pie de la Figura 71.

Los niveles de expresión de *cd4* en ambos grupos experimentales se mantuvieron constantes hasta 12 y 24 h, independientemente de la incubación de esplenocitos con PBS o LPS ($P > 0,05$). Sin embargo, en este tiempo de muestreo, los valores de expresión de *cd4* en esplenocitos de peces alimentados con la Dieta 2 e incubados con LPS fueron mayores que los de sus contrapartes incubados con PBS ($P < 0,05$). De manera similar, los niveles de expresión de *cd4* en esplenocitos incubados con LPS de la Dieta 2 fueron más altos que los medidos en el grupo de control incubado con LPS ($P < 0,05$; Figura 72).

Con respecto a los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes del estrés, los valores de expresión aumentaron entre 0 y 4 horas después de la incubación en todos los grupos experimentales, independientemente de la incubación del tejido con PBS o LPS, y se mantuvieron estables hasta el final del estudio ($P < 0,05$). A las 24 h, los niveles de expresión de la *sod* disminuyeron en los esplenocitos del grupo de control incubado con LPS en comparación con los registrados en las células incubadas con LPS ($P < 0,05$). Con respecto a los niveles de expresión de la *sod* en los esplenocitos de la Dieta 2, no hubo diferencias entre las muestras incubadas con PBS o LPS ($P > 0,05$), mientras que los niveles de la *sod* en los esplenocitos incubados con LPS fueron significativamente más altos que los registrados en las muestras incubadas con LPS del grupo control ($P < 0,05$). De manera similar a la *sod*, los niveles de transcripción de la *cat* aumentaron ligeramente de 0 a 4 horas y se mantuvieron estables hasta el final del estudio ($P < 0,05$). No se encontraron cambios en los valores de expresión génica a las 4, 12 y 24 h, con la excepción de las muestras incubadas con LPS del grupo de control que mostraron valores de expresión más bajos en comparación con los del mismo grupo incubados con PBS y los de la Dieta 2 con LPS ($P < 0,05$; Figura 72).

Los resultados de la **Dieta 4** expresados en términos de unidades de expresión relativa normalizada (NRE) en comparación con la Dieta 1 (control) se presentan en las Figuras 73 y 74.

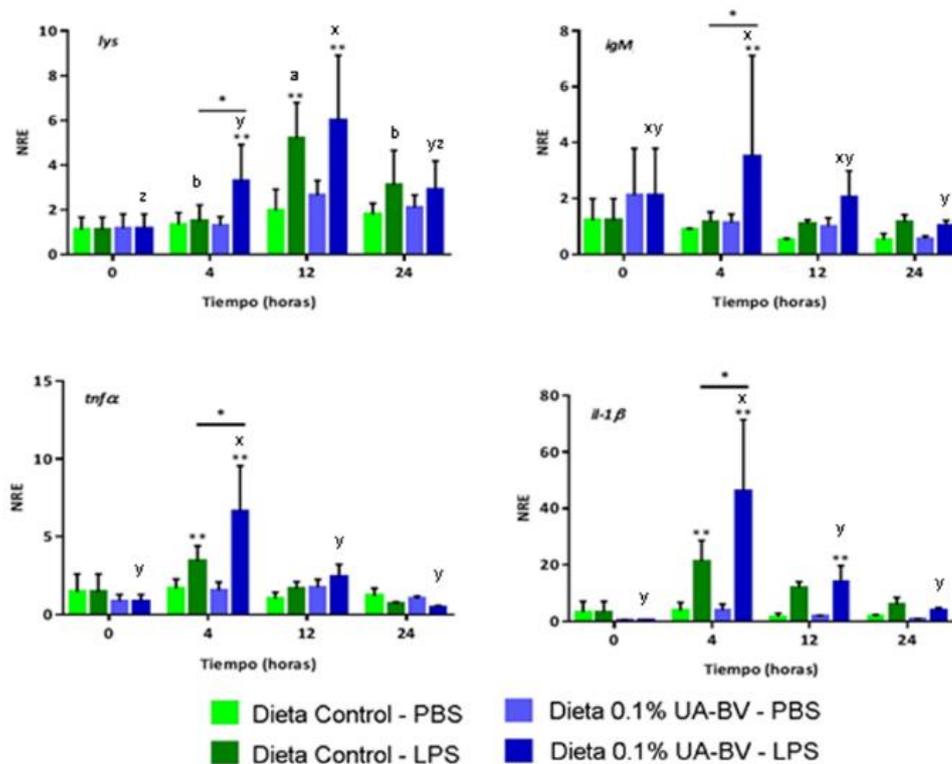


Figura 73. Expresión relativa normalizada (ERN) de los genes *lys*, *igM*, *il-1 β* y *tnfa* en un cultivo primario de células de bazo de doradas alimentadas con las dietas control (D1) y UA-VB 0,1 % (D4) a tiempos 4, 12 y 24h post-inducción con LPS. El tiempo 0h corresponde al estado basal previo al tratamiento. * representa diferencia significativa entre dietas; ** representa diferencias significativas entre células tratadas con PBS y LPS dentro de una misma dieta ($P < 0,05$).

En relación a la lisozima (*lys*), se destaca que a las 4 horas posteriores a la incubación (hpi), la expresión de este gen en los cultivos primarios de células de bazo de dorada (SPCC) de la Dieta 4 fue significativamente mayor (NRE = $3,28 \pm 1,63$) que en SPCC de peces alimentados con la Dieta 1 (NRE = $1,50 \pm 0,71$) ($P < 0,05$). A las 12 hpi, la expresión de *lys* todavía era alta en los SPCC de peces alimentados con la Dieta 4 (NRE = $6,01 \pm 2,89$) en comparación con los SPCC tratados con PBS (NRE = $2,64 \pm 0,67$). Estos resultados sugieren que la Dieta 4 promueve la expresión temprana de la lisozima en SPCC incubada a LPS en comparación con la dieta de control.

Con respecto a los niveles de expresión génica de la inmunoglobulina M (*IgM*) se mantiene el mismo patrón que el observado para la *lys*, siendo la expresión en SPCC mayor en las doradas alimentadas con la Dieta 4 (NRE $3,51 \pm 3,61$) a las 4 hpi en comparación con los SPCC de peces alimentados con la Dieta 1 (NRE = $1,18 \pm 0,34$) ($P < 0,05$). Por otro lado, a las 12 y 24 hpi no se observaron diferencias en ninguna de las dietas ($P > 0,05$), pero sí vale destacar que se observa una tendencia, pero no significativa a las 12 hpi en la expresión de *IgM* en la dieta 4 (NRE = $14,17 \pm 5,62$) en comparación con el SPCC tratado con PBS (NRE = $1,77 \pm 0,48$). Estos resultados también al igual que el gen lisozima sugieren que la Dieta 4 promueve la expresión temprana de la *IgM* en los esplenocitos de dorada incubados en LPS en comparación con la dieta de control, no manteniéndose así una diferencia significativa en los diferentes tiempos, pero sí una tendencia observada (Figura 73).

La expresión de interleucina 1 beta (*il-1 β*) registró un aumento en la expresión en aquellos peces alimentados con dieta 4 (NRE = $46,10 \pm 25,35$) en comparación con el SPCC tratado con PBS (NRE = $4,05 \pm 2,15$) (Figura 73; $P < 0,05$). Se observaron diferencias significativas entre la dieta control tratada con LPS a las 4 hpi en doradas (NRE = $21,39 \pm 7,33$) en comparación a la dieta control PBS (NRE = $3,95 \pm 2,86$), siendo la dieta control con LPS la que mayor expresión obtuvo. Por otro lado, a las 12 hpi, se observó un efecto modulador en los esplenocitos de la Dieta 4 tratados con LPS (NRE = $14,17 \pm 5,62$) en comparación con aquellos tratados con PBS de peces alimentados con la misma dieta (NRE = $1,77 \pm 0,48$). Por el contrario, quedó sin efecto modulador alguno a las mismas hpi ambas dietas control, LPS y PBS (NRE = $12,08 \pm 2,06$; NRE = $1,67 \pm 1,33$). A las 24 hpi, no se observaron diferencias en los cultivos primarios de esplenocitos tratados con LPS (NRE = $6,17 \pm 2,40$) y PBS (NRE = $1,89 \pm 0,60$) para la Dieta 1, como tampoco en las Dieta 4 tratada con LPS y PBS (NRE = $3,90 \pm 1,05$; NRE = $0,87 \pm 0,23$, respectivamente). Estos resultados muestran un aumento en la respuesta de esta citoquina pro-inflamatoria de manera contralada y en mayor expresión en los peces alimentados con la Dieta 4 en comparación con los alimentados con la Dieta 1 (control).

Otra citoquina pro-inflamatoria analizada como el factor de necrosis tumoral (*tnfa*) mostró cambios de expresión a las 4 hpi en aquellos peces alimentados con la Dieta 4 y tratados con LPS (NRE = $6,63 \pm 2,93$) una expresión mayor al SPCC tratado con PBS (NRE = $1,56 \pm 0,52$). Así también se observó una diferencia significativa en la dieta control tratada con LPS (NRE = $3,42 \pm 0,10$) a las 4 hpi en comparación a la dieta control expuesta PBS (NRE = $1,67 \pm 0,60$). A diferencia de la *il-1 β* , *tnfa* no mostró diferencias en el SPCC tratado con LPS (NRE = $2,42 \pm 0,80$) a las 12 hpi en comparación con el SPCC con PBS (NRE = $1,75 \pm 0,51$), ni tampoco en la dieta control tratada con LPS (NRE = $2,42 \pm 0,80$) y PBS (NRE = $1,75 \pm 0,51$), pero sí es observable una tendencia no significativa en la expresión de los esplenocitos expuestos a LPS (NRE = $2,42 \pm 0,80$) en la Dieta 4. Estos resultados sugieren que la expresión pro-inflamatoria es mayor y más temprana en los peces alimentados con la Dieta 4 en comparación con los animales alimentados con la Dieta 1 (control).

Se observaron diferencias a nivel del marcador de membrana de leucocitos (*cd4*) a las 4 hpi con una mayor expresión en los esplenocitos de peces alimentados con la Dieta 4 tratada con LPS (NRE = $1,50 \pm 0,80$) en comparación a aquellos peces alimentados con la Dieta 4 expuesta a PBS (NRE = $0,98 \pm 0,26$) (Figura 74). Sin embargo, estos resultados no se dan en peces alimentados con la Dieta 1 incubados con LPS (NRE = $0,98 \pm 0,20$) donde no se observa diferencia en comparación con los cultivos primarios expuestos a PBS (NRE = $0,95 \pm 0,09$). Tampoco se observaron diferencias en SPCC tratado con LPS y PBS para la Dieta 1 (NRE = $0,85 \pm 0,21$; NRE = $0,87 \pm 0,19$, respectivamente), y Dieta 4 (NRE = $0,68 \pm 0,18$; NRE = $0,81 \pm 0,26$). A las 24 hpi, se observó una mayor expresión de *cd4*, pero no significativa en las dietas control expuestas a LPS (NRE = $0,82 \pm 0,29$) y PBS (NRE = $1,04 \pm 0,18$) en comparación a los esplenocitos de peces alimentados con la Dieta 4 incubados con LPS y PBS (NRE = $0,48 \pm 0,11$; NRE = $0,61 \pm 0,11$). Estos resultados demuestran que a las 4 hpi existe un efecto significativamente estimulante para *cd4* en comparación con la Dieta 1 (control), lo que hace que su expresión sea mayor en la Dieta 4 tratada y, por lo tanto, los peces alimentados con esta dieta están mejor preparados para reaccionar frente a una infección bacteriana.

En el caso de la interleucina 10 (*il-10*), se observó que en SPCC incubados con LPS a las 4 hpi en la Dieta 4 una mayor expresión (NRE = $4,16 \pm 3,21$) que los peces alimentados con la dieta 4 tratados con PBS (NRE = $1,16 \pm 0,50$). A las 12 hpi, los esplenocitos incubados con LPS mostraron un aumento significativo en la expresión de *il-10* en los peces alimentados con la dieta control (NRE = $2,76 \pm 0,66$) en comparación a la Dieta 1 tratada con PBS (NRE = $0,93 \pm 0,52$), mostrando también así un aumento en la expresión del gen con respecto a la Dieta 4 en SPCC incubado con LPS (NRE = $4,89 \pm 1,70$) en comparación con aquellos peces alimentados con la Dieta 4 tratados con PBS (NRE = $3,01 \pm 1,38$), aquí es importante destacar que la expresión de la *il-10* en SPCC de doradas alimentadas con la Dieta 4 (NRE = $4,89 \pm 1,70$) fue mayor que SPCC de peces alimentados con dieta control (NRE = $2,76 \pm 0,66$) (Figura 74). El conjunto de estos datos sugiere que siguiendo el mismo patrón que los otros genes, se obtiene una expresión mayor y más temprana con respecto al gen *il-10* gracias a la Dieta 4 en comparación con el grupo control.

A las 4 hpi, el cultivo celular primario de esplenocitos incubado con LPS mostró un aumento en la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (*tgfb1*) en aquellos peces alimentados con la Dieta 4 (NRE = $3,34 \pm 2,63$) en comparación con el cultivo primario de esplenocitos expuesto a PBS (NRE = $2,16 \pm 0,46$). Casi la misma expresión se observaron en las dietas control tratadas con LPS y PBS (NRE = $1,42 \pm 0,22$; NRE = $1,31 \pm 0,15$, respectivamente), sin tener un efecto modulador a las 4 hpi (Figura 74). En este caso la Dieta 4, ésta promueve en conjunto con la *il-10* una estricta y temprana regulación de la respuesta anti-inflamatoria mediante un aumento de la expresión de estos genes cuando están expuestos a LPS en comparación con la Dieta 1 (control).

En relación a la expresión génica de marcadores moleculares relacionados con el estrés oxidativo, en cuanto a la superóxido dismutasa de manganeso (*mn-sod*) se observaron diferencias en los cultivos primarios de esplenocitos expuestos a LPS en doradas alimentadas con la Dieta 4 (NRE = $5,45 \pm 1,70$) comparado con las células de bazo expuestas a PBS (NRE = $2,10 \pm 0,80$). No se encontró un efecto que demuestre una modulación en SPCC en aquellos peces alimentados con la Dieta 1 expuesta a LPS (NRE = $2,94 \pm 0,39$) a las 4 hpi en comparación con la dieta control PBS (NRE = $2,58 \pm 0,39$). A las 12 hpi, se observó una leve tendencia de mayor expresión de la *mn-sod* sin observar significancia de la Dieta 4 en esplenocitos incubados con LPS (NRE = $3,85 \pm 1,11$) en comparación con la Dieta 4 tratada con PBS (NRE = $3,59 \pm 0,51$) (Figura

74). Estos datos sugieren un aumento temprano de la enzima antioxidante *mn-sod* en respuesta al LPS en aquellos peces alimentados con la Dieta 4 en comparación con la Dieta 1, lo que demuestra una mayor capacidad de las células de los peces alimentados con la Dieta 4 a responder frente a una infección bacteriana, debido a la participación de la *mn-sod* en procesos inmunitarios.

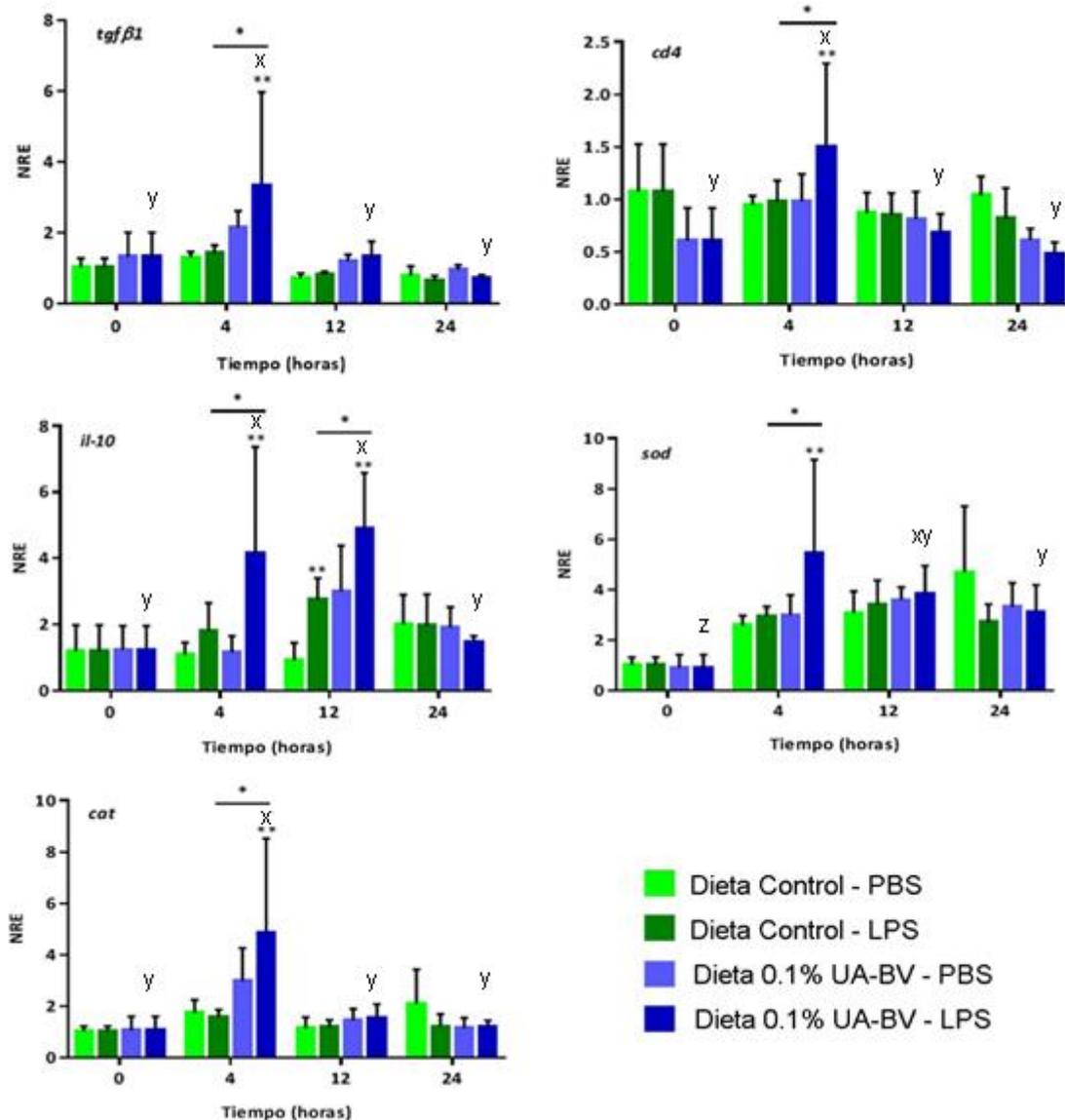


Figura 74. Expresión relativa normalizada (ERN) de los genes *tgfb1*, *cd4*, *il-10*, *sod* y *cat* en un cultivo primario de células de bazo de doradas alimentadas con las dietas control (D1) y UA-VB 0,1 % (D4) a tiempos 4, 12 y 24h post-inducción con LPS. El tiempo 0h corresponde al estado basal previo al tratamiento. * representa diferencia significativa entre dietas; ** representa diferencias significativas entre células tratadas con PBS y LPS dentro de una misma dieta ($P < 0,05$).

En relación a la expresión de catalasa (*cat*), se observaron diferencias a nivel de expresión de *cat* a las 4 hpi en esplenocitos incubados con LPS en peces alimentados con la Dieta 4 (NRE = $4,84 \pm 1,68$) en comparación la dieta 4 SPCC tratados con PBS (NRE = $2,97 \pm 1,29$). Es destacable el patrón que se observó en todos los genes con respecto a las 4 hpi donde la expresión en este caso de la *cat* fue menor en SPCC de peces alimentados con dieta control (NRE = $1,59 \pm 0,29$) en comparación a SPCC de la Dieta 4 tratados con LPS (NRE = $4,84 \pm 2,68$) donde la expresión fue mayor (Figura 74). A nivel enzimas antioxidantes estos resultados sugieren que los peces alimentados con la Dieta 4 tienen una capacidad redox aumentada en comparación con los peces alimentados con la Dieta 1 (control) que les permite afrontar una infección bacteriana.

Conclusiones

Los resultados de la Tara A2.1 indican que tanto los hemoderivados de sangre porcina, plasma secado por esprayación (APPETEIN GS®) como el hidrolizado de sangre porcina (PEPTEIVA®), así como el ácido ursólico y verbascósido extraídos de plantas medicinales como la salvia y la María Luisa, pueden ser usados como aditivos en piensos funcionales para peces. Además, el hecho de haber probado su eficiencia en dietas con muy bajo nivel de harina de pescado, pone todavía mucho más en valor su potencial uso en dietas para peces, donde en algunos casos se ha descrito que niveles altos de sustitución de la harina de pescado, si bien no afectan al crecimiento del animal, pueden comprometer su salud y respuesta inmunitaria.

En cuanto a los dos productos derivados de sangre porcina evaluados, como son el hidrolizado de plasma secado por esprayación como el hidrolizado de proteína, su inclusión en dietas para dorada (niveles finales de harina de pescado de sólo el 2%) ha sido muy positiva, permitiendo dichos ingredientes promover el crecimiento y alcanzar tasas de crecimiento incluso superiores a las de la Dieta control con un 7% de harina de pescado, así como también promover una mejor integridad y condición de los tejidos mucosales analizados, tal y como demuestran los resultados de la histología y transcriptómica realizada. Además, la inclusión de los hemoderivados porcinos ha resultado en una promoción de la respuesta inmune, tal y como ha mostrado el análisis transcriptómico de tejidos, como la prueba *ex vivo* con cultivos primarios de células del bazo.

En relación a los compuestos fenólicos evaluados, los resultados del presente estudio proporcionan importantes datos sobre las actividades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos fenólicos (ácidos ursólico y verbascósido) de *L. citriodora* y *S. officinalis* para su uso como aditivos en dietas funcionales en peces como inmunoestimulantes y antioxidantes, ya que la alimentación de doradas con la dieta con un 0,1% UA-VB mejora la condición global del pez, repercutiendo en una promoción del rendimiento en crecimiento y en su respuesta inmune frente a la exposición a un potencial agente infeccioso, tal y como se demuestra en el patrón de expresión de los marcadores moleculares relacionados con citoquinas pro- y anti-inflamatorias, enzimas relacionados con el estrés oxidativo, respuesta innata humoral y el marcador de células de superficie. En este sentido, el conjunto de marcadores moleculares muestra que el aditivo

evaluado promueve un estricto control de la respuesta pro-inflamatoria lo que permitiría al organismo combatir una posible infección bacteriana, promoviendo su salud y bienestar. A su vez, los resultados histoquímicos y transcriptómicos muestran unos tejidos mucosales (piel, branquias e intestino) más activos y con una mejor condición tisular, lo que permitiría al animal combatir eficientemente una agresión externa o tolerar mejor un proceso infeccioso. Además, la inclusión de los compuestos fenólicos evaluados mejora la calidad del filete en cuanto reduce los niveles de peroxidación lipídica, aumentando así su vida media en un lineal durante el proceso de comercialización.

El uso combinado de ambos aditivos, los procedentes de sangre porcina y los derivados de plantas medicinales, no parece aportar ventajas sustanciales a los animales, puesto que parece que los beneficios que aportan cada tipo de aditivos no tiene efectos sumatorios, quedando así diluidos sus efectos positivos cuando se incluyen en la dieta por separado.

Tarea A.2.2. Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de la inclusión de levadura y dietas inmunoestimulantes en dorada

El desarrollo sostenible de la industria acuícola requiere no solo de un enfoque económico sino también la consideración del costo biológico del mismo. Por lo tanto, se hace más conveniente el manejo preventivo de la salud (estrategia proactiva), así como también como el curativo (estrategia reactiva) de las enfermedades. En este contexto, la inmunoterapia comprende los métodos que utilizan principios inmunológicos para prevenir la enfermedad y en este sentido, el uso de dietas funcionales resulta una estrategia sostenible y respetuosa con el medio ambiente y consumidor. Los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a la enfermedad mediante un incremento en los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, convirtiéndose en agentes profilácticos primarios, no curativos. Así este grupo de aditivos se consideran como agentes profilácticos primarios, los cuales pueden ser utilizados con el fin de incrementar la capacidad defensiva general del organismo y no como medicina curativa. Sin embargo, si son usados en un estado avanzado de la enfermedad pueden ser reconocidos por el organismo como una infección aparente y agravar los síntomas de la enfermedad existente, por lo menos por un corto periodo de tiempo.

Las limitaciones de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, del huésped, tipo de inmunoestimulante usado y los procedimientos de administración. Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que suministrados en concentraciones superiores a las normales producirán efecto estimulante. Las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores. Los inmunoestimulantes de mayor uso son los de origen bacteriano (LPS, oligodeoxinucleótidos CpG), así como los β -glucanos de hongos y levaduras.

Objetivos

Evaluar el efecto inmunoestimulante de dos aditivos, un producto comercial fabricado para ganado y reformulado para peces (IMMUNOTEC[®], TECNOVIT-FARMFAES) y una levadura (*Debaromyces hansenii*), sobre la dorada y ver su efecto sobre el rendimiento productivo, salud y respuesta inmunitaria bajo distintas condiciones experimentales.

Metodología

Dietas experimentales y características del ensayo

Se diseñaron y fabricaron un total de 5 dietas experimentales (48% proteína; 17% grasa; energía: 21,7 MJ/Kg; Tabla 23), tal y como se indica a continuación:

- dieta control (Dieta 1);
- dieta con 0,15% IMMUNOTEC[®] (Dieta 2);
- dieta con 0.30% IMMUNOTEC[®] (Dieta 3);
- dieta con 1,1% de Levadura *Debaromyces hansenii* (Dieta 4);
- dieta con 2,2% de Levadura *Debaromyces hansenii* (Dieta 5).

De forma similar a la Tarea A2.1, los niveles de harina de pescado en la dieta control fue sólo del 7%, dieta experimental donde cerca del 75% de la harina de pescado es sustituida por ingredientes proteicos de origen vegetal (Tabla 23). En términos de los aditivos probados, IMMUNOTEC® es una mezcla de β -glucanos, vitamina C, extracto de *Echinacea purpurea* y manan-oligosacáridos.

Tabla 23. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales usadas en la Tarea A2.2.

Ingredients, %	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
	%	%	%	%	%
Fishmeal LT70 (NORVIK)	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000
Yeast (<i>Debaromyces hansenii</i>)				1,100	2,200
INMUNOTEC		0,150	0,300		
Soy protein concentrate (Soycomil)	21,000	21,000	21,000	21,000	21,000
Pea protein concentrate	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Wheat gluten	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Corn gluten	12,000	12,000	12,000	12,000	12,000
Soybean meal 48	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
Wheat meal	10,400	10,400	10,400	10,400	10,400
Fish oil - SAVINOR	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
Vit & Min Premix PV01	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Soy lecithin - Powder	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Binder (guar gum)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
MCP	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
L-Lysine	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
L-Tryptophan	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
DL-Methionine	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Total	100,000	100,150	100,300	101,100	102,200

As fed basis	CTRL	MIX0.15	MIX0.3	Y1.1	Y2.2
Crude protein, % feed	48,40				
Crude fat, % feed	17,20				
Fiber, % feed	1,53				
Ash, % feed	5,89				
Gross Energy, MJ/kg feed	21,67				

Todas las dietas (40 kg por dieta) fueron fabricadas por SPAROS Lda (Portugal), la descripción de la fabricación de dichas dietas puede encontrarse en Gisbert et al. (2015). Las dietas fueron proporcionadas al 3,5% en función de la biomasa estabulada; la ración alimentaria fue ajustada por medio de muestreos intermedios de periodicidad mensual, la duración del ensayo fue de 70 días. La ración alimentaria fue distribuida 8 veces al día mediante alimentadores automáticos (ARVO-TEC T Drum 2000; Arvotec, Finland).

Los tanques fueron diariamente inspeccionados por el personal técnico del IRTA con el fin de supervisar el correcto funcionamiento de una unidad de recirculación del agua, comprobar el buen estado de salud de los animales, su normal comportamiento y alimentación y retirar las bajas que pudieran acontecer durante el ensayo.

El experimento nutricional fue llevado a cabo en dos unidades de 24 tanques de 200 L de volumen conectados a dos sistemas de recirculación del agua IRTAmar® (Figura 75). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura del agua entre $23,3 \pm 1,3$ °C, oxígeno disuelto de 5.7 ± 0.2 mg L⁻¹, salinidad 35-36 ppt y fotoperíodo de 14 h Luz y 8 h Oscuridad.



Figura 75. Unidad experimental (24 tanques) conectada a un sistema IRTAmar® donde se ha realizado la Tarea A.2.2.

Al final del ensayo, todos los peces fueron muestreados en talla (longitud estándar, cm) y peso (g) previa anestesia con MS-222 (Sigma-Aldrich, España) y se procedió a tomar muestras de distintos tejidos corporales, y éstas fueron distribuidas entre los miembros del consorcio para su análisis. Con el fin de tomar muestras de distintos tejidos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico (ver Figura 34 en Tarea A2.1).

En relación a las metodologías empleadas para el análisis de la i) composición proximal de las dietas y de los peces, ii) los niveles de lípidos peroxidados y actividad de los enzimas relacionados con el estrés oxidativo, iii) el análisis de los marcadores inmunológicos no específicos, iv) evaluación de la organización histológica y propiedades histoquímicas de tejidos diana (piel, branquias e intestino), v) descripción de la microbiota intestinal y vi) análisis transcriptómico de tejidos diana se encuentran descritas en la sección metodológica de la Tarea A2.1.

Evaluación *in vivo* de las competencias inmunológicas en peces alimentados con las dietas experimentales

Al igual que pasó con la Tarea A2.1, al final del ensayo nutricional no fue posible llevar a cabo un reto bacteriano en los ejemplares alimentados con las dietas que contenían el aditivo IMMUNOTEC®, tal y como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, un segundo ensayo nutricional dosis-respuesta se realizó con el objetivo de verificar la efectividad del IMMUNOTEC® a las dos dosis probadas inicialmente en términos de supervivencia frente a un patógeno bacteriano (*Vibrio anguillarum*). Para ello, se llevó a cabo un segundo ensayo nutricional, tal y como se describe en la Figura 76, si bien en este caso se usaron juveniles de dorada con peso inicial de $0,8 \pm 0,3$ g. Un peso inicial considerablemente reducido comparado con el primer

ensayo ha sido considerado debido a la inmunocompetencia desarrollada por individuos de mayor tamaño, como se ha referido anteriormente. Todas las dietas fueron fabricadas por SPAROS Lda. (Portugal). Las dietas fueron proporcionadas al 6% en función de la biomasa establecida; la ración alimentaria fue ajustada por medio de muestreos intermedios. Este segundo ensayo fue realizado durante el primer semestre del 2019 y tuvo una duración de 45 días.

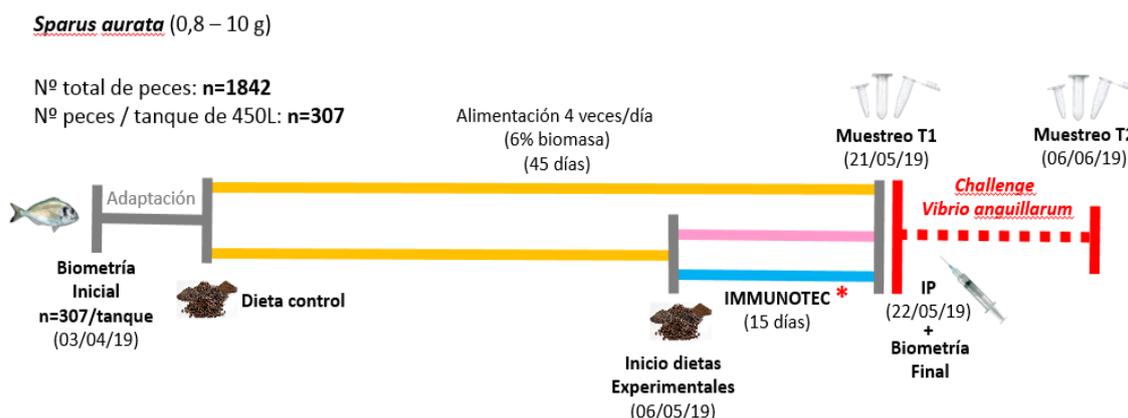


Figura 76. Ensayo nutricional dosis-respuesta IMMUNOTEC® en juveniles de dorada. La dieta control se ha administrado a lo largo de los 45 días del experimento (amarillo), mientras que las dietas IMMUNOTEC® 0,15% (color azul) y 0.3% (color rosado) se han administrado exclusivamente en los últimos 15 días previos al reto bacteriano con *Vibrio anguillarum*.



Figura 77. Placas de TSA + 0.5% NaCl con cultivo de diluciones seriadas de *Vibrio anguillarum* serotipo 01 para evaluación cuantitativa y cualitativa por medio de recuento de CFUs del inóculo inyectado intraperitonealmente en los juveniles de dorada.

Inicialmente, varias cepas de *V. anguillarum* y *P. damsela* se inyectaron a distintas concentraciones en una prueba preliminar con peces control del ensayo nutricional de modo a determinar una DL_{40} y seleccionar el patógeno y la dosis de inóculo más adecuados para su aplicación en el reto. De entre las cepas evaluadas, una cepa de *V. anguillarum* serotipo 01 fue seleccionada, crecida en medio de cultivo TSA + 0.5% NaCl, inoculada en PBS e inyectada peritonealmente al 10^6 de concentración en un volumen de 0.2 mL. La dosis inoculada se confirmó *a posteriori* por recuento de unidades formadoras de colonias (CFUs) (Figura 77). La mortalidad respectiva de las tres dietas fue registrada de triplicados de tanque por dieta (3 tanques/dieta). Se inyectaron un total de 20 peces por tanque (total de 60 peces por dieta). Un conjunto equivalente de animales se inyectó con PBS como control de procedimiento. El reto bacteriano se llevó a cabo en las instalaciones de biocontención nivel II del IRTA (Figura 78). Muestréos de suero sanguíneo y de tejidos para análisis de transcriptómica se realizaron a los 45 días de ensayo nutricional y al final del reto bacteriano con los individuos supervivientes. La duración del reto bacteriano fue de 13 días después de la inoculación de los peces con el patógeno.

Durante los 13 días que duró el reto bacteriano, los peces fueron observados a intervalos regulares de 2-3 horas con el fin de retirar los animales muertos en cada uno de los tanques, mientras que aquellos animales que mostraron un comportamiento errático, hiperventilación y letargia fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico con el fin de evitar un sufrimiento innecesario a los peces.



Figura 78. Fotografía de las instalaciones del IRTA donde se desarrolló el reto bacteriano (sala de biocontención nivel 2) (izquierda) y detalle de procedimiento de inyección peritoneal de juveniles de dorada con *Vibrio anguillarum* (derecha).

Los resultados del primero reto bacteriano se presentan en la sección de Resultados, si bien es importante avanzar que los resultados no fueron concluyentes por lo que se decidió volver a repetir el reto bacteriano, pero cambiando la pauta de alimentación. Así, una vez que no se ha podido observar diferencias en la supervivencia entre los grupos nutricionales cuando sometidos al reto bacteriano, y de modo a garantizar que los resultados han sido independientes de la circunstancia de aplicación del producto, el diseño experimental del ensayo nutricional se ha replanteado y los peces se han sometido a una pausa en la administración de las dietas IMMUNOTEC® durante 10 días (alimentación con la dieta control) para realización de un segundo reto bacteriano. La segunda versión del ensayo nutricional se encuentra ilustrada en la Figura 79.

El reto bacteriano que sucedió la segunda versión del ensayo nutricional se realizó según la metodología descrita en la primera versión del ensayo con un aumento a 10^8 de dosis de inóculo inyectada por 0,2 mL de inóculo.

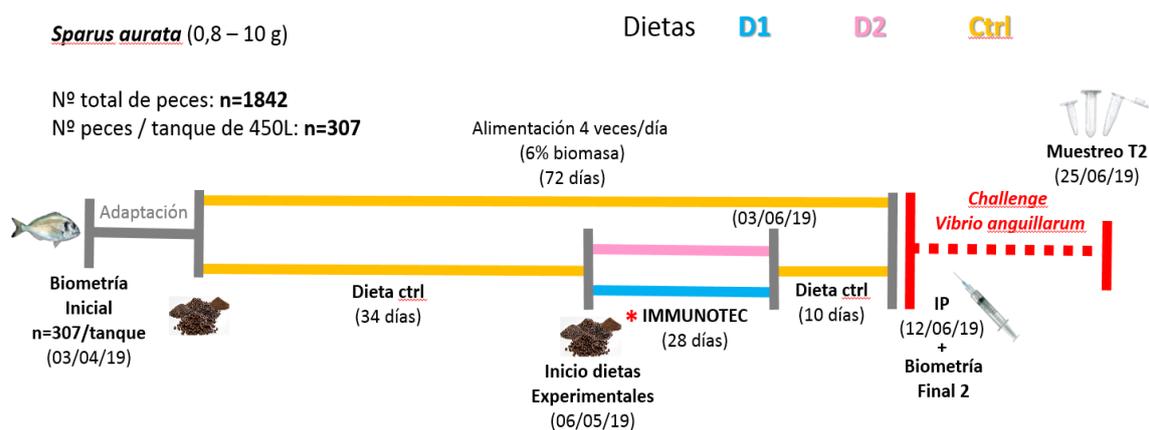


Figura 79. Segunda versión del ensayo nutricional dosis-respuesta IMMUNOTEC® en juveniles de dorada. La dieta control se ha administrado a lo largo del experimento (amarillo), mientras que la administración de las dietas IMMUNOTEC® 0,15% (color azul) y 0.3% (color rosado) se han interrumpido a los 28 días de su aplicación siendo sustituidas por dieta control en los últimos 10 días previos al reto bacteriano con *Vibrio anguillarum* (rosa y azul).

Evaluación *ex vivo* de las competencias inmunológicas en peces alimentados con las dietas experimentales

Al igual que en la Tarea A2.1 se procedió a evaluar la respuesta inmunitaria del bazo mediante un cultivo primario de esplenocitos expuestos a PBS (control) y LPS, para ello se utilizaron los bazos extraídos de doradas alimentadas con las Dietas 1 (control), Dieta 2 (IMMUNOTEC® al 0,15%) y Dieta 4 (levadura al 1,1%), al ser estos los grupos experimentales que mostraron un mejor rendimiento en términos de crecimiento somático.



Figura 80. imagen de laboratorio con los cultivos primarios de esplenocitos usados para evaluar la respuesta inmunitaria en doradas alimentadas con las dietas experimentales. Grupo de trabajo preparando los cultivos primarios.

El diseño experimental, protocolo de trabajo (procesado de los bazos, y preparación cultivos primarios), procesado de muestras (tratamiento esplenocitos y muestreo a distintas horas post exposición a PBS y LPS), procesado (extracción ARN de los cultivos primarios, síntesis de ADNc) y análisis (estudios de expresión génica por medio de PCR cuantitativa) de las muestras se ha realizado tal y como se indica en la Tarea A2.1 (Figura 80).

Evaluación *in vivo* de la tolerancia al estrés en peces alimentados con las dietas experimentales

Si bien no estaba planteado inicialmente en la propuesta, se decidió evaluar si las dietas que contenían ambos aditivos evaluados, el IMMUNOTEC® y la levadura *Debaromyces hansenii*, ofrecían a los animales una ventaja frente a un estrés ocasionado por una elevada densidad de cultivo.

Para ello se decidió exponer a los peces alimentados con las distintas dietas experimentales a dos densidades, una baja (3 kg/m^3) y otra alta (30 kg/m^3) (Figura 81). Con el fin de conseguir una densidad elevada se utilizaron unas cestas de malla de 33 L en las que se dispusieron 10 animales (biomasa por cesta = 950-975 g; densidad aproximada 30 kg/m^3). Para los peces mantenidos a baja densidad (3 Kg/m^3) se usaron los mismos tanques de 200 L que se utilizaron en el ensayo nutricional (8 peces por tanque, biomasa por tanque = 570-660 g). Cada dieta y densidad de cultivo fue evaluada por duplicado. Durante el ensayo de estrés por elevada densidad, los peces fueron alimentados de forma estándar, tal y como se ha descrito anteriormente. El cultivo a ambas densidades tuvo una duración de 25 días. Durante la duración del ensayo los

peces fueron alimentados con las mismas dietas experimentales con el fin de garantizar el efecto de las mismas sobre la potencial tolerancia al estrés que éstas pudieran ejercer sobre el animal.



Figura 81. Fotografía del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las dietas experimentales sobre la tolerancia al estrés por elevada densidad en dorada.

Durante el ensayo, los peces fueron supervisados diariamente durante las tareas alimentación y sifonado de los tanques experimentales con el fin de detectar posibles situaciones adversas en los animales derivadas de las altas densidades de cultivo.

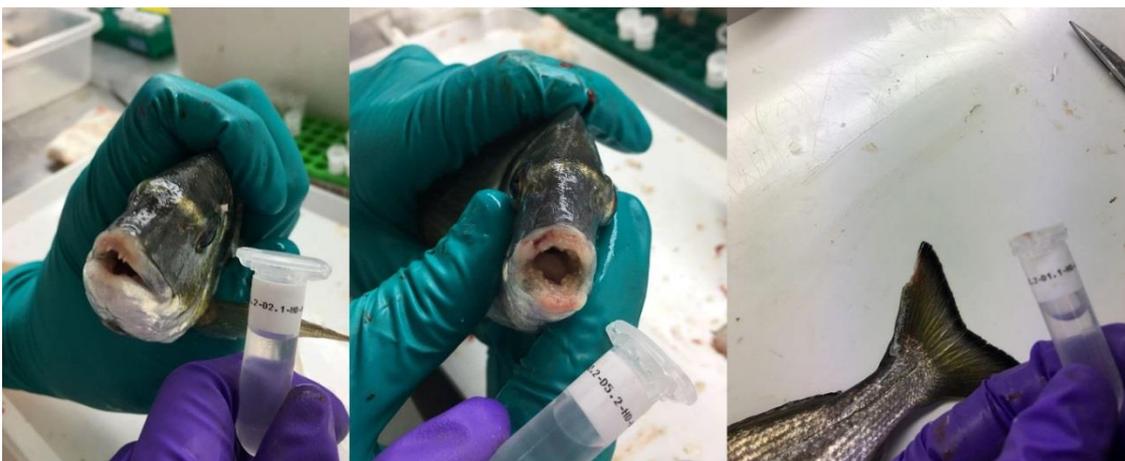


Figura 82. Ejemplos de lesiones observadas en las mandíbulas y cola de doradas mantenidas a elevadas densidades de cultivo y alimentadas con las dietas experimentales evaluadas en la Tarea A2.2.

Al final del ensayo, los animales fueron medidos, sacrificados y se procedió a la extracción de muestras de suero y mucus epidérmico, tejidos para fines histológicos y transcriptómicos, tal y como se encuentra descrito en otras secciones de este mismo informe. Durante su muestreo final se hizo una observación externa del estado de salud de los animales con el fin de detectar posibles lesiones originadas por las altas densidades de cultivo, tal y como se ilustra en la Figura 82.

Además de recolectar muestras de moco y suero para evaluar el efecto de las dietas sobre la tolerancia al estrés de los peces en condiciones de hacinamiento, también se tomaron muestras de cerebro e hipófisis para evaluar la respuesta de marcadores moleculares relacionados con la respuesta frente al estrés. El procesado de las muestras para la extracción del ARN, síntesis de ADNc y condiciones de PCR han sido descritos en otras secciones del informe, mientras que el listado de genes y cebadores usados para su cuantificación se describen en la Tabla 24.

Tabla 24. Genes usados para evaluar en cerebro e hipófisis la respuesta al estrés de doradas mantenidas a altas densidades y alimentadas con las dietas experimentales.

Gen	Tejido diana	Accession number	Oligos 5' --> 3'		Amplicon (pb)
actb	Control interno	<u>X89920</u>	Fw	TCT TCC AGC CAT CCT TCC TCG	108
			Rv	TGT TGG CAT ACA GGT CCT TAC GG	
ef1a	Control interno	<u>AF184170</u>	Fw	AGA GGC TGT CCC TGG TGA	137
			Rv	TGA TGA CCT GAG CGT TGA AG	
crh	cerebro	<u>KC195964</u>	Fw	ATG GAG AGG GGA AGG AGG T	176
			Rv	ATC TTT GGC GGA CTG GAA A	
crhbp	cerebro	<u>KC195965</u>	Fw	GCA GCT TCT CCA TCA TCT ACC	147
			Rv	ACG TGT CGA TAC CGC TTC C	
trh	cerebro	<u>KC196277</u>	Fw	GAA ACG CTT TTG GGA TAA CTC C	131
			Rv	CGG CGT GAC TCT TGT TTA TGT T	
gh	hipófisis	<u>U01301</u>	Fw	CGT CTC TTC TCA GCC GAT	131
			Rv	GCT GCT CCT CCG TCT GC	
pri	hipófisis	<u>AF060541</u>	Fw	TGA CAT CGG CGA GGA CAA CAT	111
			Rv	CGG CAG CGG AGG ACT TTC AG	
pomca	hipófisis	<u>HM584909</u>	Fw	AGC CAG AAG AGA GAG CAG TGA	120
			Rv	ATC GGG TCA GAA AAC ACT CA	
pomcb	hipófisis	<u>HM584910</u>	Fw	AGC TCG CCA GTG AGC TGT	81
			Rv	CCT CCT GCA TCA CTT CCT G	

Análisis estadístico

Excepto cuando se indique lo contrario, todos los valores en tablas y gráficas están representados como media \pm ES (error estándar de la media) y en todas las pruebas estadísticas el nivel de significación se estableció en $P < 0,05$. La normalidad y homocedasticidad de las variables de análisis fueron comprobadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de un factor y un posterior test de Duncan para identificar grupos homogéneos; en el caso de comparaciones entre solo dos grupos fue usada una t de Student. Los resultados de expresión génica relacionados con los marcadores medidos en cerebro e hipófisis fueron comparados inicialmente con un test de PERMANOVA seguido de un test post-hoc de pares.

Resultados

Crecimiento

Los resultados en términos de rendimiento productivo se comparan y analizan independientemente para cada grupo de dietas (IMMUNOTEC® y levadura), y no de forma global, al ser los aditivos evaluados de distinta naturaleza y propiedades (Figura 83).

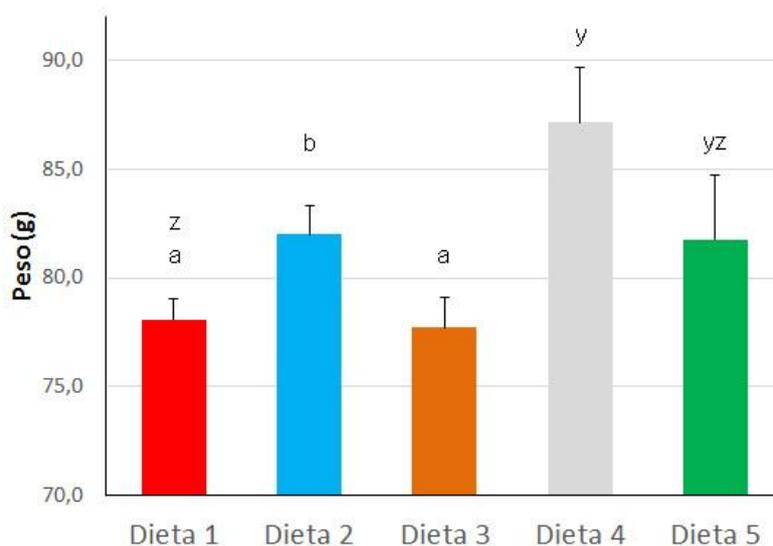


Figura 83. Resultados de crecimiento en peso de las doradas alimentadas con las dietas experimentales. Distintas dietas indican diferencias significativas entre los grupos experimentales en relación a la dieta control (Dieta 1). Las letras “a, b” hacen referencia a la comparativa entre las Dietas 1, 2 y 3, mientras que las letras “y, z” hacen referencia a la comparativa entre las Dietas 1, 4 y 5.

Al final del estudio, los peces alimentados con la Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%) fueron un 5% más pesados ($82,0 \pm 1,3$ g) que los del grupo control (Dieta 1) ($78,1 \pm 1,0$ g) ($P < 0,05$), mientras que los alimentados con la Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%) mostraron el mismo peso ($77,7 \pm 1,4$ g) que los de la dieta control (Figura 83). En relación a la Dieta 3 si bien los peces alimentados con la dosis alta del aditivo inmunostimulante presentaron estadísticamente un mismo crecimiento que los del grupo control, se observa una ligera tendencia en este grupo alimentado con la Dieta 3 a tener un peso menor. Este resultado podría venir dado por una sobrestimulación de los animales por un uso demasiado prolongado de la Dieta 3, afectando así a su crecimiento.

En relación a las dietas que contenían la levadura *D. hansenii*, se pudo observar que los peces alimentados con la Dieta 4 (1,1% de levadura) fueron un 11.7% más pesados ($87,2 \pm 2,5$ g) que los del grupo control ($P < 0,05$), mientras que la dosis alta de incorporación de la levadura (2,2%, Dieta 5) no representó ninguna ventaja en términos de crecimiento ($81,7 \pm 3,0$ g) en comparación con la dieta control (Dieta 1) (Figura 84).

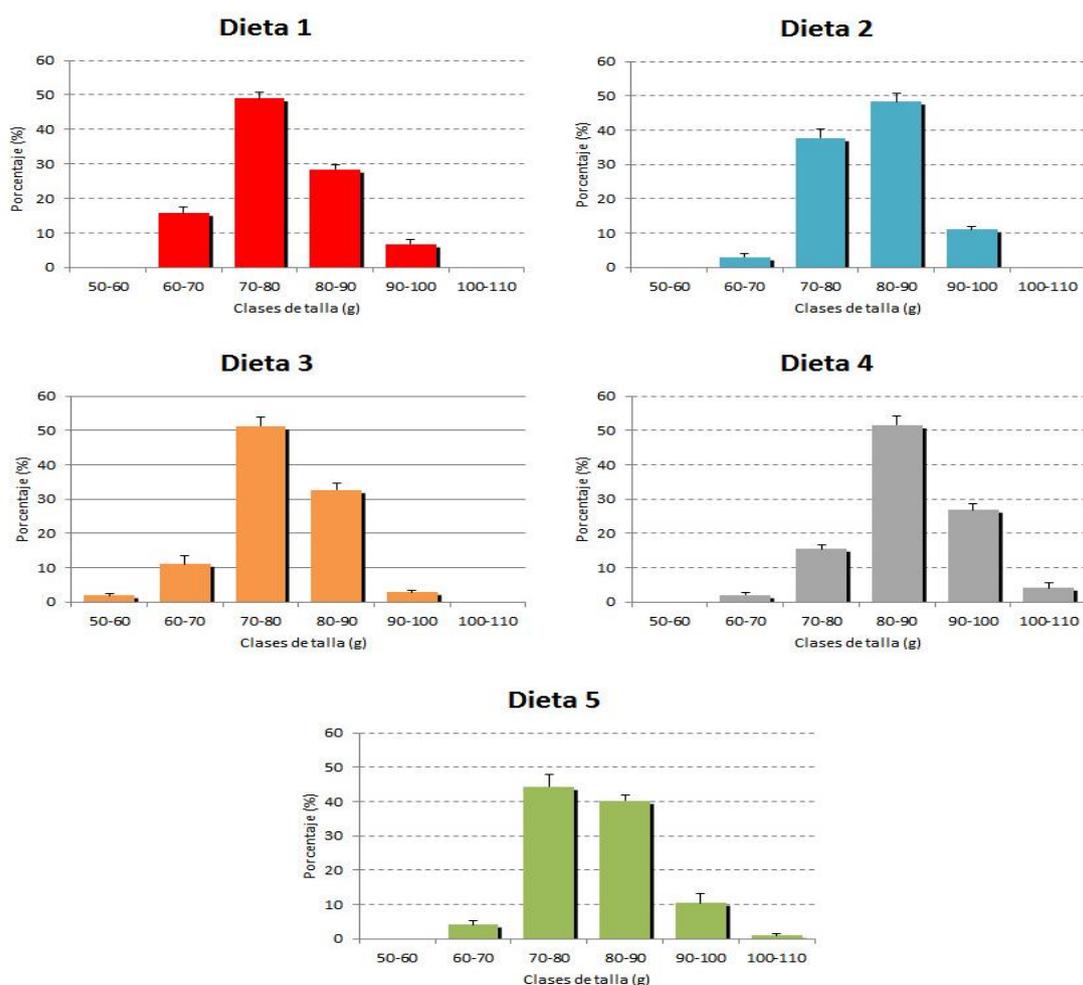


Figura 84. Distribución de tallas en peso de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales.

Los resultados de la distribución de tallas al final del ensayo nutricional se encuentran representados en la Figura 84. Como se observa, los valores de la moda en las Dietas 2 y 4 son superiores a las de la Dieta 1 (control), si bien en todos los casos, la distribución de tallas al final del ensayo siguió la normalidad.

Composición proximal del filete

Los resultados relativos a la composición proximal del filete de peces alimentados con la dieta control y aquellas dietas que contenían el aditivo inmunostimulante (Dietas 2 y 3) y levadura (Dietas 4 y 5) se presentan en la Tabla 25. En términos generales, no se observan diferencias significativas en los niveles de proteína y grasa en el filete, independientemente de la dieta considerada ($P > 0,05$).

Tabla 25. Análisis proximal del filete de doradas alimentadas con las dietas experimentales formuladas con un aditivo inmunostimulante (IMMUNOTEC®) y una levadura (*Debaromyces hansenii*).

	Humedad	Proteína	Grasa	Cenizas
Dieta 1 Control	71,3 ± 0,5	21,6 ± 0,6	5,9 ± 0,6	1,5 ± 0,1
Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0.5%)	71,8 ± 1,3	21,1 ± 0,7	5,1 ± 2,0	1,5 ± 0,1
Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0.3%)	70,9 ± 0,6	20,7 ± 0,7	6,0 ± 1,0	1,4 ± 0,1
Dieta 4 (levadura 1.1%)	70,6 ± 1,0	20,6 ± 0,9	6,3 ± 0,8	1,4 ± 0,0
Dieta 5 (levadura 2.2%)	71,3 ± 1,0	20,8 ± 0,6	5,7 ± 0,6	1,4 ± 0,0

A partir de los resultados anteriores, y teniendo en cuenta la naturaleza y propiedades de los aditivos evaluados no se consideró necesario el análisis del perfil de ácidos grasos del filete, y, por lo tanto, esta información no se incluye en el presente informe.

Estrés oxidativo

En la Tabla 26 se muestran los resultados de los niveles de peroxidación lipídica, la capacidad total antioxidante (TAC) y actividad de enzimas relacionados con el estrés oxidativo (CAT, SOD; GR y GST) en el hígado de ejemplares de dorada alimentados con las distintas dietas experimentales.

Tabla 26. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS), actividad total antioxidante (TAC) y niveles de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) medidos en hígados de doradas alimentadas con las dietas experimentales.

	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5
TBARS					
(mmol/mg proteína)	1,11 ± 0,21	1,40 ± 0,46	1,32 ± 0,72	1,08 ± 0,28	1,10 ± 0,61
TAC					
(conc/mg prot)	0,025 ± 0,004	0,023 ± 0,001	0,027 ± 0,011	0,022 ± 0,004	0,022 ± 0,008
SOD					
(% inhibición)	82,1 ± 4,0	84,8 ± 1,0	85,2 ± 4,6	85,5 ± 5,3	86,3 ± 3,3
CAT					
(nmol/min/mg prot)	1,81 ± 0,11 a	2,11 ± 0,04 b	1,92 ± 0,12 a	1,98 ± 0,16 ab	1,79 ± 0,11 a
GR					
(nmol/min/mg prot)	1,56 ± 0,22 a	1,81 ± 0,09 b	1,62 ± 0,06 a	1,61 ± 0,10 a	1,59 ± 0,11 a
GST					
(nmol/min/mg prot)	2,48 ± 0,12 a	3,14 ± 0,38 b	2,44 ± 0,48 a	2,71 ± 0,39 ab	2,62 ± 0,12 a

Si bien no se encontraron diferencias a nivel del contenido de lípidos peroxidados y de la capacidad total de peroxidación en los hígados de peces alimentados con las dietas experimentales ($P > 0,05$), se puede observar una tendencia, aunque no significativa en que los peces alimentados con las dietas que contienen IMMUNOTEC® y la levadura *D. hansenii* presentan niveles más elevados de actividad de la SOD. Sin embargo, para el resto de enzimas analizados sí que se encontraron diferencias entre grupos experimentales. En particular, los peces alimentados con IMMUNOTEC® al 0,15% (Dieta 2) presentaron niveles más elevados de CAT, GR y GST en comparación con la Dieta control, mientras que los peces alimentados con la levadura a 1,1% presentaron valores superiores en CAT y GST ($P < 0,05$). En el caso de ambos aditivos evaluados a las dosis más altas, los niveles de actividad de la CAT, GR y GST fueron intermedios entre el control y los niveles de la Dieta 2 y 4 ($P > 0,05$).

Respuesta inmune no específica en suero

No se detectó actividad lisozima en suero de para ninguna de las doradas alimentadas con las dietas ensayadas. En el caso del complemento, si bien no se detectaron diferencias significativas debido a la elevada variabilidad interindividual dentro de cada grupo experimental ($P < 0,05$), se puede observar una tendencia en que los peces alimentados con IMMUNOTEC® y la levadura *D. hansenii* presentan valores más elevados de la actividad del complemento (Figura 85).

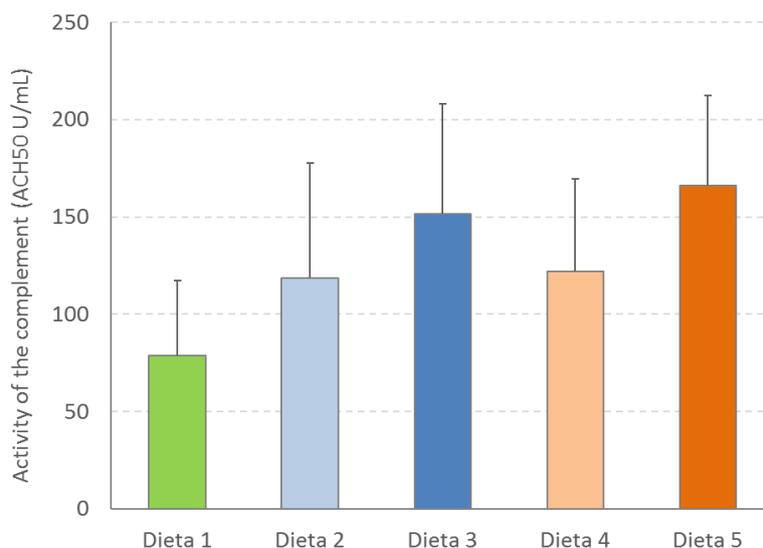


Figura 85. Niveles de complemento (ACH50 U/mL) presentes en suero de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales

En relación a los niveles de IgM y actividad bactericida tampoco se encontraron diferencias entre grupos, si bien en este caso no se observa la misma tendencia que la detectada para la actividad del complemento (Figura 86), si bien destaca la tendencia, aunque no significativa de un mayor nivel de actividad bactericida en el grupo control (Dieta 1) en comparación con el resto de grupos alimentados con los dos aditivos evaluados. Los resultados encontrados en relación a los niveles de marcadores inmunológicos no específicos en suero no se ajustan a los de otros estudios reportados en la literatura, tanto para aditivos con funciones inmunoestimuladoras que contienen β -glucanos y MOS (Torrecillas et al., 2014; Wang et al., 2017) como para la levadura *D. hansenii* (Reyes-Becerril et al., 2008). Estas diferencias entre nuestro estudio y otros publicados pueden venir principalmente determinada por el tiempo de administración de los aditivos evaluados en el presente estudio, pues una administración demasiado prolongada (70 días en nuestro estudio) puede producir el efecto contrario al que se busca con esta estrategia nutricional, tal y como se intuye con los resultados encontrados en relación a los niveles de la IgM. En el caso de la administración de la levadura *D. hansenii* se ha visto su efecto inmunomodulador a tiempos cortos de administración, entre dos y 4 semanas, tal y como ha sido descrito por (Reyes-Becerril et al., 2008).

A la vista de estos resultados, el equipo investigador decidió realizar un ensayo *in vivo* para evaluar y validación la competencia inmune de los animales usando una estrategia nutricional diferente, en la que solo se administró la dieta que contenía el aditivo IMMUNOTEC® durante 15 días (ver sección de metodología y resultados del ensayo *in vivo*).

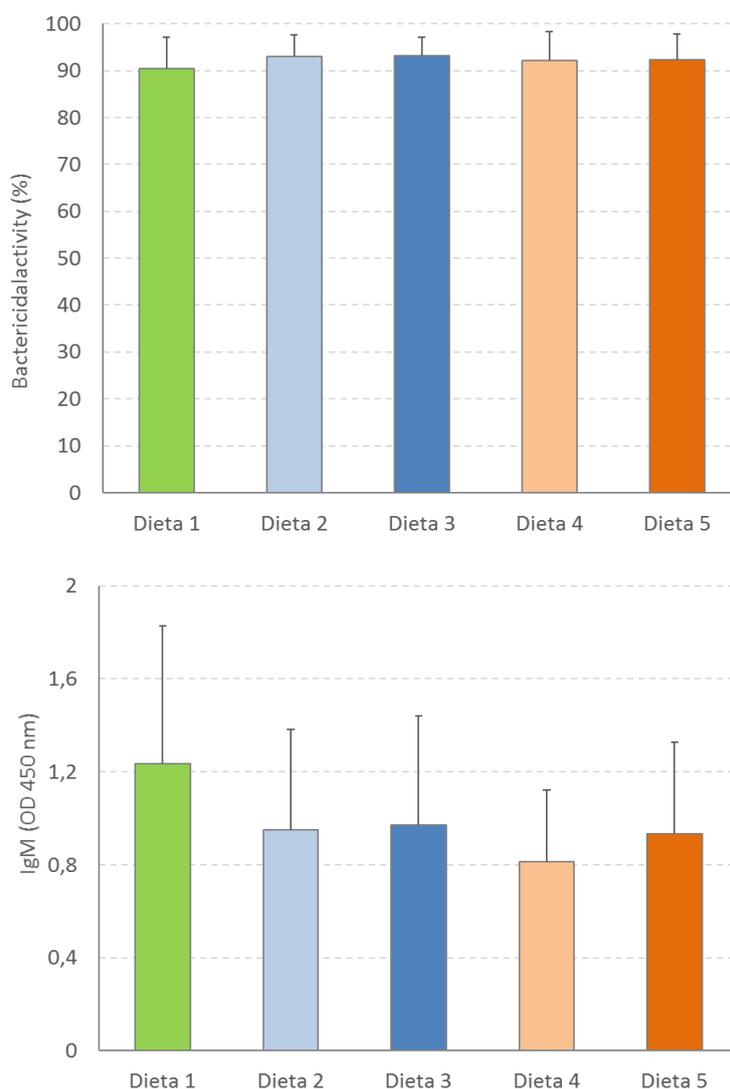


Figura 86. Niveles de Inmunoglobulina M (IgM) y actividad bactericida en el suero de doradas alimentadas con las dietas experimentales.

Microbiota intestinal

El análisis de la microbiota intestinal llevado a cabo al final del estudio nutricional reveló que no se encontraron diferencias a nivel de los valores de alfa diversidad, ni tampoco en los valores de riqueza (Chao1), diversidad (índice de Shannon) y dominancia (índice de Simpson) de los distintos grupos de bacterias analizadas, independientemente de la dieta o sección intestinal (anterior y posterior) analizadas (Tabla 27).

Tabla 27.- Diversidad alfa de las comunidades bacterianas en el intestino anterior y posterior de los especímenes de *Sparus aurata* que han recibido las dietas control (Dieta 1) y suplementadas con 0,15% ó 0,30% de IMMUNOTEC® (Dietas 2 y 3), y 1,1% ó 2,2% de *Debaromyces hansenii* (Dietas 4 y 5).

Parte	TRATAMIENTO	Chao1	Shannon	Simpson
Anterior	Control	76,93 ± 5,10	2,87 ± 0,24	0,89 ± 0,03
	<i>D. hansenii</i> 1,1%	77,43 ± 18,8	3,03 ± 0,27	0,9 ± 0,03
	<i>D. hansenii</i> 2,2%	70,16 ± 11,40	2,93 ± 0,17	0,90 ± 0,02
	Inmunotec 0,15%	73,37 ± 6,85	2,89 ± 0,37	0,89 ± 0,05
	Inmunotec 0,3%	79,43 ± 16,42	3,08 ± 0,22	0,90 ± 0,03
Posterior	Control	78,56 ± 15,03	2,51 ± 0,46	0,87 ± 0,03
	<i>D. hansenii</i> 1,1%	88,3 ± 40,02	2,5 ± 0,25	0,81 ± 0,11
	<i>D. hansenii</i> 2,2%	67,45 ± 16,93	2,24 ± 0,54	0,75 ± 0,17
	Inmunotec 0,15%	73,37 ± 20,40	2,97 ± 0,83	0,91 ± 0,2
	Inmunotec 0,3%	83,28 ± 22,20	3,00 ± 0,31	0,89 ± 0,06

Los filos más abundantes encontrados en la microbiota intestinal fueron en todos los casos por orden de abundancia Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias (Figuras 87 y 88 para los peces alimentados con IMMUNOTEC® y la levadura *D. hansenii*, respectivamente).

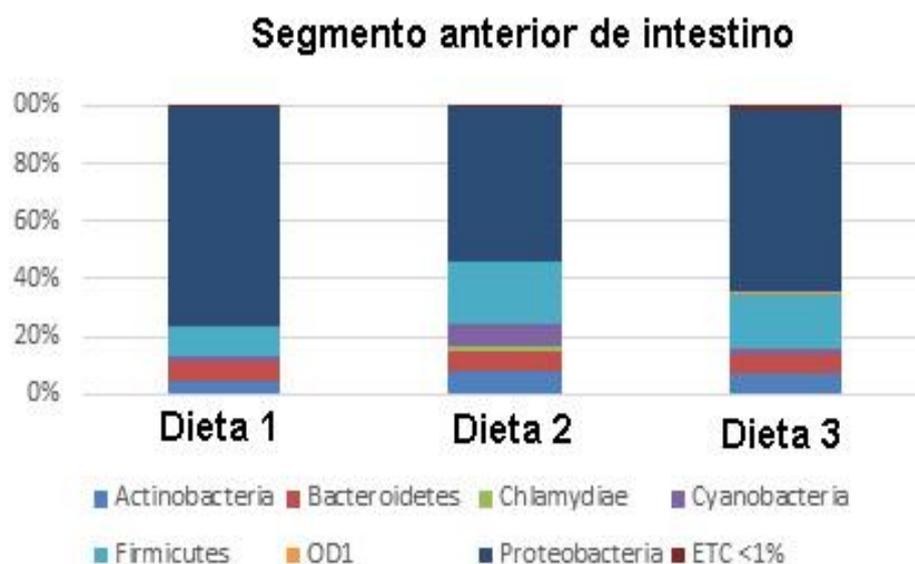


Figura 87. Composición de la microbiota a nivel de filo de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC®.

Segmento posterior de intestino

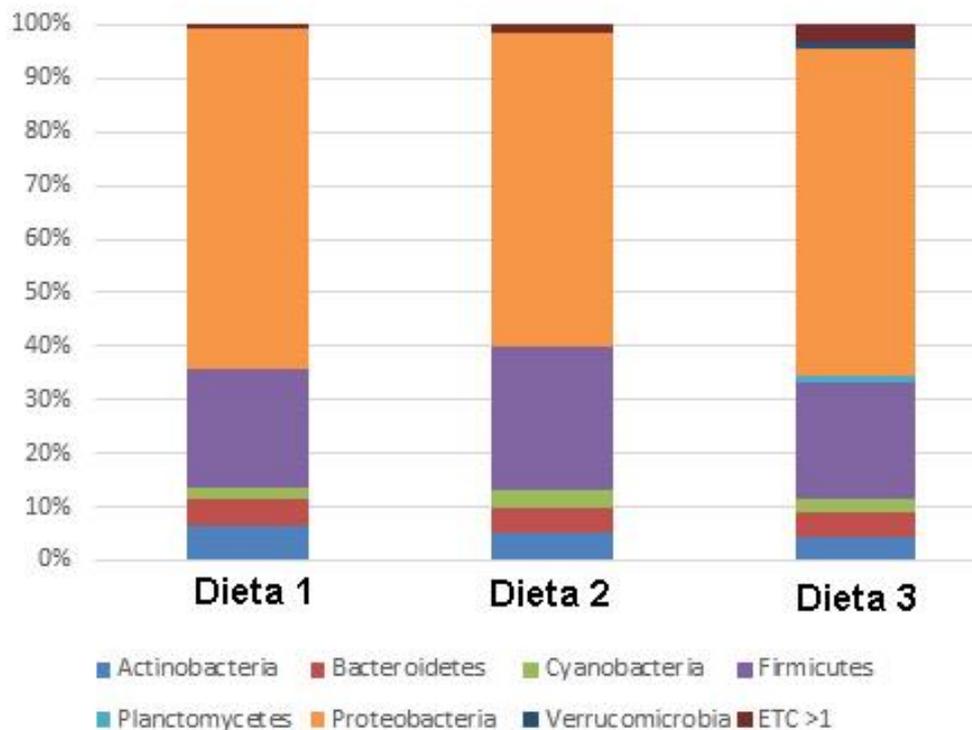


Figura 88. Composición de la microbiota a nivel de filo de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC®.

En lo que se refiere al análisis taxonómico a nivel de clase, la mayoritaria independientemente de la dieta y sección intestinal estudiada fue la de las γ -Proteobacterias (Figuras 89 y 90). Únicamente fueron apreciados incrementos significativos en el caso de las clases Bacteroidia y Planctomycetia, en el intestino anterior y posterior respectivamente de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Debaromyces hansenii* 1,1%. En el caso de los animales que recibieron la dieta suplementada con IMMUNOTEC® al 0,3%, se apreciaron incrementos significativos en el caso de la Clase Bacteroidia, tanto en el intestino anterior como posterior.

Cuando el análisis taxonómico se llevó a cabo a nivel de género, se pudo comprobar que los géneros dominantes, independientemente de la dieta o sección intestinal analizada, fueron *Pseudoalteromonas*, *Acinetobacter* y *Shewanella*. Además, los géneros *Firmicutes*, *Candidatus*, y *Arthromitus* resultaron ser también predominantes en el intestino posterior de los animales. Sin embargo, fue muy interesante observar que tanto en intestino anterior como posterior procedentes de todas las muestras, el porcentaje de géneros con una presencia <1% osciló entre el 20% y el 40% dependiendo del tratamiento y la sección intestinal considerada.

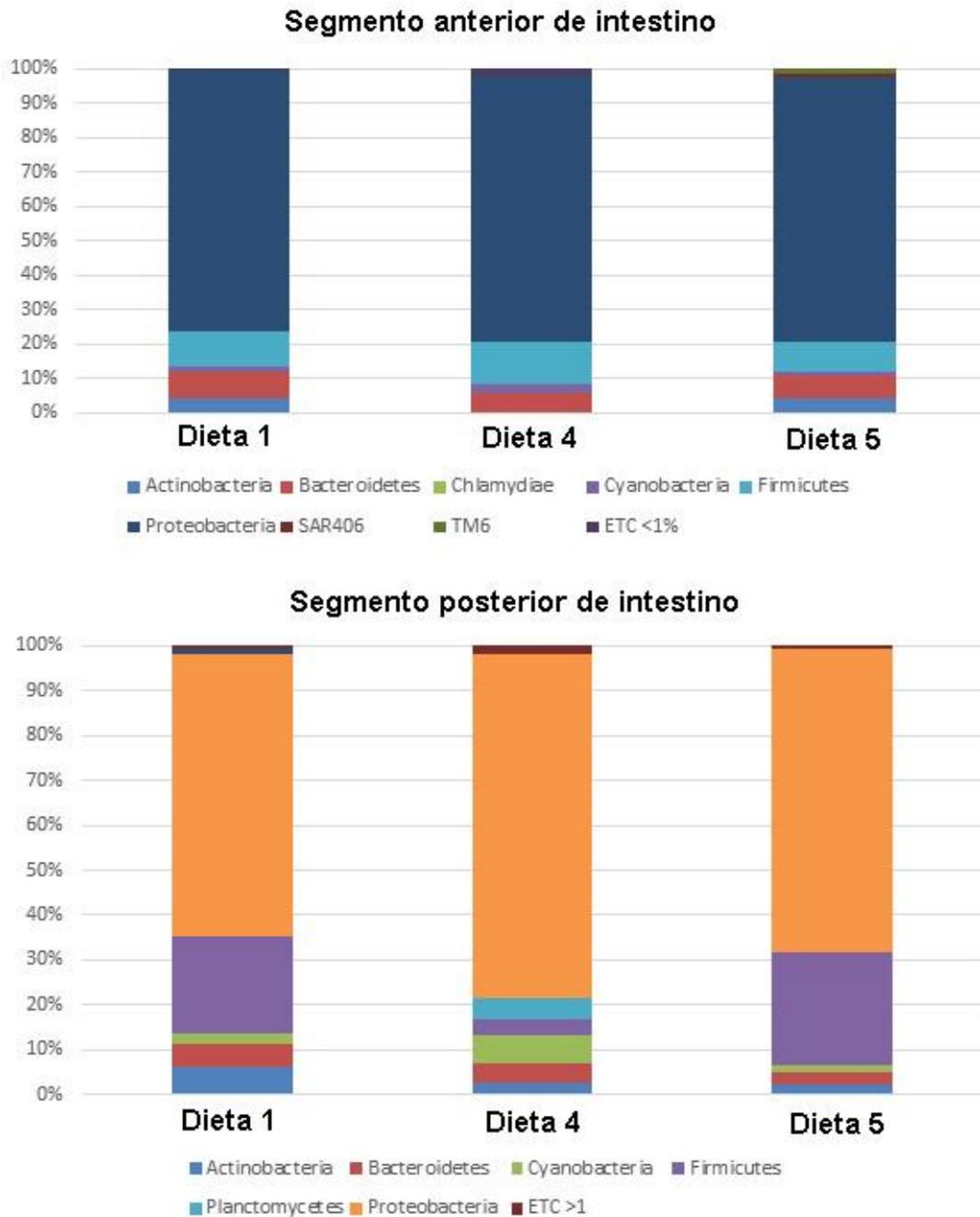


Figura 89. Composición de la microbiota a nivel de filo de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 1.1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2.2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

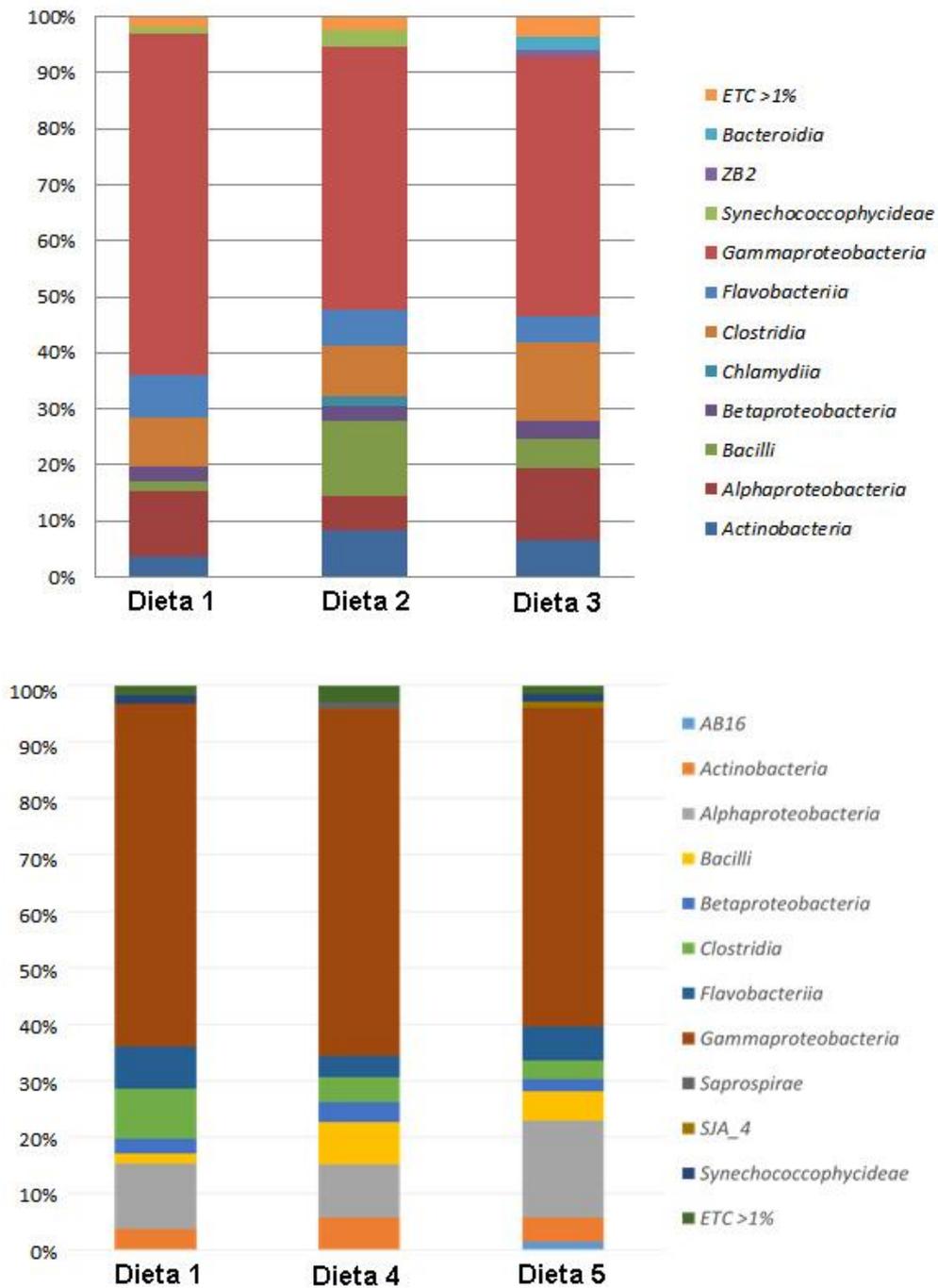


Figura 90. Composición de la microbiota del intestino anterior a nivel de clase de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC® y 1,1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2,2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

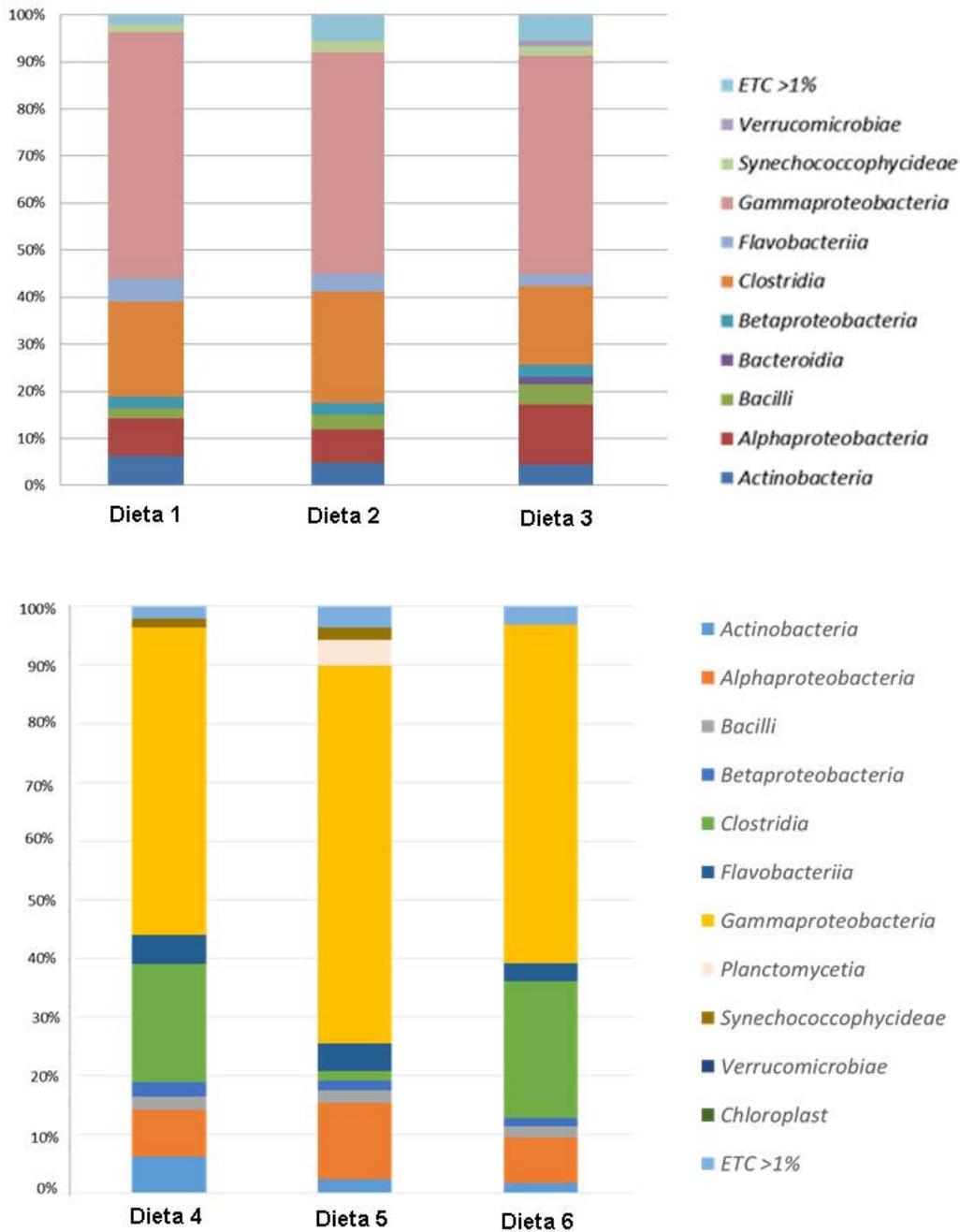


Figura 91. Composición de la microbiota del intestino posterior a nivel de clase de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC® y 1,1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2,2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

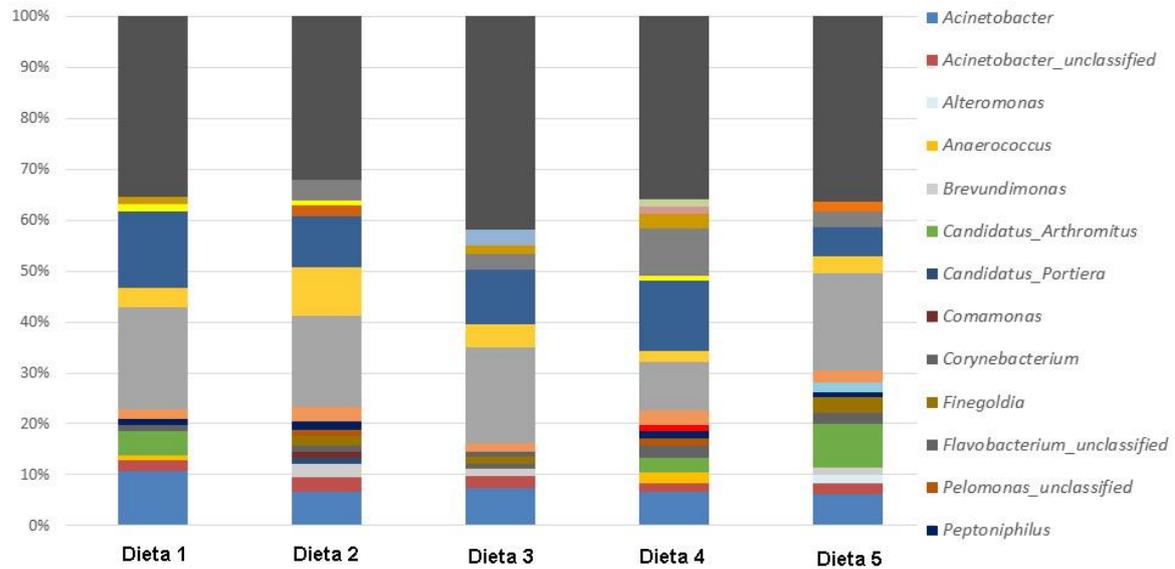


Figura 92. Composición de la microbiota del intestino anterior a nivel de género de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC® y 1,1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2,2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

El intestino anterior de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con 0,15% de IMMUNOTEC® se apreció el mayor número de diferencias, ya que mostró 11 géneros con variaciones significativas en sus abundancias (Figura 92). Concretamente 8 y 3 de ellos mostraron reducciones e incrementos, respectivamente. Entre los que mostraron incrementos de su abundancia destaca el caso de los géneros incluidos en: (i) *Streptococcus*, *Veillonella*, *Aerococcus* y *Leuconostoc* (Firmicutes), (ii) *Lutimonas* y *Polaribacter* (Bacteroidetes); (iii) *Loktanella* (α -Proteobacteria), y (iv) *Photobacterium* (γ -Proteobacteria). Los géneros *Thalassobius* (α -Proteobacterias), *Delftia* (β -Proteobacterias) y *Fluviicola* (Bacteroidetes) mostraron reducciones significativas en sus abundancias. En contraste, el efecto de estos niveles sobre el intestino posterior fue menor ya que sólo *Burkholderia* (β -Proteobacterias) y *Finegoldia* (Firmicutes), redujeron significativamente sus abundancias, mientras que se incrementó la de *Pseudomonas* (γ -Proteobacterias).

El incremento en la dieta de los niveles de IMMUNOTEC® a 0,30% tuvo un impacto menor en el intestino anterior ya que sólo 4 géneros, *Aggregibacter*, *Ruegeria* y *Dinoroseobacter* (α -Proteobacterias) y *Porphyromonas* (Bacteroidetes) mostraron incrementos significativos de su abundancia, en tanto que *Delftia* (β -Proteobacterias) y *Fluviicola* (Firmicutes) mostraron reducciones significativas de sus abundancias. En el caso del intestino posterior, 5 géneros exhibieron incrementos significativos de sus abundancias, *Dialister* (Firmicutes), *Leucothrix* (γ -Proteobacterias), *Persicirhabdus* y *Verrucomicrobium* (Verrucomicrobia) y *Prevotella* (Bacteroidetes), en tanto que los niveles de *Finegoldia* (Firmicutes) se redujeron significativamente.

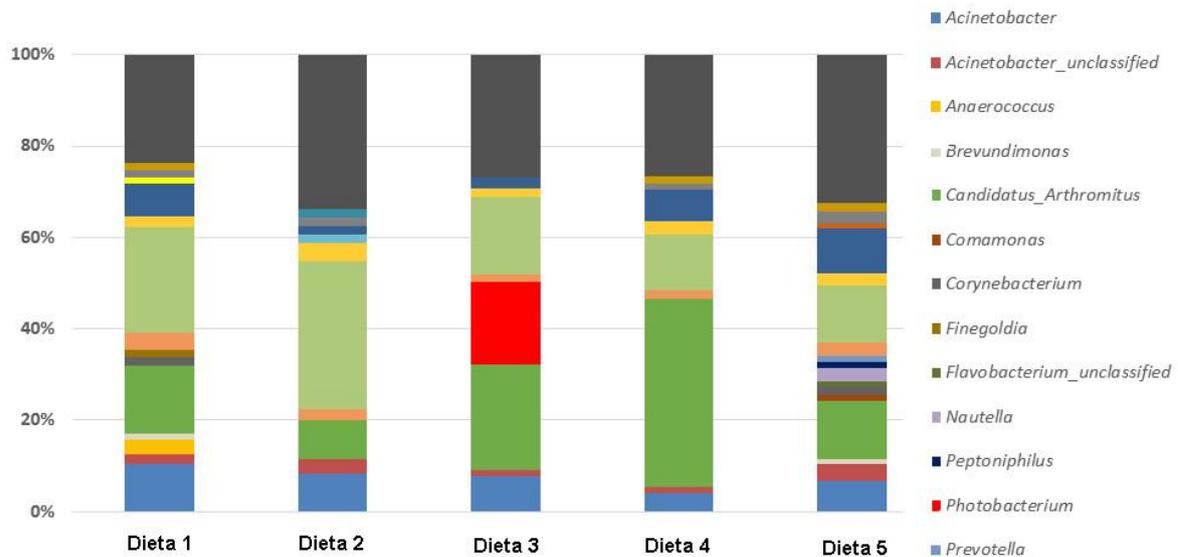


Figura 93. Composición de la microbiota del intestino posterior a nivel de género de especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC® y 1,1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2,2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

La suplementación de la dieta con la levadura *D. hansenii* mostró un menor impacto que en el caso del aditivo inmunoestimulante (IMMUNOTEC®), ya que en el intestino anterior cuando los niveles de suplementación fueron del 1,1% sólo las abundancias de géneros tales como *Prevotella* (Bacteroidetes) y *Marinomonas* (γ -Proteobacterias) se incrementaron, en tanto que *Dialister* (Firmicutes) se redujeron, en tanto que con 2,2% se redujeron los niveles de *Delftia* y también de *Dialister*. Por su parte, el efecto sobre el intestino posterior implicó según los niveles aplicados, reducciones de *Finigoldia* y *Brevundimonas* (α -Proteobacterias) e incrementos de *Ruegeria*, *Lactococcus* (Firmicutes), *Methylobacterium* (α -Proteobacterias), *Rubrobacter* (Actinobacteria) y *Photobacterium* (γ -Proteobacteria) (Figura 93).

El análisis a través del PICRUST permitió predecir las capacidades funcionales de las comunidades microbianas del intestino en base al tratamiento aplicado. El análisis del metagenoma a nivel de KEGG 1 se pudo comprobar que independientemente de la sección intestinal y del tratamiento aplicado, las categorías funcionales más frecuentes fueron aquellas relacionadas con las funciones de metabolismo y las de procesamiento de información genética y ambiental (Figura 94).

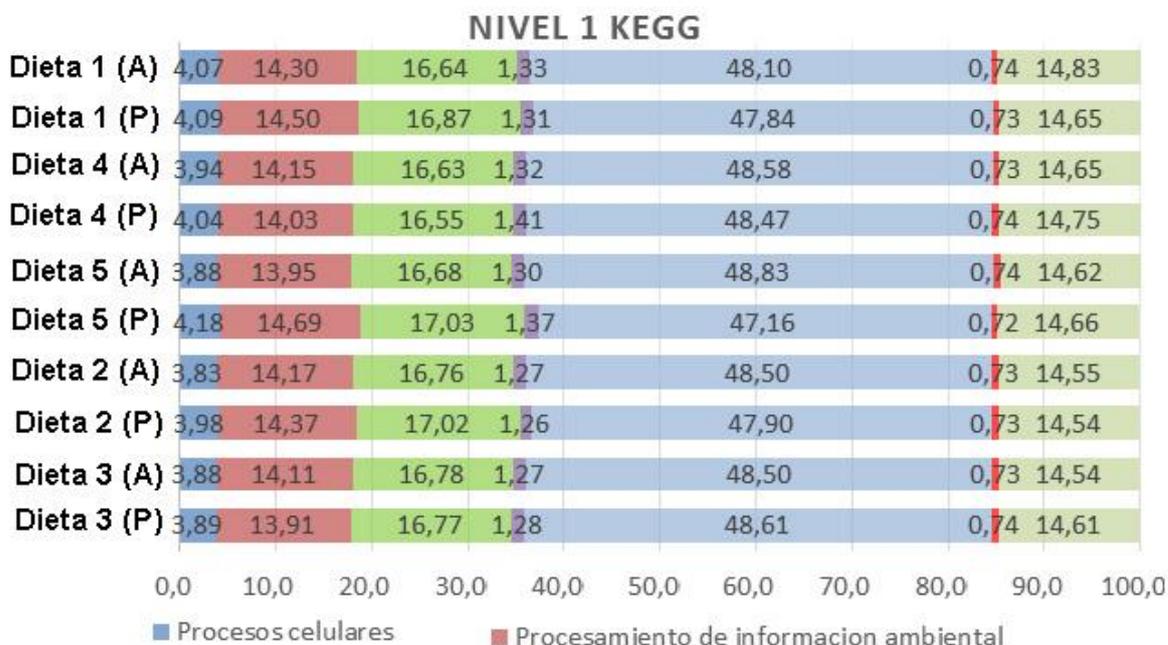


Figura 94. Comparación de la abundancia relativa de los perfiles de las funciones generadas a partir del PICRUST a nivel KEGG 1 de la microbiota de intestino anterior (A) y posterior (P) de los especímenes de *Sparus aurata* alimentados con la dieta control (Dieta 1), y otras suplementadas con 0,15% (Dieta 2) y 0,30% (Dieta 3) de IMMUNOTEC® y 1,1% de levadura *D. hansenii* (Dieta 4) y 2,2% de levadura *D. hansenii* (Dieta 5).

Sin embargo, cuando el análisis funcional se llevó a nivel KEGG 2, sólo se apreciaron diferencias significativas en el caso del intestino anterior (Figura 95) y posterior (Figura 96) de los peces que recibieron las dietas suplementadas con el IMMUNOTEC®. De este modo el PICRUST predijo que, en el intestino anterior, la metagenómica de la dieta suplementada con IMMUNOTEC® al 0,15% y 0,30% podría asociarse con incrementos significativos ($P < 0,05$) en el metabolismo de carbohidratos y nucleótidos, respectivamente. Por otra parte, en el caso del intestino posterior, se pudo ver que la metagenómica detectada en los ejemplares que recibieron la dieta suplementada con 0,3% podría relacionarse con incrementos significativos ($P < 0,05$) del metabolismo de nucleótidos y de crecimiento y muerte celular, y reducciones ($P < 0,05$) de la funcionalidad de señalización e interacción de moléculas. Estos cambios en la microbiota y procesos biológicos asociados podrían explicar y estar en parte asociados con las diferencias en crecimiento somático encontradas entre tratamientos, especialmente en los grupos alimentados con el IMMUNOTEC®, pues en el caso de la levadura, estos cambios parecen estar más asociados a la presencia de poliamidas producidas por la levadura, tal y como han descrito Tovar-Ramirez et al. (2004, 2010).

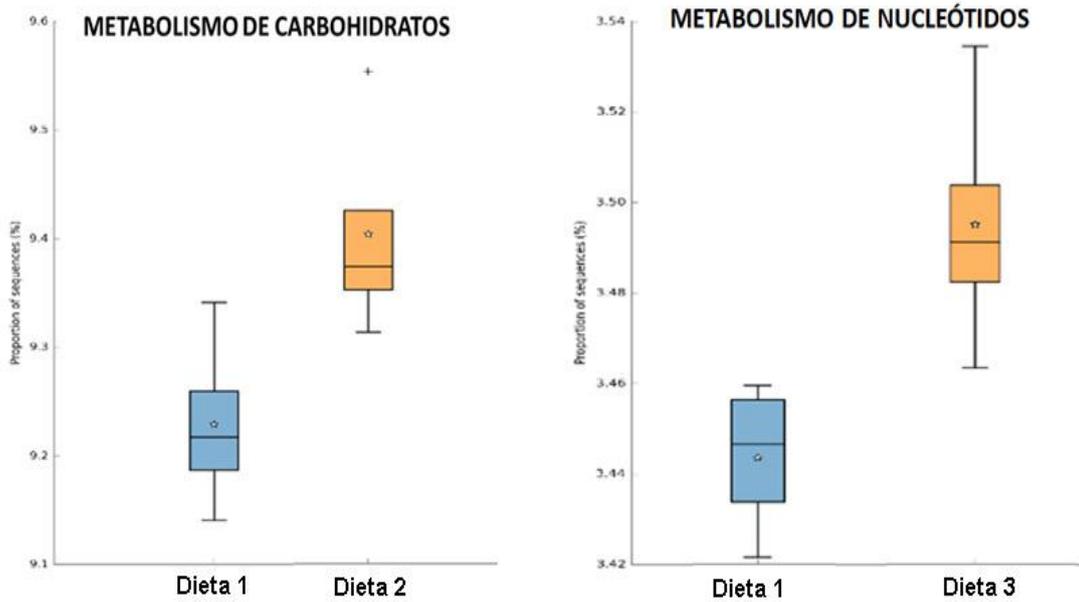


Figura 95. Comparación de la abundancia relativa de los perfiles de las funciones generadas a partir del software PICRUSt de la microbiota del intestino anterior de los juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con las Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%) y Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,30%). Sólo se presentan los resultados para aquellos procesos y grupos experimentales que han mostrado diferencias significativas con la Dieta 1 (control) ($P < 0,05$).

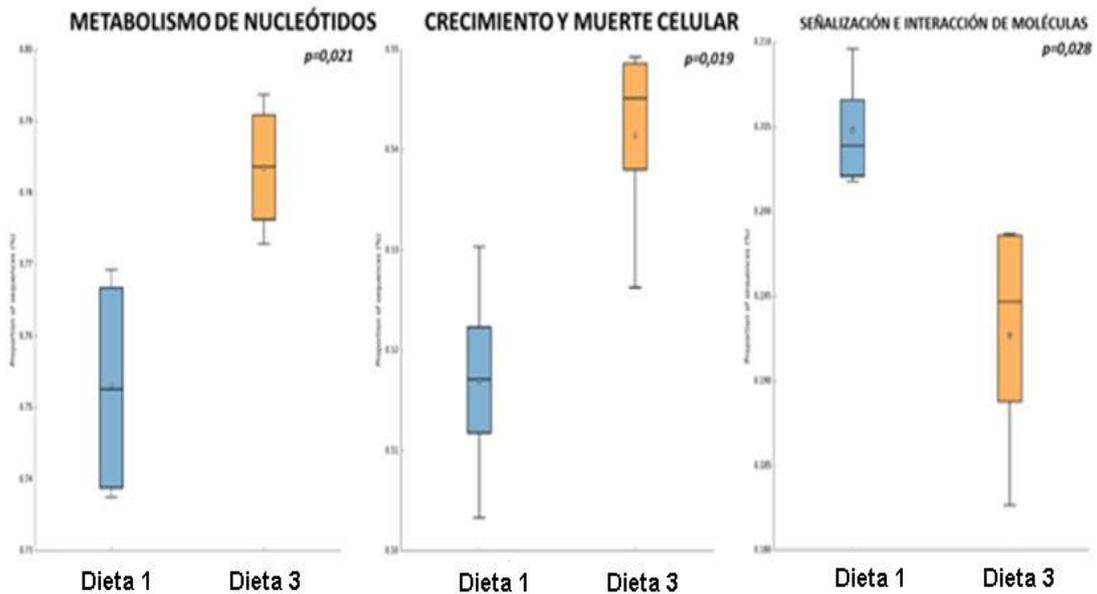


Figura 96. Comparación de la abundancia relativa de los perfiles de las funciones generadas a partir del software PICRUSt a nivel de KEGG 3 de la microbiota del intestino posterior de los juveniles de dorada *Sparus aurata* alimentados con la Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,30%). Sólo se presentan los resultados para aquellos procesos y grupos experimentales que han mostrado diferencias significativas con la Dieta 1 (control) ($P < 0,05$).

En relación al conjunto global de los resultados del análisis de la microbiota de doradas alimentadas con los aditivos evaluados podemos concluir lo siguiente:

En este estudio se ha podido comprobar que los filos más abundantes encontrados en la microbiota intestinal fueron en todos los casos por orden de abundancia Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias. Proteobacterias, Firmicutes y Actinobacterias fueron los informados como mayoritarios por Estruch et al. (2015) en la microbiota intestinal de *Sparus aurata*, si bien en este caso fue el filo Actinobacteria el que resultó ser el más abundante a lo largo del tracto gastrointestinal.

Por otra parte, los géneros dominantes en la microbiota intestinal en la dorada, independientemente de la dieta o sección intestinal analizada, fueron *Pseudoalteromonas*, *Acinetobacter* y *Shewanella*. Tanto *Pseudoalteromonas* como *Acinetobacter* han sido previamente descritos como grupos predominantes en la microbiota de larvas de esta especie (Califano et al., 2017; Serra et al., 2018). El porcentaje de géneros con una presencia <1% fue desde el 20% hasta casi el 40%, dependiendo del tratamiento y la sección intestinal. Este resultado coincide con recientes estudios realizados con ejemplares de esta especie de unos 60 g de peso (Rimoldi et al., 2018), lo que indica todavía que se ha de realizar un gran esfuerzo para completar la caracterización de la microbiota en esta especie, especialmente en géneros poco abundantes.

Por lo que respecta a los resultados derivados del análisis de la microbiota intestinal de los peces que recibieron los tratamientos con las dietas funcionales, hay que decir que *D. hansenii* es una levadura que puede ser empleada como inmunoestimulante en acuicultura (Reyes-Becerril et al., 2008; Medina-Córdova et al., 2018), pero para la cual también se ha descrito un efecto modulador de la microbiota intestinal (Tapia-Paniagua et al., 2011). Así, en doradas alimentadas con una dieta suplementada con *D. hansenii* durante 4 semanas, se pudo observar la existencia de una reducción de la diversidad (Reyes-Becerril et al., 2012). Sin embargo, en contraste en nuestro estudio no ha habido variaciones significativas de estos parámetros. A nivel del efecto de esta levadura sobre la composición de la microbiota, se ha descrito en pez cebrá un incremento en la abundancia de ciertas especies principalmente incluidas en Proteobacterias y Firmicutes, como *Lactococcus* (Siriappagounder et al., 2018). *Debaromyces hansenii* tiene una alta capacidad para producir aminopeptidasas y lipasas, actividades que podrían ser uno de los factores implicados en esta capacidad moduladora de la microbiota (Raggi et al., 2014). Nuestros resultados han mostrado que esta levadura administrada al 1,1% fue capaz de inducir incrementos significativos en el caso de las clases Bacteroidia y Planctomycetia, en el intestino anterior y posterior respectivamente.

Pero fue el intestino anterior de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con 0,15% de IMMUNOTEC® donde se apreciaron el mayor número de diferencias en lo referido a la composición taxonómica a nivel de géneros. IMMUNOTEC® lleva en su composición entre otros componentes, mano-monoligosacáridos (MOS), y β -glucanos, productos que han mostrado capacidad para modular la microbiota intestinal de animales. En el caso de los MOS, en nuestro caso no se ha observado que la inclusión del compuesto haya causado una variación significativa en la alfa-diversidad de las comunidades microbianas estudiadas. Estos resultados contrastan con los informados por otros autores que han informado que la suplementación de MOS indujo un incremento de la riqueza de especies y de la diversidad en la microbiota intestinal de doradas (Dimitroglou et al., 2010). De cualquier forma, es interesante destacar que en el estudio realizado por estos autores se empleó la DGGE como metodología para evaluar la estructura y

composición de la microbiota intestinal. Esta técnica no detecta como bandas aquellos grupos cuya abundancia sea inferior al 1%. En nuestro estudio hemos aplicado la NGS, lo que nos ha permitido comprobar que el porcentaje de géneros con una abundancia menor del 1% fue en todos los casos superiores al 20%, lo que podría explicar el contraste de los resultados de Dimitroglou et al. (2010) y los nuestros. De cualquier forma, Gonçalves y Gallardo-Escárate (2017) analizaron por NGS la microbiota intestinal de ejemplares de trucha a los que se alimentó con una dieta suplementada con un 0,6% de MOS durante 30 días, y pudieron observar incrementos de la riqueza y diversidad. Además, detectaron una disminución de los niveles de Proteobacteria e incrementos de Firmicutes y Bacteroidetes respecto a la dieta control. En nuestro estudio, no hemos constatado variaciones significativas entre filos y clases, independientemente de la dieta analizada; sin embargo, cuando el análisis taxonómico se realizó a nivel de género si se pudieron observar algunas diferencias significativas respecto a la abundancia. Curiosamente, la suplementación de la dieta con IMMUNOTEC® incrementó las β -Proteobacteria y Bacilli.

En otros trabajos se ha podido comprobar que, en el intestino anterior de humanos, *Streptococcus* convierte los azúcares en lactato (Bodijink et al., 2007; Zoetendal et al., 2012), el cual a su vez puede ser empleado por *Veillonella* como fuente de carbono y convertirlo en acetato y propionato. *Leuconostoc* también disminuye con lo cual las LAB disminuyen y de esta forma los niveles de ácido láctico (Hugenholtz et al., 2013). El mayor impacto de IMMUNOTEC® se observa a nivel del intestino anterior de los peces que recibieron la dieta suplementada con el 0,15% de este compuesto. Cuando los niveles fueron del 0,30% se vio efecto sobre el intestino anterior y posterior.

La adición de IMMUNOTEC® a la dieta, si bien no produjo cambios significativos en los niveles de Firmicutes, al analizar a nivel de género, se pudo comprobar que sí existe diferencias significativas en las abundancias de géneros tales como *Streptococcus*, *Veillonella* y *Aerococcus*, mientras a 0,30% parece que el efecto sólo tiene efecto sobre Firmicutes en intestino posterior con incrementos y reducciones significativas de las abundancias de *Dialister* y *Fingoldia*, respectivamente.

En estudios realizados con peces se ha descrito que la suplementación de la dieta con 0,6% de MOS indujo un incremento significativo de los recuentos de LAB (Aker et al., 2016). En contraste, en nuestro estudio se han visto reducciones significativas de las abundancias de Firmicutes, tales como *Veillonella* y *Aerococcus*, y las bacterias ácido lácticas *Leuconostoc* y *Streptococcus*. Estos últimos géneros contienen cepas que han sido descritas como probióticas.

En el intestino posterior de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con IMMUNOTEC® 0,30% existe un incremento significativo de dos géneros del filo *Verrucomicrobia*. Wang et al. (2018) informaron de reducciones de las abundancias de Varrucomicrobios en ratones alimentados con una dieta alta en grasas y suplementada con MOS, mientras que el índice Firmicutes/Bacteroidetes se incrementó, resultados que no coincide con lo observado en nuestro estudio. La suplementación de la dieta con 0,3% IMMUNOTEC® causó un incremento significativo del género *Prevotella* en el intestino posterior de los ejemplares, resultado en concordancia con lo observado en ratones por Wang et al. (2018).

Por lo que respecta a los β -glucanos se ha informado que pueden tener un cierto efecto prebiótico (Chaikliang et al., 2015). En este contexto, su suplementación en la dieta de *Scophthalmus maximus* causó cambios en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal

(Miest et al., 2016). En el caso de *Cyprinus carpio* existen datos del efecto de los β -glucanos, que informaron de la reducción de la riqueza y de los niveles de *Lactococcus* (Kühlwein et al., 2013), mientras Jung-Schroers et al. (2016) informaron de un incremento de la diversidad. Estos datos contrastan con los obtenidos en nuestro estudio, donde no se han observado diferencias significativas en lo que se refiere a estos parámetros entre ninguno de los tratamientos estudiados. Por otra parte, se ha descrito la capacidad de los β -glucanos para reducir los niveles de *Vibrio* presentes en el caso de *Solea senegalensis* (Carballo et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio este efecto no se ha observado. También existen resultados que apuntan que este producto es capaz de incrementar las abundancias de los Bacteroidetes, especialmente del género *Prevotella*, en tanto que disminuyen los de Firmicutes (Wang et al., 2016).

Finalmente mencionar que el análisis mediante el software PICRUSt permitió realizar una aproximación predictiva a las capacidades funcionales de las comunidades microbianas del intestino en base al tratamiento aplicado. De esta forma, se demostró que, las categorías funcionales más frecuentes fueron aquellas relacionadas con las funciones de metabolismo y las de procesamiento de información genética y ambiental, aunque sólo se observaron diferencias significativas en el caso del intestino anterior y posterior de los peces que recibieron las dietas funcionales suplementadas con IMMUNOTEC® y más concretamente con incrementos en genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y nucleótidos en el intestino anterior de las dietas suplementadas con 0,15% y 0,30%, respectivamente, mientras que en el caso de la metagenómica del intestino posterior de los ejemplares que recibieron la dieta suplementada con 0,3% se relacionó con incrementos significativos del metabolismo de nucleótidos y de crecimiento y muerte celular, en tanto que fue con reducciones de la funcionalidad de señalización e interacción de moléculas.

En resumen, se ha podido demostrar que: (i) las dietas funcionales ensayadas no indujeron cambios en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal de dorada; (ii) si bien la composición a nivel de grandes grupos taxonómicos no se diferenció significativamente de la de los ejemplares control, si se detectaron diferencias significativas a nivel de género, y especialmente de aquellos cuya abundancia fue inferior al 1%, (iii) las dietas funcionales que incluyeron el aditivo IMMUNOTEC®, demostraron tener un mayor efecto sobre la composición de la microbiota que la levadura *Debaromyces hansenii*; (iv) en base a la metagenómica de las dietas suplementadas con el IMMUNOTEC® se puede predecir un efecto de esta sobre el metabolismo de los carbohidratos, nucleótidos, así como en el crecimiento y muerte celular y la señalización e interacción de moléculas; (v) estos potenciales cambios en la funcionalidad fueron dependientes de los niveles de IMMUNOTEC®, así como de la sección intestinal analizada.

Histología de tejidos diana

No se observaron diferencias significativas entre dietas en relación a las características histoquímicas de las mucinas producidas por las células mucosas, independientemente de las características propias de cada tejido considerado (piel, branquia e intestino). Los resultados para cada uno de los tejidos analizados se muestran en la Tabla 28. Se observaron diferencias en la cuantificación y composición de mucinas glucoproteicas (neutras, y/o ácidas), y en la riqueza en residuos glucídicos (ej., ácido siálico, etc) con mayor presencia en la piel de mucinas neutras. Sin embargo, en las mucosas intestinales predominan las glucoproteínas sulfatadas, y en menor grado las neutras y carboxiladas.

Tabla 28. Diferencias en la composición glicoproteica de las células mucosas de la piel (epidermis), branquias e intestino en dorada. Los valores corresponden a todos los grupos experimentales al no encontrarse diferencias estadísticas en las propiedades histoquímicas de las mucinas entre dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

	Piel	Branquias	Intestino
Glicoproteínas neutras (tinción PAS)	2 - 3	1 - 3	1 - 3
Glicoproteínas carboxiladas (tinción AA pH 2,5)	0 - 1	0 - 1	1 - 3
Glicoproteínas sulfatadas poco ionizadas (tinción AA pH 1)	0 - 1	0 - 1	2 - 3
Glicoproteínas sulfatadas muy ionizadas (AA pH 0,5)	0	0	2 - 3
B-D-GlcNAc/Neu5Ac (WGA)	3	3	2 - 3
α-β-Gal/α-β-GalNAc (SBA)	0 - 2	1 - 3	1 - 3

Como indican los resultados de la Figura 97, las dietas evaluadas en esta tarea no promovieron al desarrollo del número de células mucosas en el intestino, al no encontrarse diferencias significativas entre los grupos experimentales ($P > 0,05$). Es importante también destacar que la inclusión del inmunoestimulante comercial y la levadura tampoco tuvieron un efecto negativo sobre la mucosa intestinal, ya que la densidad de células mucosas en los peces alimentados con las Dietas 2-5 fue similar a la del grupo control.

En relación a la histoquímica de lectinas, los valores comparativos a nivel de mucosa intestinal para juveniles de dorada alimentados con las dietas experimentales se encuentran presentados en la Tabla 29. El análisis histoquímico evidencia una mayor reactividad frente a determinadas lectinas (ConA y/o SNA) en los peces alimentados con IMMUNOTEC® y la levadura (*Debaromyces hansenii*), posiblemente debido a la adición de un polisacárido rico en Manosa/Glucosa en las mucinas de las células mucosas del intestino. La mayoría de las células mucosas presentan alta reactividad frente a la lectina WGA (N-acetilglucosamina y ácido siálico/NANA).

Tabla 29. Histoquímica de lectinas en células mucosas del intestino de ejemplares de *S. aurata* alimentados con las distintas dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

Dieta	Lectinas			
	Con A	WGA	SBA	SNA
Dieta 1 (control)	0	0 - 3	0 - 3	0 - 3
Dieta 2 (0,15% IMMUNOTEC®)	0	0 - 3	0 - 3	0 - 2
Dieta 3 (0,30 % IMMUNOTEC®)	0 - 1	0 - 3	0 - 3	0 - 2
Dieta 4 (1,1 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	0 - 3	0 - 3	0 - 2
Dieta 5 (2,2 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	0 - 3	0 - 3	0 - 2

Tabla 30. Histoquímica de lectinas en células mucosas de la piel (epidermis) de ejemplares de *S. aurata* alimentados con las distintas dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

Dieta	Lectinas			
	Con A	WGA	SBA	SNA
Dieta 1 (control)	0 - 1	3	1 - 2	0 - 1
Dieta 2 (0,15% IMMUNOTEC®)	0 - 1	3	1 - 2	0 - 1
Dieta 3 (0,30 % IMMUNOTEC®)	0 - 1	3	1 - 2	0 - 1
Dieta 4 (1,1 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	3	1 - 2	0 - 1
Dieta 5 (2,2 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	3	1 - 2	0 - 1

Tal y como se observa en la siguiente figura y se ha mencionado anteriormente, la adición del aditivo con propiedades inmunoestimulantes y la levadura no indujo cambios a nivel del intestino en el número de células mucosas (Figura 97), resultados que parecen indicar la ausencia de una estimulación a nivel local por parte de las dietas evaluadas.

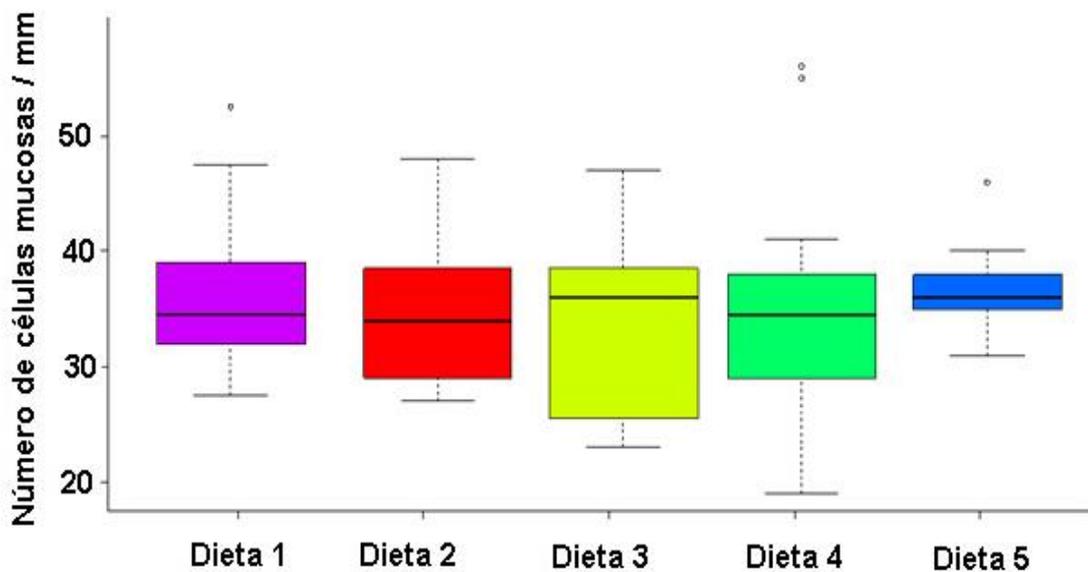


Figura 97. Representación de tipo Box-Plot de la densidad de células mucosas en el epitelio intestinal de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Dieta 1 (control); Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%); Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%); Dieta 4 (levadura *D. hansenii* 1,1%) y Dieta 5 (levadura *D. hansenii* 2,2%).

Tabla 31. Histoquímica de lectinas en células mucosas del epitelio branquial en ejemplares de *S. aurata* alimentados con las distintas dietas. Intensidad de reacción: 0, negativa; 1, débil; 2, moderada; 3, intensa.

Dieta	Lectinas			
	Con A	WGA	SBA	SNA
Dieta 1 (control)	0 - 1	3	1 - 3	0 - 2
Dieta 2 (0,15% IMMUNOTEC®)	0 - 1	3	1 - 3	0 - 2
Dieta 3 (0,30 % IMMUNOTEC®)	0 - 1	3	1 - 3	0 - 2
Dieta 4 (1,1 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	3	1 - 3	0 - 2
Dieta 5 (2,2 % <i>Debaromyces hansenii</i>)	0 - 1	3	1 - 3	0 - 2

En relación a la histoquímica de lectinas, en las células mucosas branquiales, se observa una reactividad negativa o débil frente a la ConA (residuos de manosa>>> glucosa). La mayoría de las células mucosas presentan alta reactividad frente a la lectina WGA (N-acetilglucosamina y ácido siálico/NANA). Con la lectina SBA (galactosa y N-acetil galactosamina) la reacción fue variable en función de los grupos analizados, así como también de los animales (variabilidad intrapoblacional). La reactividad con la lectina SNA (ácido siálico) fue negativa en la mayoría de las células mucosas y solo escasas y aisladas células mostraron reactividad frente a SNA.

A partir de los datos histológicos e histoquímicos obtenidos podemos concluir que la dieta con el inmunoestimulante comercial (IMMUNOTEC®) no indujo cambios significativos en el número de células mucosas intestinales, epidérmicas o branquiales, lo que sugiere que este aditivo tiene un papel inmunomodulador de tipo sistémico, más que un efecto local a nivel de las mucosas. Estos resultados están en parte de acuerdo con el análisis transcriptómico realizado en dichos tejidos (ver siguiente sección). Sin embargo, a partir del análisis histoquímico de las lectinas se evidencia una mayor reactividad frente a determinadas lectinas (ConA y/o SNA) que identifican residuos de manosa/glucosa y ácido siálico (positivo al Azul Alcian pH: 2,5) con IMMUNOTEC® y la levadura (*D. hansenii*), posiblemente debido a la adición del polisacárido rico en Manosa/Glucosa, que en el caso del aditivo inmunoestimulador podría venir dado por la presencia de MOS en la formulación de IMMUNOTEC®, mientras que en el caso de la levadura podría ser debido a la acción de la misma o cambios observados en la composición y diversidad de la microbiota intestinal.

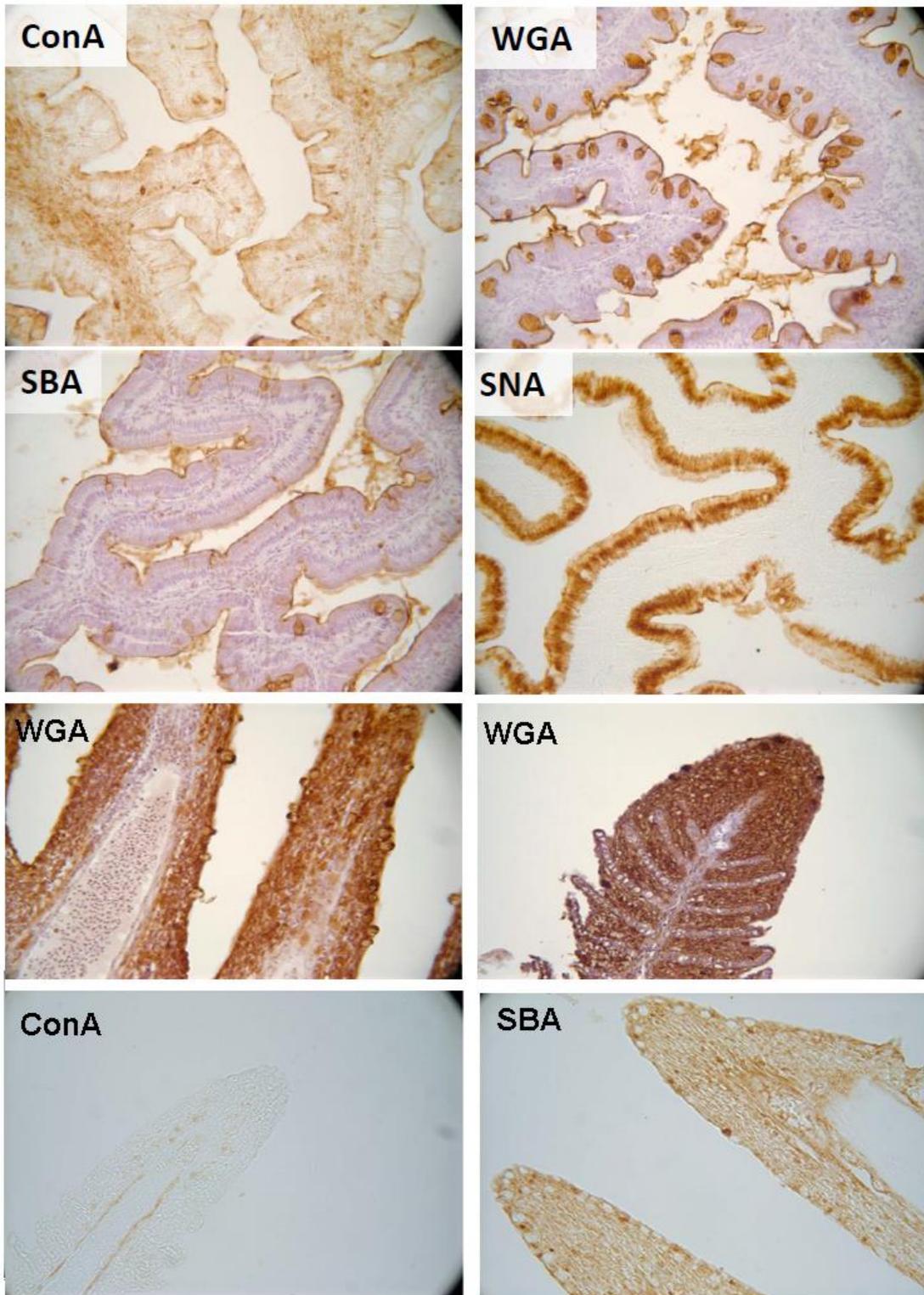


Figura 98. Algunos ejemplos de la histoquímica de lectinas realizada en tejido branquial e intestino de dorada (ver detalles en Tarea A2.1).

Análisis transcriptómico

Para el análisis transcriptómico de las dietas evaluadas en comparación con la dieta control (Dieta 1) se analizaron los siguientes tejidos: piel, intestino, riñón cefálico e hígado) de los peces alimentados con las Dietas 2 (IMMUNOTEC®) y 4 (levadura *D. hansenii*).

A título informativo y a modo de ejemplo, en la Figura 99 se muestran los resultados comparativos de los genes diferencialmente expresados entre las tres dietas analizadas (Dietas 1, 2 y 4) para la piel. En el diagrama de Venn se puede observar que la dieta de la levadura *D. hansenii* es la que produce un mayor número de genes que están modulando su expresión de forma diferente respecto la dieta control, siendo la dieta IMMUNOTEC® la que produce un menor número de genes modulados respecto la Dieta 1.

Es interesante destacar que de estos genes que se están modulando en las dietas funcionales, hay 80 genes comunes que se modulan en ambas dietas funcionales respecto la dieta control. Estos resultados indican que cada uno de los aditivos evaluados tiene una función distintita dadas sus características particulares y que, por lo tanto, los resultados transcriptómicos que se presentan a continuación son para cada uno de los tejidos analizados, pero comparados exclusivamente entre la Dieta 1 y la Dieta 2, y la Dieta 1 y la Dieta 4.

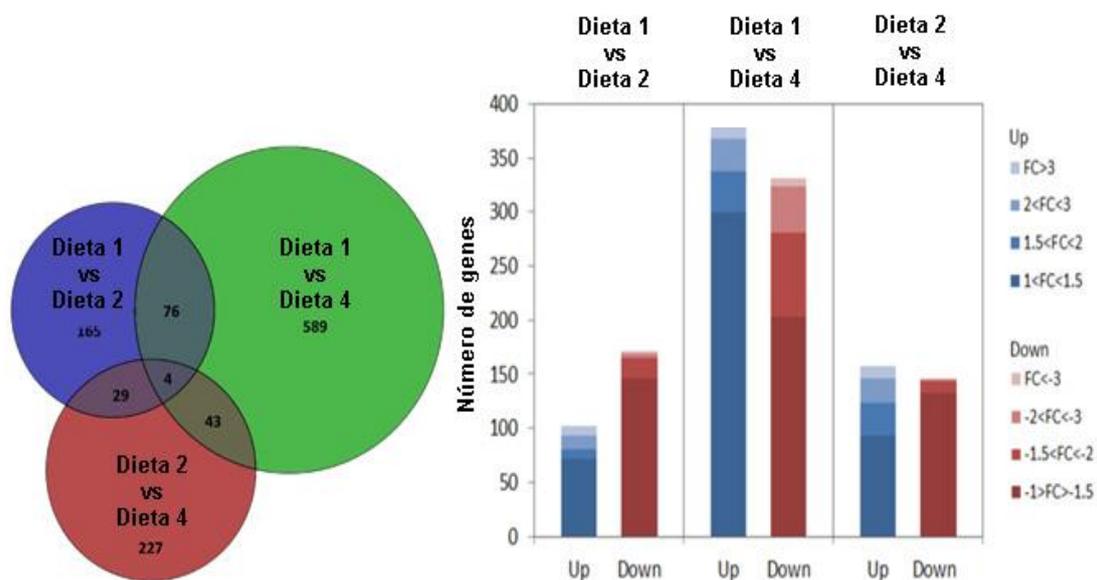


Figura 99. Diagrama de Venn donde se observan los genes donde la modulación transcriptómica es exclusiva o compartida en dos o más grupos de comparaciones (parte izquierda). En el lado derecho está la representación del número de genes sobregulados (up) y subregulados (down) en las comparaciones entre dietas, pudiéndose observar que entre la Dieta 1 y la Dieta 4 es donde se observan mayores diferencias de regulación de genes diferencial.

- *Estudio comparativo entre la dieta control (Dieta 1) y la Dieta 2 (IMMUNOTEC®)*

Las doradas alimentadas con la Dieta 2 muestran en **intestino** la modulación de 104 genes diferencialmente expresados (GDE) tal y como se representa en la Figura 100, de los cuales 72 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (60 GDE $1.0 < x < 1.5$; 6 GDE $1.5 < x < 2.0$; 3 GDE $2.0 < x < 2.5$; 3 GDE $3.0 < x < 5.0$). Por otra parte, 32 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (27 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 3 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 2 GDE $-2.0 > x > -2.5$).

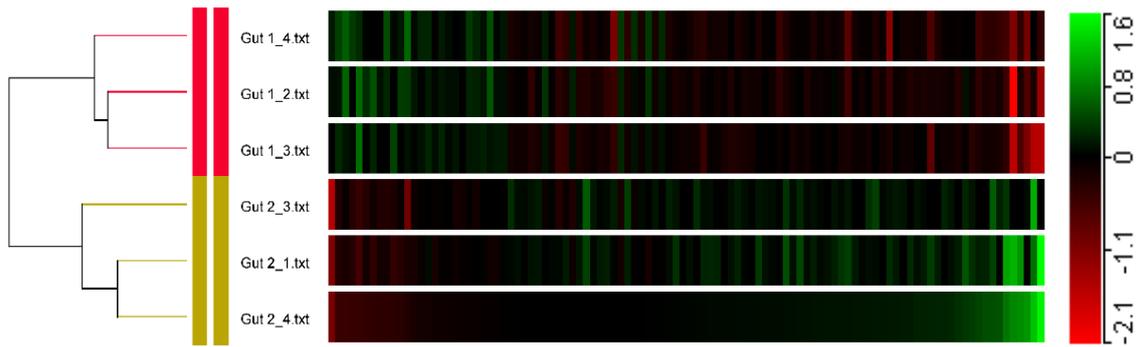


Figura 100. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en intestino de peces alimentados con la Dieta 2 (IMMUNOTEC®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: Gut1 (grupo control); Gut2 (peces alimentados con la Dieta 2).

En el caso de la **piel** (Figura 101), la modulación de 274 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 102 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (72 GDE $1.0 < x < 1.5$; 9 GDE $1.5 < x < 2.0$; 12 GDE $2.0 < x < 3.0$; 5 GDE $3.0 < x < 4.0$; 4 GDE $4.0 < x < 8.0$). Por otra parte, 172 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (146 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 19 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 4 GDE $-2.0 > x > -3.0$; 3 GDE $-3.0 > x > -11.5$).

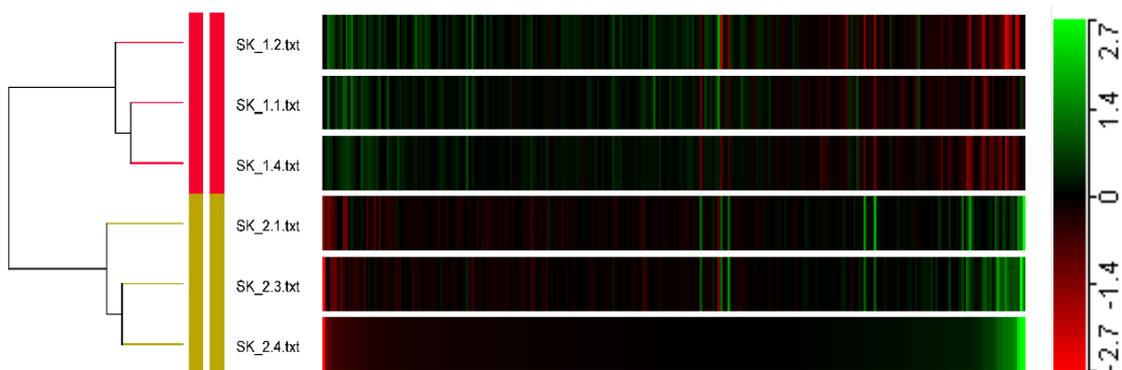


Figura 101. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en piel de peces alimentados con la Dieta 2 (IMMUNOTEC®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: Sk_1 (grupo control); SK_2 (peces alimentados con la Dieta 2).

Las doradas alimentadas con la Dieta 2 muestran en **riñón cefálico** la modulación de 636 genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 102), de los cuales 196 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (148 GDE $1.0 < x < 1.5$; 29 GDE $1.5 < x < 2.0$; 12 GDE $2.0 < x < 2.5$; 3 GDE $2.5 < x < 3.0$; 2 GDE $3.0 < x < 4.0$; 2 GDE $4.0 < x < 6.0$). Por otra parte, 440 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (209 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 159 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 49 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 16 GDE $-2.5 > x > -3.0$; 6 GDE $-3.0 > x > -4.0$; 1 GDE $x < -7.5$).

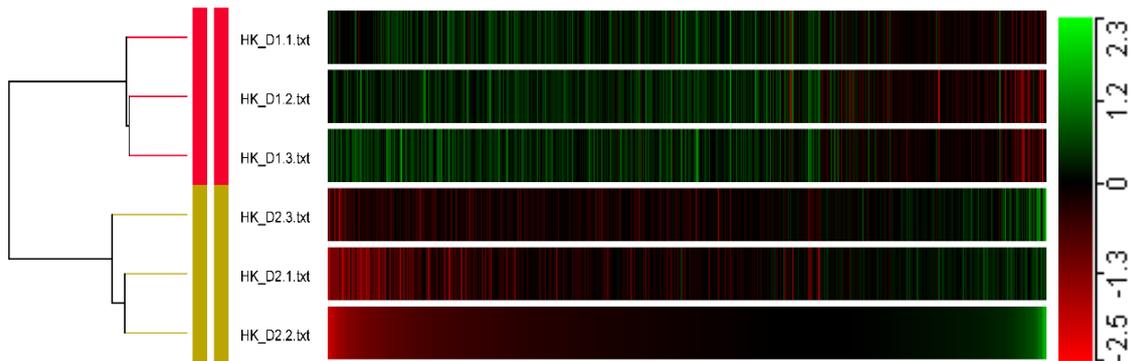


Figura 102. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en el riñón cefálico de peces alimentados con la Dieta 2 (IMMUNOTEC®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: HK_D1 (grupo control); HK_D2 (peces alimentados con la Dieta 2).

Las doradas alimentadas con la Dieta 2 muestran en **hígado** la modulación de 812 genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 103), de los cuales 528 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (189 GDE $1.0 < x < 1.5$; 254 GDE $1.5 < x < 2.0$; 62 GDE $2.0 < x < 2.5$; 17 GDE $2.5 < x < 3.0$; 5 GDE $3.0 < x < 4.0$; 1 GDE $x < 7.0$). Por otra parte, 284 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (232 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 43 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 6 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 3 GDE $-2.5 > x > -6.0$).

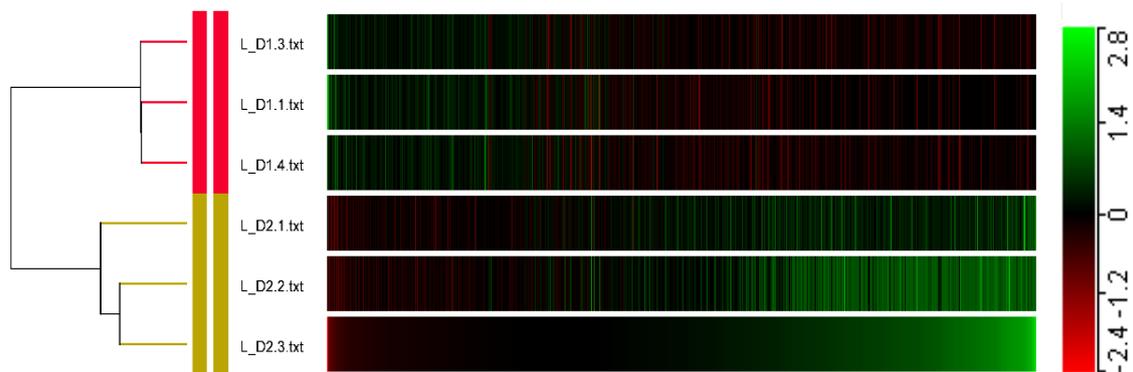


Figura 103. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en el hígado de peces alimentados con la Dieta 2 (IMMUNOTEC®). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: L_D1 (grupo control); L_D2 (peces alimentados con la Dieta 2).

La **respuesta fisiológica** de los tejidos asociados a mucosas en peces alimentados la Dieta 2 se muestra como sigue: al analizar el grado de interacción entre el total de GDE para el **intestino**, no se observaron procesos biológicos representados (Figura 104).

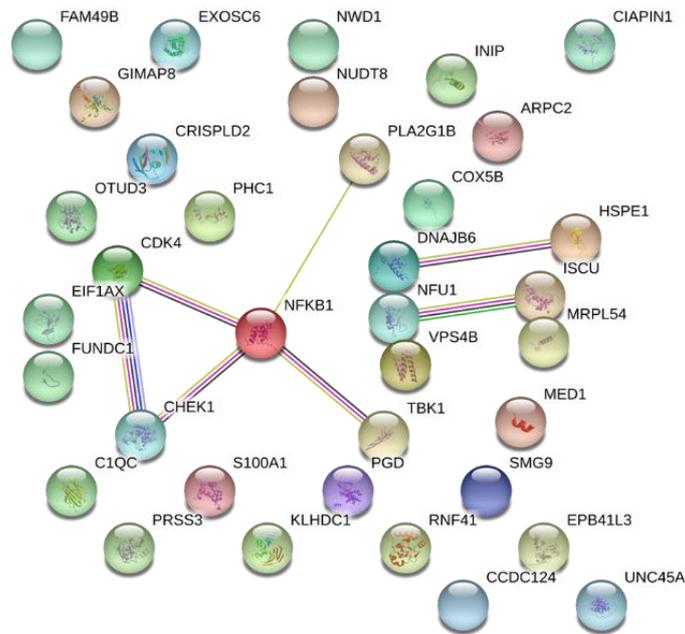


Figura 104. Red interacción de los genes diferencialmente sobre-expresados en el intestino de doradas alimentadas con IMMUNOTEC 0.5. Los colores de cada gene sobre-expresado es azaroso.

En el caso de la **piel**, se observa una reducida red de interacción, aunque bastante heterogénea desde el punto de vista funcional. Así, se registran una serie de procesos incluidos como de expresión génica, traducción, biogénesis, metabolismo asociado a proteínas, transporte de proteínas y localización de proteínas en membrana (Figura 105). Esto sugiere que el IMMUNOTEC® estaría favoreciendo procesos asociados a síntesis de proteínas, los cuales con nuestra herramienta de análisis mediante interactomas muestran la presencia de procesos transversales desde la transcripción hasta la localización de la proteína.

En el caso del **riñón cefálico**, y a pesar de la gran cantidad de genes diferencialmente expresados, en la red de interacción para los genes sobre-expresados sólo se observan procesos asociados a *protein binding* y actividad quimioattractante, lo que sugiere que el riñón cefálico podría estar relacionado a procesos inmunológicos (Figura 106). En el caso de los genes sub-expresados, no se observó una interacción entre las entidades representadas (Figura 107).

En el caso de la **piel**, para los genes sobre-expresados se observan una serie de procesos biológicos incluidos la regulación de la expresión génica, traducción, biosíntesis ribosomal, transporte de proteínas, y localización de proteínas a membrana (Figura 108). Importantemente, en el caso de los genes sub-expresados se observa la regulación de procesos similares a aquellos procesos biológicos aparecidos en la sobre-expresión tales como *splicing* y biogénesis ribosomal. Además, otros procesos también se observan una regulación de procesos tales como la activación de leucocitos (Figura 109).

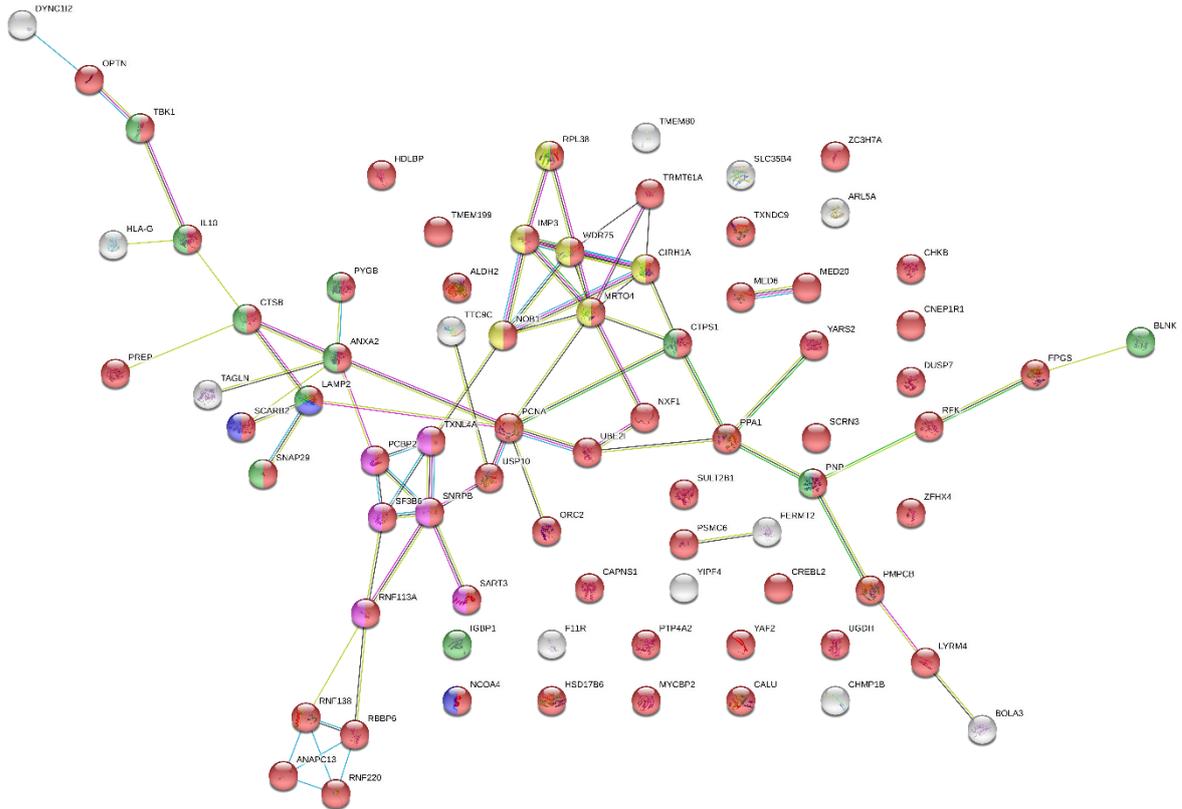


Figura 109. Interactoma para los genes diferencialmente sub-expresados en hígado de doradas alimentadas con la Dieta 2. Se representan los procesos biológicos correspondientes a procesos de splicing (púrpura), biogénesis ribosomal (amarillo), activación leucocitos (verde), y destinación de proteínas al lisosoma (azul).

➤ *Estudio comparativo entre la dieta control (Dieta 1) y la Dieta 4 (levadura Debaromyces hansenii)*

Tal y como se muestra en la Figura 110, las doradas alimentadas con la Dieta 4 muestran en **intestino** la modulación de 164 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 50 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (45 GDE $1.0 < x < 1.5$; 3 GDE $1.5 < x < 2.0$; 2 GDE $2.0 < x < 2.5$). Por otra parte, 114 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (99 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 14 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 1 GDE $-2.0 > x > -2.5$).

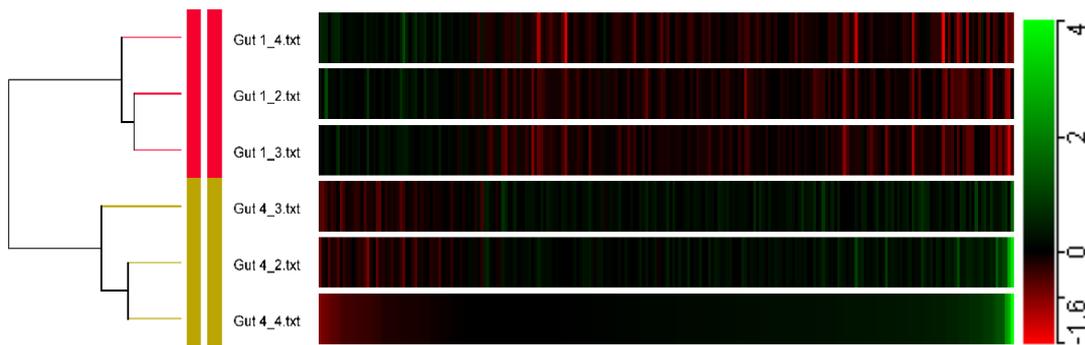


Figura 110. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en intestino de peces alimentados con la Dieta 4 (levadura 1.1%). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: Gut 1 (grupo control); Gut 4 (peces alimentados con la Dieta 4).

En el caso de la **piel**, la modulación de 712 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 380 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (300 GDE $1.0 < x < 1.5$; 37 GDE $1.5 < x < 2.0$; 22 GDE $2.0 < x < 3.0$; 8 GDE $3.0 < x < 4.0$; 4 GDE $4.0 < x < 14.5$). Por otra parte, 332 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (203 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 78 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 31 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 12 GDE $-2.5 > x > -3.0$; 5 GDE $-3.0 > x > -4.0$; 3 GDE $-4.0 > x > -5.5$) (Figura 111).

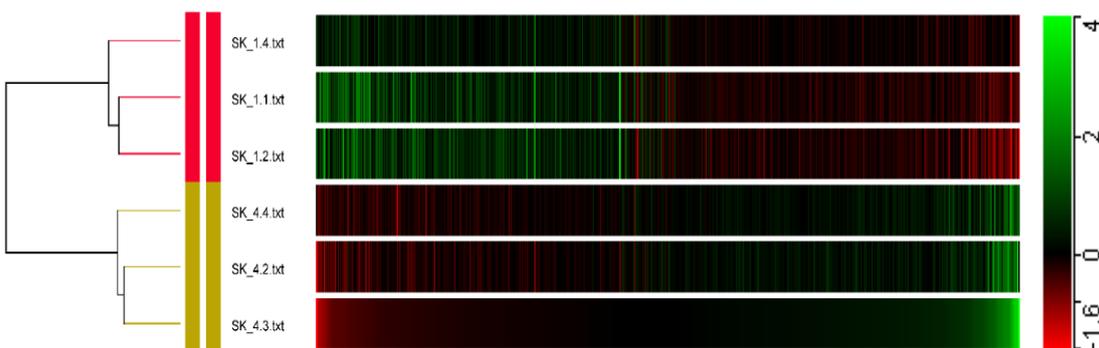


Figura 111. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en piel de peces alimentados con la Dieta 4 (levadura 1.1%). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: Sk_1 (grupo control); SK_4 (peces alimentados con la Dieta 4).

Las doradas alimentadas con la dieta 4 muestran en **riñón cefálico** la modulación de 304 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 138 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (92 GDE $1.0 < x < 1.5$; 31 GDE $1.5 < x < 2.0$; 9 GDE $2.0 < x < 2.5$; 3 GDE $2.5 < x < 3.0$; 2 GDE $3.0 < x < 4.0$; 1 GDE $x < 15.5$). Por otra parte, 166 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (113 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 33 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 15 GDE $-2.0 > x > -2.5$; 4 GDE $-2.5 > x > -3.0$; 1 GDE $x < -3.2$) (Figura 112).

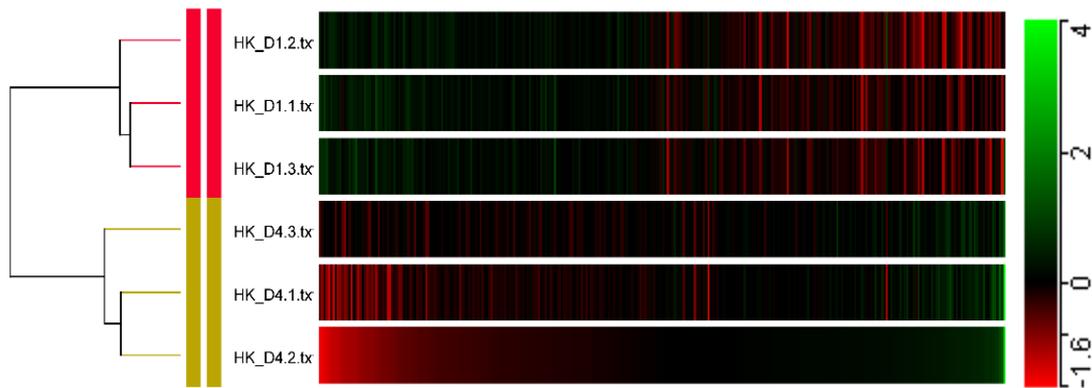


Figura 112. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en el riñón cefálico de peces alimentados con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: HK_D1 (grupo control); HK_D2 (peces alimentados con la Dieta 4).

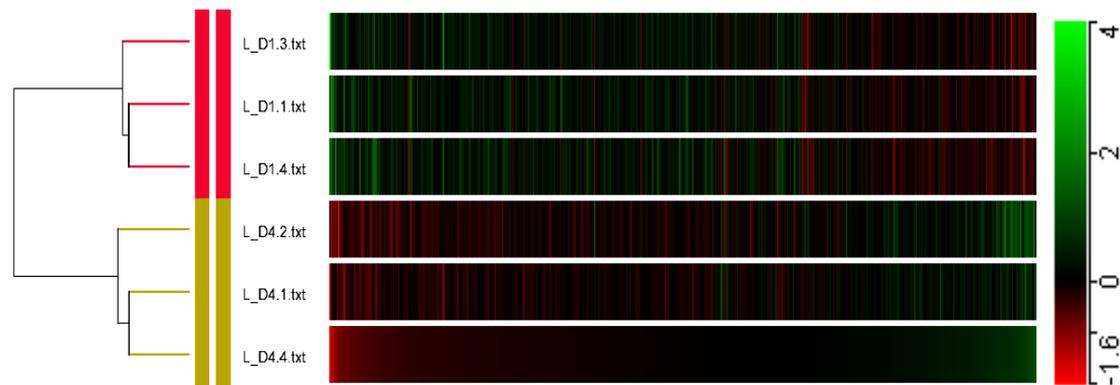


Figura 113. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en el hígado de peces alimentados con la Dieta 4 (levadura 1.1%). Se representan los resultados para tres arrays para cada uno de las dietas: L_D1 (grupo control); L_D4 (peces alimentados con la Dieta 4).

Las doradas alimentadas con la Dieta 4 muestran en **hígado** la modulación de 491 genes diferencialmente expresados (GDE), de los cuales 170 muestran un perfil de sobre-expresión en comparación con la dieta control (115 GDE $1.0 < x < 1.5$; 43 GDE $1.5 < x < 2.0$; 7 GDE $2.0 < x < 2.5$; 5 GDE $2.5 < x < 3.5$). Por otra parte, 321 GDE mostraron un perfil de sub-expresión (235 GDE $-1.0 > x > -1.5$; 70 GDE $-1.5 > x > -2.0$; 14 GDE $-2.0 > x > -3.0$; 2 GDE $-5.0 > x > -8.0$) (Figura 113).

La **respuesta fisiológica** de los tejidos asociados a mucosa en peces alimentados con la Dieta 4 (levadura *D. hansenii* 1,1%) indica que:

En el caso del **intestino**, la red de interacción muestra un escaso número de genes interactuando entre sí. Dentro de los procesos biológicos implicados en dicha red de interacción, se cuenta con la regulación post-transcripcional de la expresión génica y procesos de metabolismo celular (Figura 114)

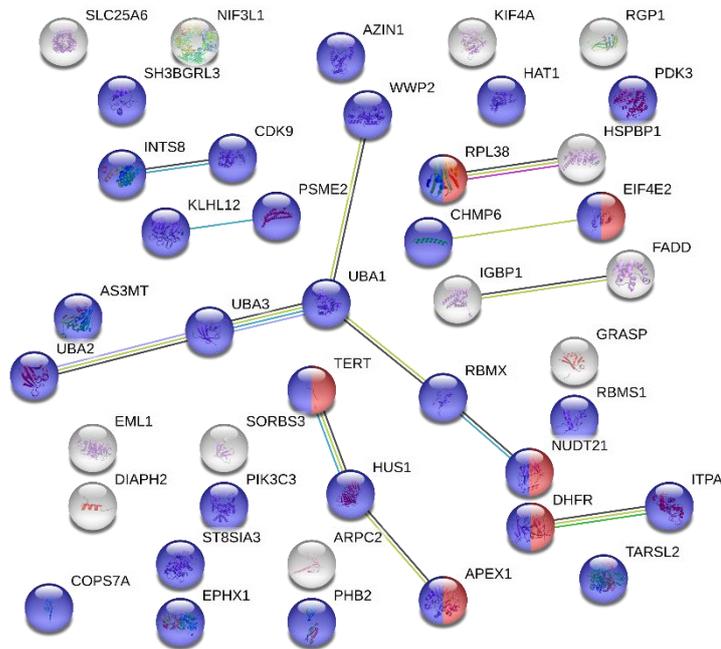


Figura 114. Interactoma de los genes diferencialmente sobre-expresados en el intestino de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). En color, se presentan los genes implicados en los procesos enriquecidos de post-transcripcional de la expresión génica (rojo) y procesos de metabolismo celular (azul).

Para la piel, se presenta una red de interacción para los genes sobre-expresados contenido 68 genes. Sólo un proceso biológico enriquecido fue obtenido: membranas vesiculares fagocíticas (Figura 115). Los genes sub-expresados muestran una red de interacción para una red total de 58 genes. El único proceso enriquecido obtenido corresponde al procesamiento de RNA (Figura 116).

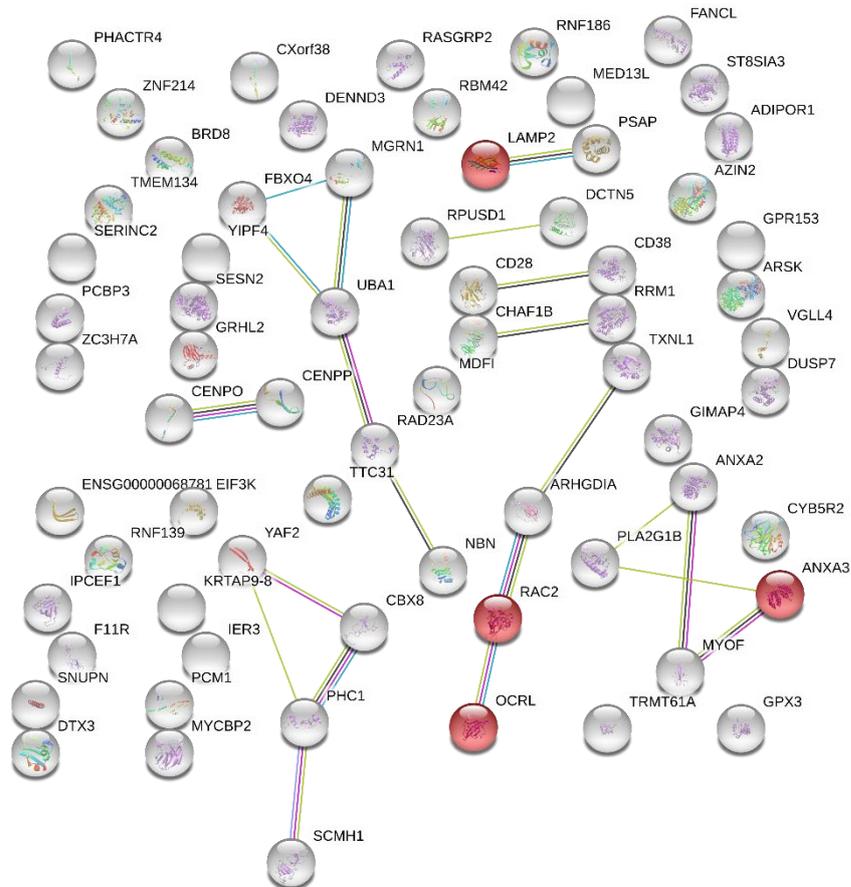


Figura 115. Interactoma para los genes diferencialmente sub-expresados en piel de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Las esferas en rojo representan aquellos genes involucrados en membrana vesicular fagocítica (rojo).

En el **riñón cefálico**, no se observa red de interacción para los genes sobre-expresados (Figura 117). Para los genes sub-expresados una débil red de interacción se observa entre los transcritos obtenidos. Sólo 47 de ellos participan en la red de interacción. Además, sólo el proceso enriquecido de exportación de proteínas se aprecia en la red.

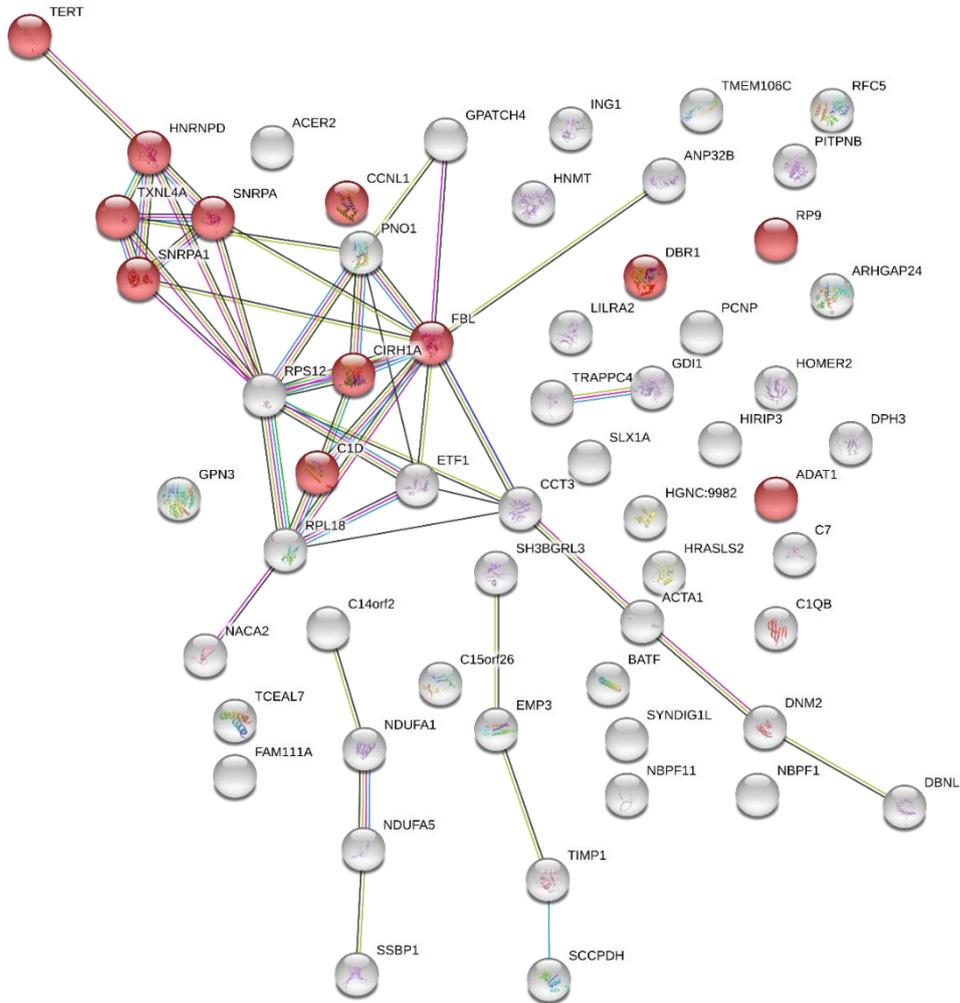


Figura 116. Interactoma para los genes diferencialmente sub-expresados en piel de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Las esferas en rojo representan aquellos genes involucrados en procesamiento del RNA.

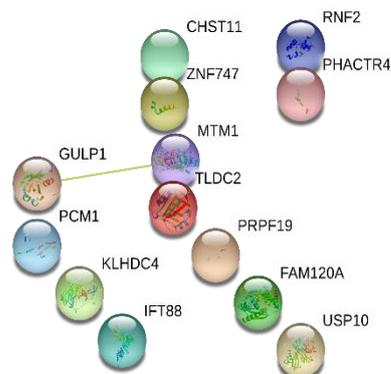


Figura 117. Red de interacción de los genes diferencialmente sobre-expresados en riñón cefálico de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Los colores de las esferas no tienen ninguna significancia biológica.

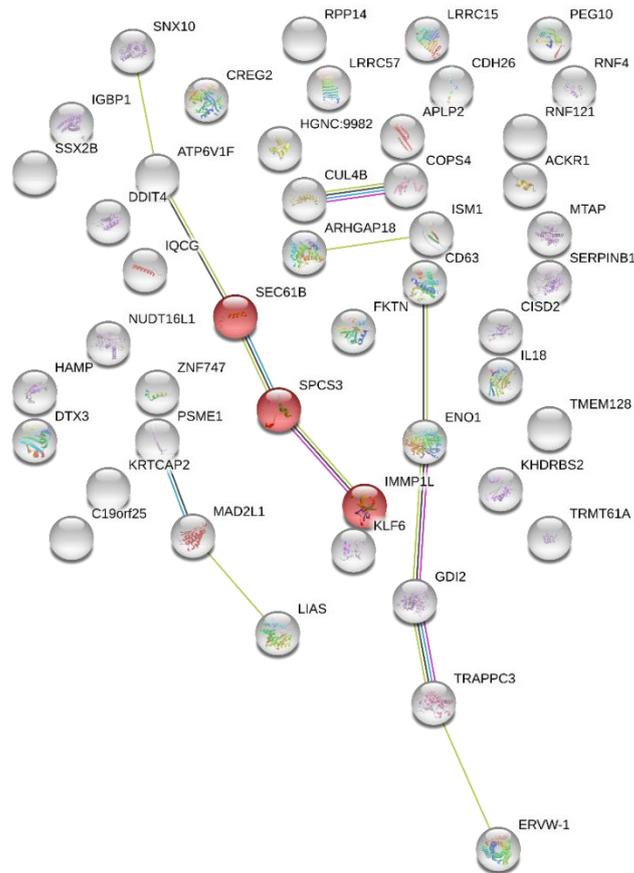


Figura 118. Interactoma para los genes diferencialmente sub-expresados en riñón cefálico de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Las esferas en rojo representan aquellos genes involucrados en exportación de proteínas.

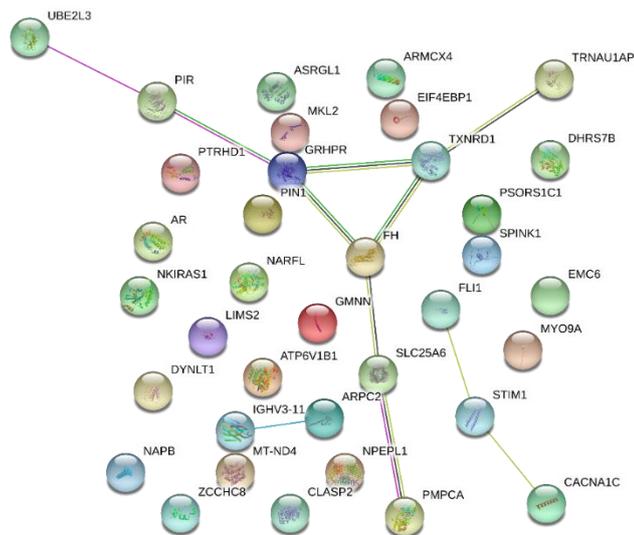


Figura 119. Red de interacción de los genes diferencialmente sobre-expresados en hígado de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Los colores de las esferas no tienen ninguna significancia.

En **hígado**, importantes diferencias se observan entre los interactomas de sobre-/sub-expresión. Mientras en el primero se observa una red de interacción entre entidades (8 genes; Figura 119), en los genes sub-expresados se observan 92 genes formando parte de la red de interacción. En esta última, una clara interacción se observa entre los diferentes procesos biológicos enriquecidos obtenidos incluyendo expresión génica, biogénesis ribosomal, transporte de proteínas y metabolismo. Importantemente, se aprecia además la presencia de procesos inmunes tales como activación de leucocitos y neutrófilos (Figura 120).

En línea con estos procesos, la presencia de procesos de regulación de la exocitosis sugiere que ambos procesos podrían estar unidos. En su conjunto, los datos en hígado sugieren que una fuerte regulación de la respuesta inmune tiene lugar en tiempo final. A partir de ello, no se descarta la posibilidad que esta observación pueda ser el efecto de una activación de dicha respuesta en un tiempo anterior al muestreo.

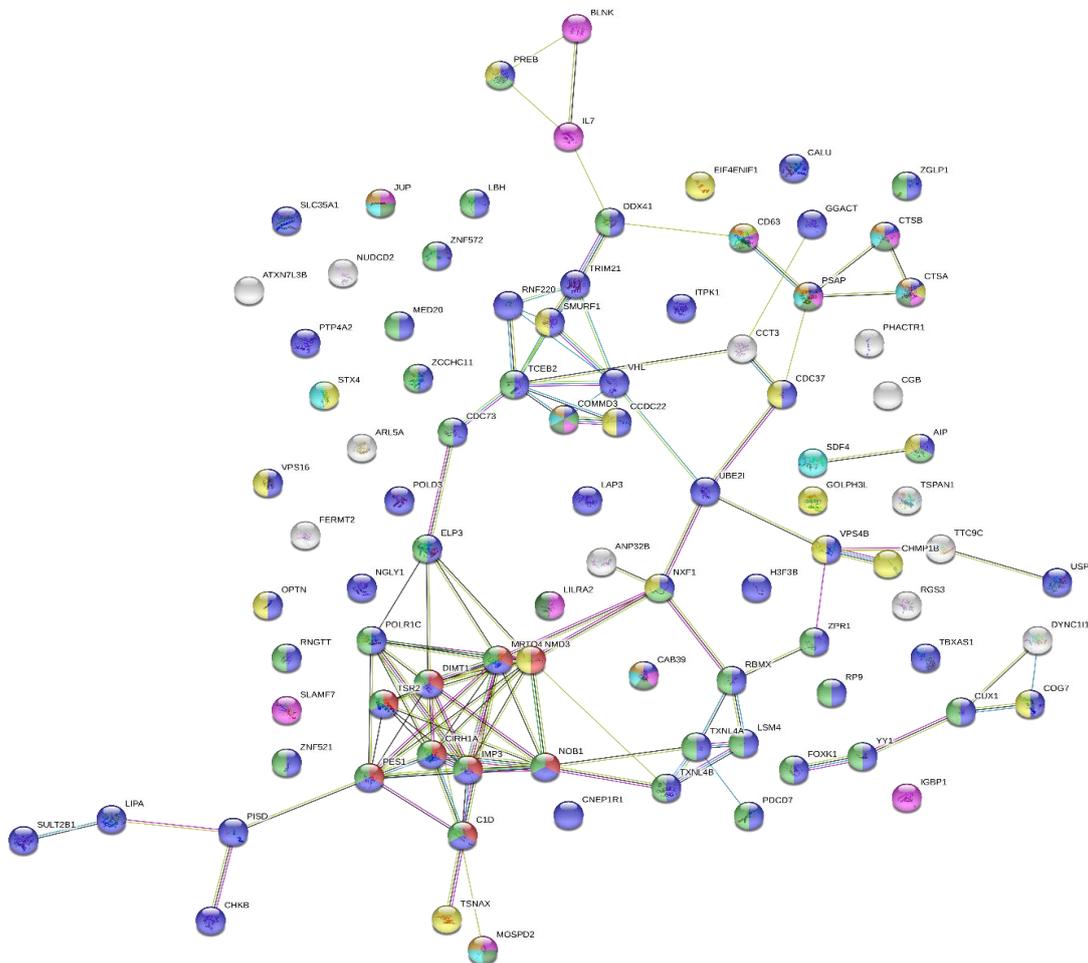


Figura 120. Interactoma para los genes diferencialmente sub-expresados en hígado de doradas alimentadas con la Dieta 4 (levadura 1,1%). Las esferas en rojo representan aquellos genes involucrados en expresión génica (verde), biogénesis ribosomal (rojo), transporte de proteínas (amarillo), activación de leucocitos (púrpura), de neutrófilos (verde oscuro) y su degranulación (amarillo oscuro), metabolismo celular (azul), y regulación de la exocitosis (azul celeste).

Prueba de validación: evaluación *in vivo* de la tolerancia al estrés en peces alimentados con las dietas experimentales

Contrariamente a lo esperado, al final del ensayo *in vivo* en el que se evaluó de tolerancia al estrés de los peces alimentados con las dietas experimentales, no se encontraron diferencias a nivel de crecimiento (peso) entre los peces alimentados con las dietas con IMMUNOTEC® y la levadura *D. hansenii* independientemente de la densidad de estabulación considerada (3 vs 30 kg/m³) (Tabla 32; P > 0,05). En este sentido, no se observaron diferencias en peso entre los peces mantenidos a baja y alta densidad, si bien el grupo de peces mantenidos a 30 kg/m³ mostró algunas lesiones a nivel de la boca y aletas, lesiones debidas al elevado grado de hacinamiento de los peces.

Tabla 32. Valores de peso (g) e índice de condición de Fulton (K) de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales y mantenidas a 3 y 30 kg/m³ durante un período de 25 días. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar de todos los peces en cada tanque.

	Peso (g)		Índice de condición	
	3 kg/m ³	30 kg/m ³	3 kg/m ³	30 kg/m ³
Dieta 1 (control)	102,5 ± 16,0	101,3 ± 15,7	2,5 ± 0,05	2,5 ± 0,03
Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%)	102,6 ± 16,1	101,6 ± 15,8	2,5 ± 0,04	2,6 ± 0,07
Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,30%)	99,7 ± 15,8	99,2 ± 15,7	2,5 ± 0,06	2,6 ± 0,04
Dieta 4 (Levadura 1,1%)	103,9 ± 16,1	104,3 ± 15,9	2,5 ± 0,07	2,6 ± 0,05
Dieta 5 (Levadura 2,2%)	104,3 ± 16,0	103,6 ± 15,9	2,6 ± 0,04	2,6 ± 0,05

Con el fin de evaluar si los aditivos probados tenían un efecto positivo sobre la tolerancia al estrés en doradas mantenidas a altas densidades se procedió a cuantificar los niveles de marcadores de estrés en mucus epidérmico (respuesta local) y en plasma (respuesta sistémica). Los resultados de dichos análisis se encuentran representados en la Figura 121.

Los resultados representados en la Figura 121 indican que, a nivel de glucosa del mucus epidérmico, hay diferencias significativas entre los niveles medidos en el grupo sometido a baja densidad de la Dieta 4 (0,9001 ± 0,075 mg/dL) en comparación con los valores medidos en peces alimentados con las Dietas 1 y 2 (0,5601 ± 0,06 mg/dL y 0,5648 ± 0,081 mg/dL respectivamente). Hay diferencias significativas en el factor dieta y en la interacción de los factores evaluados (P < 0,05). En los niveles de glucosa plasmática no se observan diferencias significativas (P > 0,05).

A nivel de concentración de proteína en el mucus epidérmico, hay diferencias significativas entre la baja densidad y la alta densidad de la Dieta 2 (0,8965 ± 0,08 mg/mL y 1,448 ± 0,165 mg/mL, respectivamente). También hay diferencias significativas entre las altas densidades de las Dietas 2 y 3 (1,448 ± 0,165 mg/mL y 1,057 ± 0,105 mg/mL, respectivamente). La interacción entre los dos factores estudiados es significativa (P < 0,05). En los niveles de proteína plasmática no hay diferencias significativas (P > 0,05).

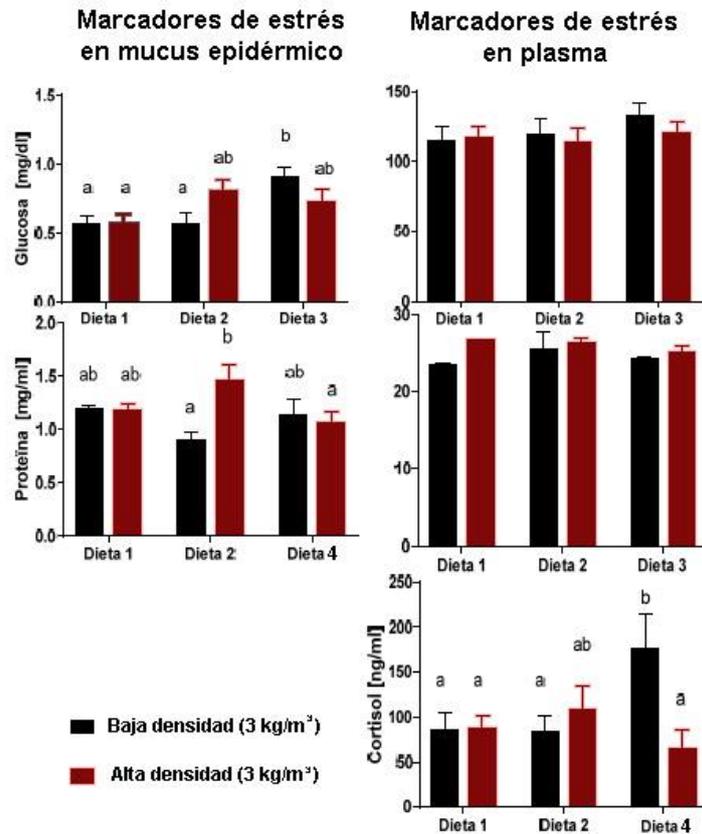


Figura 121. Evaluación de la glucosa, proteína y cortisol tanto a nivel local (parte izquierda) como de sistema (parte derecha). Se representa la media de cada dieta y además se indica la densidad de cultivo a la que estaba cada dieta (barras negras, baja densidad – control; barras rojas, alta densidad - estrés) con su respectiva desviación estándar. El análisis estadístico para valorar diferencias significativas fue el de una ANOVA dos factores y un post-test de comparaciones múltiples de Sidak ($P < 0,05$). Las letras representan las diferencias significativas entre niveles.

A nivel de cortisol plasmático, en la Dieta 2 suplementada con la levadura *D. hansenii*, es mucho más elevado en grupo mantenido a baja densidad ($176,1 \pm 39,19$ ng/mL) respecto el nivel de cortisol de las doradas donde se ha aplicado el estrés de alta densidad ($64,34 \pm 20,8$ ng/mL). También es significativamente superior respecto a los otros grupos de baja densidad de las Dietas 1 y 2 ($85,04 \pm 19,61$ ng/mL y $84,14 \pm 17,91$ ng/mL, respectivamente). La interacción entre los dos factores estudiados es significativa.

El conjunto de los resultados indica que la estabulación de los peces durante 25 días a elevadas densidades (30 kg/m³) no alteró los niveles de glucosa en plasma y moco epidérmico de los peces alimentados con la Dieta 1 (control); resultados que podrían venir dados por una adaptación de los peces a dicha densidad durante el periodo experimental y que además vendrían apoyados por la ausencia de diferencias a nivel de crecimiento somático. Sorprende el caso de los peces alimentados con la levadura y mantenidos a baja densidad (3 kg/m³) quienes parece que tiene niveles de glucosa en mucus epidérmico y niveles de cortisol en plasma superiores a los de la Dieta 1 (control), si bien cuando dichos peces se encuentran a elevadas densidades (30 kg/m³) los niveles de los marcadores de estrés se reducen.

En la dieta suplementada con IMMUNOTEC® se observa la tendencia de los metabolitos a tener niveles superiores donde se ha aplicado una densidad de 30 kg/m³, donde los niveles de proteína del moco son significativamente superiores a los del control (baja densidad) y en los niveles de glucosa del moco y cortisol plasmático hay niveles superiores respecto al control de la misma dieta. Por lo tanto, podemos afirmar que los peces donde se había aplicado un estrés por confinamiento estaban estresados ya que han comprobado los niveles de cortisol plasmático y son similares al estudio de Kanshari et al. (2018) donde se aplicó un estrés por vacunación y exposición al aire donde los niveles de cortisol fueron de 75 ng/mL e incluso superiores. No obstante, en nuestro experimento, las doradas expuestas a baja densidad (3 kg/m³) mostraron también una tendencia a presentar unos niveles de glucosa y cortisol similares a las doradas donde se aplicó el estrés por alta densidad (30 kg/m³), pues se observan valores de cortisol similar los grupos estresados. Esto indica que la baja densidad (3 kg/m³) seleccionada como condición experimental control no resultó ser tal para los animales, y fue percibido por las doradas como una situación estresante. Las razones de esta respuesta al estrés en los grupos de baja densidad parecen debidas probablemente a la disminución de las interacciones sociales entre los organismos en el tanque, provocando por tanto una situación que las doradas control codificaron como un agente estresante. En concordancia con esta hipótesis, la casi nula interacción social entre las doradas probablemente fue la causante de que los peces de la condición experimental control, provocando así un estrés aún mayor que el que se quería obtener por alta densidad. Esta hipótesis viene apoyada por que los niveles de cortisol plasmático en peces no estresados oscila entre 10 y 30 ng/mL (Kanshari et al., 2018) y en nuestro estudio los valores fueron cercanos a los 100 ng/mL. Por consiguiente, los resultados de la presente prueba de validación frente a un agente estresante como la densidad no se consideran como concluyentes, pues no han permitido poner de manifiesto las bondades de los aditivos evaluados frente a una condición de cultivo de alta densidad.

Además de los marcadores de estrés en moco y plasma se procedió a evaluar la expresión de distintos genes relacionados con la respuesta frente al estrés por hacinamiento, genes que fueron evaluados en muestras de cerebro e hipófisis de individuos de *S. aurata* sometidos a diferentes condiciones experimentales. El análisis preliminar de PERMANOVA incluyó comparaciones entre la expresión de genes y las dietas, mientras que se usó una prueba de pares post hoc para evaluar la presencia de diferencias significativas entre los niveles de densidad dentro de cada dieta diferente y entre cada combinación de dietas dentro de cada nivel de densidad. Los resultados para dichos análisis de marcadores de cerebro e hipófisis se presentan en la Figura 122.

A nivel de marcadores de cerebro, la expresión de la hormona liberadora de corticotropina (*crh*) no mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P > 0,05$). La expresión de la hormona liberadora de tirotrópina (*trh*) en cerebro mostró diferencias significativas entre los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P < 0,05$). De hecho, las comparaciones dentro de las dietas revelaron una diferencia significativa entre la densidad de control y la alta densidad en la Dieta Control ($P = 0,006$), como lo muestran los resultados de las pruebas por pares, mientras que en los grupos alimentados con la dieta inmunomoduladora que contenía el aditivo IMMUNOTEC® y la dieta con la levadura, no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de *trh* entre el grupo de alta y baja densidad.

La expresión de la proteína de unión al factor liberador de corticotropina (*crhbp*) en cerebro no mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P > 0,05$).

La expresión de la hormona de crecimiento en hipófisis (*gh*) mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, según lo confirmado por los resultados del análisis PERMANOVA ($P < 0,05$). De hecho, las comparaciones entre la densidad de control y la alta densidad en la Dieta 4 (levadura 1,1%) revelaron diferencias significativas ($P = 0,014$), como lo muestran los resultados de las pruebas por pares. También se encontraron diferencias significativas entre la Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%) y la Dieta 4 (levadura 1,1%) en alta densidad ($P = 0,029$). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes niveles de densidad en la Dieta 1 (control), Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%), Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%) y Dieta 5 (levadura 2,2%), como se muestra en la Figura 122.

La expresión de prolactina no mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P > 0,05$). De manera diferente, las comparaciones entre las dietas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la Dieta 1 (control) y la Dieta 5 (levadura 2,2%) dentro del nivel de alta densidad ($P = 0,042$) y entre los niveles de densidad dentro de la Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%) ($P = 0,02$), como lo muestran los resultados de las pruebas por pares.

La expresión de pro-opiomelanocortina A (*pomca*) mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P < 0,05$). De hecho, las comparaciones entre tratamientos mostraron diferencias significativas entre la alta densidad y la baja densidad en la Dieta 5 (levadura 2,2%) ($P = 0,01$).

La expresión de pro-opiomelanocortina B (*pomcb*) mostró diferencias significativas entre las dietas y los tratamientos, como lo demuestran los resultados del análisis PERMANOVA ($P < 0,05$) (Figura 122). Además, las comparaciones entre dietas mostraron una diferencia significativa entre las diferentes dietas, tanto en densidad de control como en densidad alta. En particular, se encontraron diferencias significativas entre la Dieta 1 (control) y la Dieta 3 (IMMUNOTEC® 0,3%) en la densidad de control ($P = 0,019$), entre la Dieta 3 y la Dieta 4 (levadura 1,1%) en la densidad de control ($P = 0,01$) y entre la Dieta 3 y la Dieta 5 (levadura 2,2%) en los grupos mantenidos a una alta densidad de estabulación ($P = 0,04$).

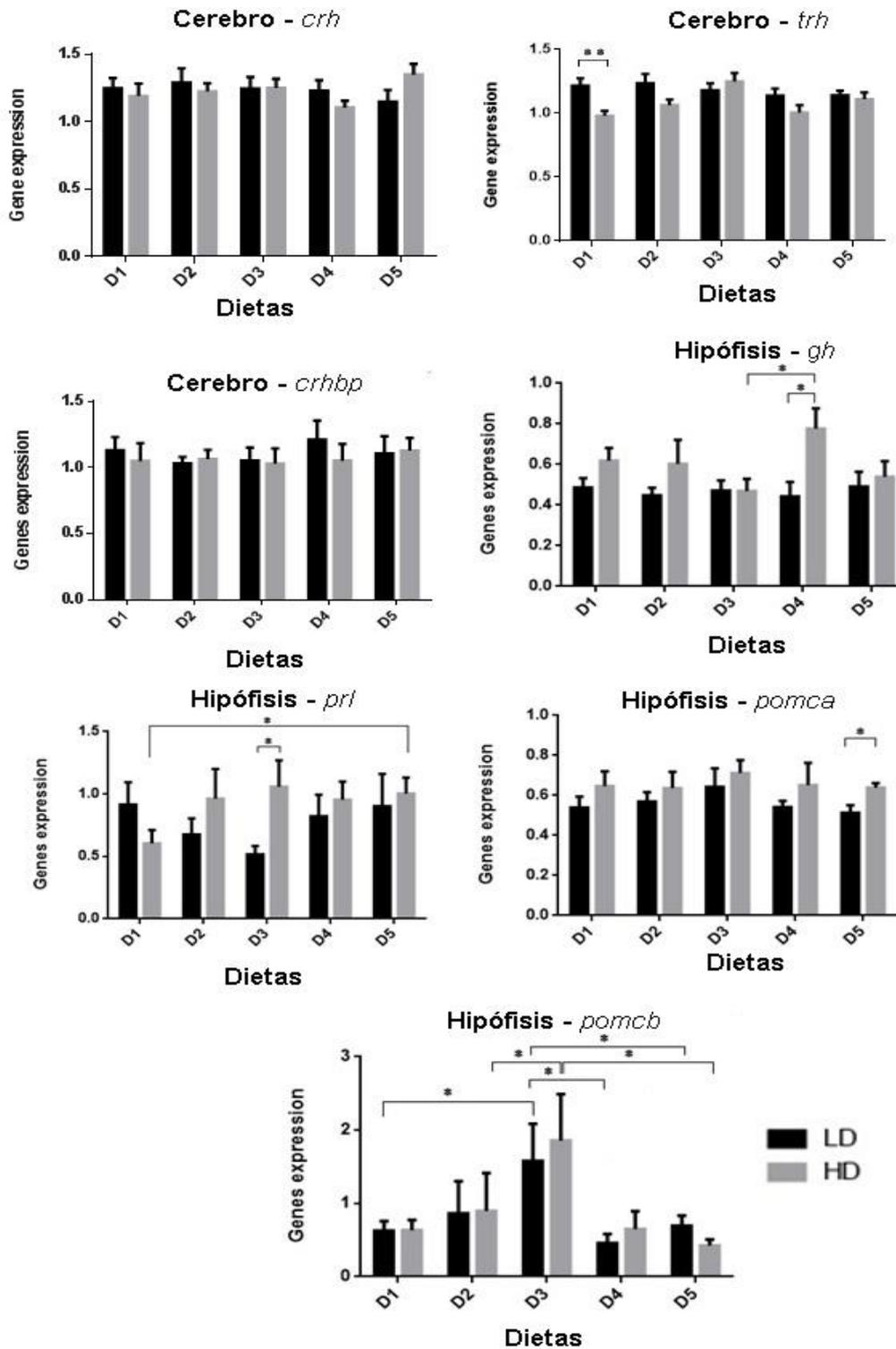


Figura 122. Expresión génica de marcadores de estrés en cerebro e hipófisis den dorada alimentadas con distintas dietas y sometidas a distintos niveles de densidad (LD, baja densidad: 3 vs HD, alta densidad: 30 kg/m³). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los pares comparados (P < 0,05).

A partir de los resultados de los marcadores de estrés evaluados en moco, suero y los patrones de expresión génica evaluados en cerebro e hipófisis en peces alimentados con las distintas dietas experimentales y sometidos a una prueba de estrés por hacinamiento, podemos deducir lo siguiente:

Tal y como ya se ha comentado anteriormente, en la práctica acuícola se tiende a incrementar la densidad de cultivo (con la consiguiente situación de confinamiento). El confinamiento se considera una fuente de estrés para los peces en la acuicultura, ya que es una condición perjudicial y amenazadora para la salud y el crecimiento de los peces de cultivo. Para hacer frente a este problema, los organismos desencadenan una reacción en cascada, definida como respuesta al estrés, que involucra al sistema endocrino, en particular el eje HPI, que conduce a la producción de cortisol que se libera en el torrente sanguíneo. El cortisol altera el sistema inmunológico, haciendo que los peces sean más susceptibles a las enfermedades. Por esta razón, existe un creciente interés por parte de los piscicultores en desarrollar nuevos métodos capaces de evitar que los peces criados puedan experimentar problemas relacionados con la cría, salvaguardando el bienestar sin comprometer la producción. Entre los diversos factores que alteran la buena calidad de los peces cultivados, la dieta es uno de los aspectos clave.

Por este motivo, esta investigación se ha realizado con el objetivo de analizar el efecto de dos dietas experimentales, una que contiene el aditivo para piensos IMMUNOTEC[®] administrado en dos niveles porcentuales (0,15% Dieta 2; 0,3% Dieta 3) y la otra que contiene el levadura *D. hansenii* en dos concentraciones (1,1% Dieta 4; 2,2% Dieta 5), y dos niveles de densidad de población (3 kg/m³ LD – baja densidad; 30 kg/m³ HD – alta densidad), analizando cómo afectan los niveles de expresión de diversos genes del HPI a nivel cerebro e hipófisis. Desde un punto de vista general, se observa que la expresión de genes relacionados con el cerebro no fue significativamente diferente entre las dietas y los niveles de densidad, resultados que están en concordancia con los parámetros de estrés medidos en mucus epidérmico y sangre. Pero en cambio, los genes relacionados con la hipófisis mostraron diferencias significativas en la expresión entre las dietas y los niveles de densidad. Estos resultados iniciales podrían indicar una mayor participación de la hipófisis en la respuesta al estrés en respuesta a las dietas y las densidades de población. Además, se observa que los genes relacionados con el cerebro mostraron niveles de expresión más altos que los genes relacionados con la hipófisis. Este patrón podría deberse a una participación diferente de los dos tejidos en la cascada endocrina, tal y como se representa en la Figura 123.

Centrándose en los genes relacionados con la hipófisis, se puede observar que la expresión de *pomcb* varía en todas las dietas en ambos niveles de densidad. Estos resultados indican que la expresión de *pomcb* podría verse más afectada por la composición de las dietas, en ambos niveles de densidad de población. En particular, se ha observado que la Dieta 3 mostró el mayor nivel de expresión a alta densidad. Esta dieta, que contiene el mayor porcentaje del alimento suplementario IMMUNOTEC[®], podría promover efectivamente la producción de POMCB, que está más abajo de las respuestas al estrés.

Además, la expresión de *pri* en dorada aumentó significativamente en respuesta a la densidad y la administración de alimentos inmunoestimulantes. Los resultados de este estudio podrían compararse con observaciones de estudios previos, en los cuales la administración de PRL tuvo un efecto creciente en los niveles de cortisol en plasma, destacando un posible papel de la PRL en el eje del estrés.

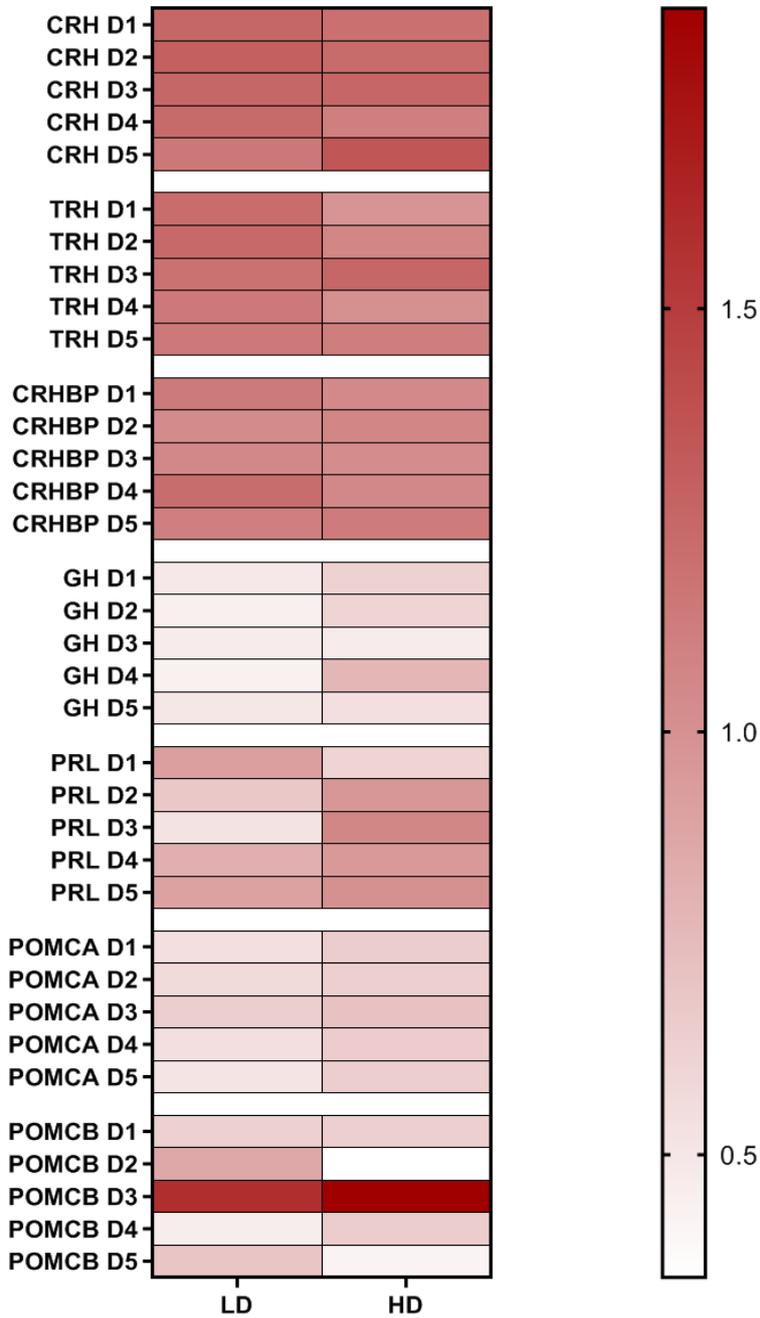


Figura 123. Tendencias de la expresión de genes relacionados con el cerebro y la hipófisis en comparación con cinco dietas diferentes y dos densidades de almacenamiento (D1 = Dieta 1, D2 = Dieta 2, D3 = Dieta 3, D4 = Dieta 4, D5 = Dieta 5; LD = Densidad baja, HD = Alta densidad).

Cuando se desencadena una respuesta al estrés, el resultado puede cambiar según la intensidad y la duración del factor estresante y se ha demostrado que la respuesta al estrés puede suprimir o mejorar algunas vías de la respuesta inmune (Dhabhar, 2009). De hecho, los peces sometidos a situaciones de estrés son más propensos a contraer enfermedades, por ejemplo, se observó que *S. aurata* afectado por el síndrome de invierno mostró una alta susceptibilidad a las infecciones y que sus sistemas inmunitarios estaban más reprimidos en comparación con otros peces (Tort et al., 1998). Se ha demostrado que el estrés también afecta el crecimiento en el teleosteo, causando una disminución en las tasas de crecimiento en una amplia gama de peces, incluyendo la dorada (Pickering, 1993). El estrés fisiológico puede regular a la baja la expresión de genes relacionados con el crecimiento, por ejemplo, en el salmón Coho, lo que sugiere una relación entre la expresión de genes relacionada con el crecimiento y la respuesta al estrés (Nakano et al., 2013).

Sin embargo, se ha demostrado que los inmunoestimulantes naturales, como las levaduras, pueden prevenir enfermedades en el cultivo de peces (Anderson, 1992; Sakai, 1999) y promover el crecimiento, aunque, en relación con el crecimiento, no está claro si estos productos son capaces de aumentar el apetito o mejorar la digestibilidad (Martínez Cruz et al., 2012). Por ejemplo, se muestra que los probióticos son promotores del crecimiento cuando se agregan en la dieta de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), que mostró un aumento en el peso (Lara-Flores et al., 2003) o en peces ornamentales, como el xifo de cola de espada (*Xiphophorus helleri*) y guppy (*Poecilia reticulata*), en las que se alimentó con diferentes tipos de probióticos (Ghosh et al., 2008).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación destaca los beneficios de los probióticos en el huésped, cuando se administran en cantidades adecuadas. Además, estos tipos de probióticos son totalmente seguros para el medio ambiente y para la salud humana, ya que son biocompatibles y biodegradables. Además, las células de levadura tienen tasas de crecimiento rápidas y costos contenidos (Martínez Cruz et al., 2012). También es más fácil trabajar con los probióticos en diferentes concentraciones, ya que no son tan sensibles a la luz, la humedad o la temperatura, como lo son otros micronutrientes en la alimentación. Por estas razones, los probióticos continúan probándose en dietas de peces cultivados.

Muchos estudios también se enfocaron en el tiempo y la dosis de alimentación, ya que estos son los dos factores que pueden afectar la respuesta de los peces a la dieta. En acuicultura, la dosis de probióticos administrados varía y la dosis óptima puede variar según el huésped (Nayak, 2010). Como se ha demostrado para la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en algunos casos, mientras que una dosis baja no puede estimular el sistema inmunológico, una dosis más alta puede ser peligrosa para el organismo (Nikoskelainen et al., 2001), por lo que la dosis óptima de diferentes probióticos debe ser determinada para cada huésped. También la duración de la alimentación es importante en la eficacia de los probióticos. En peces, el rango óptimo de alimentación, para ganar peso y mejorar la resistencia a las enfermedades, es de 1 a 10 semanas (Nayak, 2010). Algunos investigadores afirman que un régimen de alimentación prolongada no es útil para los probióticos (Choi et al., 2008), pero un régimen de alimentación más corto puede conducir a una disminución en la respuesta inmune de los peces (Panigrahi et al., 2005), tal vez debido a la incapacidad de cepas para establecer y multiplicar en el intestino de pescado (Nayak, 2010).

En este estudio, se encontró que los niveles de expresión de *gh* en la hipófisis de peces mantenidos en condiciones de alta densidad (30 kg/m³) eran más altos que los peces mantenidos en densidad de control (3 kg/m³) para cada dieta experimental, incluso si solo hay diferencias entre las densidades de siembra en peces alimentados con la levadura *D. hansenii* a 1,1% (Dieta 4) fueron estadísticamente significativos. Además, los niveles de expresión de *gh* en peces alimentados con 1,1% de *D. hansenii* (Dieta 4) fueron significativamente más altos que los niveles de expresión en peces alimentados con 0,3% de IMMUNOTEC[®] (Dieta 3), lo que sugiere que la Dieta 4 podría ser más efectiva para estimular el crecimiento y, en consecuencia, que las dosis altas pueden no ser óptimas para la promoción de la expresión de *gh*. Estos resultados son confirmados por los resultados preliminares del peso de los peces. De hecho, los peces alimentados con la Dieta 4 durante la prueba nutricional mostraron un 11,7% más de peso (87,2 ± 2,5 g) que los peces alimentados con dieta de control, mientras que los peces alimentados con la Dieta 5 no mostraron un aumento de peso en comparación con los peces alimentados con la Dieta control.

Con frecuencia, los niveles más altos de expresión en peces mantenidos en condiciones de alta densidad, pueden ser una respuesta indirecta derivada de una creciente demanda de estrés energético (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Sin embargo, en este estudio, el aumento en los niveles de expresión de la hormona de crecimiento *gh* en la alta densidad de población, podría deberse al efecto de la administración de aditivos alimentarios con propiedades de promoción del crecimiento e inmunoestimulantes en peces criados. De todos modos, debido a la falta de datos sobre los niveles de concentración plasmática de GH, es difícil definir correctamente la relación entre la transcripción, la traducción y la secreción de GH en este estudio. También se requieren estudios adicionales para establecer si la duración de la alimentación en el presente estudio es eficaz para estimular el sistema inmune de la dorada.

Prueba de validación: evaluación *in vivo* de las competencias inmunológicas en peces alimentados con las dietas experimentales

Las gráficas representadas en la Figura 124 describen los resultados del porcentaje de mortalidad de las doradas alimentadas con las dietas experimentales según la segunda versión del ensayo nutricional en la que el aditivo IMMUNOTEC[®] fue evaluado a dos dosis de inclusión y suministrado sólo durante 15 días tras una semana de reposo y alimentación de todos los grupos con la Dieta 1 (ver sección Metodología).

En este caso, se observó que en una de las dietas con inclusión del aditivo IMMUNOTEC[®] disminuyó significativamente el índice de mortalidad cuando los resultados fueron comparados con la Dieta control. Aunque considerada la marcada variabilidad asociada a las réplicas de tanques en los análisis, la diferencia entre tratamientos alimentarios demuestra una tendencia significativa entre grupos ($P < 0,05$).

El conjunto de estos resultados obtenidos permite inferir que el aditivo ejerce un efecto inmunoestimulador capaz de mejorar la supervivencia frente a una infección bacteriana, cuando es administrado a una dosis concreta y durante un periodo precedente y no continuado a una posible situación de infección, recomendándose así su administración por periodos de tiempo cortos y con un tiempo de reposo antes de que el huésped entre en contacto con el organismo patógeno.

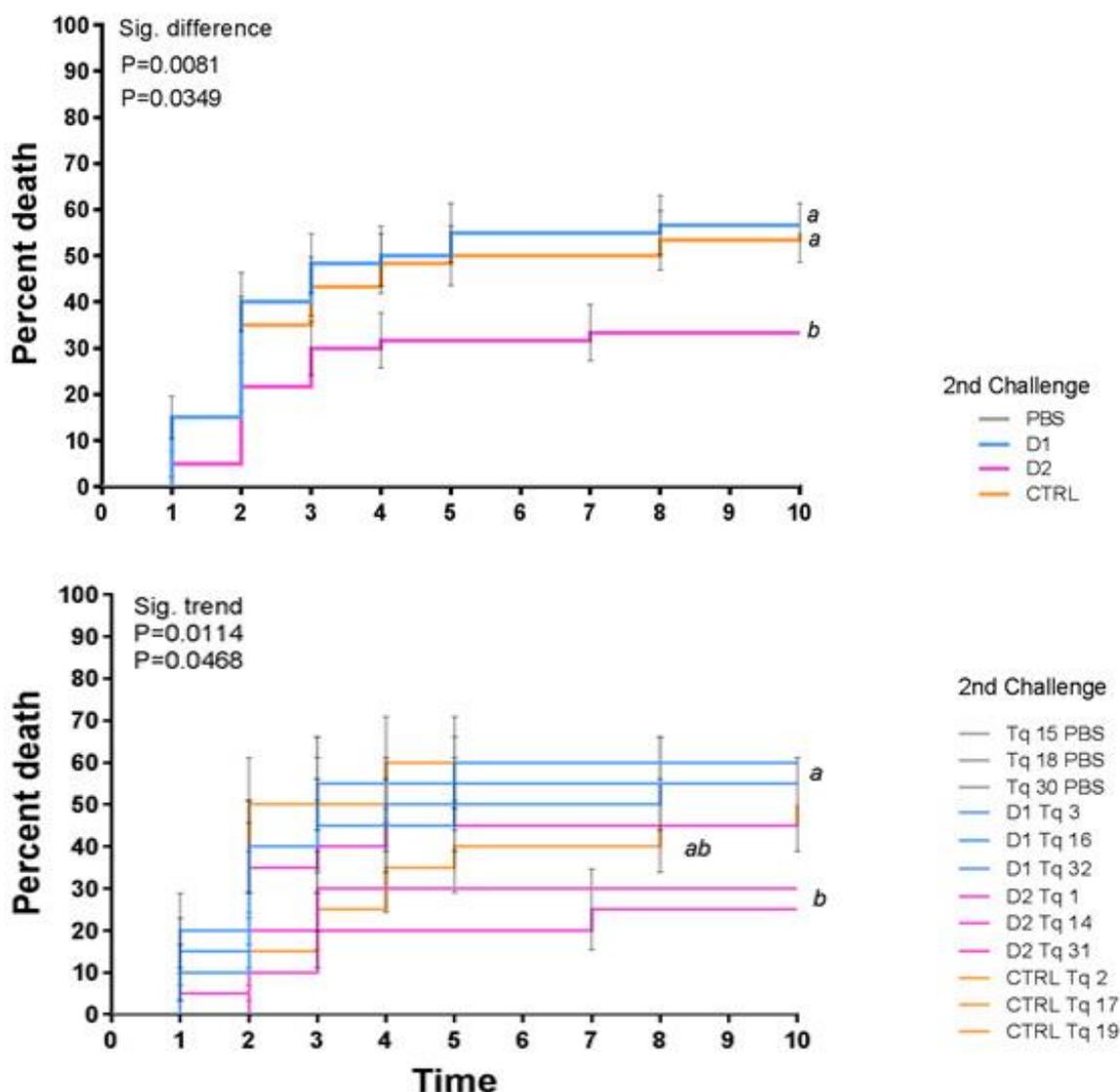


Figura 124. Porcentaje de mortalidad de peces provenientes de la segunda versión del ensayo nutricional con las dietas control (amarillo), IMMUNOTEC® 0,15% y 0,3% (rosa y azul, respectivamente), inyectados intraperitonealmente al 10^8 de concentración en un volumen de 0,2 mL de inóculo de *Vibrio anguillarum*. Representación gráfica de la mortalidad asociada a cada dieta considerando el pez como unidad experimental (arriba); representación gráfica de la mortalidad asociada a cada dieta considerando el tanque como unidad experimental (abajo). Las barras representan la desviación estándar y las letras diferencias significativas entre los grupos dietéticos experimentales ($P < 0,05$; Kaplan-Meier).

El crecimiento de los juveniles de dorada fue también monitorizado a lo largo de ambas versiones del diseño experimental del ensayo nutricional. La aplicación del aditivo a las dos dosis de inclusión durante los dos sistemas de administración del aditivo evaluados no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento en peso de las doradas en ninguna de las fases experimentales a lo largo del ensayo (Tabla 33). Estos resultados contrastan con los obtenidos a tallas mayores y cuando el aditivo fue administrado a tiempos mayores (70 días; Figura 83).

Tabla 33. Peso medio y desviación estándar de las doradas al inicio de administración de las dietas con inclusión de IMMUNOTEC® 0,15% y 0,3% (06/05/2019); a final de la primera versión del ensayo nutricional: 15 días de administración de dietas IMMUNOTEC® 0,15% y 0,3% (22/05/2019); y a final de la segunda versión del ensayo nutricional con las dietas experimentales: 28 días de administración de dietas IMMUNOTEC® 0,15% y 0,3% seguido de 10 días de dieta control (12/06/2019).

Dieta	Peso (g)		
	06/05/2019	22/05/2019	12/06/2019
Control	3,2 ± 1,1	5,6 ± 1,5	9,9 ± 2,8
D1 (IMMUNOTEC®, 0,15%)	3,3 ± 1,1	5,4 ± 1,6	9,9 ± 2,4
D2 (IMMUNOTEC®, 0,30%)	3,2 ± 1,0	5,6 ± 1,7	9,8 ± 3,2

Prueba de validación: evaluación *ex vivo* de las competencias inmunológicas en peces alimentados con las dietas experimentales

Con vistas a evaluar a un posible efecto beneficioso sobre la respuesta inmune de los peces alimentados con dos aditivos, IMMUNOTEC® y la levadura *Debaromyces hansenii*, se evaluó la modulación de los genes relacionados con el sistema inmune según la metodología descrita previamente (ver Tarea A2.1) y muestras de bazo de peces alimentados con ambos aditivos durante 70 días. Debido a este propósito se utilizó como tejido clave por su capacidad específica para activar la respuesta inmune, el bazo, el cual fue expuesto a PBS (condición control) y LPS.

Los resultados de la expresión relativa normalizada de citoquinas pro inflamatorias (*il-1β* y *tnfa*), citoquinas antiinflamatorias (*il-10* y *tgfβ1*), lisozima (*lys*), receptor de membrana (*cd4*), inmunoglobulina M (*igM*) y de marcadores del estrés oxidativo (*sod* y *cat*) en células de bazo de dorada están representados en las Figuras 125 y 126 donde resultados alojan diferencias significativas entre células de bazo expuestas a LPS y células tratadas con PBS (células control), indicando el éxito del procedimiento. En general, los genes relacionados con el sistema inmune presentan una menor magnitud de expresión para las células de la Dieta 2 (D2), comparativamente con la dieta control que presenta una regulación génica más acentuada, principalmente a las 12 y 24 h pos exposición a LPS.

Además, el patrón de expresión observado indica una disminución de la respuesta inmunitaria de las células de esplenocitos de doradas alimentadas con la Dieta 2 frente a la exposición al LPS cuando comparada con la respuesta de células incubadas con PBS, lo que sugiere una potencial intolerancia por parte de los individuos alimentados con el IMMUNOTEC®, posiblemente debido a la excedencia en el tiempo de administración del aditivo. Por otro lado, la expresión relativa de la catalasa (*cat*) es significativamente más elevada en los esplenocitos para los tiempos 0 y 24 h de exposición al LPS, indicando una mejora potencial del estado redox de las células de los individuos alimentados con el aditivo en fases tempranas de exposición y prolongado en el tiempo. Sin embargo, los resultados de la expresión de *sod*, aunque exhibiendo una tendencia semejante, no demuestran diferencias significativas entre dietas. El conjunto de estos resultados podría explicar la mejor respuesta a una infección bacteriana observada en juveniles de dorada alimentados con IMMUNOTEC® al 1,1% (resultados ensayo *in vivo*; Figura 124).

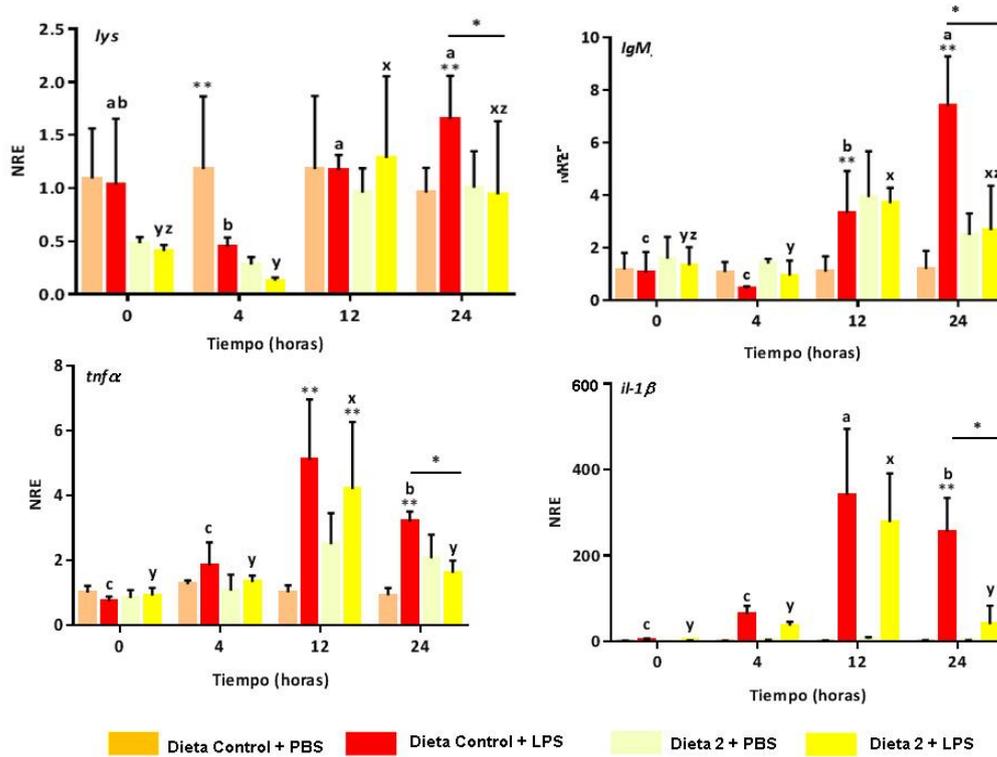


Figura 125. Expresión génica (n = 6) de lisozima (*lys*), inmunoglobulina M (*IgM*), factor de necrosis tumoral alfa (*tnfa*) e interleucina 1β (*il-1β*) de esplenocitos de dorada alimentados con una Dieta 1 (control) y la Dieta 2 (IMMUNOTEC® 0,15%). Los detalles sobre las gráficas se encuentran descritos anteriormente.

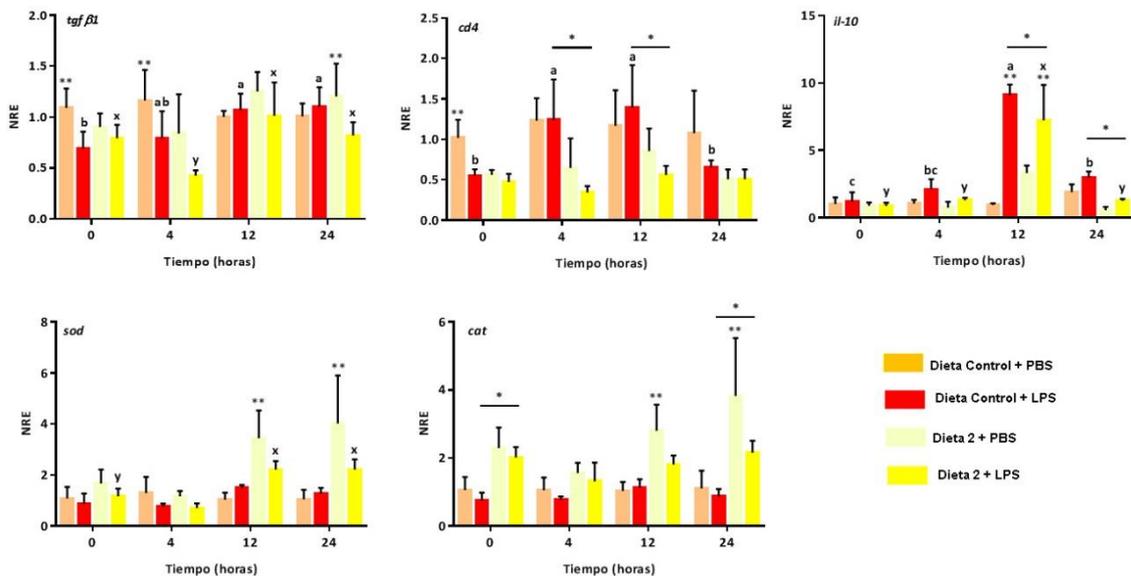


Figura 126. Expresión génica (n = 6) de citoquinas antiinflamatorias (*il-10*, *tgfb1*), el marcador de superficie *cd4* y las enzimas de estrés antioxidante *sod* y *cat* de esplenocitos de dorada alimentados con una Dieta 1 (control) y (IMMUNOTEC® 0,15%). Los detalles sobre las gráficas se encuentran descritos en el pie de la Figura 2.16.

Por otra parte, el mismo análisis se ha realizado con esplenocitos de peces alimentados con la Dieta 4, suplementada con levadura *Debaromyces hansenii* al 1,1 % (Figura 127).

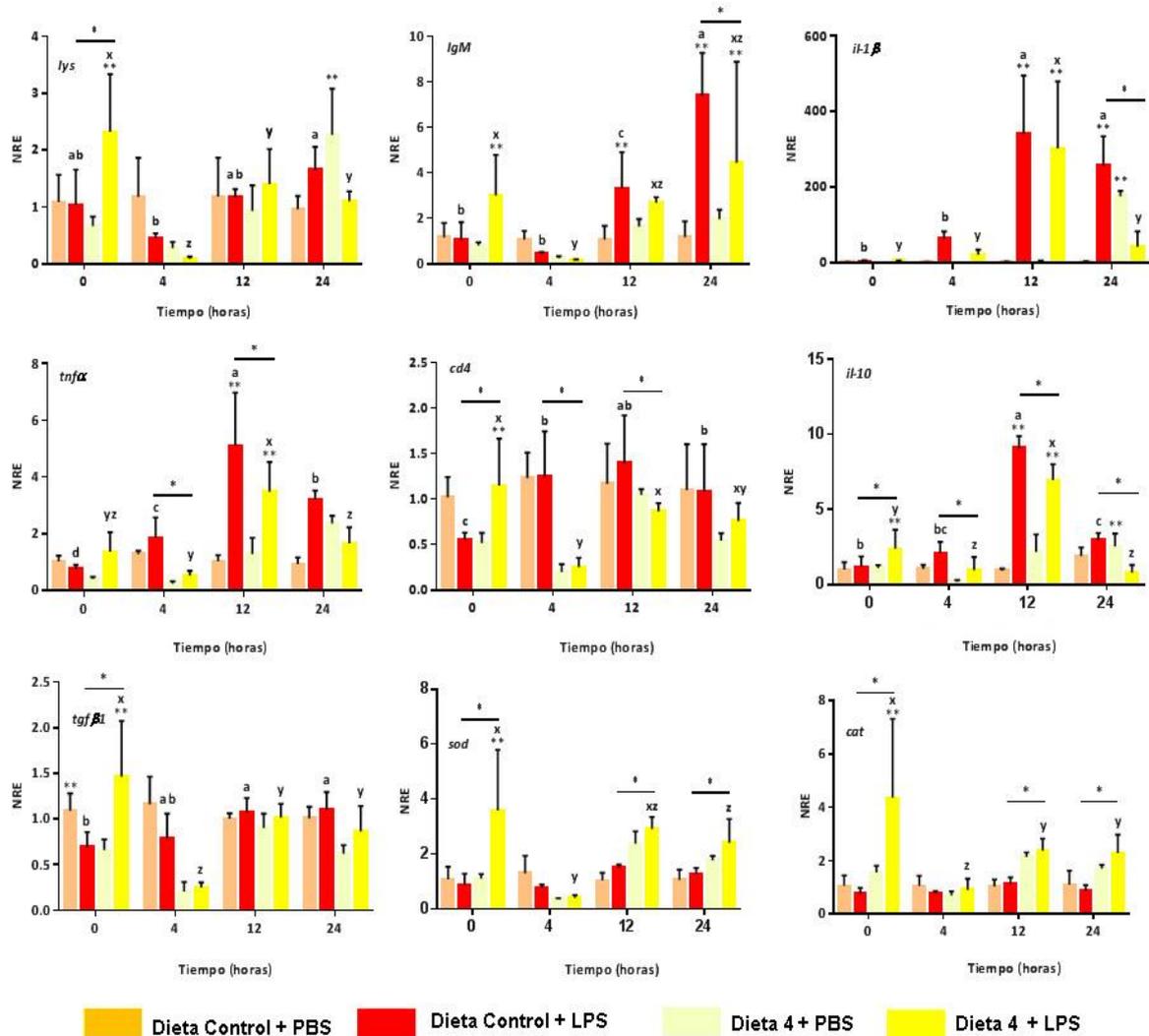


Figura 127. Expresión génica (n = 6) de lisozima (*lys*), inmunoglobulina M (*IgM*), factor de necrosis tumoral alfa (*tnfa*), interleucina 1β (*il-1β*), citoquinas antiinflamatorias (*il-10*, *tgfβ1*), el marcador de superficie *cd4* y las enzimas de estrés oxidante *sod* y *cat* de esplenocitos de dorada alimentados con una Dieta 1 (control) y la Dieta 4 (levadura *D. hansenii*). Los detalles sobre las gráficas se encuentran descritos anteriormente.

Los resultados de la expresión relativa normalizada en las células de bazo de doradas alimentadas con la dieta suplementada con levadura (Dieta 4) indican un patrón donde las citoquinas antiinflamatorias (*il-10* y *tgfβ1*), lisozima (*lys*), receptor de membrana (*cd4*), y los marcadores del estrés oxidativo (*sod* y *cat*) se observan sobre expresados a tiempo 0 h de incubación con LPS. Es de mencionar que, al contrario del ensayo *ex vivo* realizado para la tarea A2.1., donde el tiempo 0 h corresponde a la ausencia de incubación con LPS, en el presente ensayo las células se han sometido a LPS a un tiempo inicial, descrito como 0 h, y muestreadas

para análisis pocos minutos post-inoculación. Esta alteración en el procedimiento permite observar una respuesta temprana entre dietas que no se pudieron constatar en el ensayo anterior (Tarea A2.1). Estos resultados indican que las células de las doradas alimentadas con la Dieta 4 tienen una capacidad de respuesta inmune más eficaz en el tiempo frente a la presencia de LPS. Esta respuesta se observó constante o incluso atenuada en los siguientes tiempos de incubación con LPS, siguiendo sobre expresada en el caso de sod y cat en comparación con la dieta control.

La expresión de la inmunoglobulina M (*igM*) presenta una tendencia similar, aunque no significativa, y la regulación de las citoquinas pro inflamatorias (*il-1 β* y *tnfa*), al contrario de los demás genes evaluados, demuestra ser afectada por el LPS a partir de las 4 h de incubación, con una respuesta disminuida por parte de las células de la Dieta 4 cuando comparada con la dieta control. Por lo tanto, estos resultados indican un aumento de la respuesta inmunitaria de las células D4 (*cd4*) frente a la exposición al LPS a tiempos iniciales de incubación, lo que sugiere una potencial mejora de la respuesta inmune y estatus redox por parte de los individuos alimentados con la levadura *D. hansenii*.

Conclusiones

En esta tarea del proyecto DIETApplus se han probado dos aditivos, un primer aditivo de carácter inmunomodulador (IMMUNOTEC®) y un segundo aditivo de tipo probiótico con propiedades también inmunomoduladoras como es la levadura *Debaromyces hansenii*.

El aditivo comercial evaluado en esta tarea con propiedades inmunoestimulantes IMMUNOTEC®, aditivo probado por primera vez en peces y formulado con β -glucanos, *Echinacea purpurea*, MOS y vitamina C, demostró ser una estrategia eficaz para promover la respuesta inmune del organismo a nivel sistémico, tal y como indicaron las pruebas de validación realizadas (ensayos *ex vivo* y reto bacteriano frente a *Vibrio anguillarum*). En este contexto no es baladí resaltar que la estrategia de alimentación de los peces con dicho aditivo fue clave para lograr el efecto deseado sobre el organismo y una respuesta inmune que permitiera responder de forma efectiva a una infección bacteriana. Así, cuando el aditivo fue administrado de forma continua por un periodo largo de tiempo, más de dos meses, el resultado obtenido no fue el deseado, pues se observó una sobrestimulación del sistema inmune que no redundó en diferencias en los niveles de marcadores relacionados con la respuesta inmune sistémica del organismo. Sin embargo, una administración del aditivo en pulsos de 15 días, seguido por un periodo de descanso de una semana-diez días, permite al animal tener una buena respuesta inmunitaria y responder satisfactoriamente a una infección bacteriana, tal y como se demostró en el segundo reto bacteriano llevado a cabo. En este contexto, destacan los resultados histológicos y transcriptómicos que apoyarían un papel preponderante como promotor de la respuesta inmune sistémica del IMMUNOTEC®, si bien su efecto a nivel local es más bien moderado, pero existente, tal y como indican los resultados del ensayo *ex vivo* llevado a cabo con cultivos primarios de esplenocitos.

Las incorporaciones de los aditivos evaluados en las dietas no indujeron cambios sustanciales en la riqueza y diversidad de la microbiota intestinal de dorada, ya que la composición a nivel de grandes grupos taxonómicos no se diferenció significativamente de la de los ejemplares control, resultados que son de relevancia si se considera el uso de una levadura probiótica en dos de las formulaciones evaluadas. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas a nivel de género, y especialmente de aquellos cuya abundancia fue inferior al 1%. Las dietas funcionales que incluyeron el aditivo IMMUNOTEC® demostraron tener un mayor efecto sobre la composición de la microbiota que la levadura *Debaromyces hansenii*, resultados que podrían venir dados por la presencia de β -glucanos y *Echinacea purpurea* en este aditivo, En base a la metagenómica de las dietas suplementadas con el IMMUNOTEC® se puede predecir un efecto de esta sobre el metabolismo de los carbohidratos, nucleótidos, así como en el crecimiento y muerte celular y la señalización e interacción de moléculas; estos potenciales cambios en la funcionalidad fueron dependientes de los niveles de IMMUNOTEC® en la dieta, así como de la sección intestinal analizada.

Finalmente concluir, que la incorporación de ambos aditivos, el inmunomodulador y la levadura probiótica, tuvo un efecto positivo en el crecimiento de los animales cuando dichos aditivos fueron incorporados a bajas dosis en la dieta. Estos resultados no vienen determinados por la presencia de compuestos promotores del crecimiento en dichos aditivos, sino que están debidos a una mejor condición y salud general de los animales alimentados con dichas dietas. En este sentido, es relevante mencionar que las dietas fueron formuladas con un 75% de sustitución de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales (dietas con sólo un 7% de harina de pescado), por lo que estos resultados son de gran relevancia, pues permiten no sólo reducir de forma sustancial la inclusión de harina de pescado en la dieta en pro de un desarrollo de dietas sostenibles, sino que además, garantizan la promoción de una buena salud y condición de los animales, tal y como se demuestra con el conjunto de variables analizadas (parámetros de crecimiento, composición proximal, histología e histoquímica, transcriptómica y respuesta inmune no específica).

Tarea A2.3: Ensayos con aceites esenciales como herramientas para el tratamiento de ectoparásitos

La presente Tarea está estructurada alrededor dos actividades, una centrada en dorada y la segunda corvina. Los ensayos relacionados con la primera de las especies giran en torno al ectoparásito monogénea que afecta el cultivo de esta especie en jaulas, *Sparicotyle chrysophrii*, mientras que los estudios realizados en corvina están centrados en combatir las infestaciones de otro monogénea *Scianocotyle panzerii*.

Tarea A2.3.1: Prueba nutricional dosis-respuesta sobre el efecto de distintos niveles de inclusión de aceites esenciales en la dieta y la respuesta frente a una exposición de ectoparásitos en dorada

Durante muchos años, las piscifactorías han luchado contra las infestaciones ectoparasitarias, que generalmente se deben a la intensificación del proceso de producción. El uso tradicional de agentes quimioterapéuticos para prevenir y controlar las enfermedades de los peces en la acuicultura, como los antibióticos y los desinfectantes, ha sido muy criticado debido a la aparición de cepas patógenas resistentes, el impacto ambiental de su aplicación y la acumulación de residuos en los peces, lo que lleva a un creciente interés en el desarrollo de tratamientos alternativos y respetuosos con el medio ambiente. En los últimos años, las estrategias nutricionales centradas en el uso de aditivos para piensos como moduladores de las respuestas inmunológicas y fisiológicas, así como las terapias anti-estrés y antioxidantes, han despertado gran interés en el sector de la acuicultura. Por lo tanto, el uso de alimentos funcionales en la acuicultura es una realidad debido a sus numerosas ventajas productivas, de bienestar y ambientales. En el caso particular de la piscicultura mediterránea, los tratamientos in situ en jaulas marinas para *Sparicotyle chrysophrii*, un parásito branquial monogéneo específico de la dorada, incluyen baños de formalina y otros productos químicos utilizados en las desinfecciones de rutina, además de la limpieza de las redes (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). Sin embargo, considerando el impacto ambiental de los tratamientos químicos y la preocupación por los riesgos para la salud humana que también se han planteado (Wooster et al., 2005), los tratamientos alternativos son urgentemente necesarios.

Los aditivos fitogénicos para piensos son herramientas profilácticas y terapéuticas importantes para prevenir y/o tratar numerosas enfermedades, lo que resulta en un impacto positivo en la salud y el bienestar de los animales de granja, así como en los sistemas de producción. Entre otras opciones, como el uso de probióticos, prebióticos, inmunoestimulantes y ácidos orgánicos, los fitogénicos son un grupo de sustancias naturales de origen vegetal (derivado de hierbas, especias o extractos) utilizadas en la nutrición animal que representan una nueva clase de aditivos para piensos que han estado ganando interés en el sector de la acuicultura. En particular, los aceites esenciales (EOs) se han evaluado en las últimas dos décadas en varias especies de animales de granja y domésticos debido a sus propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, antiinflamatorias y antioxidantes. Con respecto a las especies acuáticas, se han demostrado cuantiosas evidencias de sus propiedades beneficiosas y su eficacia en el rendimiento y la salud de los peces (Encarnaçãõ, 2016). En los alimentos acuícolas, los EOs

demonstraron resultados positivos como aditivos dietéticos, como capacidad estimulante del apetito, mejora en la utilización de los alimentos y el crecimiento, y en el refuerzo del sistema inmunitario innato con el aumento de la resistencia contra las enfermedades bacterianas y parasitarias (Sutili et al., 2017). El uso de aceites esenciales de ajo, timol y/o carvacrol en alimentos funcionales para acuicultura se ha probado y demostrado su efectividad en la lucha contra los desafíos bacterianos y parasitarios, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

Objetivos

El objetivo final del ensayo es estudiar el efecto potencial de la adición de aditivos en los piensos para el engorde de peces marinos en la prevención frente a la infección por el ectoparásito *S. chrysophrii*. Para la consecución del objetivo final de esta tarea se ha realizado un trabajo previo que incluyó la generación de una población de peces previamente infectados por el parásito (donantes) y la realización de un ensayo de alimentación de 65 días de duración usando peces libres de parásitos (receptores) a los que se alimentaron con las diferentes dietas experimentales y una dieta control. Finalmente, se validó la eficiencia de los EOs frente al ectoparásito mediante la realización de un reto (“challenge”) de cohabitación durante 4 semanas, exponiendo los diferentes grupos de peces receptores (dietas control y experimentales) con los peces donantes (infestados) con el ectoparásito, peces que estaban previamente marcados, y manteniendo las mismas dietas en cada grupo. De esta manera se ha evaluado la existencia del efecto de la alimentación con los aditivos ensayados sobre la parasitación en los peces receptores.

Metodología

La metodología que se describe a continuación hace principalmente referencia a la descripción del diseño experimental usado para la validación de los aditivos evaluados en el presente estudio. En relación a los métodos usados para el procesamiento y análisis de las muestras, éstos se encuentran detalladamente descritos en anteriores secciones de la presente memoria.

Obtención de peces infestados exclusivamente con el ectoparásito *Sparicotyle chrysophrii*

Generalmente en la zona este del Mediterráneo, las parasitaciones branquiales más habituales por monogéneas en doradas engordadas en jaulas están producidas por dos especies distintas de parásitos: *Sparicotyle chrysophrii* y *Furnestinia echenis*. Se trata de dos tipos de parásitos diferentes entre otras características, por su patogenicidad, siendo las infecciones por *S. chrysophrii* las que presentan mayores problemas, pero que muy frecuentemente se encuentran realizando parasitaciones mixtas con las dos especies. Por lo tanto, el primer paso que se tuvo que realizar fue la generación de una población de doradas infectadas exclusivamente por *S. chrysophrii*. Para proceder a la generación de este stock de peces infectados se obtuvieron, por un lado, peces libres de parásitos (juveniles de poco peso traídos de un criadero –libres totalmente de parásitos- y preengordados en las instalaciones del IRTA usando sistemas de recirculación) y por el otro lado, peces altamente parasitados traídos directamente de las jaulas de engorde de la empresa Culmarex situadas en Sagunto (Valencia). Una vez en el laboratorio

parte de los peces parasitados provenientes de las jaulas se sacrificaron mediante desmedulación siguiendo el protocolo de sacrificio aprobado para la especie por el comité de ética del IRTA, se diseccionaron las branquias y se aislaron los adultos y juveniles diferenciados de *S. chrysophrii* junto con las laminillas branquiales a las que estaban adheridos. Una vez aislados y confirmada la ausencia de ejemplares de *Furnestinia* sp. Que pudieran haber contaminado el stock, se agruparon los ejemplares de *Sparicotyle* sp. En grupos de 10 individuos (junto con las laminillas branquiales) que mediante una pipeta Pasteur se depositaron sobre la branquia izquierda de los peces libres del parásito que previamente habían sido anestesiados (MS-222, 20 ppm), revisando que las laminillas y parásitos quedaran retenidos por la branquia del pez (si alguna laminilla se escapaba o era liberada por los movimientos branquiales se rescataba del agua y se volvía a introducir en la branquia). Una vez realizada la inserción de los parásitos en la branquia de los peces, éstos se pasaban a agua limpia y se aislaban en un tanque. Esta maniobra se realizó durante varios días a lo largo de dos meses hasta alcanzar un número suficiente de individuos infectados. Una vez constituido el stock de peces infectados periódicamente se sacrificaron algunos ejemplares a fin de comprobar la existencia de infección y estimar el número de *Sparicotyle* sp. presentes en las branquias.

Alimentación con los aditivos experimentales

Una vez establecida la población de peces infectados con el parásito, se pudo iniciar el ensayo nutricional con los piensos a los que se habían adicionado los aditivos comerciales. Los productos a testar fueron suministrados por las empresas NUTRIAD SA y TECNOVIT SA (NUTRIAD SA, aditivos: A7, B8, C9, D10, E11; TECNOVIT SA, aditivos: AROTEC-A[®], AROTEC-G[®]). Los nombres y formulaciones de los aditivos evaluados de NUTRIAD SA se han mantenido confidenciales durante toda la ejecución del proyecto. Respecto a los aditivos de TECNOVIT SA, estos se han descrito como productos microencapsulados compuestos por aceite esencial de ajo (AROTEC-A[®]) y aceite esencial de ajo con timol y carvacrol (AROTEC-G[®]), habiéndose añadido en pienso extrusionado en una relación de 10 Kg/Ton (1%) y 5 Kg/Ton (0,5%) respectivamente. Los piensos fueron fabricados por Sparos Ltd. (Portugal) usando una formulación standard de pienso para dorada (46% proteína; 18% grasa; energía: 21,5 MJ/Kg).

Los peces libres de parásitos y pre-engordados que se habían mantenido en recirculación en las instalaciones del IRTA se muestrearon (peso y longitud standard) y se distribuyeron en los tanques de las pruebas a razón de 25 individuos por tanque. Los peces libres de parásitos fueron trasladados a los tanques reservados para la prueba de alimentación con las 5 dietas experimentales. Cada tratamiento constaba de 3 tanques (450 litros, conectados a un sistema de recirculación IRTAmar[®], con temperatura constante de $22,0 \pm 0,5$ °C; niveles de oxígeno cerca del 90% de saturación, salinidad 35-36 ppt) con 25 peces cada uno (en total 75 peces por tratamiento). El día 12 de septiembre se hizo el muestreo final, una vez transcurridos aproximadamente 50 días de alimentación con las dietas.

Ensayo de cohabitación

El día 12 de septiembre, coincidiendo con el muestreo final de alimentación, se seleccionaron 27 peces (receptores) de cada tratamiento y se trasladaron a 4 tanques de 450 litros, tanques

cuadrados de esquinas redondeadas donde es más fácil comprobar el comportamiento y la alimentación de los peces. En estos tanques se procedió a realizar la segunda parte del ensayo, de cohabitación con peces infectados experimentalmente con *Sparicotyle*. Para este ensayo, la proporción inicial de peces receptores (no infectados): donantes (infectados) fue de 3:1, es decir en cada tanque se situaron 27 peces receptores y 9 infectados (donantes). Los peces donantes se seleccionaron del stock de los tanques de peces parasitados y se han diferenciado de los peces receptores con marcación por corte de aleta caudal. Cada tanque (receptores y donantes) se siguió alimentando con la misma dieta correspondiente a cada ensayo hasta el final del ensayo. Dada la baja parasitación de los individuos donantes, se procedió a añadir más peces donantes manteniendo una proporción 2 receptores (27 peces) 1 donante (14 peces) a la mitad del ensayo de cohabitación. A las cuatro semanas de cohabitación, se dio por finalizado el ensayo y se muestrearon todos los peces de cada uno de los tanques, separando los individuos receptores de los donantes. Los peces se pesaron, midieron (longitud standard) y guardaron de forma individualizada en bolsas marcadas. Los peces se congelaron a -20 °C para un posterior recuento de los parásitos presentes. Para cada ejemplar de determinó el número de parásitos existente en todas las laminillas de los arcos branquiales tanto del lado derecho como del izquierdo (recuento total de parásitos), diferenciándose cuatro categorías: adultos, juveniles, larvas y huevos de acuerdo a las características morfológicas.

De forma similar, se tomaron muestras biológicas para los mismos parámetros descritos en la Tarea A2.1 y su procesado se encuentra detallado anteriormente (ver sección de la metodología para el análisis de parámetros del mucus epidérmico en la Tarea A1.1, mientras que los análisis bioquímicos, histológicos y transcriptómicos están descritos en la Tarea A2.1). La metodología usada para el análisis estadístico de los resultados de las distintas variables es similar al ya descrito en la Tarea A2.1.

Resultados

Resultados de crecimiento (fase ensayo nutricional – sin presencia del ectoparásito)

En la siguiente tabla (Tabla 34) se muestran los resultados de crecimiento somático en peso de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales antes de ser sometidos a un reto por cohabitación con peces portadores del ectoparásito.

Los peces alimentados con las dietas AROTEC-G® y Nutriad C9 fueron en media un 4% y 6% más pequeños en peso que los del grupo control, mientras que el resto de dietas experimentales no afectó el crecimiento somático en peso de los animales. Las citadas diferencias de crecimiento pueden ser debidas a una menor ingesta del alimento, reducción que potencialmente podría ser debida a una menor ingesta del alimento relacionada con su palatabilidad.

Tabla 34. Peso medio y desviación estándar de los peces en los muestreos inicial y final de la fase ensayo nutricional. Letras distintas (ab) y (xy) hacen referencias a la comparativa realizada entre las dietas con aditivos proporcionados por las empresas TECNOVIT y NUTRIAD, respectivamente (ANOVA), ya que la distinta naturaleza de los aditivos evaluados hace que no sea recomendable su análisis integrado y, por tanto, los aditivos proporcionados por cada empresa se han comparado por separado en relación al grupo control.

Fecha muestreo	18/07/17	12/09/17
Dieta	Peso (g)	Peso (g)
AROTEC-A®	40,4 ± 5,4 a	155,7 ± 21,4 ab
AROTEC-G®	40,4 ± 5,1 a	150,8 ± 14,9 b
Nutriad A7	40,4 ± 5,5 a	159,0 ± 24,3 x
Nutriad B8	40,3 ± 4,8 a	155,0 ± 15,5 xy
Nutriad C9	40,2 ± 4,9 a	148,9 ± 26,1 y
Nutriad D10	40,2 ± 5,1 a	161,8 ± 23,9 x
Nutriad E11	40,0 ± 5,3 a	153,7 ± 17,8 xy
Control	40,2 ± 4,7 a	157,8 ± 14,2 a axy

Resultados de crecimiento (fase ensayo cohabitación con el ectoparásito)

Al final del periodo de cohabitación, sólo los peces alimentados con la dieta Nutriad C9 mostraron un crecimiento 21% inferior que el grupo control, mientras que el crecimiento en el resto de los grupos experimentales fue similar al del grupo control.

En la Tabla 35 se muestran los resultados de crecimiento somático en peso de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales. Como ya ha sido mencionado anteriormente con los resultados del ensayo nutricional, dichos resultados parecen ser debidos a una menor ingesta de la dieta Nutriad C9 por parte de los peces, pues la observación diaria de los tanques indicó que en ese grupo experimental sobraba más alimento no ingerido en comparación con el resto de los grupos experimentales, resultado que podría venir dado por la presencia de algún ingrediente en el aditivo que afectara el gusto y palatabilidad de la dieta, reduciendo así su consumo por parte del pez. En el caso de los peces alimentados con la dieta AROTEC-G®, las diferencias de crecimiento desaparecieron durante el periodo de cohabitación con el parásito, si bien, todavía existe una tendencia, aunque no significativa, de que los peces alimentados con dicho alimento presenten un ligero menor crecimiento.

Estos resultados podrían venir dados por una adaptación con el tiempo de los peces al alimento, aunque es recomendable que se mejora la encapsulación de los EOs para reducir sus potenciales efectos aversivos sobre la palatabilidad del alimento.

Tabla 35. Peso medio y desviación estándar de los peces en los muestreos intermedio y final de la fase ensayo cohabitación con el ectoparásito. Letras distintas (ab) y (xy) hacen referencias a la comparativa realizada entre las dietas con aditivos proporcionados por las empresas TECNOVIT y NUTRIAD, respectivamente (ANOVA), ya que la distinta naturaleza de los aditivos evaluados hace que no sea recomendable su análisis integrado y, por tanto, los aditivos proporcionados por cada empresa se han comparado por separado en relación al grupo control.

Fecha muestreo	22/09/17	31/10/17
Dieta	Peso (g)	Peso (g)
AROTEC-A®	161,9 ± 23,4 a	204,8 ± 28,7 a
AROTEC-G®	151,5 ± 13,4 a	195,4 ± 21,7 a
Nutriad A7	165,3 ± 24,8 x	201,9 ± 31,2 x
Nutriad B8	158,9 ± 15,8 x	201,2 ± 20,6 x
Nutriad C9	154,7 ± 26,5 x	161,4 ± 28,5 y
Nutriad D10	165,1 ± 21,1 x	197,5 ± 26,3 x
Nutriad E11	155,0 ± 18,6 x	196,1 ± 30,4 x
Control	162,1 ± 15,4 a x	205,4 ± 23,9 ax

Composición proximal del filete

En los resultados de la composición proximal del filete de los peces alimentados con las distintas dietas experimentales no se han observado diferencias significativas en los parámetros evaluados (proteína, grasa, humedad y cenizas) entre los grupos experimentales (Tabla 36). Sin embargo, en esta tabla no se presentan los resultados analíticos de todas las dietas, sino que a partir de los resultados obtenidos relativos a los niveles de parasitación (final ensayo de cohabitación, ver sección) y tras consultarlo con las empresas participantes en este ensayo, sólo se presentan los resultados relativos a la calidad del filete de los peces alimentados con las dietas que contenían los aditivos AROTEC-A® y AROTEC-G® (TECNOVIT-FARMFAES) y Nutriad C9 y Nutriad D10 (NUTRIAD SA).

Tabla 36. Composición proximal del filete (en %[p/p], expresión de resultados sobre sustancia natural; promedio ± desviación estándar) de doradas (*Sparus aurata*) alimentadas con las dietas experimentales seleccionadas: AROTEC-A®, AROTEC-G®, Nutriad C9 y Nutriad D10.

Dieta	Proteína (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)
AROTEC-A®	22,1 ± 0,0	5,5 ± 0,5	71,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1
AROTEC-G®	21,4 ± 0,1	5,2 ± 0,1	73,1 ± 0,7	1,3 ± 0,1
Nutriad C9	21,0 ± 0,4	4,9 ± 0,0	72,3 ± 0,4	1,4 ± 0,1
Nutriad D10	21,5 ± 0,7	4,8 ± 0,1	72,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0
Control	21,5 ± 0,4 a	5,2 ± 0,2	73,2 ± 1,8 a	1,4 ± 0,0

Teniendo en cuenta que la inclusión de los ingredientes no afectó la formulación basal de la dieta en términos de su contenido en harina y aceite de pescado, así como tampoco de otras fuentes alternativas de proteína y grasa, y teniendo en cuenta el contenido final de grasa en el filete en comparación con los peces de la Dieta control, se descartó proceder a caracterizar el perfil de ácidos grasos del filete en este estudio.

Respuesta inmune no específica en suero

Lo datos de los parámetros inmunológicos evaluados en plasma sanguíneo a final del ensayo nutricional en las doradas alimentadas con las distintas dietas formuladas con varios aditivos para combatir una parasitación por el monogenea *Sparicotyle* indican que la respuesta inmune humoral no se ha visto significativamente afectada por ninguna de las dietas experimentales.

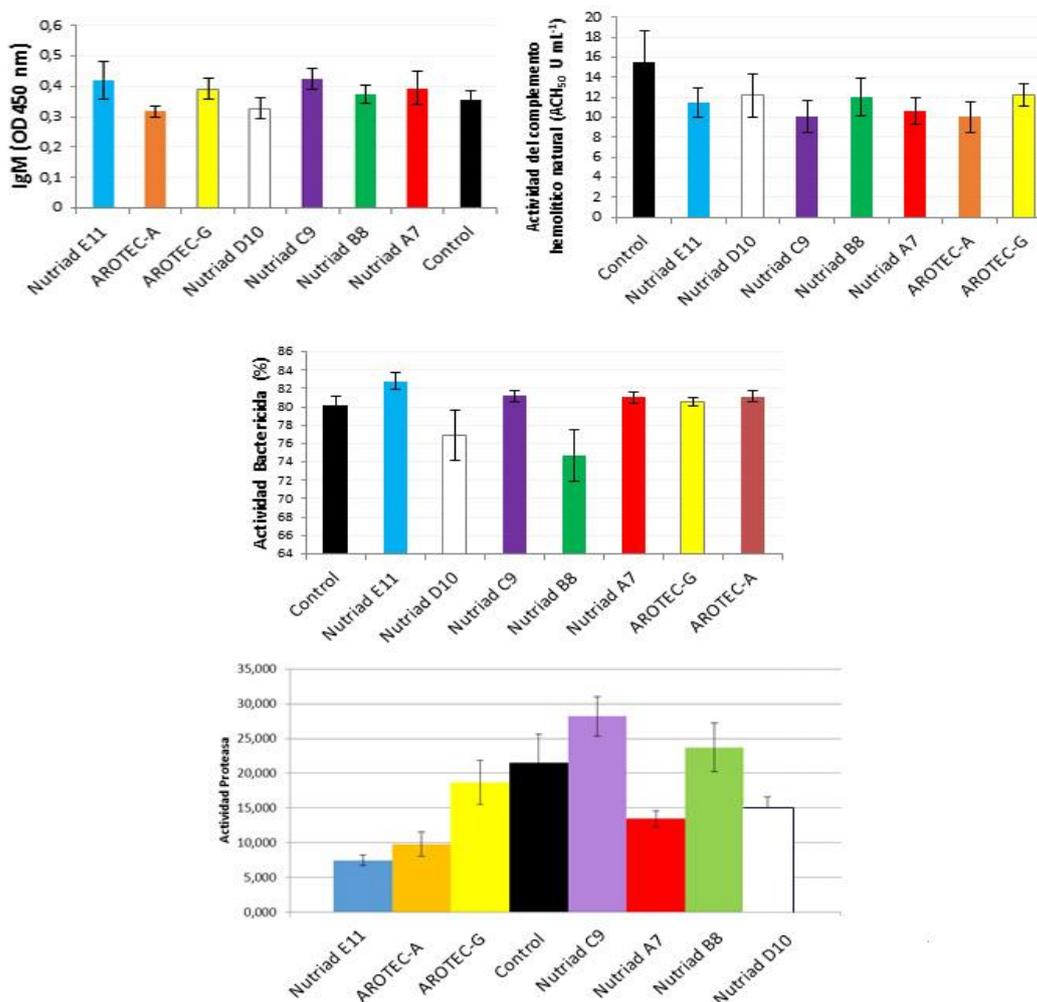


Figura 128. Parámetros inmunológicos evaluados en suero de doradas alimentados con diferentes dietas experimentales a final de 65 días de ensayo nutricional. Las barras verticales indican el error standard de la media.

No se han observado diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los resultados de inmunoglobulina-M, actividad del complemento hemolítico natural, actividad bactericida y actividad de proteasa se encuentran ilustrados en la Figura 128.

Marcadores de estrés en mucus epidérmico

Los resultados relacionados con el efecto de los aditivos en la dieta sobre los distintos marcadores del mucus epidérmico como indicadores del estado de salud y de la condición general del animal (ver Tarea A.1) sólo fueron analizados en el grupo de peces alimentados con la dieta que contenía el aditivo AROTEC G[®], pues ésta fue la dieta que resultó en los niveles más bajos de parasitación en relación al grupo control (dieta sin aditivo) y crecimiento similar a ésta. El resto de tratamientos experimentales fue descartado una vez contrastados los datos del ensayo con las empresas que cedieron sus aditivos a evaluar. Los datos obtenidos relativos a los biomarcadores clásicos del estrés en mucus epidérmico (cortisol, el lactato y la glucosa, y sus relaciones) para las doradas alimentadas con la dieta AROTEC G[®] se encuentran representados en la Tabla 37 y la Figura 129.

Los resultados revelaron una disminución significativa de los metabolitos en mucus como la glucosa, lactato y cortisol en los animales alimentados con AROTEC-G[®], lo que sugiere una mejora en el estado general de la salud y el bienestar de los peces. Cuando calculado la ratio metabolito/proteína, se observa que el cortisol se ve igualmente significativamente reducido en el mucus de los animales alimentados con el aditivo.

Tabla 37. Respuesta de los metabolitos en mucus epidérmico y respectivas ratios a las dietas experimentales control y AROTEC-G[®] a final del ensayo nutricional en dorada. T-Student (* P < 0,05); ** P < 0,01).

Marcador	Dieta Control	Dieta AROTEC-G [®]
Glucosa (µg/mL)	13,43 ± 3,95	6,88 ± 1,63 *
Lactato (µg/mL)	9,80 ± 2,62	3,62 ± 1,09 *
Cortisol (ng/mL)	3,47 ± 0,85	0,35 ± 0,05 *
FRAP (µmol/mL)	1923 ± 244	1790 ± 315
Proteína (mg/mL)	16,73 ± 2,22	12,86 ± 1,77
Glucosa/Pr (µg/mg)	0,74 ± 0,16	0,60 ± 0,17
Lactato/Pr (µg/mg)	0,46 ± 0,05	0,31 ± 0,12
Glucosa/Lac (mg/mg)	0,69 ± 0,14	0,77 ± 0,15
Cortisol/Pr (ng/g)	208,0 ± 48,80	31,85 ± 7,03 **
FRAP/Pr (µmol/mg)	114,0 ± 16,9	139 ± 23,1

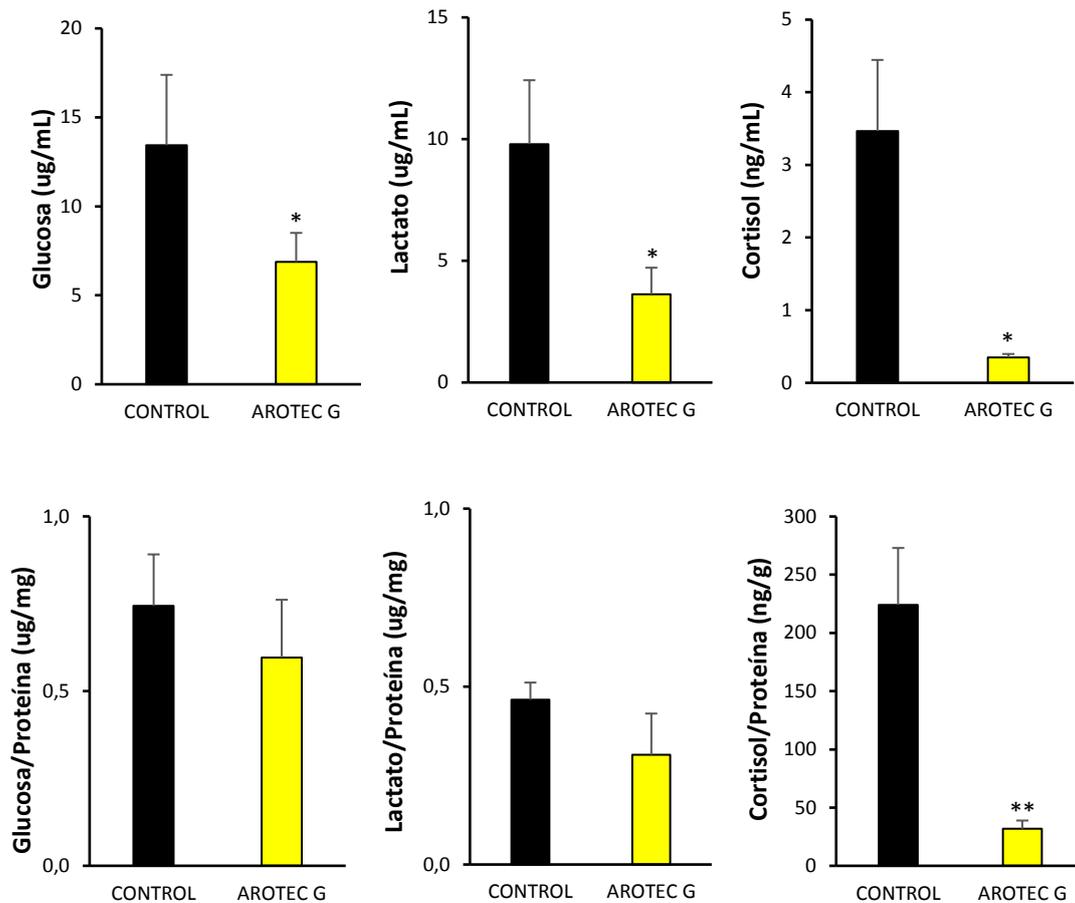


Figura 129. Respuesta de los metabolitos en mucus epidérmico y respectivas ratios a las dietas experimentales control y AROTEC-G® a final del ensayo nutricional en dorada. T-Student (* P < 0,05); ** P < 0,01).

Además del análisis de los metabolitos, se ha evaluado el crecimiento de bacterias (*E. coli*, *P. anguilliseptica* y *V. anguillarum*) en el mucus de las doradas alimentadas con las dietas experimentales. Las curvas de crecimiento de dichos patógenos (*V. anguillarum* y *P. anguilliseptica*) y respectivas tasas de inhibición están representadas en la Figura 130.

La presencia del aditivo AROTEC-G® en la dieta de las doradas inhibió significativamente el crecimiento de bacterias patógenas específicas de peces en el mucus epidérmico a las 12 y 14 h de incubación. Frente a un patógeno no específico, como es el caso de la *E. coli*, la respuesta parece no ser significativamente afectada por la dieta, aunque se observe una tendencia de aumento del porcentaje de inhibición de la bacteria en mucus de peces alimentados con el aditivo.

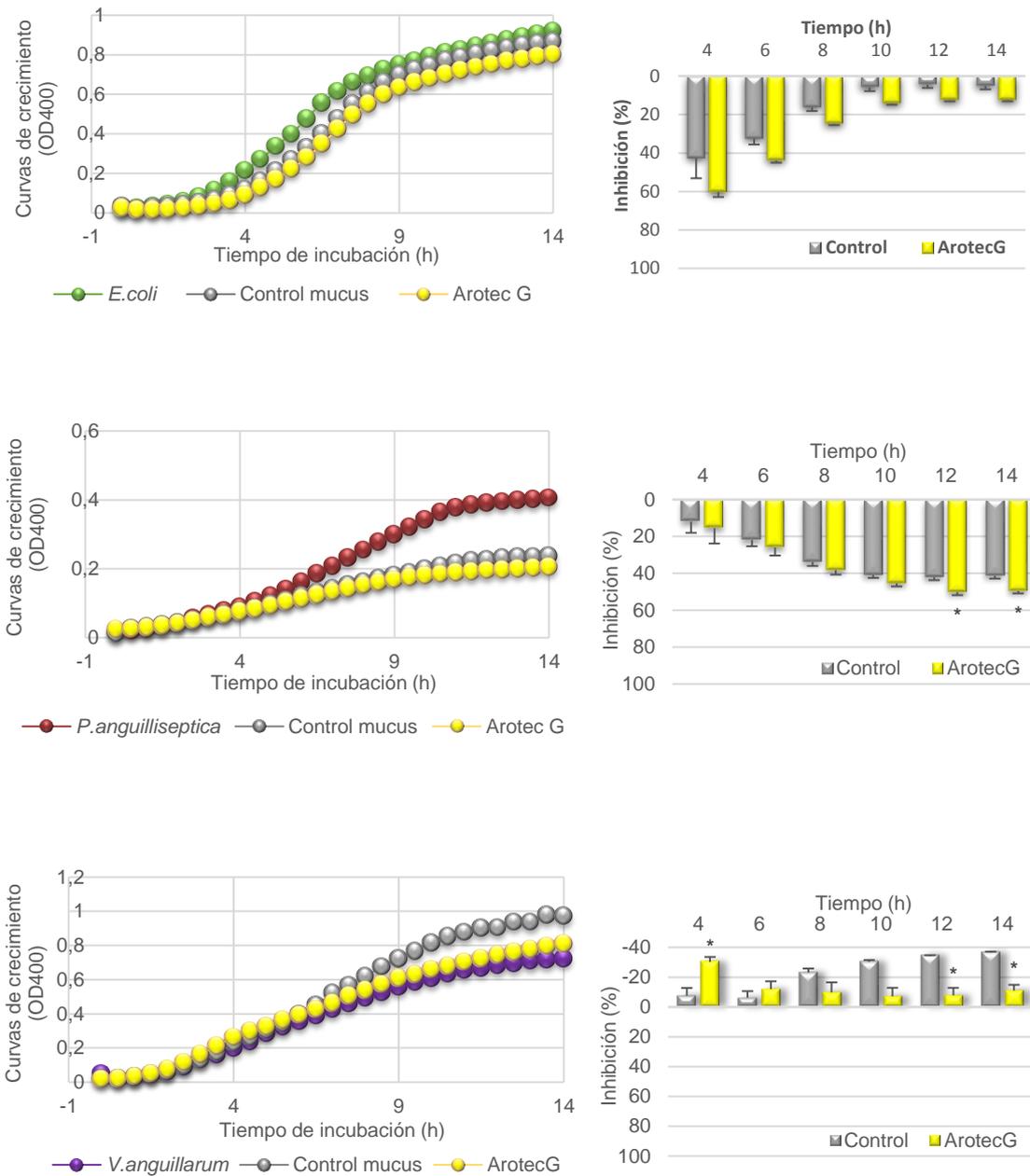


Figura 130. Derecha: resultados de absorbancia de cultivos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas anguilliseptica* y *Vibrio anguillarum* en mucus epidérmico de doradas alimentadas con dieta control y dieta suplementada con AROTEC-G®. Izquierda: Porcentaje de inhibición del crecimiento de respectivas bacterias en los distintos tiempos de incubación (T-Student, * P < 0,05).

El conjunto de los resultados de los análisis de mucus epidérmico de las doradas demuestra que la administración del aditivo AROTEC-G® en la dieta promueve una disminución de la respuesta de los parámetros de estrés, indicando una mejora del status general de salud de los animales en comparación con la dieta control. Por otro lado, el aumento significativo de la inhibición del crecimiento de bacterias específicas de peces en el mucus de doradas alimentas con el aditivo

revela un aumento de la capacidad inmunoprotectora del mucus/piel señalando su potencial eficiencia contra bacterias y ectoparásitos.

Microbiota intestinal

En el caso del intestino anterior, los resultados obtenidos a partir de los patrones de DGGE mostraron agrupamientos de las muestras de los especímenes alimentados con la Dieta control (sobre 65%), los alimentados con las Dietas Nutriad E11 y AROTEC A[®] (aproximadamente un 60%) y la Dieta NUTRIAD D10 (sobre un 70%) (Figura 120). Por otro lado, los tratamientos Nutriad E11 y AROTEC A[®] fueron los que mostraron una mayor similitud de sus patrones de DGGE (aproximadamente un 50%), respecto a los ejemplares alimentados con la Dieta control (Figura 131). Por lo que se refiere al intestino posterior, también se pudo constatar un agrupamiento de los patrones de DGGE de ciertas dietas, como la Dieta Control, y las Dietas suplementadas con los aditivos experimentales NUTRIAD E11 y NUTRIAD D10, siendo sus similitudes (sobre un 70%) en general superiores a las detectadas en el caso del intestino anterior.

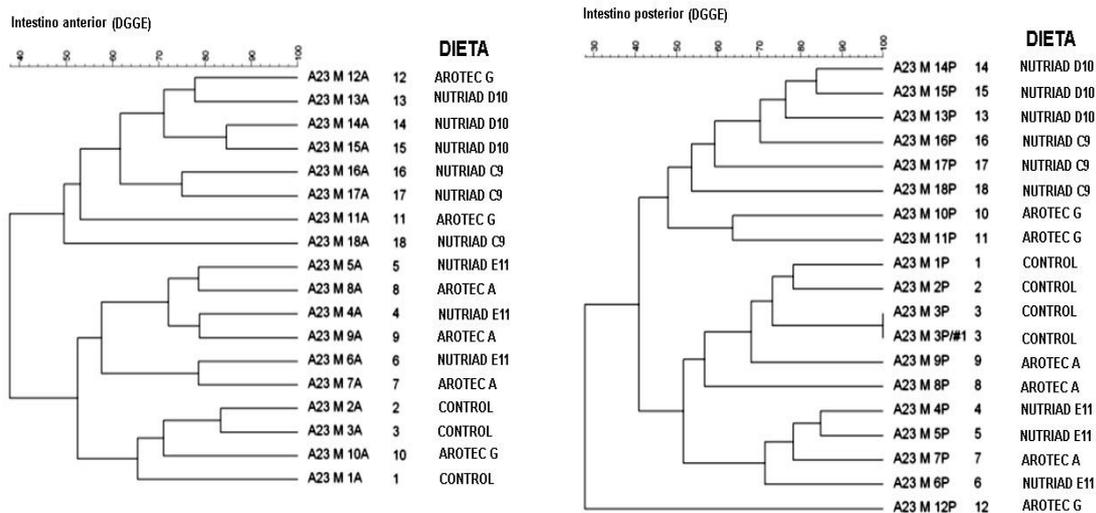


Figura 131. Análisis de los patrones de bandas de DGGE obtenidas a partir de las muestras de intestino anterior (izquierda) y posterior (derecha) de ejemplares de *Sparus aurata* alimentadas con una Dieta control y las dietas con los aditivos experimentales NUTRIAD D10, E11 y C9 (NUTRIAD), y los aditivos comerciales AROTEC A[®] y AROTEC G[®] (TECNOVIT-FARMFAES).

Tabla 38. Valores medios de los parámetros ecológicos de riqueza (R), índice de diversidad de Shannon (Ho) y de habitabilidad (Rr), obtenidos a partir de las muestras de intestino anterior y posterior de ejemplares de *Sparus aurata* alimentadas las dietas experimentales. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

		CÓDIGOS DIETAS					
		CONTROL	AROTEC A	NUTRIAD D10	NUTRIAD E11	AROTEC G	NUTRIAD C9
Diversidad	A	2,34±0,14	2,50±0,18	2,16±0,35	2,68±0,15	2,26±0,48	2,49±0,23
	P	2,26±0,19	2,47±0,15	2,44±0,07	2,71±0,26	2,02±0,51	2,62±0,26
Habitabilidad	A	42,91±13,01	47,58±15,01	34,16±20,41	65,16±20,32	46,91±37,86	52,75±19,48
	P	29,16±11,57	49,16±7,00	52,41±18,36	79,75±27 ^(ab)	22,25±13,85	77,16±30,92
Riqueza	A	13,00±2,00	13,67±2,31	11,33±3,51	16,00±2,65	13,00±5,29	14,33±2,89
	P	10,66±2,08	14,33±1,15	14,33±2,51	17,66±3,21	9,00±3,46 ^(cd)	17,33±3,51

El cálculo de los parámetros ecológicos que se muestran en la Tabla 2, parámetros determinados a partir de los patrones de bandas de DGGE anteriormente mostrados, no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos, respecto a la microbiota de las muestras del intestino anterior ($P > 0,05$). Por el contrario, sí se pudieron determinar diferencias significativas entre los valores de riqueza específica de la Dieta suplementada con AROTEC G[®] respecto a las Dietas NUTRIAD E11 y NUTRIAD C9, así como también en los valores de habitabilidad entre la Dieta control y las Dietas suplementadas con los aditivos experimentales NUTRIAD E11 y NUTRIAD C9 ($P < 0,05$).

Análisis transcriptómico

Dado que los resultados de parasitación han demostrado una mejor eficacia del AROTEC-G[®] respecto al resto de dietas, el análisis transcriptómico sólo se hizo en branquia y piel de este grupo, y así establecer el mecanismo de acción de dicho aditivo y comprender y su funcionamiento protector en relación con la parasitación de *Sparicotyle chrysophrii* (ver resultados prueba de validación). Aunque la dieta Nutriad C9 presentó igualmente eficacia en la disminución de ectoparásitos, la considerable diferencia de crecimiento en peso al final del ensayo de cohabitación llevó a su exclusión de los análisis, tras consultar dichos resultados con la empresa que cedió el aditivo.

El análisis del perfil transcriptómico de la **piel** demostró la modulación de 534 genes diferencialmente expresados (GDE) en los peces alimentados con el aditivo en comparación con la dieta de control. Entre ellos, 393 genes se han visto sobre-expresados ("Up") y 141 genes han mostrado un perfil de sub-expresión ("Down") por la presencia del aditivo en la dieta (Figuras 132 y 133). El análisis mediante interactomas de los genes diferenciante expresados en piel se realizó según descrito en la Tarea A2.1. y el total de interacciones se ilustra en las Figuras 134-140. Estos análisis indican que la dieta con inclusión de AROTEC-G[®] favorece los procesos de

procesamiento de ARN, biogénesis y transporte vesicular que podrían estar relacionados con un aumento de la respuesta secretora de la piel. El perfil transcriptómico en branquia indica que un número total de 759 genes se expresaron diferencialmente en branquias de doradas alimentadas con la inclusión de AROTEC-G® en la dieta. De éstos, 556 genes se sobre-expresaron y 203 genes presentaron una disminución de su expresión (Figuras 132 y 133).

El estudio del interactoma de **branquia** demostró una fuerte respuesta de esta mucosa a la inclusión del aditivo, habiéndose verificado que los genes prominentemente regulados en las branquias en el grupo alimentado con el aditivo están involucrados en las rutas de los procesos *redox*, metabólicos y sistema inmunitario. En particular, los procesos de inmunidad mediada por neutrófilos son preponderantes.

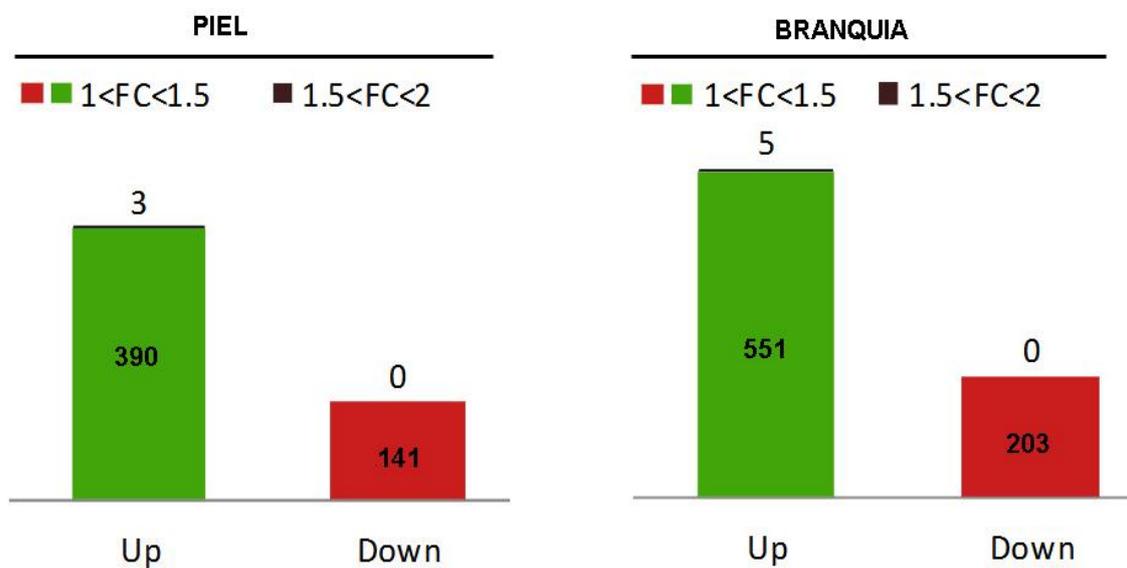


Figura 132. Genes diferencialmente expresados (GDE) en piel y branquia, después del ensayo nutricional con inclusión del aditivo AROTEC-G®. La mayoría de los DGE mostraron un patrón de expresión menor a 1.5 veces de cambio.

El mapa jerárquico sobre el total de genes diferencialmente expresado en los tejidos diana analizados, la piel y las branquias, muestra una clara segregación entre los grupos control y el grupo alimentado con el aditivo AROTEC-G®, lo que corrobora el carácter diferencial de los GDE entre ambos tratamientos (Figura 133).

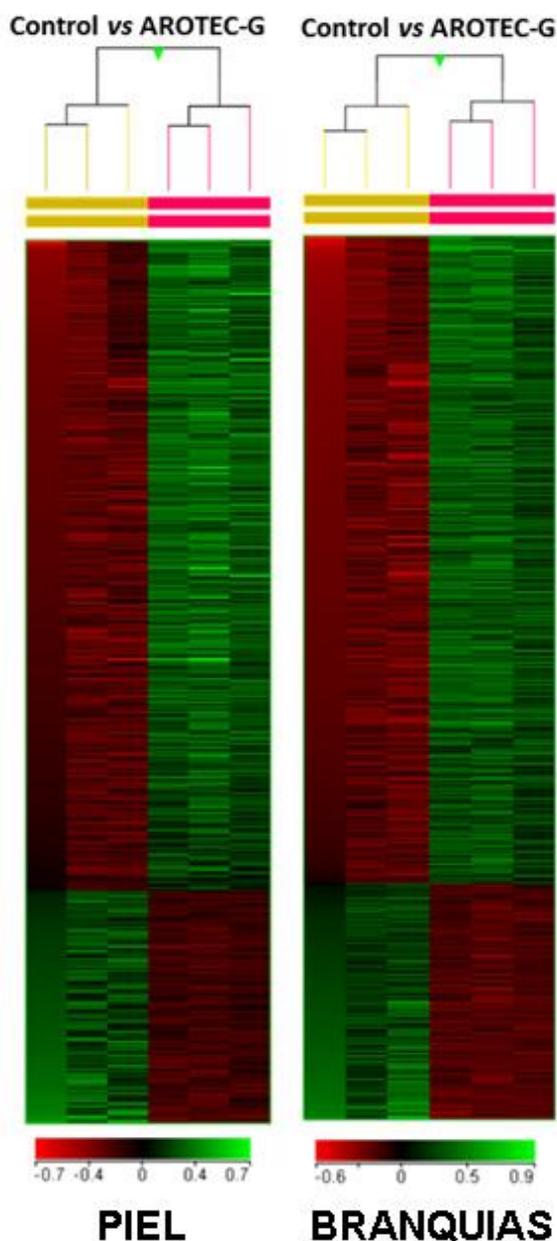


Figura 133. Mapa jerárquico de los genes diferencialmente expresados en piel (A) y branquias (B) de peces alimentados con el aditivo AROTEC-G®. Se representan los resultados para tres arrays (replicados biológicos) para cada una de las dietas evaluadas: dieta control (*cluster amarillo*); dieta AROTEC-G® (*cluster rojo*).

Los resultados del análisis transcriptómico y del interactoma de los genes diferencialmente expresados en relación a la dieta control permiten inferir que la suplementación de la dieta de doradas con AROTEC-G®, promueve una respuesta más marcada en la branquia, tejido diana del ectoparásito *Sparicotyle chrysophii*, que en piel (Figura 134). Sin embargo, los análisis de piel indican la activación de procesos biológicos que podrían explicar los resultados observados por otros análisis que indican un aumento de la secreción y capacidad inmune de esta mucosa (Figuras 135-140), tal y como se ha demostrado en los análisis realizados en el mucus

epidérmico. Es importante destacar que el aditivo evaluado tiene un efecto distinto según el tejido considerado, tal y como se muestra en la Figura 123, donde se muestra que el aditivo evaluado sólo afectó a un total de 45 genes en ambos tejidos diana de los 354 y 759 genes expresados diferencialmente en piel y branquia, respectivamente.

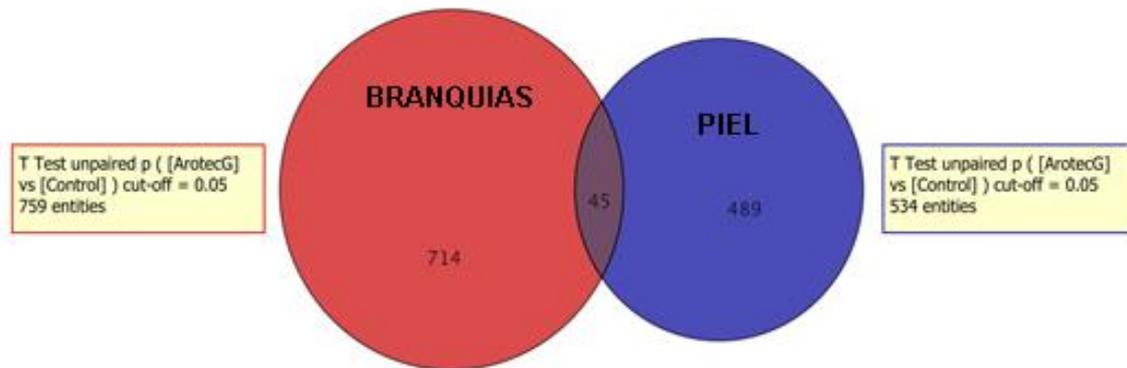


Figura 134. Diagrama de Venn representativo de los DGE en branquias (rojo) y piel (azul) de los juveniles de doradas alimentados con la dieta suplementada con AROTEC-G®.

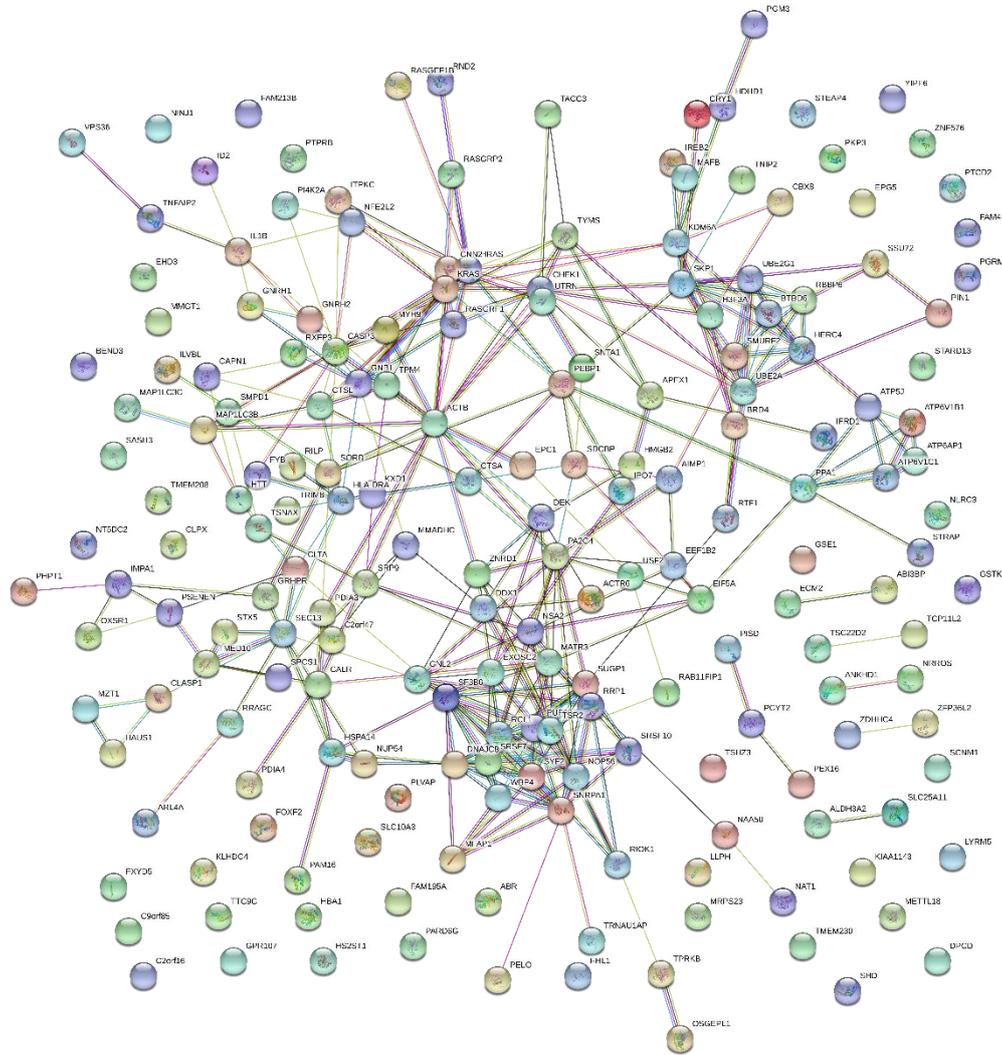


Figura 135. Interactoma general de la piel de peces alimentados con la suplementada con el aditivo AROTEC-G® en relación a los GDE representativos del total de procesos biológicos activados.

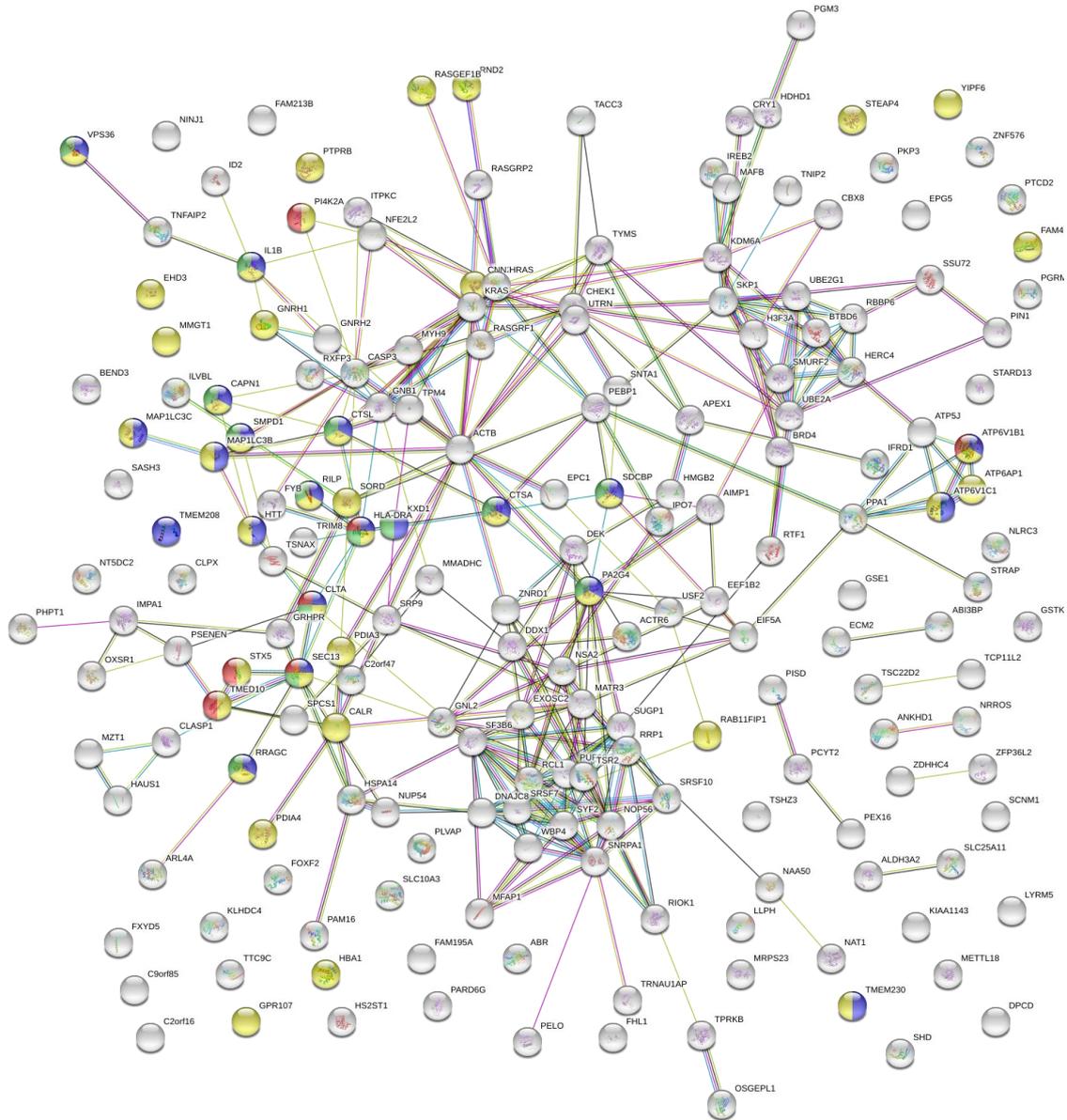


Figura 137. Interactoma de la piel de peces alimentados con la Dieta AROTEC-G® en relación a los genes implicados en el transporte vesicular (rojo), vesículas (amarillo), vacuolas (azul) y lisosoma (verde).

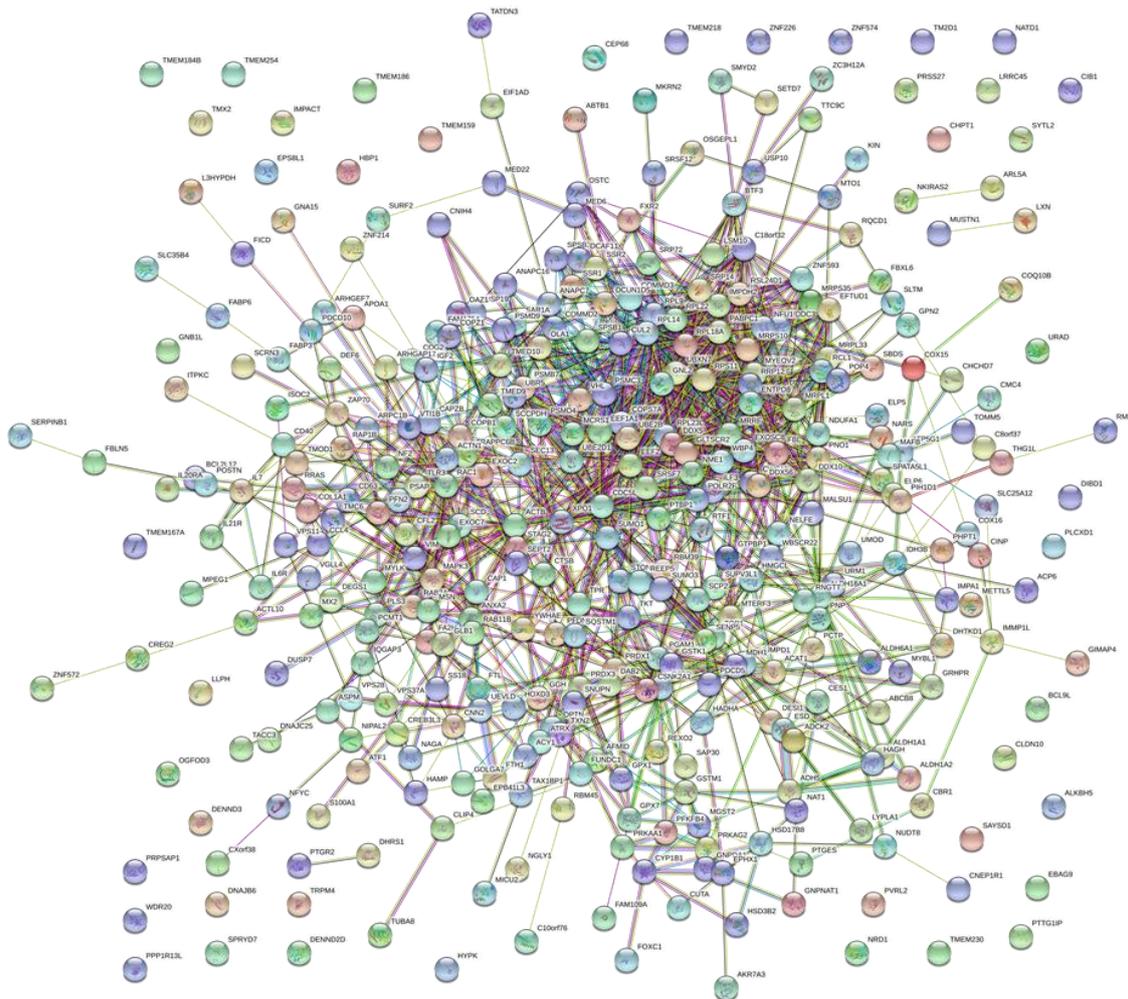


Figura 138. Interactoma general de la branquia de peces alimentados con la suplementada con el aditivo AROTEC-G® en relación a los GDE representativos del total de procesos biológicos activados.

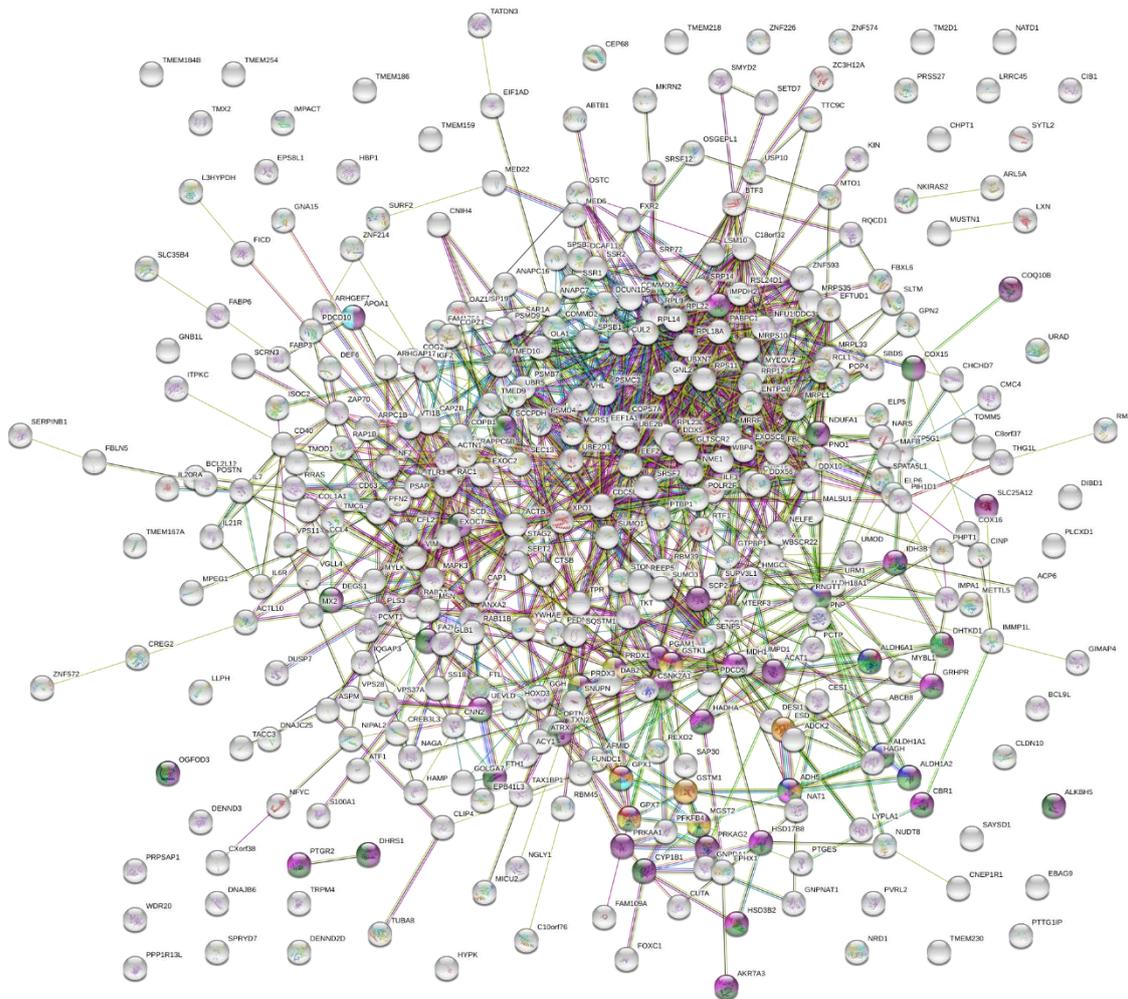


Figura 139. Interactoma de la branquia de peces alimentados con la Dieta AROTEC-G® en relación a los genes implicados en procesos de reducción-oxidación (lila), detoxificación celular (amarillo), oxidación de proteínas (azul celeste), actividad de oxireductasa (verde, rosa) y actividad de peroxidasa (rojo).

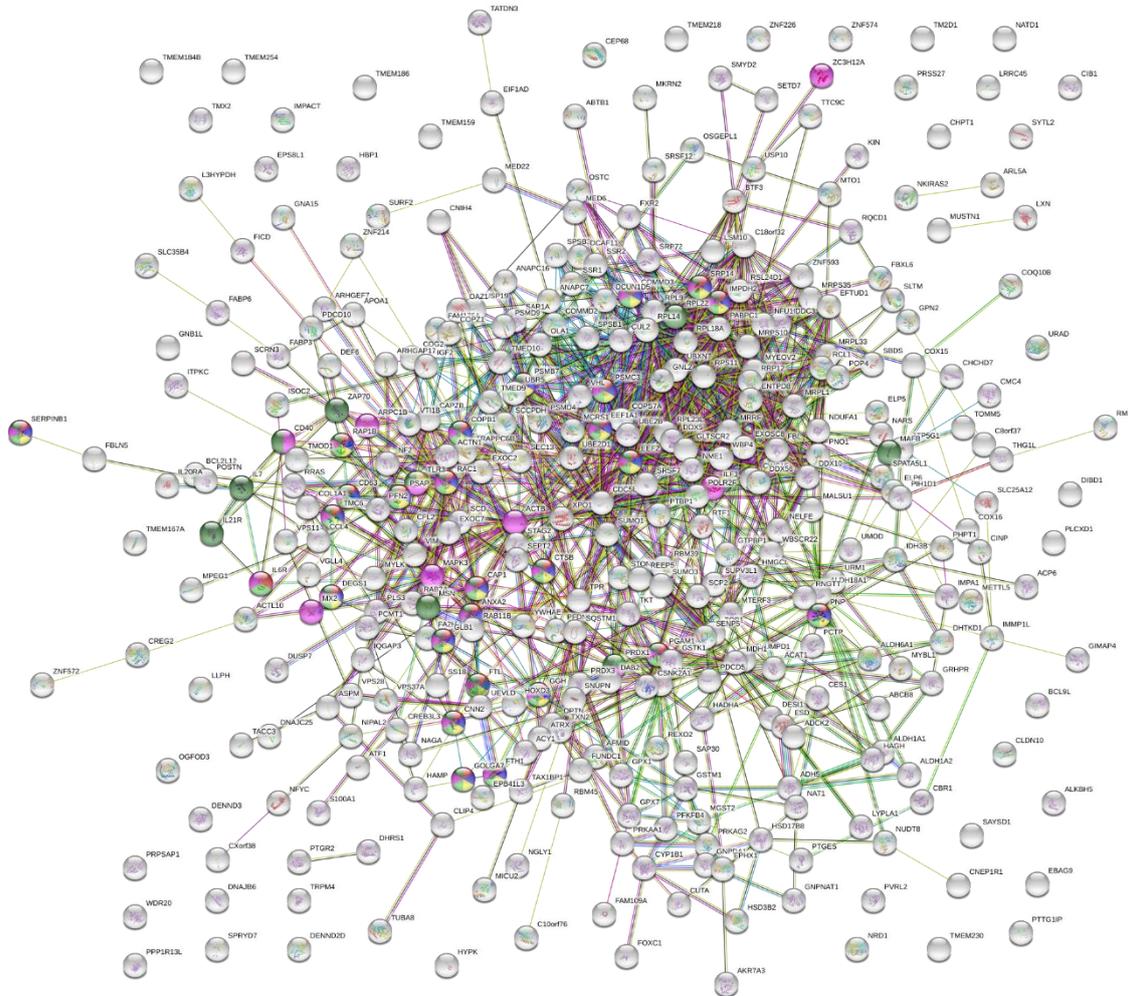


Figura 140. Interactoma de la branquia de peces alimentados con la Dieta AROTEC-G® en relación a los genes implicados en el proceso efector inmune (rosa), en procesos de inmunidad mediada por neutrófilos (rojo), degranulación de neutrófilos (azul oscuro), inmunidad mediada por leucocitos (verde claro), activación de leucocitos (verde oscuro) y activación de leucocitos mieloides (amarillo).

Resultados del análisis histológico en tejidos diana

A nivel estructural y morfológico, las branquias están constituidas por un soporte cartilaginoso central, un sistema vascular y un epitelio multiestratificado. Los filamentos branquiales sirven de soporte a las laminillas branquiales que constituyen la unidad respiratoria básica. Estas están formadas por un seno sanguíneo central, revestido y atravesado por células pilares y rodeado, a ambos lados por el epitelio respiratorio.

En los resultados de los análisis histológicos no se han observado diferencias significativas en el número de células mucosas en los tres tejidos diana: branquias, intestino o en piel. En general se observa un incremento de mucinas carboxiladas (Azul Alcian pH. 2,5) ricas en residuos de ácido siálico (lectina SNA), con la dieta AROTEC-G®, que contiene aceites esenciales. El resumen de los resultados más relevantes del estudio histopatológico de las branquias de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales se muestran en la siguiente Tabla 39.

Tabla 39. Resumen de las alteraciones histopatológicas en tejido branquial de ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales. La cuantificación es semicualitativa a partir de las observaciones llevadas a cabo por dos observadores independientes.

Alteración	Dietas experimentales							
	CONTROL	AROTEC A	AROTEC G	NUTRIAD A7	NUTRIAD B8	NUTRIAD D10	NUTRIAD E11	NUTRIAD C9
Epitelioquistes	8/0	2/2	0/0	8/1	0/0	0/1	0/0	1/13
Infiltración leucocitaria	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Hiperplasia con fusión lamelar	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Telangiectasia	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Edema	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Separación del epitelio lamelar	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

En el caso de del estudio histopatológico de branquia, los juveniles de dorada alimentados con la dieta control presentaron epitelioquistes, quistes del sanguinicola (*Digenea*, *Aporocotylidae*: *Cardicola aurata*), y diferentes estadios de desarrollo de monogeneas (*Furnestinia echeneis*); además de alteraciones genéricas (fusión de laminillas, telangiectasia/aneurismas, hipertrofias e hiperplasia, e infiltraciones leucocitarias) (Figuras 141 y 142).

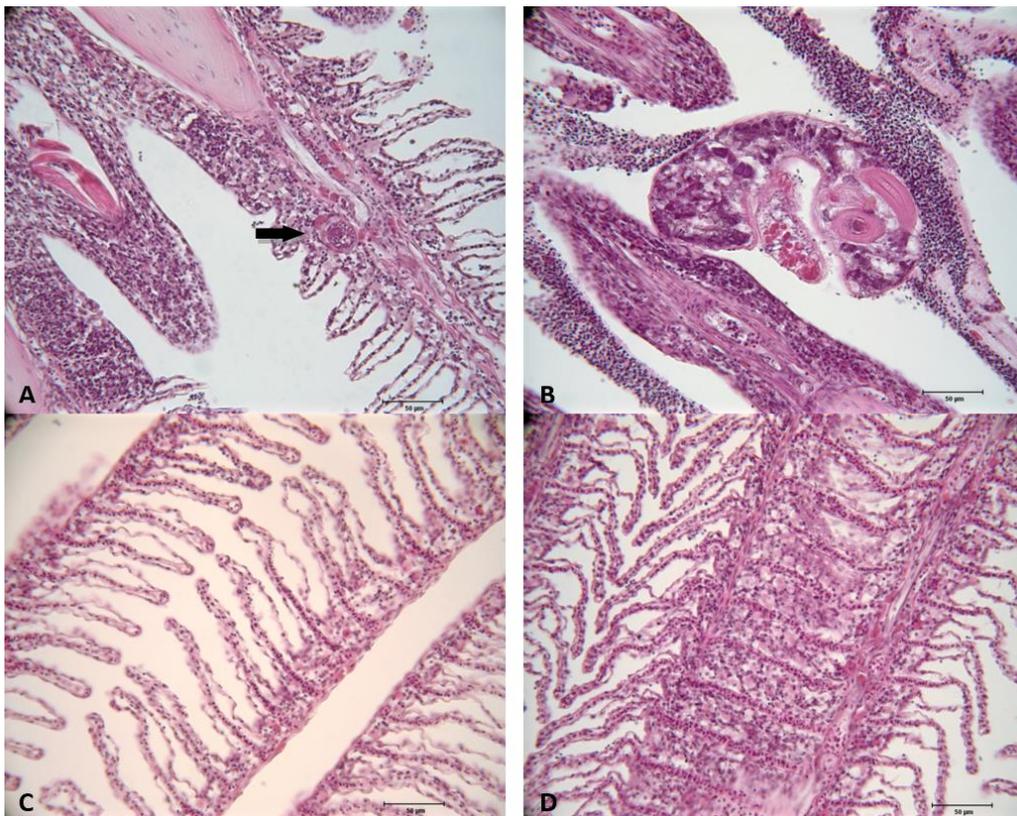


Figura 141 (A-D). Imágenes de cortes histológicos de branquia de juveniles de dorada (*Sparus aurata*) a final del ensayo nutricional (grupo alimentado con la Dieta control). A) Quistes de sanguinicola (*Cardicola aurata*) y filamentos de branquias edematosas; B) Infestación parasítica por monogenea (*Furnestinia echeneis*); C) Edemas en los filamentos branquiales; D) Señales de hipertrofias e hiperplasias celulares. Escala: 50 µm.

Es importante destacar que, si bien los animales usados en el estudio nutricional provenían de un cultivo controlado y estaban en buenas condiciones sanitarias, el ensayo se realizó en circuito abierto y, por lo tanto, sin un control estricto de la calidad, hecho que explicaría la elevada incidencia de alteraciones histopatológicas en los animales alimentados con la dieta control. Sin embargo, todas estas parasitosis y alteraciones histopatológicas disminuyeron considerablemente con la suplementación del aditivo AROTEC-G[®], resultados que estarían de acuerdo con la mejor condición y salud de este tejido, tal y como indican los resultados transcriptómicos.

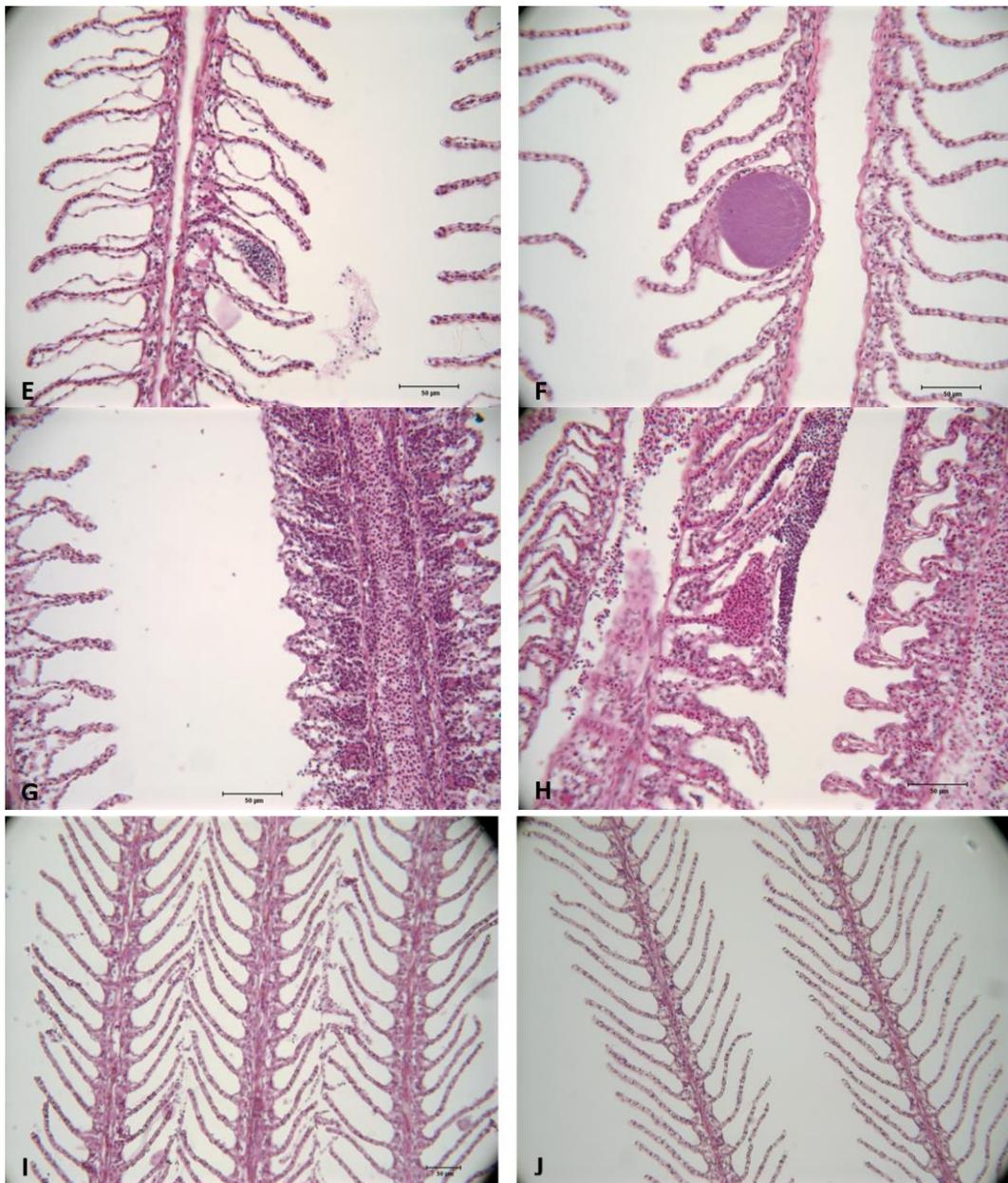


Figura 142 (E-H). Imágenes de cortes histológicos de branquia de juveniles de dorada (*Sparus aurata*) a final del ensayo nutricional (grupo alimentado con la Dieta control). E) Infiltraciones leucocitarias y edemas. F) Epiteliocistis. G) Acortamiento y fusión de laminillas. H) Telangiectasia/aneurismas. En las imágenes I y J se pueden observar filamentos branquiales de dorada sin incidencias histopatológicas. Escala: 50 µm.

Prueba de validación: resultados de prevalencia del ectoparásito

Finalmente, tras el ensayo nutricional en el que los peces fueron alimentados con las dietas experimentales, una fracción de éstos fue expuesto al ectoparásito mediante un ensayo de cohabitación con peces parasitados, con el fin de evaluar el potencial efecto protector de los

aditivos evaluados frente a un proceso de infestación por *S. chrysophii*. Tras 39 días de cohabitación, período durante el cual los peces fueron alimentados con las dietas experimentales, los resultados relativos a los conteos de parásitos sobre un total de 15 peces por dieta experimental mostraron diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$), tal y como se presenta en la Tabla 40 y Figuras 143 y 144.

El análisis estadístico de los resultados muestra que la mejor dieta en cuanto a la disminución del número total de ectoparásitos fueron las dietas AROTEC-G® (TECONOVIT-FARMFAES) y Nutriad C9 (NUTRIAD S.A.), siendo que el estadio de adultos de *S. chrysophii* es el que se vio significativamente más afectado por el efecto de las dietas experimentales y, consecuentemente, la presencia de huevos, aunque los estadios de juveniles y larvas presenten igualmente una tendencia de disminución. Las demás dietas experimentales demuestran no afectar significativamente la presencia del ectoparásito.

Tabla 40. Valores de parasitación (media \pm desviación standard) del número de parásitos *Sparicotyle chrysophii* (estadios de desarrollo: adultos, juveniles, larvas, huevos y total) contabilizados en cada grupo experimental. Las letras *a*, *b*, *c* indican diferencias significativas entre dietas con los aditivos comerciales AROTEC y control ($P < 0,05$). Las letras *x*, *y*, *z*, *v* indican diferencias significativas entre dietas con los aditivos experimentales NUTRIAD y control ($P < 0,05$).

Dietas	<i>Sparicotyle chrysophii</i>				
	Adultos	Juveniles	Larvas	Huevos	TOTAL
AROTEC-A®	12,0 \pm 7,0 a	6,5 \pm 4,0 a	4,1 \pm 2,1 a	18,9 \pm 19,1 b	22,7 \pm 10,4 a
AROTEC-G®	1,8 \pm 2,3 b	4,1 \pm 2,1 a	0,7 \pm 0,9 a	1,2 \pm 2,4 c	6,6 \pm 4,3 b
Nutriad A7	13,1 \pm 7,7 xy	7,8 \pm 5,5 x	4,1 \pm 4,7 x	35,7 \pm 53,1 y	25,1 \pm 13,9 x
Nutriad B8	19,8 \pm 8,2 x	9,7 \pm 4,6 x	7,8 \pm 6,4 x	55,3 \pm 50,6 z	37,3 \pm 16,8 x
Nutriad C9	1,9 \pm 1,1 y	2,3 \pm 1,2 x	1,0 \pm 1,1 x	3,3 \pm 4,8 v	5,2 \pm 2,6 y
Nutriad D10	18,4 \pm 13,6 xy	9,7 \pm 7,5 x	4,1 \pm 3,2 x	23,3 \pm 20,8 xy	32,3 \pm 21,7 x
Nutriad E11	12,4 \pm 6,5 xy	4,8 \pm 3,1 x	6,5 \pm 7,6 x	19,7 \pm 13,9 xyv	23,7 \pm 14,1 x
Control	14,1 \pm 7,0 a xy	10,9 \pm 3,8 a x	2,4 \pm 1,4 a x	9,3 \pm 11,6 a xv	27,4 \pm 11,3 a x

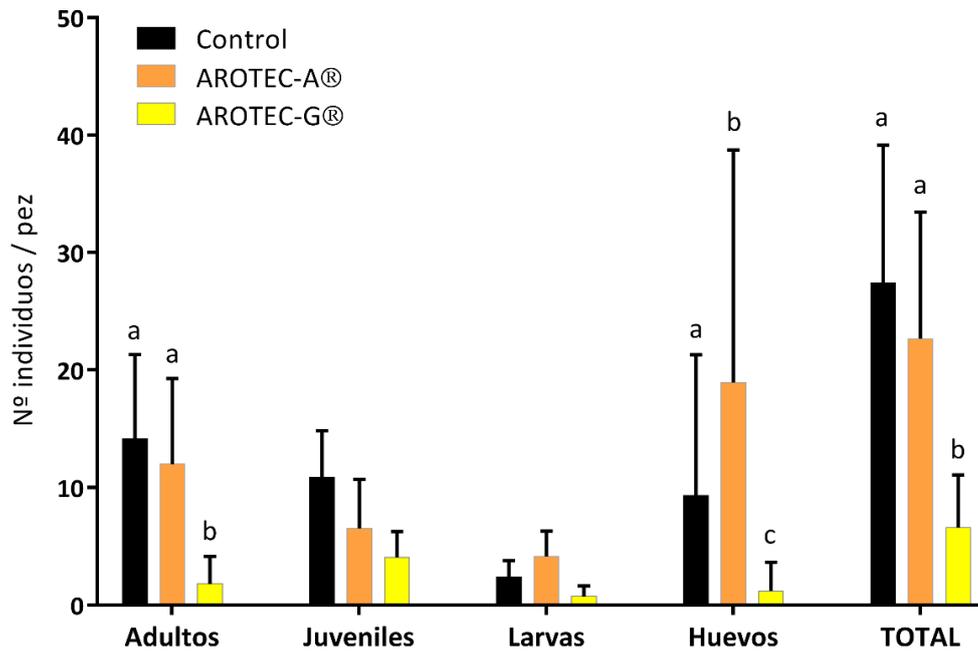


Figura 143. Número medio de adultos, juveniles, larvas, huevos y total del parásito *Sparicotyle chrysophii* por pez y dietas experimentales control, AROTEC-A® y AROTEC-G®. El valor total de parásitos considera los estadios de adulto, juveniles y larvas, con exclusión de los huevos. Las barras verticales indican la desviación standard y las letras las diferencias significativas entre dietas ($P < 0,05$).

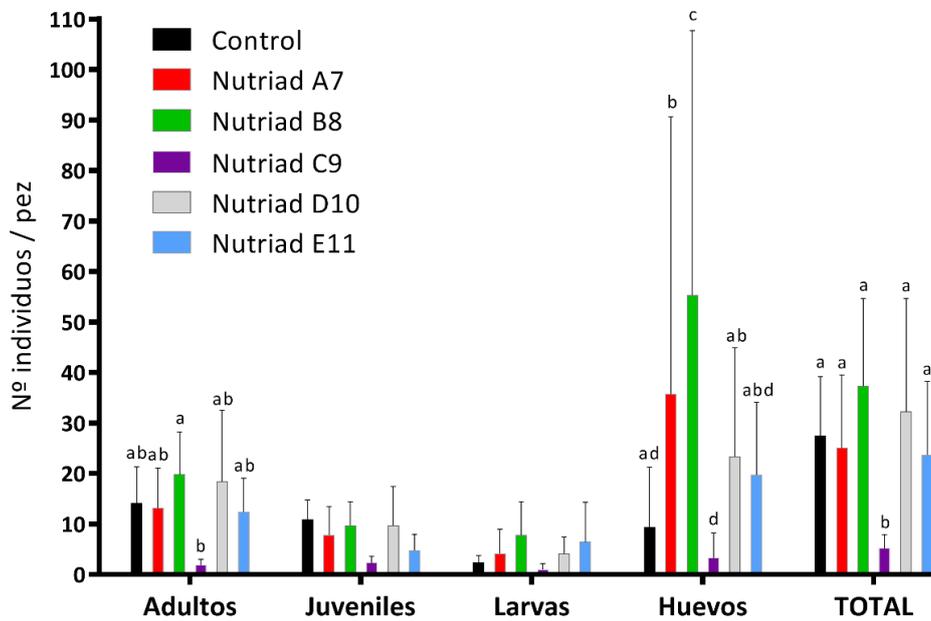


Figura 144. Número medio de adultos, juveniles, larvas, huevos y total del parásito *Sparicotyle chrysophii* por pez y dietas experimentales control, Nutriad A7, B8, C9, D10 y E11. El valor total de parásitos considera los estadios de adulto, juveniles y larvas, con exclusión de los huevos. Las barras verticales indican la desviación standard y las letras las diferencias significativas entre dietas ($P < 0,05$).

Conclusiones

Los resultados de la presente tarea diseñada para evaluar el efecto de distintos aditivos basados en aceites esenciales para combatir la parasitación con el monogénea *Sparicotyle chrisophrii* indican que la inclusión de AROTEC-G® en la alimentación de dorada mejora inequívocamente la salud de las branquias, su robustez y su capacidad inmunológica local, lo que indica su eficacia contra potenciales patógenos específicos de las branquias. La respuesta observada en piel sugiere que la inclusión de AROTEC-G® en la dieta promueve la inmunocompetencia de la primera barrera de defensa de los peces, apuntando a un potencial efecto de protección frente a ectoparásitos de piel, habiéndose observado una reducción de hasta el 78% de la prevalencia del ectoparásito en peces alimentados con la dieta suplementada con AROTEC-G®. Los resultados de la parasitación observados a final del ensayo de cohabitación apoyan los resultados obtenidos del conjunto de los análisis, demostrando la eficacia del aditivo.

Además, es importante destacar la reducción significativa de los biomarcadores de estrés evaluados en mucus epidérmico en los animales alimentados con AROTEC-G®, metabolitos como la glucosa, el lactato y el cortisol, lo que sugiere una mejora en el estado general de la salud y el bienestar de los peces. Cuando calculado la ratio metabolito/proteína, se observa que el cortisol se ve igualmente significativamente reducido en el mucus de los animales alimentados con el aditivo, mostrando los efectos beneficiosos del aditivo en la condición general y bienestar de las doradas alimentadas con AROTEC-G®.

Si bien el uso del citado aditivo no repercutió significativamente en el crecimiento somático de las doradas, sí que se observó una ligera tendencia a que los peces alimentados con la dieta que contenía el aditivo AROTEC-G® fueran algo más pequeños en peso que los de la Dieta control. A partir de estos resultados, la empresa está trabajando en mejorar el proceso de encapsulación del aceite esencial de ajo, pues se ha visto que este compuesto puede afectar negativamente el gusto del alimento y, por lo tanto, afectar a la ingesta del alimento. Sin embargo, los resultados relativos a la disminución de la prevalencia del parásito y mejora de la condición e inmunidad de la piel y las branquias superan en creces la ligera disminución en el crecimiento observada y, por consiguiente, la empresa está desarrollando un plan comercial de envergadura para llevar este aditivo al mercado acuícola nacional e internacional.

A partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto y teniendo en cuenta el diseño experimental y la aproximación analítica llevada a cabo en DIETApplus, la empresa TECNOVIT – FARM FAES, fabricante del aditivo AROTEC-G®, ha iniciado este mes de julio un ensayo en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con el fin de evaluar la inclusión del aditivo AROTEC-G® en dietas para salmón y evaluar su efecto promotor sobre la salud de piel y branquias. Además de evaluar los mecanismos de acción de dicho aditivo en el salmón, principal especie acuícola a nivel mundial, el ensayo también pretende evaluar su potencial aplicación frente a uno de los mayores problemas que afecta la industria salmonera, la infestación por el piojo del salmón (*Caligus rogercresseyi*). Dicho ensayo se está llevando a cabo en las instalaciones del *Institute of Aquaculture* en la Universidad de Stirling (Reino Unido), y en él participan varios miembros del consorcio DIETApplus, y está previsto que finalice a finales del mes de setiembre.

Tarea A2.3.2: Tratamiento frente a ectoparásitos mediante distintos aceites esenciales en corvina

La mayoría de las enfermedades en la corvina son de etiología parasitaria (Toksen et al., 2007; Duncan et al., 2008; Merela et al., 2009; Quilichini et al., 2009; Ternengo et al., 2010; Soares et al., 2012; entre otras). Desafortunadamente, este tipo de trabajos están mayoritariamente enfocados a describir el brote parasitario, pero no tratan sobre su posible control. Excepto por el estudio de Soares et al. (2012), todos se refieren a los parásitos monogeneos, que tienen un ciclo directo, lo que hace que sea extremadamente difícil romper el ciclo de vida y el control de dichos procesos de paratosis. Los medicamentos probados frente a paratosis producidas por monogeneos se presentan en Shinn y Bron (2012). Sin embargo, no existe información disponible sobre la corvina. En el caso de parásitos pertenecientes al grupo de Monogenea, éstos se tratan normalmente con praziquantel o levamisol, ambos de los cuales se usan en medicina humana y de animales terrestres (Redman et al., 1996; Robertson y Martin, 1993).

Dado que la corvina se cultiva normalmente en jaulas marinas, el tratamiento por balneación es factible, pero presenta dificultades técnicas (Ohno et al., 2009). Además, potencialmente podría tener un efecto perjudicial para el medio ambiente circundante, por lo que resulta más interesante buscar alternativas como compuestos naturales con actividad parasiticidas que puedan ser también administrados en el alimento. Dado que muchos productos farmacéuticos no tienen licencia para su uso en acuicultura, se realizó una revisión sobre el uso de aceites esenciales y como resultado en el presente estudio nos centramos en el uso de aceites esenciales con propiedades vermícidas. Los aceites esenciales han sido utilizados con éxito para tratar enfermedades en peces (Hirazawa, 2000; Pessoa et al., 2002; Macedo et al., 2010, El Gahlil, 2012; Maggiore et al., 2012; Militz et al., 2014).

Objetivos

El objetivo final del ensayo es estudiar el efecto potencial de la adición de aceites esenciales en los piensos para el engorde para corvina en la prevención frente a la parasitación de trematodos del género *Scianocotyle pancerii*, así como también evaluar el efecto de dichos aceites esenciales sobre el crecimiento y respuesta inmune no específica en corvina.

Metodología

Evaluación *ex vivo* de distintos aceites esenciales como tratamiento antiparasitario por balneación frente a *Scianocotyle sp*

Con el fin de evaluar la actividad vermícida de distintos aceites esenciales (canela, menta, timo, pino y bergamota) se procedió a realizar un ensayo *ex vivo* con explantes de branquias que estaban parasitadas. Varias estrategias fueron empleadas para abastecernos de parásitos y proceder al trabajo planteado en las instalaciones del IRTA. Inicialmente se realizó un viaje a una piscifactoría en la costa valenciana, a 5 horas del IRTA, y se recogieron varias branquias de peces recién muertos después de que se confirmara que estaban infectados con *Scianocotyle sp*. Posteriormente, estos tejidos parasitados fueron llevados al IRTA en condiciones húmedas

colocados en placas de Petri estériles llenas de papel mojado con agua de mar estéril. Las branquias se colocaron en las placas de Petri y luego se sellaron con parafilm en una caja isoterma. A su llegada, las branquias que contenían huevos se colocaron dentro de un tanque que contenía 15 peces alrededor de 100 g de peso. También se recolectaron dos lotes de 20 parásitos para colocarlos directamente sobre las branquias de 2 peces. Una quincena de días más tarde, los 2 juveniles expuestos directamente a parásitos adultos y otros 2 peces del tanque expuestos a huevos de parásitos, fueron sacrificados y sus branquias examinadas bajo la lupa binocular con el fin de detectar la posible presencia del ectoparásito (distintos estadios de desarrollo). Estos resultados previos mostraron que los 2 peces expuestos directamente al parásito estaban infestados; sin embargo, los que se expusieron al tanque con huevos de *Scianocotyle sp.* no lo estaban. Otra semana más tarde, se sacrificaron dos peces más, que nuevamente no tenían parásitos. Una semana más tarde (4 semanas), se sacrificaron dos peces y uno de ellos tenía algunos parásitos en las branquias, por lo tanto, los peces restantes (n = 9) también fueron sacrificados para estimar la prevalencia del parásito, que fue 2 de 11 (alrededor del 20%). A partir de estos resultados, y dada la escasa información publicada sobre el ciclo de vida de esta especie de parásito monogeneo se descartó el transporte de tejidos parasitados para su posterior uso con fines experimentales.

Por consiguiente, la actividad vermícida de distintos aceites esenciales (canela, menta, timo, pino y bergamota) se realizó en las instalaciones de la empresa ANDROMEDA Group, en su polígono de jaulas de cultivo de corvina en Villajoyosa (Alicante). Para ello, diez ejemplares de aproximadamente 1-2 kg de peso fueron sacrificados por el personal de ANDROMEDA durante la monitorización del estado de la salud de sus peces en cultivo. Una vez en tierra, los peces fueron examinados y en aquellas branquias donde se detectaron ejemplares adultos de *Scianocotyle sp.*, éstas fueron separadas del animal y mantenidas en vida en agua de mar hasta su exposición al aceite esencial, tal y como se indica en la Figura 145.



Figura 145. Fotografías tomadas en las instalaciones de Andromeda Group en Villajoyosa (Alicante) donde se evaluaron las capacidades vermícidas de distintos aceites esenciales en explantes de branquias de corvina.

Una vez estandarizados los tiempos en que el parásito se mantenía en vida en el explante de branquia, se procedió a evaluar la actividad vermícida de los aceites esenciales de canela, menta, timo, pino y bergamota, siendo la variable medida el “tiempo de vida” del ectoparásito. Se consideró que el ectoparásito estaba muerto cuando no respondía a ningún estímulo externo y

dejaba de moverse o se desenganchaba del explante branquial. Cada uno de los aceites esenciales fue probado a distintas concentraciones (0,1, 0,2 y 0,4%), usándose como control positivo una solución de formaldehído (150 ppm; tiempo medio de vida del parásito anclado al explante branquial en la solución de formol de 1-2 minutos). Como control positivo se usó el formaldehido ya que este producto químico normalmente usado para el tratamiento de estos ectoparásitos. Como control negativo se usó agua de mar (tiempo medio de vida en agua de mar del parásito anclado al explante branquial de 2 horas). Cada concentración fue evaluada al menos por triplicado (Figura 146).

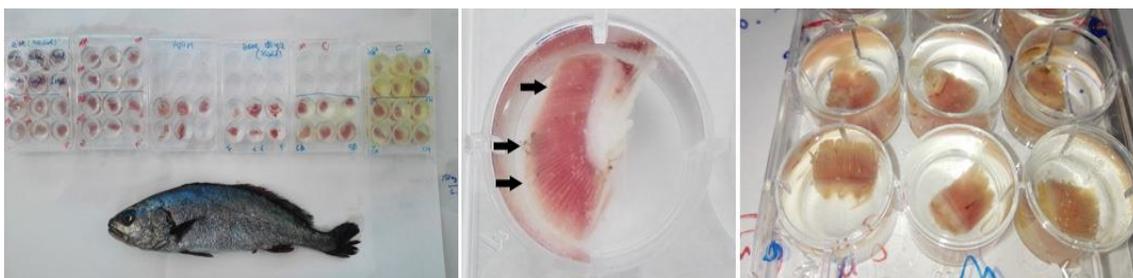


Figura 146. Fotografías tomadas en las instalaciones de Andromeda Group en Villajoyosa (Alicante) donde se evaluaron las capacidades vermícidas de distintos aceites esenciales en explantes de branquias de corvina. Imagen izquierda: ejemplo e la evaluación de distintos aceites esenciales en placas de 12 pocillos. Imagen central: explante de tejido branquial de corvina donde se pueden apreciar distintos ectoparásitos (flecha negra). Imagen derecha: detalle de la placa de 12 pocillos con distintos explantes branquiales para fines experimentales.

Aprovechando que el equipo investigador se había desplazado hasta las instalaciones de cultivo de la empresa y que en ese día concreto también el personal de la misma estaba realizando el seguimiento de salud de distintos lotes de seriola (*Seriola dumerilii*), se procedió a realizar el mismo experimento, pero con explantes branquiales de esta otra especie. En este caso particular, el ectoparásito objeto de interés fue el Monogenea *Zeuxapta seriolae* (Figura 147).



Figura 147. Fotografías tomadas en las instalaciones de Andromeda Group en Villajoyosa (Alicante) donde se evaluaron las capacidades vermícidas de distintos aceites esenciales en explantes de branquias de seriola.

Prueba de validación de la incorporación de distintos aceites esenciales en la dieta como tratamiento terapéutico frente a ectoparásitos en corvina

Dado el vacío de conocimiento existente sobre este tema en corvina, con el fin de evaluar la capacidad vermícida de distintos aceites esenciales en la dieta frente a parásitos monogéneos en esta especie de pez, ha sido preciso desarrollar una aproximación experimental progresiva en la que primero se han evaluado la palatabilidad de distintos aceites esenciales incluidos en la dieta, seguido de un análisis de su toxicidad sobre el organismo, para al final acabar evaluando su eficacia como vermícida frente a un ensayo de cohabitación con animales parasitados portadores del monogéneo a erradicar de los cultivos de corvina. La metodología de los distintos ensayos llevados a cabo dentro de esta Tarea se describe a continuación:

- Primer ensayo: selección de aceites esenciales

Se realizó un ensayo inicial para evaluar la aceptabilidad de los diferentes aceites esenciales (EO del inglés “*essential oils*”) por los juveniles de corvina. Cantidades (30 g) conocidas de pienso comercial (EFICO SIGMA 862; Biomar, Spain) fueron recubiertos con 6 mL de cada EO evaluado (bergamote, manzanilla, canela, clavo, niaolui, eucalipto, lavanda, limón, menta, pino, romero, tomillo y árbol de té). El alimento se ofreció en raciones de 5 g diarios durante un período de 6 días. Cada dieta recubierta con un EO distinto fue evaluada en un tanque de 100L que contenía 3 peces (peso medio individual = 50 g), mientras 1 tanque fue usado como control (alimento comercial no recubierto con ningún EO). Los peces fueron expuestos a las dietas experimentales durante 6 días, periodo durante el cual los peces fueron observados durante su alimentación con el fin de ver el comportamiento del animal en relación al gusto del pienso comercial recubierto con cada EO y la cantidad de pienso ingerido cuantificada. Los peces se observaron durante 5 min. El objetivo de este ensayo fue seleccionar distintos EO según su aceptabilidad para ser evaluados posteriormente en estudios nutricionales y pruebas de validación frente a ectoparásitos monogéneos.

- Segundo ensayo: prueba tolerancia

Una vez evaluados cuales EO eran aceptados en la dieta, se realizó un segundo experimento para evaluar su potencial toxicidad sobre la corvina, ya que distintos autores han reportado su toxicidad a largo plazo (Athanassopoulou et al., 2004; Hirazawa et al., 2000). Por consiguiente, dos EOs fueron evaluados durante seis semanas siguiendo una aproximación experimental similar a cualquier prueba con el fin de determinar la eficacia de cualquier nuevo medicamento o tratamiento cuya eficacia es conocida, pero se desconoce su tratamiento. Los EOs seleccionados según sus propiedades y resultados de la prueba 1 fueron el EO de menta y canela, los cuales fueron comparados con una dieta control (sin EO) y otra dieta con un vermícida comúnmente usado en veterinaria, el praziquantel (Hirazawa et al. 2000). Los alimentos fueron preparados tal y como ha sido descrito en la Prueba 1, usando la dieta comercial EFICO SIGMA 862 (Biomar, Spain) como base.

Cada tratamiento (Dieta control, Dieta EO menta, Dieta EO canela y Dieta Praziquantel) fue evaluado por triplicado, en tanques de 100L y con 6 peces de un peso medio individual de 50 g. Diariamente, la fracción de la ración suministrada a los peces (2 g, aproximadamente) y que no

era consumida era recuperada de cada tanque, secada a 95 °C en una estufa y su peso determinado en una balanza analítica con el fin de determinar el consumo diario de pienso para cada grupo experimental. Al final del ensayo, se muestrearon 4 peces por tanque (n = 12 por grupo experimental) con el fin de analizar la respuesta inmune no específica y parámetros de estrés en suero. Además, se tomaron muestras de hígado, intestino y branquias para evaluar la toxicidad de los compuestos sobre dichos tejidos. La toma de muestras, su procesado y análisis de las muestras con fines inmunológicos, histológicos y para evaluar los niveles de estrés en animales se llevó a cabo tal y como se ha descrito en secciones anteriores de esta memoria.

- Tercer ensayo: prueba de validación

A partir de los resultados de los dos primeros ensayos, se decidió evaluar el efecto de una dieta comercial recubierta con EO de canela frente a una parasitación de la corvina por ejemplares monogénea de *Scianocotyle* sp. En este caso, el EO de menta fue descartado ya que los peces una vez probaban el alimento lo escupían y no lo ingerían, por lo que este EO fue finalmente descartado pese a su buen potencial antiparasitario.

Para realizar este experimento, se necesitaron peces infectados y, por lo tanto, el equipo investigador se desplazó a una granja de cultivo de corvina donde junto con el personal técnico de la misma se procedió a sacrificar varios ejemplares y a recolectar distintas masas de huevos que fueron transportados en condiciones de humedad por carretera a las instalaciones del IRTA donde se realizó el ensayo de cohabitación con el ectoparásito. Durante 5 semanas, 180 juveniles procedentes de una instalación en tierra y que no habían entrado nunca en contacto con el ectoparásito y, por lo tanto, estaban limpios del mismo, fueron expuestos en varios tanques de 400 L a 20 peces que habían sido previamente infectados en sus agallas con las masas de huevos recuperadas de los animales en cultivo en jaulas. Al final de las 5 semanas, se confirmó que los peces tenían parásitos y comenzó el experimento. Para ello, 10 peces de cada tanque se anestesiaron y se observaron sus agallas bajo una luz fuerte con la ayuda de una lupa con el fin de detectar la presencia del ectoparásito en el tejido branquial.

Para este experimento, se prepararon tres dietas como se ha descrito anteriormente, una Dieta control (EFICO SIGMA 862; Biomar), una dieta con EO de canela y una nueva dieta preparada con un extracto acuoso de la planta medicinal *Echinaecea purpurea*. Esta nueva estrategia fue seleccionada en base a los resultados de la Tarea A2.2 y teniendo en cuenta sus propiedades inmunoestimulantes en peces (Guz et al., 2014; Oskoi et al., 2012) y por consiguiente se decidió investigar si un inmunoestimulante beneficiaría a los peces frente a una infestación de ectoparásitos. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado (n = 17 por tanque). Las condiciones de cultivo fueron; temperatura de $21,1 \pm 1,2$ °C, oxígeno a $6,7 \pm 0,3$ ppm, salinidad del 35‰ y fotoperíodo de 12 h de luz / 12 de oscuridad). El ensayo tuvo una duración de tres semanas durante las cuales los peces fueron alimentados dos veces al día (8 AM y 3 PM) con una ración de 7,5 g. Dos días antes de comenzar el experimento, se muestrearon un total de 9 peces para la determinación de su peso, se tomaron muestras de sangre y muestras de distintos tejidos para histología (hígado, intestino y branquias). De la muestra de sangre fresca, un hematocrito. Las muestras de sangre fueron usadas para determinación del hematocrito y parámetros inmunes no específicos en suero (actividad del complemento) y marcadores del estrés (glucosa y cortisol). La prevalencia del parásito fue evaluada visualmente al inicio y final del ensayo mediante la observación de las branquias de los animales bajo una lupa binocular.

Resultados

Evaluación *ex vivo* de distintos aceites esenciales como tratamiento antiparasitario frente a monogéneas *Scianocotyle sp.* y *Zeuxapta sp.*

En el caso de la corvina, los resultados relativos a la capacidad vermícida de los distintos aceites esenciales (canela, menta, timo, pino y bergamota) se encuentra resumida en la Tabla 41. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los aceites esenciales que han mostrado mayor efecto vermícida frente a *Scianocotyle sp.* son los de canela y menta, aceites que han mostrado una buena actividad vermícida independientemente de la concentración evaluada.

En este contexto, y teniendo en cuenta el coste de los aceites esenciales, los autores de este estudio recomiendan el uso de baños de canela y menta al 0,1%, pues a mayores concentraciones la mejora en el tiempo de exposición no representa una mejora sustancial en los tiempos de trabajo para realizar baños terapéuticos para desparasitar a los peces en cultivo.

Tabla 41. Tiempo medio de supervivencia de adultos del ectoparásito *Scianocotyle sp.* expuestos a diferentes aceites esenciales y distintas concentraciones de los mismos. El tiempo de supervivencia en agua de mar de los ectoparásitos fue de 2 h, mientras que el tiempo medio de vida tras la exposición a formaldehído (150 ppm) no superó el minuto.

Aceite esencial	Concentración		
	0,1%	0,2%	0,4%
Canela	3 – 4 min	2 – 3 min	1 – 3 min
Menta	3 – 4 min	2 – 3 min	1 – 3 min
Timo	> 15 min	7 – 10 min	4 – 7 min
Pino	> 10 min	5 – 7 min	4 – 7 min
Bergamota	> 10 min	5 – 7 min	4 – 7 min

A partir de los datos anteriormente presentados, se hizo la misma aproximación con el Monogénea *Zeuxapta seriolae*, siendo los aceites de timo, pino y bergamota los más eficientes frente al ectoparásito que afecta a la seriola. Es interesante destacar la diferencia entre el tiempo medio de vida de *Scianocotyle sp.* en relación a *Zeuxapta sp.* cuando ambos ectoparásitos se mantuvieron en los explantes de branquia en agua de mar; así como también su mayor y distinta sensibilidad a los aceites evaluados.

Tabla 42. Tiempo medio de supervivencia de adultos del ectoparásito *Scianocotyle sp.* expuestos a diferentes aceites esenciales y distintas concentraciones de los mismos. El tiempo de supervivencia en agua de mar de los ectoparásitos fue de 15-20 minutos, mientras que el tiempo medio de vida tras la exposición a formaldehído (150 ppm) no superó el minuto.

Aceite esencial	Concentración		
	0,1%	0,2%	0,4%
Canela	3 – 5 min	2 – 3 min	< 1 min
Menta	3 – 5 min	2 – 3 min	< 1 min
Timo	1 – 2 min	< 1 min	< 1 min
Pino	1 – 2 min	< 1 min	< 1 min
Bergamota	1 – 2 min	< 1 min	< 1 min

Los resultados en explantes branquiales de corvina y seriola parasitados con sus respectivos ectoparásitos específicos, *Scianocotyle sp.* y *Zeuxapta sp.*, tratados con distintos aceites esenciales, indican que es posible tratar las parasitosis ocasionadas por dichos monogeneas con canela y menta al 0,1% en el caso de *Scianocotyle sp.* y aceites esenciales de timo, bergamota y pino en el caso de *Zeuxapta sp.* Los aceites esenciales anteriormente mencionados y sus dosis de aplicación representan una estrategia sostenible y respetuosa en relación al medio ambiente para tratar las infestaciones de ectoparásitos que comúnmente afectan a la corvina y seriola en granjas de cultivo.

Prueba de validación de la incorporación de distintos aceites esenciales en la dieta como tratamiento terapéutico frente a ectoparásitos en corvina

A partir de los resultados del primer ensayo indican que la corvina aceptada los piensos recubiertos con los siguientes EOs: romero, pino, canela, bergamote, niaouli, lavanda, clavo y menta, mientras que el alimento recubierto con los EOs de, pino, manzanilla, limón y árbol de té fueron descartados al no ser consumidos. En el caso de los EOs seleccionados el consumo no fue total, el alimento era consumido mayoritariamente durante 4 de los 6 días que duró la prueba, mientras que el resto del tiempo el alimento era parcialmente consumido.

Los resultados del segundo ensayo son los siguientes. El peso medio inicial de los peces fue de 61 g y seis semanas más tarde, el peso final promedio fue de $67,5 \pm 4,84$ g para las corvinas alimentadas con el pienso con el EO de menta, $71,5 \pm 5,89$ g para aquellas alimentadas con el pienso comercial con canela, $63,3 \pm 5,38$ g para las corvinas con el pienso que contenía el vermífida Praziquantel, mientras que el peso final para los peces alimentados con la dieta comercial sin inclusión de EO o vermífida fue de $85,0 \pm 4,98$ g (Figura 148).

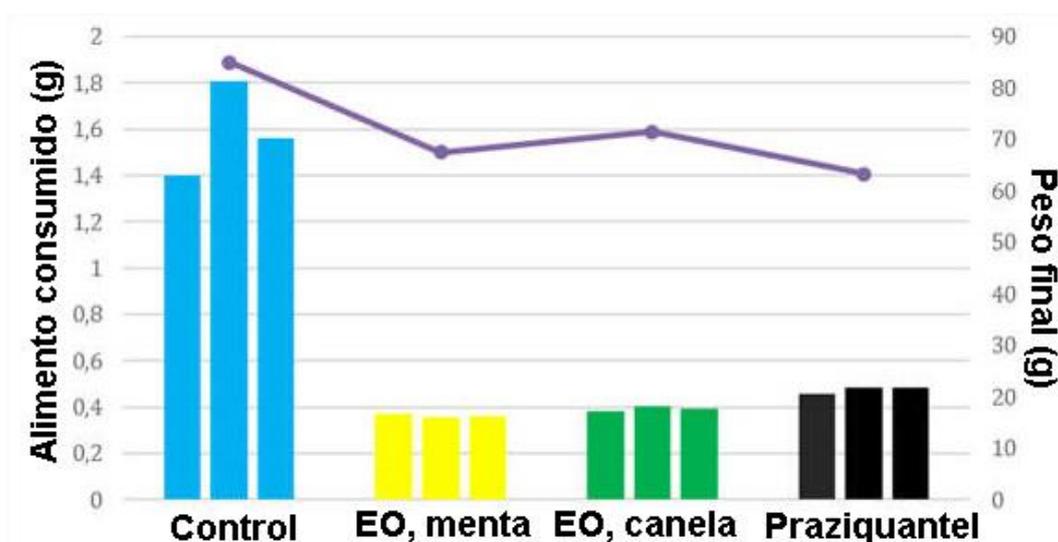


Figura 148. Ingesta de alimento (barras) y peso medio final (línea) de juveniles de corvina alimentadas con distintas dietas para evaluar su potencial uso terapéutico vermícida. Cada barra indica el valor medio de cada replicado experimental.

El análisis estadístico puso de manifiesto que los peces alimentados con ambos EO evaluados fueron menores en peso que los peces alimentados con la dieta control ($P < 0,05$), si bien no existieron diferencias entre ambas dietas que contenían menta y canela. Los peces con mejor peso al final de las seis semanas fueron aquellos con Praziquantel, siendo más de 20 g más pequeños que los de la dieta control ($P < 0,05$). A lo largo del ensayo no se dieron bajas en ninguno de los grupos experimentales, por lo que la supervivencia fue del 100% para las cuatro dietas evaluadas.

Los resultados de la Figura 148 en los que se reportan de forma comparativa el crecimiento de los peces y el consumo de pienso, permiten detectar que las diferencias de peso observadas entre los peces alimentados con las dietas que contenían los EOs de menta y canela fueron básicamente debidas a un menor consumo de pienso, consumo que fue entorno a cuatro veces inferior en los peces alimentados con la dieta que contenía EOs. El descenso en el consumo del pienso se debe básicamente al gusto de los pellets de pienso con los EOs de menta y canela, pues son gustos a los que los peces no están acostumbrados y, por consiguiente, rechazan de forma notable. Destacan los resultados del grupo alimento con Praziquantel; en este caso, pese a que los peces consumieron una mayor cantidad de pienso que los alimentados con los EOs, su crecimiento en peso fue significativamente peor. Estos resultados podrían venir debidos a un efecto secundario del producto químico con propiedades vermícidas evaluado sobre el organismo, afectando así a su crecimiento. Sin embargo, no se dispone de datos toxicológicos que permitan validar la hipótesis anteriormente citada.

Estos resultados indican que la estrategia de aplicar los EOS directamente sobre el pienso mediante su esprayación no resulta una estrategia recomendable pese a su potencial utilidad como agentes vermícidas, y que, por lo tanto, su inclusión en la dieta tiene que llevarse a cabo a través de estrategias de microencapsulación como las aplicadas con el extracto de ajo usado

en la Tarea A2.3.1 en los productos evaluados de la gama AROTEC®. Además, el uso de un vermífugo como el Praziquantel es totalmente desaconsejable pues puede tener efectos secundarios sobre el organismo derivados de su posible toxicidad durante un tiempo de administración como el evaluado (6 semanas).

El valor promedio de glucosa en la sangre de los peces experimentales se muestra en la Figura 149. El valor máximo fue medido en un pez del grupo control con 395,3 mg/dL y el mínimo fue de 20,3 mg/dL en uno alimentado la dieta recubierta de EO de canela. Destaca que, por norma general, los peces del grupo control mostraron valores significativamente más altos de glucosa ($P < 0,01$) que, en todos los otros tratamientos, resultados que podrían venir debidos no tanto por la respuesta de los ejemplares muestreados al estrés sino por su mejor alimentación, si bien los menores valores de glucosa en las dietas que contenían los EOs de menta y canela podrían venir explicadas por un efecto sedante de los mismos. Sin embargo, estos resultados no explicarían los valores reducidos de glucosa en el grupo alimentado con el pienso con Praziquantel.

El nivel de lisozima es un importante índice de inmunidad innata de peces y es ubicuo en su distribución entre los organismos vivos. Está bien documentado que la lisozima de los peces posee actividad lítica contra las bacterias, también se sabe que es de naturaleza opsonica y activa el sistema del complemento y los fagocitos. Está presente en moco, tejido linfóide, plasma y otros fluidos corporales de peces. La lisozima también se ha utilizado como un indicador de estrés agudo (Demers y Bayne, 1996). Para este parámetro el valor mínimo fue encontrado en un pez del grupo control de 13,7 U/mL y el máximo en uno alimentado con la dieta recubierta con EO de canela (375,0 U/mL). El rango de valores está dentro de los valores encontrados para diferentes especies de peces y no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$; Figura 149); resultados que vendrían asociados a la elevada variabilidad interindividual encontrada dentro de un mismo grupo experimental.

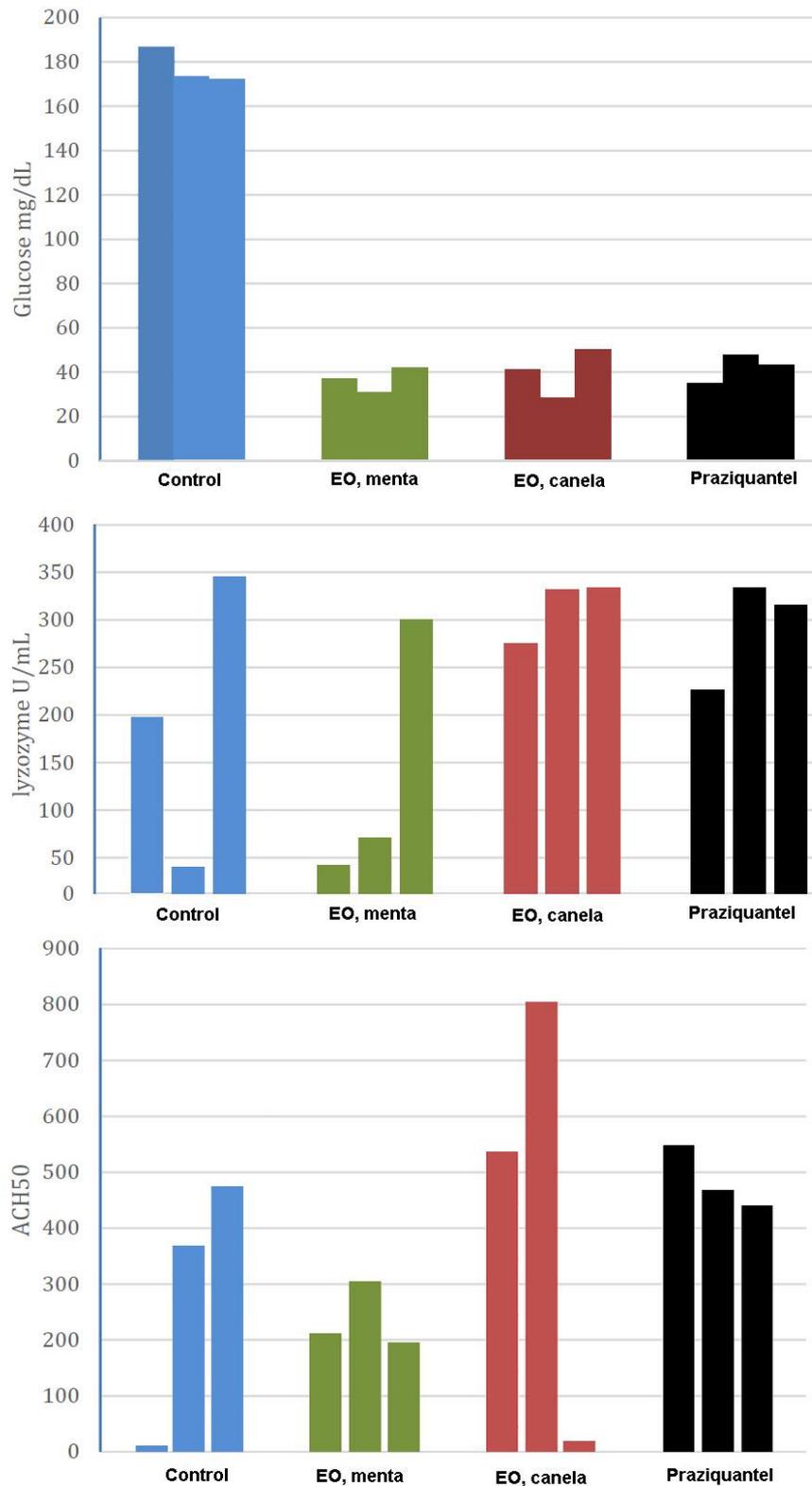


Figura 149. Valores de glucosa en suero y actividad del lisozima y complemento en juveniles de corvina alimentados con distintas dietas para evaluar su potencial uso terapéutico vermícida. Cada barra indica el valor medio de cada replicado experimental.

El sistema del complemento es parte del sistema inmune que mejora (complementa) la capacidad de los anticuerpos y células fagocitarias para eliminar microbios y las células dañadas de un organismo, promueve la inflamación y ataca la membrana celular del patógeno. Los peces alimentados con alimentos enriquecidos con el EO de menta tienen valores significativamente más bajos de actividad del complemento ($P = 0,03$), resultados que indicarían que estos peces tienen una respuesta inmune no específica ligeramente más baja que el resto de animales, si bien los valores encontrados se encuentran dentro del rango de valores reportados en la literatura para distintas especies de peces.

De acuerdo con los resultados de la histología, los hígados de los animales examinados presentaron algún foco necrótico en el parénquima hepático y algunos también ejemplares tenían zonas de congestión (datos no mostrados). El intestino no presentó alteraciones destacables. Sin embargo, el análisis comparativo entre dietas no mostró ninguna correlación entre los grupos experimentales y las alteraciones hepáticas observadas, alteraciones que se asocian más al origen de los peces y su condición inicial que no al propio experimento desarrollado.

En el tercer ensayo de la presente tarea (prueba de validación) se decidió descartar el uso de menta, ya que tal y como indicaron los resultados del segundo ensayo, la respuesta inmune no específica en suero se veía reducida en comparación con los peces alimentados con el EO de canela. Además, se incorporó una nueva dieta basada en un extracto acuoso de la planta medicinal *Echinacea purpurea*. Ambas dietas fueron comparadas con una dieta control.

Como se puede observar en la Figura 150 los peces alimentados con la dieta control crecieron de forma notable durante la primera semana de ensayo, aumentando de 250 g a 280 g de peso medio; sin embargo, en la semana siguiente y como efecto de una fuerte prevalencia del parásito en los animales el crecimiento disminuyó, alcanzándose valores de peso medio de 232 g, valores de peso ligeramente inferiores a los del inicio del ensayo.

En relación a las corvinas alimentadas con la dieta recubierta con el EO de canela se observa un importante descenso del peso medio de los animales durante la primera semana de ensayo, reduciéndose los valores de 250 g a 185 g, descenso en el peso que se atribuye a un descenso en el consumo por la presencia del EO en el pienso y a la adaptación de los animales a la palatabilidad del mismo, tal y como se observa durante la segunda semana cuando el peso de los animales se recuperó a 245 g, valores similares a los del inicio del ensayo. En el caso particular de la nueva dieta evaluada con un extracto de *Echinacea* sp. se observa un importante incremento en el peso durante la primera semana de ensayo (290 g) y segunda semana (297 g), el descenso en la tasa de crecimiento observado durante este período podría venir dado por un aumento de la prevalencia del ectoparásito en este grupo experimental (Tabla 43).

La prevalencia inicial del ectoparásito en los grupos experimentales fue estimada en torno al $80 \pm 10\%$, si bien es difícil de saber con exactitud la magnitud de este valor en toda la población de corvinas usadas en el ensayo, ya que solo una fracción pequeña de los animales fue sacrificada con el fin de estimar la presencia del ectoparásito en el tejido branquial, pues el resto de animales fue destinado a evaluar el efecto vermífugo de las dietas experimentales. Los resultados de prevalencia de *Scianocotyle* sp. en corvinas alimentadas con las distintas dietas experimentales al final del ensayo de cohabitación se muestran en la Tabla 43.

Los resultados indican que la prevalencia del ectoparásito fue del 100% en las corvinas alimentadas con las Dietas Control y con el extracto de *Echinacea* sp., si bien la prevalencia en el grupo alimentado con el EO de canela fue del 60%. Tal y como se ilustra en la Tabla 43 también se observaron diferencias a nivel del grado de intensidad de parasitación entre los tratamientos experimentales.

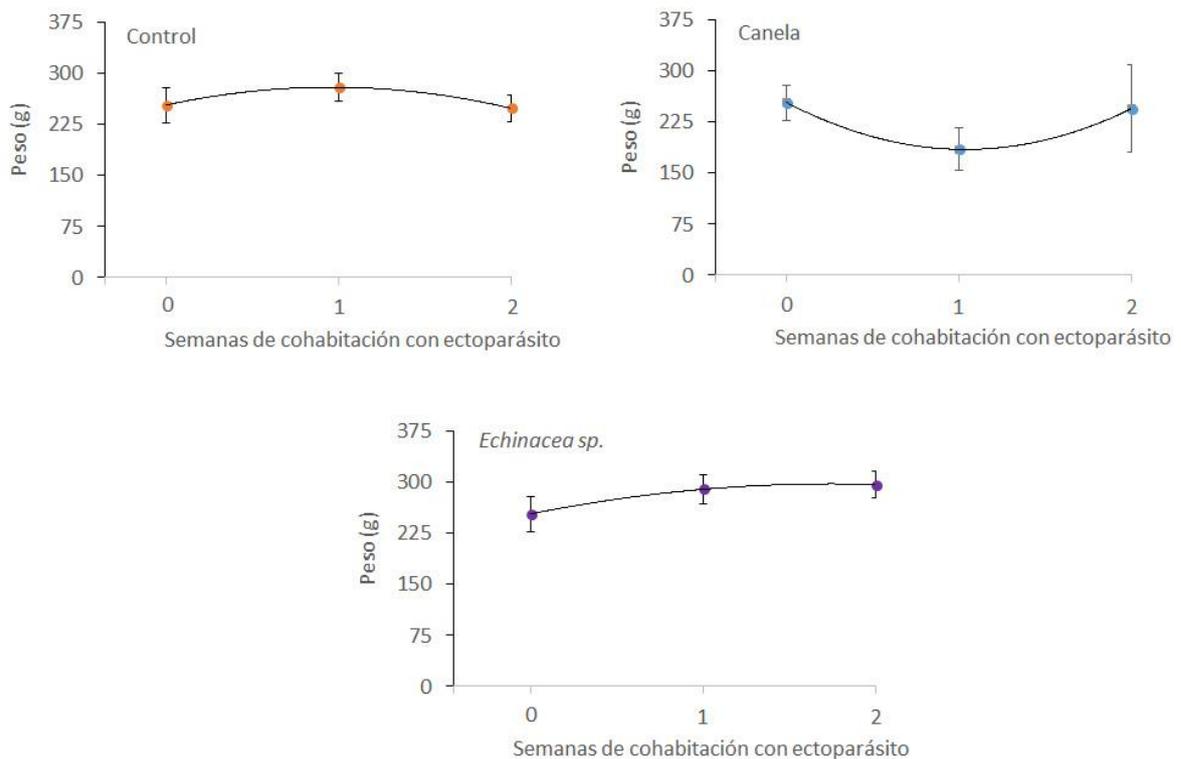


Figura 150. Crecimiento medio de corvinas alimentadas con dos dietas experimentales con propiedades vermícidas (EO de canela y extracto acuoso de *Echinacea* sp.) durante una prueba de validación en la que los animales fueron expuestos al ectoparásito monogénea *Scianocotyle* sp.

Los resultados de esta prueba de validación indican que el aceite esencial de canela tiene unas buenas propiedades vermícidas frente al ectoparásito monogénea *Scianocotyle pancerii*. que afecta los cultivos en jaulas de corvina, si bien su uso como aditivo en la dieta requiere de mejoras en su forma de presentación e incorporación en la dieta, ya que dicho aceite no puede ser incorporado directamente sobre el pienso, sino que se recomienda que sea previamente microencapsulado con el fin de reducir su efecto sobre la palatabilidad del pienso y no afectar a su ingesta y crecimiento de los animales.

Tabla 43. Prevalencia e intensidad de parasitación del ectoparásito monogénea *Scianocotyle* sp. en corvinas alimentadas con distintas dietas con propiedades vermícidas.

	Prevalencia (%)	Intensidad de parasitación (Número parásitos por branquia)		
		Nº = 1 - 4	5 > Nº > 8	Nº > 8
Dieta control	100	2	15	2
Dieta <i>Echinacea</i> sp.	100	1	15	10
Dieta EO canela	60	7	0	0

Conclusiones

Los aceites esenciales representan una buena alternativa para el control de ectoparásitos en corvina y también en seriola debido a sus propiedades vermícidas. En este contexto, su uso para tratamientos por medio de balneación representa una estrategia viable y sostenible frente al uso actual de productos químicos que tienen un elevado impacto sobre el medio natural. En el caso particular del ectoparásito que afecta al cultivo de la corvina, el monogénea *Scianocotyle* sp, los aceites esenciales más efectivos en términos de concentración y tiempo de aplicación, son los de canela y menta, mientras que en el caso de *Zeuxapta* sp., el ectoparásito que afecta a la seriola, los aceites esenciales con mejores resultados fueron los de timo, pino y bergamota. Estos resultados indican que los aceites esenciales anteriormente mencionados y sus dosis de aplicación representan una estrategia sostenible y respetuosa en relación al medio ambiente para tratar las infestaciones de ectoparásitos que comúnmente afectan a la corvina y seriola en granjas de cultivo.

Los resultados de la prueba de validación indican que el aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) es un buen aditivo para ser incorporado en dietas con fines terapéuticos frente al ectoparásito monogénea *Scianocotyle panzerii* que comúnmente afecta las granjas de cultivo de la corvina, sin bien, si bien su uso como aditivo en la dieta requiere de mejoras en su forma de presentación e incorporación en la dieta, ya que dicho aceite no puede ser incorporado directamente sobre el pienso, sino que se recomienda que sea previamente microencapsulado con el fin de reducir su efecto sobre la palatabilidad del pienso y no afectar a su ingesta y crecimiento de los animales.

Tarea A2.4: Ensayo nutricional de tipo dosis respuesta de dietas promotoras de la salud e integridad de las mucosas en corvina

A partir de los resultados de las Tareas A2.1 y A2.2 se decidió evaluar algunos de los aditivos con mejores resultados en la otra especie modelo del proyecto DIETAplus, la corvina (*Argyrosomus regius*). Además, se decidió añadir dos grupos experimentales más dedicados a evaluar el efecto de dos nuevos aditivos que no estaban considerados inicialmente en la propuesta, aditivos diseñados y manufacturados por la empresa TECNOVIT-FARMFAES y cuya composición estuvo centrada en ácidos grasos de cadena media, ácidos orgánicos y aceites esenciales. Por consiguiente, esta tarea se ha dividido en dos subtareas, una inicial (Tarea A2.4.1) dedicada a evaluar los compuestos inicialmente considerados, dos ingredientes de subproductos porcinos (Appetein® y Pepteiva®, APC EUROPE SA) y de un aditivo nutracéutico con propiedades inmunomoduladoras (IMMUNOTEC®, TECNOVIT-FARMFAES), y una segunda (Tarea A2.4.2) dedicada a evaluar dos aditivos promotores de la salud y condición intestinal con funciones antiparasitarias y antimicrobianas (BUTYTEC® y ACITEC®, TECNOVIT-FARMFAES).

Tarea A2.4.1 Ensayo de dietas salud promotoras de la salud e integridad de las mucosas en la corvina

Objetivos

El objetivo final del ensayo es validar en corvina (*Argyrosomus regius*) los efectos inmunoestimuladores potenciales de la adición de ingredientes subproductos porcinos (Appetein® y Pepteiva®, APC EUROPE SA) y de un aditivo nutracéutico (IMMUNOTEC®, TECNOVIT-FARMFAES) probados anteriormente en dorada en las tareas A2.1. y A2.2., respectivamente.

Metodología

Corvinas con un peso inicial de $7,4 \pm 1,3$ g procedentes de la empresa ANDROMEDA Group en Villajoyosa (Alicante), fueron transportadas por carretera a las instalaciones del IRTA en Sant Carles de la Ràpita, donde fueron aclimatadas durante 10 días. Antes de empezar el ensayo nutricional, un total de 60 peces fueron distribuidos en un total de 16 tanques de 500 L conectados a una unidad de recirculación del agua (IRTAmor®) (Figura 33).

El listado de ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales se encuentra reflejado en la Tabla 44. Como en las anteriores tareas, las dietas fueron diseñadas en colaboración con la empresa portuguesa SPAROS Lda y su fabricación se llevó a cabo en las instalaciones de la citada empresa. Como sólo se evaluó un ingrediente distinto a una sola dosis, las dietas recibieron el nombre del ingrediente evaluado. A diferencia de las otras tareas desarrolladas en dorada, la corvina no tolera tan bien bajos contenidos de harina de pescado en sus dietas, y por lo tanto se optó por diseñar una dieta con un moderado contenido de este

ingrediente (35% de harina de pescado en una dieta con un 50% en proteína cruda). Cada dieta fue evaluada durante 64 días por cuadruplicado.

Tabla 44. Listado de ingredientes y composición proximal de las dietas para corvina usadas para evaluar el efecto de distintos ingredientes y aditivos sobre la salud y condición de las mucosas.

Ingredients	CTRL	IMMUNOTEC	APPETEIN	PEPTEIVA
	%	%	%	%
Fishmeal LT70 (NORVIK)	35,000	35,000	33,200	33,650
CPSP 90	3,400	3,400		
Appetein GS (APC)			5,000	
PEPTEIVA (APC)				5,000
Soy protein concentrate (Soycomil)	10,000	10,000	10,000	10,000
Wheat gluten	6,600	6,600	6,600	6,600
Corn gluten	8,000	8,000	8,000	8,000
Soybean meal 48	5,000	5,000	5,000	5,000
Rapeseed meal	4,500	4,500	4,500	4,500
Wheat meal	13,630	13,430	13,480	13,080
Sardine oil - Sopropêche	12,350	12,350	12,700	12,650
Vit & Min Premix INVIVO 1%	1,000	1,000	1,000	1,000
Antioxidant powder (Verdilox)	0,200	0,200	0,200	0,200
Sodium propionate	0,100	0,100	0,100	0,100
L-Taurine	0,200	0,200	0,200	0,200
Yttrium oxide	0,020	0,020	0,020	0,020
Total	100,00	99,80	100,00	100,00

Proximate composition	CTRL	IMMUNOTEC	APPETEIN	PEPTEIVA
Crude protein, % feed	50,4	50,4	50,4	50,4
Crude fat, % feed	16,2	16,2	16,2	16,2
Ash, % feed	8,0	8,0	7,9	8,2
Gross Energy, MJ/kg feed	22,1	22,1	22,1	22,1

Teniendo en cuenta los resultados observados en la Tarea A2.2 relativos a la inclusión del aditivo inmunomodulador de efecto sistémico IMMUNOTEC®, se ha considerado excesivo el tiempo de administración del aditivo en el ensayo con dorada, habiéndose decidido el reajuste del diseño experimental y por consiguiente en el caso del estudio de la corvina, se ha optado por una aplicación en “pulso” como describe la Figura 140, así como también la reducción del nivel de inclusión del aditivo de un 0,15% a un 0,10%. La administración del aditivo IMMUNOTEC® se realizó durante un mes desde el inicio del ensayo, una pausa de dos semanas (alimentación con la Dieta control) seguida de otro periodo de administración del aditivo de otras dos semanas hasta finalización del ensayo (Figura 151). En el caso de los ingredientes Appetein® y Pepteiva® las dietas se han administrado ininterrumpidamente a lo largo de los 64 días del ensayo. Las dietas fueron proporcionadas dos veces al día (primera hora de la mañana y primera hora de la tarde) al 4,5% en función de la biomasa estabulada mediante alimentadores automáticos (ARVO-TEC T Drum 2000; Arvotec, Finland); la ración alimentaria fue ajustada por medio de muestreos intermedios.

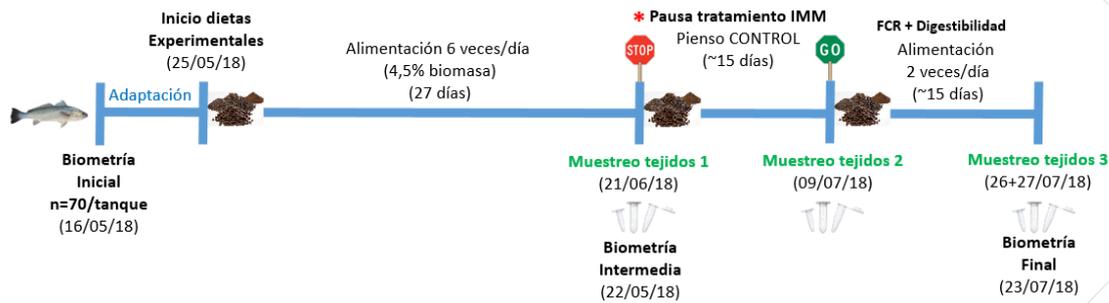


Figura 151. Diseño experimental de la prueba nutricional de validación de los subproductos porcinos Appetein® y Pepteva® (APC EUROPE SA) y del aditivo inmunoestimulante IMMUNOTEC® (TECNOVIT FARMFAES) en corvina.

Al final del ensayo, todos los peces fueron muestreados en talla (longitud estándar, cm) y peso (g) (Figura 152) con previa anestesia con MS-222 (Sigma-Aldrich, España). Igualmente, para el cálculo de la eficiencia alimentaria y determinación del índice de conversión del alimento, la cantidad de pienso suministrada en cada tanque y la cantidad de alimento no ingerido eran diariamente calculados con el fin de determinar el índice de conversión del alimento (FCR, del inglés “*feed conversion ratio*”) (Figura 153). Para ello, el pienso no ingerido era recogido dos veces al día, era deshidratado en una estufa (100 °C) y pesado. Con el fin de tomar muestras de distintos tejidos corporales en distintos tiempos del ensayo nutricional, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico y las muestras fueron distribuidas entre los miembros del consorcio para su análisis.



Figura 152. Fotografía de corvinas (*Argyrosomus regius*) durante un muestreo (izquierda). Imagen de las instalaciones del IRTA donde se desarrolló el ensayo nutricional de la tarea A.2.4. (derecha).



Figura 153. Fotografía de personal técnico del IRTA realizando recogida de desechos (heces y alimento no ingerido) para cálculos relativos al índice de conversión del alimento.

Las metodologías seguidas para la evaluación del efecto de las dietas sobre el organismo fueron similares a las descritas para el resto de tareas de la Actividad 2, si bien existen algunas salvedades. En primer lugar, debido a que para la corvina no existen herramientas transcriptómicas desarrolladas como el microarray usado para la dorada (Tareas A2.1, A2.2 y A2.3) no se pudo realizar una aproximación de análisis masivo similar. En este contexto, se decidió apostar por la estrategia planteada dentro de la Actividad 1 liderada con el IFAPA en colaboración con el grupo de investigación de la UAB de desarrollar una base de datos de transcriptómica masiva para la corvina a partir de la secuenciación masiva de varios tejidos (tarea no incluida inicialmente en el proyecto DIETApplus), por lo que hasta que estos resultados no han estado disponibles (primer semestre 2019) no ha sido posible evaluar a nivel transcriptómico la respuesta a nivel tisular de los aditivos evaluados en esta tarea. En segundo lugar, es importante también destacar que en esta Tarea se han usado metodologías relativas al efecto de las dietas sobre la fisiología digestiva del animal (actividad enzimas digestivos) no empleadas hasta ahora en el proyecto y, por lo tanto, se procede a continuación a su descripción:

Análisis de enzimas digestivos

Con el fin de analizar el efecto de las dietas experimentales sobre la funcionalidad del sistema digestivo, al final del ensayo nutricional el tracto digestivo de corvinas previamente fue diseccionado ($n = 5$ peces por tanque) y, su intestino, estómago y ciegos pilóricos separados y congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los cinco peces de cada tanque fueron usados para preparar un pool de tejidos para su análisis, considerándose el tanque como unidad experimental.

Los tejidos seleccionados fueron homogenizados (1–2 min a $0\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 30 volúmenes de manitol 50 mM, 2 mM Tris-HCl buffer, pH 7,0) y sonicados según Gisbert et al. (2009). Posteriormente,

las muestras se centrifugaron (3.300 g, 3 min a 4 °C) y el sobrenadante se recolectó, se repartió en alícuotas y fue congelado a -80 °C para la determinación de los enzimas pancreáticos (proteasas alcalinas totales, tripsina, amilasa y lipasa), gástricos (pepsina) e intestinales (fosfatasa alcalina). Para la cuantificación de la fosfatasa intestinal del borde en cepillo en cepillo de los enterocitos, éstos se purificaron de acuerdo con Crane et al. (1979).

Las proteasas alcalinas totales se analizaron mediante el método de la azo-caseína (Walter, 1984) utilizando 50 mM de tampón Tris-HCl (pH 9,0). La tripsina se analizó a 25 °C utilizando BAPNA como sustrato en un tampón 50 mM Tris-HCl, CaCl₂ 20 mM (pH 8,2). Una unidad de tripsina por mL (U) se definió como 1 μmol BAPNA hidrolizado por minuto y mL de extracto medido a λ = 407 nm (Holm et al., 1988). La actividad de la amilasa fue medida utilizando un 0,3% de almidón soluble disuelto en tampón Na₂HPO₄ (pH 7,4) como sustrato (Métais y Bieth, 1968) y su actividad (U) medida como los mg de almidón que se hidrolizaron durante 30 min/mL de extracto a 25 °C a λ = 580 nm. La actividad de la lipasa activada por sales biliares se midió durante 30 min a 25 °C utilizando p-nitrofenilo miristato como sustrato disuelto en un tampón Tris-HCl 0,25 mM (pH 9,0), 2-metoxietanol 0,25 mM y 5 mM colato sódico. La reacción se detuvo con una mezcla de acetona:n-heptano (5: 2), el extracto centrifugado (6.080 g, 2 min a 4 °C) y la absorbancia del sobrenadante leída a λ = 405 nm. Actividad de la lipasa (U) se definió como el μmol del sustrato hidrolizado min/mL de extracto (Iijima et al., 1998). La pepsina fue cuantificada como La actividad de la pepsina (U) se definió como μmol de tirosina liberada por minuto a 25 °C por ml de homogeneizado de tejido, usando una solución de hemoglobina como sustrato, a λ = 280 nm. La fosfatasa alcalina fue cuantificada a 25 °C utilizando 4-nitrofenil fosfato (PNPP) como sustrato en tampón 30 mM Na₂CO₃ (pH 9,8). Una unidad de actividad (U) se definió como 1 μg PNPP liberado por minuto y mL de homogenizado de borde en cepillo a λ = 407 nm (Bessey et al., 1946). La actividad de los enzimas analizados fue expresada como actividad específica (U/mg proteína), siendo la proteína analizada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y lectura de absorbancia usando un espectrofotómetro (Tecan™ Infinite M200, Mannedorf, Suiza). La actividad enzimática fue comparada estadísticamente mediante una ANOVA de un factor, tal y como se ha descrito en otras secciones del presente informe.

Resultados

Crecimiento

Para el estudio del rendimiento de las distintas dietas experimentales, se evaluaron los siguientes parámetros: crecimiento somático peso final (PF, g), incremento de peso (Δpeso, g), incremento de peso diario (Δpeso diario, g), tasa de crecimiento específico (TEC), factor de condición de Fulton (K), tasa de conversión de alimentación (IC) y porcentaje de supervivencia se han analizado. Los resultados se encuentran descritos en las Tablas 45 y 46. Al contrario de lo que se había observado en la tarea A2.1. con dorada, la inclusión de los ingredientes derivados de subproductos porcinos, APPETEIN® y PEPTEIVA®, como sustitutos del 5% de la HP, afectó negativamente la mayoría de los parámetros de rendimiento en las corvinas, con una particular

disminución del peso y aumento del IC (Tabla 45). Estos resultados pueden estar relacionados con los distintos niveles de HP utilizados en la formulación de las dietas de dorada (7% HP) y corvina (35% HP), y la presencia de hidrolizado de proteína de pescado (CPSP-90, Soppopêche, Francia) en las dietas de corvina y su ausencia en las de dorada. En este contexto ha sido descrito que la inclusión del hidrolizado de proteína de pescado puede tener un efecto promotor de la ingesta, resultados que permitirían en parte explicar el ligero mejor rendimiento productivo en encontrado con la Dieta Control en comparación con las Dietas APPETEIN® y PEPEIVA®.

Tabla 45. Parámetros de crecimiento de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, APPETEIN® y PEPEIVA® a final del ensayo nutricional. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, P < 0,05).

	Control	Appetein®	Pepteiva®
PF (g)	70,57 ± 2,74 a	64,44 ± 1,39 b	65,40 ± 1,43 b
Δpeso (g)	63,22 ± 2,74 a	57,09 ± 1,39 b	58,05 ± 1,43 b
Δpeso diario (g)	1,05 ± 0,05 a	0,95 ± 0,02 b	0,97 ± 0,02 b
TEC (%)	3,77 ± 0,06 a	3,62 ± 0,04 b	3,64 ± 0,04 b
K	1,74 ± 0,04 a	1,69 ± 0,02 a	1,68 ± 0,05 a
IC	0,74 ± 0,04 a	0,81 ± 0,02 b	0,82 ± 0,07 b
Supervivencia (%)	98,92 ± 1,37 a	100 ± 0,00 a	100 ± 0,00 a

Por otro lado, la inclusión del aditivo IMMUNOTEC® al 0,10% parece no haber afectado significativamente el crecimiento de las corvinas en comparación con la Dieta control (Tabla 46). Estos resultados también son algo distintos a los encontrados en dorada (Tarea A2.2), pues en el caso de la dorada, la inclusión del aditivo IMMUNOTEC® resultó en una mejora del crecimiento somático de los animales.

Tabla 46. Parámetros de crecimiento de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control y IMMUNOTEC® al final del ensayo nutricional. No se han observado diferencias significativas entre dietas (ANOVA, P < 0,05).

	Control	IMMUNOTEC®
PF (g)	70,57 ± 2,74	69,58 ± 1,92
Δpeso (g)	63,22 ± 2,74	63,22 ± 1,92
Δpeso diario (g)	1,05 ± 0,05	1,04 ± 0,03
TEC (%)	3,77 ± 0,06	3,75 ± 0,05
K	1,74 ± 0,04	1,78 ± 0,07
IC	0,74 ± 0,04	0,73 ± 0,03
Supervivencia (%)	98,92 ± 1,37	98,93 ± 1,37

A la luz de estos resultados, parece que, si bien cada día los requerimientos nutricionales de la corvina son mejor conocidos y que la formulación de las dietas para esta especie es mejor, todavía existe cierto margen de mejora con el fin de que determinados ingredientes (APPETEIN®

y PEPTEIVA®) y aditivos (IMMUNOTEC®) puedan ser incorporados en estas dietas con un efecto positivo en términos de crecimiento sobre el organismo.

Composición proximal

La calidad del filete de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales se ha evaluado según su composición en proteínas, lípidos, carbohidratos (CHO), humedad y cenizas como descrito en la Tarea A.2.1. La sustitución del 5% de HP por los ingredientes APPETEIN® y PEPTEIVA® en la dieta ha disminuido significativamente un 25% del contenido en lípidos del filete ($P < 0,05$), si bien dicha disminución en grasa bruta ha ido acompañada de un incremento en el contenido proteico del filete (Tabla 47; $P < 0,05$).

Tabla 47. Composición proximal del filete de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, APPETEIN® y PEPTEIVA® a final del ensayo nutricional. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, $P < 0,05$).

	Control	APPETEIN®	PEPTEIVA®
Humedad (%)	76,66 ± 0,23 a	77,75 ± 0,59 a	77,21 ± 0,70 a
Proteínas (%)	12,85 ± 0,51 b	14,31 ± 0,31 a	14,55 ± 0,48 a
Lípidos (%)	8,59 ± 1,16 a	6,22 ± 0,51 b	6,41 ± 0,93 b
Cenizas (%)	1,63 ± 0,09 a	1,46 ± 0,06 a	1,53 ± 0,18 a
CHO (%)	0,30 ± 0,06 a	0,26 ± 0,07 a	0,28 ± 0,05 a

En concordancia con los resultados observados anteriormente en dorada (Tarea A2.2), los resultados del análisis de la composición proximal del filete de corvina indican que la inclusión del aditivo IMMUNOTEC® no afecta significativamente ninguno de los parámetros evaluados (Tabla 48).

posición proximal del filete de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control y IMMUNOTEC® a final del ensayo nutricional. No se han observado diferencias significativas entre dietas (ANOVA, $P < 0,05$).

	Control	IMMUNOTEC®
Humedad (%)	76,66 ± 0,23	76,48 ± 0,45
Proteína (%)	12,85 ± 0,51	13,59 ± 0,84
Lípidos (%)	8,59 ± 1,16	7,25 ± 1,62
Cenizas (%)	1,63 ± 0,09	1,49 ± 0,09
CHO (%)	0,30 ± 0,06	0,29 ± 0,06

Actividad enzimas digestivos

La actividad enzimática de los enzimas digestivos tripsina, pepsina, amilasa, proteasas totales y fosfatasa alcalina se midió por métodos analíticos cinéticos y de punto final en estómago (pepsina), ciegos pilóricos (tripsina, pepsina, amilasa, proteasas totales) e intestino (fosfatasa alcalina). La Tabla 49 describe la actividad de estos enzimas en las distintas partes de tracto digestivo en las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, APPETEIN® y PEPTEIVA®. Los resultados permiten concluir que la inclusión de estos ingredientes no afecta la actividad de los enzimas digestivos analizados y, por consiguiente, el ligero descenso en el crecimiento observado en los animales alimentados con las dietas no es debido a una alteración de las capacidades digestivas derivadas del uso de estos ingredientes en la dieta, sino más bien por diferencias en la ingesta y formulación de las mismas, tal y como ya ha sido comentado. También es importante destacar que, si bien no se han detectado diferencias significativas en relación a la actividad de la fosfatasa alcalina, sí que existe una tendencia a que los peces alimentados con APPETEIN® y PEPTEIVA® presenten valores más elevados de actividad, resultados que estarían de acuerdo con estudios previos realizados en dorada en los que el uso de hemoderivados porcinos promueve el desarrollo y madurez de la mucosa intestinal (Gisbert et al., 2015).

Tabla 49. Actividad enzimática de tripsina, pepsina, amilasa, lipasa y proteasas totales en estómago y sacos pilóricos; y actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en muestras de corvinas alimentadas con las dietas control, APPETEIN® y PEPTEIVA®. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, P < 0,05).

Tejido	Actividad (U/mg prot)	Dieta		
		Control	APPETEIN®	PEPTEIVA®
Estomago + sacos pilóricos	Tripsina	0,00085 ± 0,00013 a	0,00074 ± 0,0001 a	0,00083 ± 0,00022 a
	Pepsina	0,47 ± 0,07 a	0,47 ± 0,06 a	0,44 ± 0,02 a
	Amilasa	0,33 ± 0,07 a	0,27 ± 0,07 a	0,34 ± 0,07 a
	Lipasa	0,0040 ± 0,0011 a	0,0040 ± 0,0013 a	0,0047 ± 0,0008 a
	Proteasas totales	0,017 ± 0,002 a	0,010 ± 0,005 a	0,008 ± 0,002 a
Intestino	Fosfatasa alcalina	0,035 ± 0,010 a	0,047 ± 0,010 a	0,041 ± 0,011 a

En el caso de la dieta con el inmunomodulador, el análisis de los enzimas digestivos demuestra que la inclusión del aditivo IMMUNOTEC® aumenta significativamente la actividad enzimática

de la amilasa y lipasa activada por sales biliares en los sacos pilóricos en comparación con los valores de actividad medidos en las corvinas alimentadas con la dieta control (Tabla 50).

Los demás enzimas digestivos no se han visto afectados por las dietas experimentales. *A priori*, la relevancia e interpretación de las diferencias observadas en relación a la actividad específica de la amilasa y lipasa observados en el presente estudio no están claros, pues dichos cambios de actividad no estuvieron asociados a diferencias de crecimiento y/o deposición de nutrientes en el organismo.

Tabla 50. Actividad enzimática de tripsina, pepsina amilasa, lipasa y proteasas totales en estómago y sacos pilóricos; y actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en muestras de corvinas alimentadas con las dietas control y IMMUNOTEC®. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, $P < 0,05$).

Tejido	Actividad (U/mg prot)	Dietas	
		Control	IMMUNOTEC®
Estomago + sacos pilóricos	Tripsina	0,00085 ± 0,00013 a	0,00114 ± 0,00029 a
	Pepsina	0,47 ± 0,07 a	0,52 ± 0,17 a
	Amilasa	0,33 ± 0,07 a	0,42 ± 0,05 b
	Lipasa	0,0040 ± 0,001 b	0,0075 ± 0,001 b
	Proteasas totales	0,017 ± 0,002 a	0,017 ± 0,006 a
Intestino	Fosfatasa alcalina	0,035 ± 0,010 a	0,037 ± 0,009 a

Niveles de peroxidación lipídica y actividad enzimas relacionados con estrés oxidativo

Los niveles de peroxidación lipídica, actividad total antioxidante y actividad de enzimas relacionados con el estrés oxidativo en corvinas alimentadas con las dietas experimentales fue evaluada en muestras de intestino e hígado, resultados que se muestran en las Tablas 51 y 52.

Tabla 51. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS), actividad total antioxidante (TAC) y niveles de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) medidos en hígados de doradas alimentadas con las dietas experimentales.

Tejido: Hígado	Control	APETEIN®	PEPTEIVA®
TBARS (mmol/mg proteína)	0,051 ± 0,011	0,081 ± 0,024	0,074 ± 0,019
TAC (conc/mg prot)	5,78 ± 1,51	4,89 ± 1,01	4,91 ± 0,79
SOD (% inhibición)	8,79 ± 0,95	8,22 ± 0,79	8,45 ± 0,66
CAT (nmol/min/mg prot)	151,08 ± 7,68	143,15 ± 6,22	149,9 ± 3,14
GR (nmol/min/mg prot)	10,07 ± 5,71	12,01 ± 3,78	11,96 ± 2,22
GST (nmol/min/mg prot)	155,57 ± 7,58	147,59 ± 6,22	160,33 ± 4,87
GPX (nmol/min/mg prot)	57,26 ± 5,97	50,44 ± 3,21	49,21 ± 7,23

Tabla 52. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS), actividad total antioxidante (TAC) y niveles de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) medidos en hígados de doradas alimentadas con las dietas experimentales.

Tejido: intestino	Control	APETEIN®	PEPTEIVA®
TBARS (mmol/mg proteína)	0,0365 ± 0,0329	0,0211 ± 0,0111	0,0241 ± 0,0194
TAC (conc/mg prot)	5,29 ± 1,05	4,41 ± 1,11	5,01 ± 0,79
SOD (% inhibición)	10,13 ± 4,48	9,78 ± 3,21	9,33 ± 2,45
CAT (nmol/min/mg prot)	47,12 ± 9,83	45,99 ± 3,48	46,41 ± 4,51
GR (nmol/min/mg prot)	7,13 ± 0,85	7,89 ± 0,99	7,77 ± 1,01
GST (nmol/min/mg prot)	93,36 ± 22,94	90,01 ± 15,10	84,59 ± 17,29
GPX (nmol/min/mg prot)	68,19 ± 20,08	70,01 ± 10,02	75,06 ± 15,41

Los niveles de peroxidación lipídica y actividad de enzimas antioxidantes medidos en intestino e hígado indicaron que no existieron diferencias significativas entre las dietas experimentales

evaluadas, resultados que están de acuerdo con los resultados de la Tarea A2.1 obtenidos en juveniles de dorada.

En relación al resto de parámetros (descripción de la organización histológica de tejidos diana, respuesta inmune no específica en suero y marcadores de estrés en mucus epidérmico), éstos están todavía en proceso de análisis por los distintos miembros del consorcio DIETAplus responsables de dichos análisis. En este estudio, se decidió que los análisis de microbiota intestinal no eran pertinentes a la vista de los resultados de la Tarea A2.1, y a partir de las conversaciones del equipo investigador con la empresa TECNOVIT-FARMFAES, se decidió focalizar el esfuerzo de trabajo y recursos disponibles en el análisis de las muestras de la Tarea A2.4.2 (ensayos de los aditivos ACITEC® y BUTYTEC®, TECNOVIT-FARMFAES).

En lo que concierne a los resultados del análisis transcriptómico de tejidos diana (qPCR) relativos a la Tarea A2.4.1, en la actualidad se están procesando las muestras derivadas de la actividad (extracción de RNA, análisis de su calidad y síntesis de cDNA) para su posterior análisis transcriptómico por qPCR de genes marcadores del estatus inmunológico. Sin embargo, se creyó conveniente esperar a los resultados de RNAseq derivados de la Tarea A1.3 con el fin de tener una base robusta de marcadores moleculares sobre los que trabajar en los estudios relacionados con la corvina.

Tarea A2.4.2: Estudio nutricional combinado de tipo dosis-respuesta de aditivos promotores de la salud y condición intestinal con funciones antiparasitarias y antimicrobianas asociadas en corvina

Es reconocido que la salud de la microbiota intestinal es esencial para la promoción de la salud y bienestar del hospedador. Los ácidos orgánicos y sus sales son capaces de inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos y, en consecuencia, preservar el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal. Los ácidos orgánicos también mejoran las secreciones pancreáticas, lo que aumenta la digestibilidad de los nutrientes. Resultados de distintos estudios indican que la suplementación de varios ácidos orgánicos en la dieta mejora el rendimiento de los peces (Reddy, 2015).

En particular, los efectos de los ácidos grasos de cadena media (MCFA) en la dieta se han estudiado en varias especies de peces. Los MCFA derivan principalmente de los triglicéridos de la dieta y las fuentes naturales de MCFA son generalmente el aceite de coco, el aceite de almendra de palma y la leche. Se ha sugerido que los MCFA tengan un papel en la regulación de la respuesta inmunológica, aunque su mecanismo de acción difiera del de los antibióticos, y que modulan positivamente la microbiota intestinal de los peces (Rimoldi et al., 2018).

Varios estudios sugieren que las actividades bacteriostáticas y bactericidas de los MCFA se deben a la capacidad de la disminución del pH del intestino, inclusive del pH citoplasmático de las bacterias, impidiendo de esta forma el crecimiento de bacterias patógenas sensibles al pH y favoreciendo la microbiota beneficiosa (Ringo et al., 2016; Piazzon et al., 2017).

Objetivos

El objetivo final del ensayo es estudiar el efecto potencial de la adición de aditivos microencapsulados (ACITEC-MC® y BUTYTEC-PLUS®, TECNOVIT-FARMFAES) con propiedades antiparasitarias y antimicrobianas derivadas de la inclusión de ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena media y aceites esenciales en los piensos de engorde para corvina.

Metodología

El ensayo nutricional correspondiente a esta tarea se ejecutó en paralelo con el descrito en la Tarea A2.4.1. Los detalles de la condición inicial de los peces, formulación de la dieta basal, fabricación de las dietas experimentales, metodología y condiciones de cultivo están descritos en la sección de la Tarea A2.4.1. La composición de las dietas evaluadas en este ensayo se describe en la Tabla 53. El ensayo tuvo una duración de 65 días, y al final del ensayo, todos los peces fueron muestreados en talla (longitud estándar, cm) y peso (g) previa anestesia con MS-222 (Sigma-Aldrich, España) como descrito en la tarea anterior.

Tabla 53. Listado de ingredientes y composición proximal de las dietas para corvina usadas para evaluar el efecto de distintos ingredientes y aditivos sobre la salud y condición de las mucosas.

Ingredients	CTRL	BUTYTEC	ACITEC
	%	%	%
Fishmeal LT70 (NORVIK)	35,00	35,00	35,00
CPSP 90	3,40	3,40	3,40
Soy protein concentrate (Soycomil)	10,00	10,00	10,00
Wheat gluten	6,60	6,60	6,60
Corn gluten	8,00	8,00	8,00
Soybean meal 48	5,00	5,00	5,00
Rapeseed meal	4,50	4,50	4,50
Wheat meal	13,63	13,45	13,33
Sardine oil - Sopropeche	12,35	12,35	12,35
Vit & Min Premix INVIVO 1%	1,00	1,00	1,00
Antioxidant powder (Verdilox)	0,20	0,20	0,20
Sodium propionate	0,10	0,10	0,10
L-Taurine	0,20	0,20	0,20
Yttrium oxide	0,02	0,02	0,02
BUTYTEC - TECNOVIT		0,180	
ACITEC - TECNOVIT			0,300
Total	100,00	100,00	100,00

Proximate composition	CTRL	BUTYTEC	ACITEC
Crude protein, % feed	50,4	50,4	50,4
Crude fat, % feed	16,2	16,2	16,2
Ash, % feed	8,0	8,0	8,0
Gross Energy, MJ/kg feed	22,1	22,1	22,1

Se realizaron dos muestreos de tejidos (Figura 154) seguidos del sacrificio de los peces por sobredosis de anestésico y las muestras fueron distribuidas entre los miembros del consorcio para su análisis.

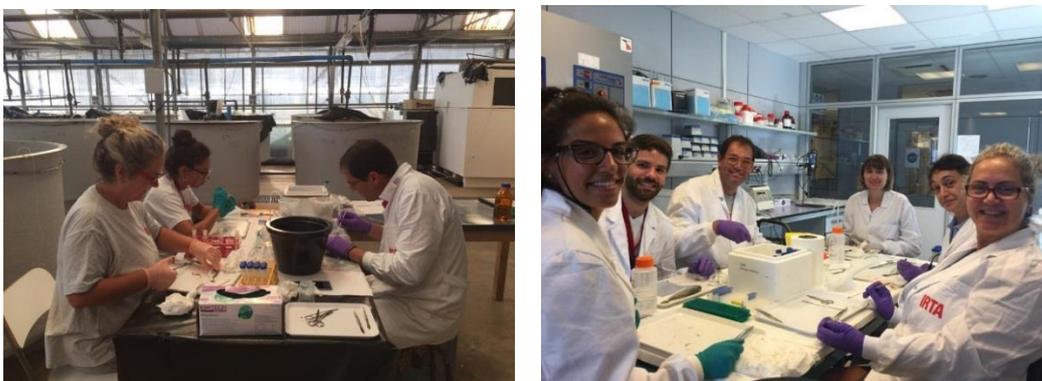


Figura 154. Imágenes del equipo investigador participante en el ensayo con corvinas realizando muestreos de tejidos a los 27 días de ensayo nutricional (izquierda) y muestreo de tejidos final del ensayo (derecha) en las instalaciones del IRTA-SCR.

La metodología utilizada para el análisis de los distintos parámetros evaluados con el fin de medir el efecto de las dietas experimentales sobre los juveniles de corvina, así como los análisis estadísticos realizados, es similar al del resto de metodologías ya descritas en la Tarea A2, y por consiguiente no procede describirlas en la presente sección.

Resultados

Crecimiento

Como descrito en la Tarea A.2.4.1, varios parámetros de performance se han analizado al final del ensayo nutricional. Los resultados indican que la inclusión de los aditivos BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC® en la dieta no afectó significativamente el crecimiento de las corvinas al cabo del periodo total de administración (Tabla 54). Si bien no se observan diferencias entre grupos experimentales, el crecimiento observado en los animales del presente estudio puede considerarse como bueno, con tasas de crecimiento específico comprendidas entre 3,7 y 3,8% del peso de los animales al día. Estos resultados relativos a la tasa de crecimiento dan validez al conjunto de resultados obtenidos en el estudio.

Tabla 54. Parámetros de crecimiento de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, ACITEC-MC® y BUTYTEC-PLUS® a final del ensayo nutricional. No se han observado diferencias significativas entre dietas (ANOVA, $P < 0,05$).

	Dietas		
	Control	BUTYTEC-PLUS®	ACITEC-MC®
FW (g)	70,57 ± 2,74	67,80 ± 3,24	68,40 ± 0,65
WG (g)	63,22 ± 2,74	60,45 ± 3,24	61,05 ± 0,65
DWG (g)	1,05 ± 0,05	1,01 ± 0,05	1,02 ± 0,01
SGR (%)	3,77 ± 0,06	3,70 ± 0,08	3,72 ± 0,02
K	1,74 ± 0,04	1,73 ± 0,07	1,74 ± 0,04
FCR	0,74 ± 0,04	0,77 ± 0,04	0,77 ± 0,01
Supervivencia (%)	98,92 ± 1,37	99,29 ± 1,43	100 ± 0,00

Composición proximal

La calidad del filete de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales se ha evaluado según su composición en proteína, lípidos, carbohidratos, humedad y cenizas como descrito en la tarea A2.1. La inclusión de los aditivos BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC® en la dieta de corvina no afectó significativamente ninguno de los parámetros evaluados a final del ensayo nutricional, tal y como se indica en la Tabla 55.

Tabla 55. Composición proximal del filete de las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC® a final del ensayo nutricional. No se han observado diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $P < 0,05$).

	Dietas		
	Control	BUTYTEC-PLUS®	ACITEC-MC®
Humedad (%)	76,66 ± 0,23	76,44 ± 0,85	76,87 ± 0,67
Proteína (%)	12,98 ± 0,16	13,01 ± 0,41	13,06 ± 0,28
Lípidos (%)	8,59 ± 1,16	8,61 ± 1,64	7,87 ± 1,53
Cenizas (%)	1,63 ± 0,09	1,52 ± 0,07	1,51 ± 0,06
CHO (%)	0,30 ± 0,06	0,33 ± 0,08	0,29 ± 0,12

Actividad enzimas digestivos

Los enzimas digestivos tripsina, pepsina, amilasa, proteasas totales y fosfatasa alcalina se analizaron según descrito en la Tarea A.2.4.1. y los resultados figuran en la Tabla 56. describe la actividad de estos enzimas en las distintas partes de tracto digestivo en las corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC®.

Los resultados permiten concluir que la inclusión de estos aditivos no afecta la actividad de los enzimas digestivos de una forma general, a excepción de la actividad de la amilasa que se ve significativamente aumentada en el estómago y sacos pilóricos de corvinas alimentadas con la dieta BUTYTEC-PLUS®. Este aumento puede deberse al mayor contenido en carbohidratos observado en la composición de esta dieta, pues los niveles de amilasa pancreática responden a los niveles de carbohidratos (almidón) de la dieta.

Tabla 56. Actividad enzimática de tripsina, pepsina amilasa, lipasa y proteasas totales en estómago y sacos pilóricos; y actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en muestras de corvinas alimentadas con las dietas control, BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC®. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, $P < 0,05$).

Tejidos	Actividad (U/mg prot)	Dietas		
		Control	BUTYTEC-PLUS®	ACITEC-MC®
Estómago + sacos pilóricos	Tripsina	0,00085 ± 0,0001	0,00108 ± 0,0002	0,00089 ± 0,0002
	Pepsina	0,47 ± 0,07	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,05
	Amilasa	0,33 ± 0,07 b	0,47 ± 0,07 a	0,30 ± 0,03 b
	Lipasa	0,0040 ± 0,0011	0,0036 ± 0,0012	0,0026 ± 0,0012
	Proteasas totales	0,017 ± 0,002	0,016 ± 0,005	0,014 ± 0,004
Intestino	Fosfatasa alcalina	0,035 ± 0,010	0,036 ± 0,009	0,032 ± 0,007

Niveles de peroxidación lipídica y actividad enzimas relacionados con estrés oxidativo

Se ha realizado el análisis de marcadores relacionados con el estrés oxidativo según la metodología descrita en la tarea A2.1. Los resultados de la actividad de los enzimas analizados se encuentran detallados en las Tablas 57 y 58, según el tejido considerado.

Se puede observar que la inclusión de ambos aditivos BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC® no afectó la actividad de ninguno de los enzimas relacionados con el estrés oxidativo evaluados ni los niveles de peroxidación lipídica (LPO) o la capacidad antioxidante total (TAC) en las muestras de intestino de corvina.

Tabla 57. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatióna reductasa (GR), glutatióna S-transferasa (GST), glutatióna peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD), peroxidación lipídica (LPO) y capacidad antioxidante total (TAC) en intestino de corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC®. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, P < 0,05).

Tejido: intestino	Dietas		
	Control	BUTYTEC-PLUS®	ACITEC-MC®
LPO (nmol/μl)	0,0365 ± 0,0329	0,0136 ± 0,0171	0,0474 ± 0,0143
TAC (nmol/μl)	5,29 ± 1,05	5,07 ± 0,71	4,32 ± 0,48
GR (nmol/min/mg prot)	7,13 ± 0,85	11,80 ± 2,84	12,76 ± 3,76
GST (nmol/min/mg prot)	93,36 ± 22,94	119,77 ± 34,79	169,51 ± 41,00
GPX (nmol/min/mg prot)	68,19 ± 20,08	73,15 ± 11,52	92,06 ± 14,49
SOD (% inhibición/mg prot)	10,13 ± 4,48	9,43 ± 3,15	17,14 ± 3,70
CAT (nmol/min/mg prot)	47,12 ± 9,83	56,90 ± 20,89	80,60 ± 21,42

Por otro lado, la alimentación con la dieta BUTYTEC-PLUS® produjo un aumento significativo en la actividad enzimática de la glutatióna peroxidasa (GPX) en hígado en comparación con la dieta control. Los demás marcadores analizados en hígado se han visto inalterados por la presencia de los aditivos en la alimentación.

Tabla 58. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatióna reductasa (GR), glutatióna S-transferasa (GST), glutatióna peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD), peroxidación lipídica (LPO) y capacidad antioxidante total (TAC) en hígado de corvinas alimentadas con las dietas experimentales control, BUTYTEC-PLUS® y ACITEC-MC®. Diferentes letras indican diferencias significativas entre dietas (ANOVA, P<0,05).

Tejido: hígado	Dietas		
	Control	BUTYTEC-PLUS®	ACITEC-MC®
LPO (nmol/μl)	0,0514 ± 0,0110	0,0202 ± 0,0248	0,0418 ± 0,0208
TAC (nmol/μl)	5,78 ± 1,51	6,19 ± 1,25	5,41 ± 0,56
CAT (nmol/min/mg prot)	151,08 ± 7,68	137,77 ± 34,45	120,55 ± 7,47
GR (nmol/min/mg prot)	10,07 ± 5,71	5,25 ± 1,19	6,70 ± 0,63
GST (nmol/min/mg prot)	155,57 ± 7,58	155,73 ± 20,32	143,46 ± 14,33
GPX (nmol/min/mg prot)	57,26 ± 5,97 b	94,03 ± 23,10 a	84,73 ± 11,62 ab
SOD (% inhibición/mg prot)	8,79 ± 0,95	8,26 ± 0,71	8,07 ± 0,91

Microbiota intestinal

En la Figura 155 se representan los resultados que se derivan de los dendrogramas obtenidos a partir de los patrones de DGGE obtenidos de las muestras de intestino posterior de las corvinas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Los resultados mostraron un agrupamiento de las muestras de los especímenes control en torno al 60%, si bien es de destacar que dos de ellas mostraron similitudes próximas al 70% en tanto que en las otras dos este porcentaje fue del 80%. Si bien las similitudes de los patrones de DGGE de los ejemplares de los que recibieron la dieta BUTYTEC-PLUS® fueron próximas al 64%, tres de los cuatro especímenes presentaron unas similitudes de sus patrones muy altas (próximas al 90%) La dieta funcional con el aditivo ACITEC-MC® es la que exhibió unas similitudes más bajas en sus patrones de DGGE.

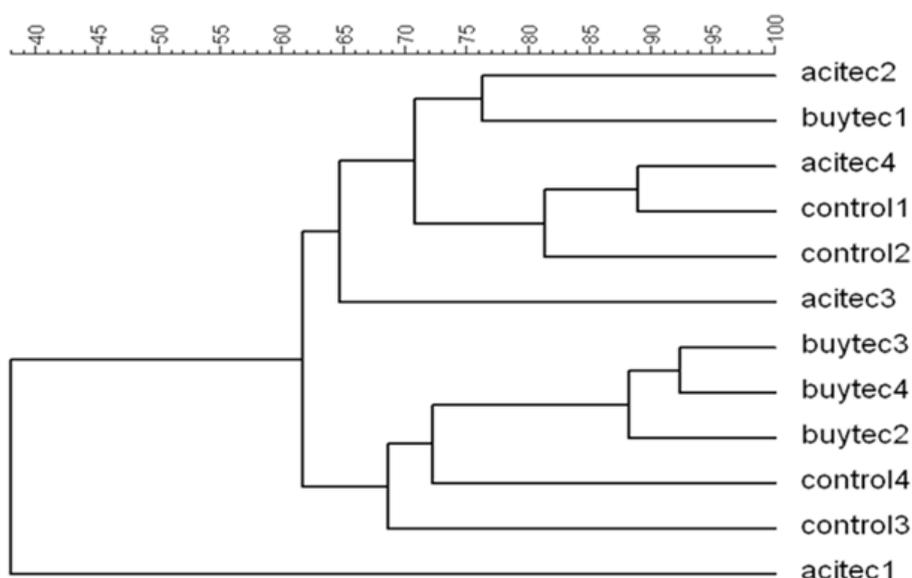


Figura 155. Análisis de los patrones de bandas de DGGE obtenidas a partir de las muestras de intestino posterior de ejemplares de *Argyrosomus regius* alimentadas con la dieta control, así como con otras suplementadas con ACITEC-MC® y BUTYTEC-PLUS®.

Por otra parte, en la Tabla 59 se muestran los valores de los parámetros ecológicos calculados a partir de los patrones de bandas de DGGE. Si bien la dieta con el aditivo BUTYTEC-PLUS® no mostró diferencias significativas respecto al tratamiento control, sí mostró incrementos significativos de todos los parámetros respecto a la microbiota de los peces alimentados con la dieta suplementada con el aditivo ACITEC-MC® ($P < 0,05$).

Tabla 59. Valores medios de los parámetros ecológicos de riqueza (R), índice de diversidad de Shannon (Ho) y de habitabilidad (Rr), obtenidos a partir de las muestras de intestino anterior y posterior de ejemplares de *Argyrosomus regius* alimentadas con una dieta control, así como con otras suplementadas con ACITEC-MC® y BUTYTEC-PLUS® (c): diferencias significativas (P < 0,05) respecto a la dieta BUTYTEC-PLUS®.

		TRATAMIENTOS		
		Controles	Acitec	Buitec
Diversidad	P	1,92±0,66	1,81±0,35 (c)	2,41±0,05
Habitabilidad	P	26,27±19,27	13,14±9,96 (c)	37,52±7,93
Riqueza	P	10,25±3,70	7,25±3,09 (c)	12,25±1,25

El análisis de los patrones de DGGE de las muestras de las corvinas alimentadas con las distintas dietas experimentales indican que, en el caso de la Dieta control, el patrón de bandas mostró una agrupación en torno al 60%. En cambio, la dieta suplementada con el aditivo BUTYTEC-PLUS® parece inducir una mayor similitud de los patrones de bandas, ya que la mayoría de los ejemplares de los que recibieron esta dieta presentaron unas similitudes de sus patrones próximas al 90%. Por el contrario, la dieta funcional ACITEC-MC® es la que exhibió una similitud más baja de sus patrones de DGGE, lo que nos estaría indicando una posible heterogeneidad de los grupos predominantes de microorganismos de la microbiota. Los valores de los parámetros ecológicos calculados no mostraron diferencias significativas entre la dieta control y las funcionales, si bien la dieta ACITEC-MC® mostró reducciones significativas de todos los parámetros en comparación con los valores calculados a partir de las muestras del tratamiento con BUTYTEC-PLUS®.

En resumen, en comparación con la dieta control las dietas funcionales no mostraron diferencias significativas sobre la microbiota del intestino posterior, aunque la dieta ACITEC-MC® mostró menores valores de riqueza, diversidad y habitabilidad que la microbiota de los especímenes alimentados con la dieta BUTYTEC-PLUS®, resultados que podrían venir dados por su diferente composición. Sin embargo, estos resultados no se han correlacionado con diferencias de crecimiento y/o fisiológica digestiva de los peces. Estos resultados indican que los aditivos evaluados no han resultado tener el efecto benéfico que se esperaba, por lo que TECNOVIT-FARMFAES está re-evaluando la formulación y composición de los aditivos evaluados con el fin de que sean validados en futuros ensayos con peces.

Tarea A2.5: Prueba de validación sobre el uso de un aditivo con propiedades sedantes para el transporte de peces

Durante la ejecución del proyecto DIETApplus y como fruto de la intensa relación del consorcio investigador con el sector privado, se generó la oportunidad de realizar una prueba de validación para evaluar el efecto de un sedante natural derivado de nopal (*Opuntia ficus indica*) para ser usado en el transporte de peces. Si bien, esta tarea no fue considerada dentro de la propuesta original del proyecto DIETApplus presentada al MAPAMA, el consorcio investigador ha decidido presentar los resultados preliminares del ensayo en esta memoria.

Introducción

El transporte de peces es una actividad común en el ámbito de la acuicultura, pero no menos importante que otras. Los métodos de transporte pretenden transportar el máximo de peces con el mínimo de volumen de agua y con una mortalidad mínima, y además de manera económica e impactando lo más mínimo en el bienestar y condición de los animales.

La capacidad de transporte, depende entre otros factores de la temperatura del agua, duración del transporte, el tamaño de los peces y la especie, entre otras variables. Para aumentar la supervivencia durante el transporte se utilizan algunos aditivos, por ejemplo: sedantes, estabilizadores de la calidad del agua y antibióticos, entre otros, algunos de los cuales reducen la tasa metabólica de los peces y otros mantiene la calidad del agua (Cole et al., 1999). En este contexto, no es sólo importante reducir el estrés derivado del alto hacinamiento y estímulos físicos y sonoros asociados al transporte, sino también afectar lo menos posible su bienestar, con el fin que una vez lleguen éstos a su destino, su recuperación será rápida y tendrá un bajo impacto sobre el crecimiento de los animales y su inmunidad.

Objetivos

Entre los distintos productos químicos y extractos de plantas con propiedades medicinales que han demostrado su eficacia como sedantes para el transporte de peces, en la presente tarea se ha pretendido evaluar el efecto de la adición de un extracto de *Opuntia ficus indica* (0.004 mL/L de agua) en una situación real de transporte de peces por carretera (4 horas).

Metodología

El aditivo a evaluar en el presente estudio fue un extracto de *Opuntia ficus indica* (origen: Nutri Biotech Services Ltd.; Malta) y el promotor del estudio fue la empresa privada española TECNIVIT – FARMFAES. La dosis de administración del producto (0,004 mL del extracto por L de agua) fue la recomendada por el fabricante del mismo, así como también su forma de administración disuelto en el agua de transporte.

Diseño experimental: transporte por carretera entre el Centro de investigación del IRTA en San Carlos de la Rápita y el estabulario de peces de la Universidad Autónoma de Barcelona en

Bellaterra (distancia = 180 Km; duración del trayecto = 4 horas y 45 minutos – distancia real recorrida = 510 km). Unidades experimentales: 2 cubas de 500 L de volumen cargadas en un vehículo de transporte (Nissan NAVARA), en cada una se transportan 50 doradas de peso medio de 350 g (densidad de transporte = 35 kg/m³). En una cuba realiza el transporte de los peces en condiciones estándar (niveles de oxígeno a saturación mediante la inyección de oxígeno disuelto 25 ppm y 19 °C), mientras que en la otra se disuelve el aditivo a la razón de 0,004 mL del extracto por L de agua. Los parámetros de temperatura y niveles de oxígeno disuelto en el agua fueron medidos a lo largo del trayecto hasta llegar a destino.

Una vez en la UAB, las cubas de transporte fueron vaciadas, los niveles de oxígeno y temperatura medidos, y los animales (n = 7) fueron anestesiados para la toma de muestras en ambos grupos experimentales. Para realizar el seguimiento de los animales una vez llegados a destino y ver su capacidad de recuperación, el resto de animales fue distribuido en dos tanques de 2.000 L (un tanque por condición experimental, conectados a un sistema de recirculación del agua dotado de un filtro biológico y UV).

Los siguientes parámetros fueron analizados en todos los puntos de muestro: presencia de lesiones externas en los animales, marcadores de estrés en mucus epidérmico y plasma, niveles de marcadores moleculares de estrés en cerebro e hipófisis, niveles de estrés oxidativo en muestras de hígado, branquia e hígado y perfil transcriptómico por microarray de intestino y riñón (respuesta inmune local y sistémica). Los tiempos de muestreo con el fin de evaluar el estado de los peces una vez finalizado el transporte y su recuperación a lo largo de los días siguientes fueron los siguientes (Figuras 156 y 157): T0 (antes de salida del IRTA) peces del mismo lote pero que no se transportaran (condición basal) 11 h AM día 0, n = 7; T1 (llegada a la UAB) 16 h PM día 0 - n = 7 por condición; T2 (UAB): 19 h PM día 1 (3 horas post llegada a la UAB) - n = 7 por condición; T3 (UAB): 11 h PM día 2 (19 h post llegada a la UAB, 24 h post T0) - n = 7 por condición y T4 (UAB): 22 h PM día 3 (38 h post llegada a la UAB) - n = 7 por condición.

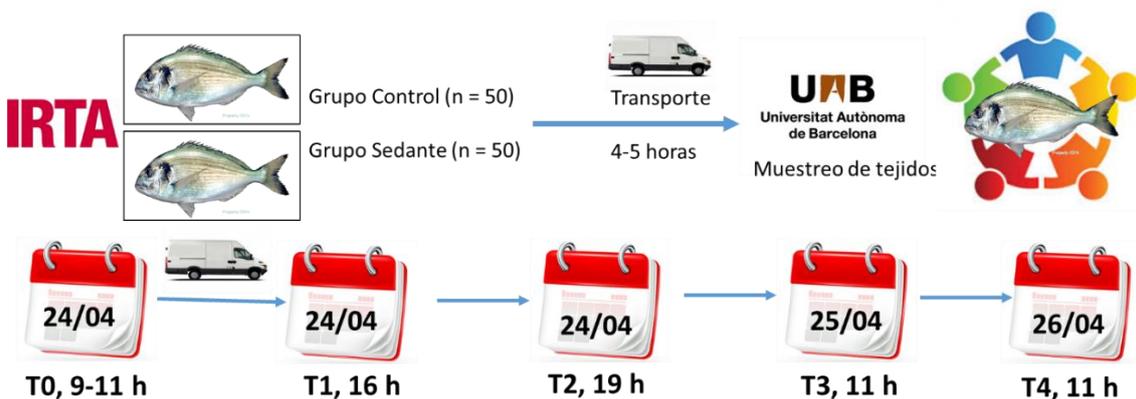


Figura 156. Planificación de la toma de muestras de peces transportados con la presencia y ausencia de un sedante en el agua para evaluar su eficacia en condiciones de transporte de elevada densidad. La toma de muestras del T0 corresponde una muestra de peces del mismo grupo pero que no fue transportada, valores que se consideran como basales para su comparación con el resto de nuestros realizados tras el transporte de los animales.

La metodología usada para el procesado y análisis de las muestras para distintos fines analíticos es similar al descrito en otras secciones de la presente memoria y, por lo tanto, no procede su descripción pormenorizada en esta sección del informe (ver Tareas A1.1, A2.1 y A2.2).

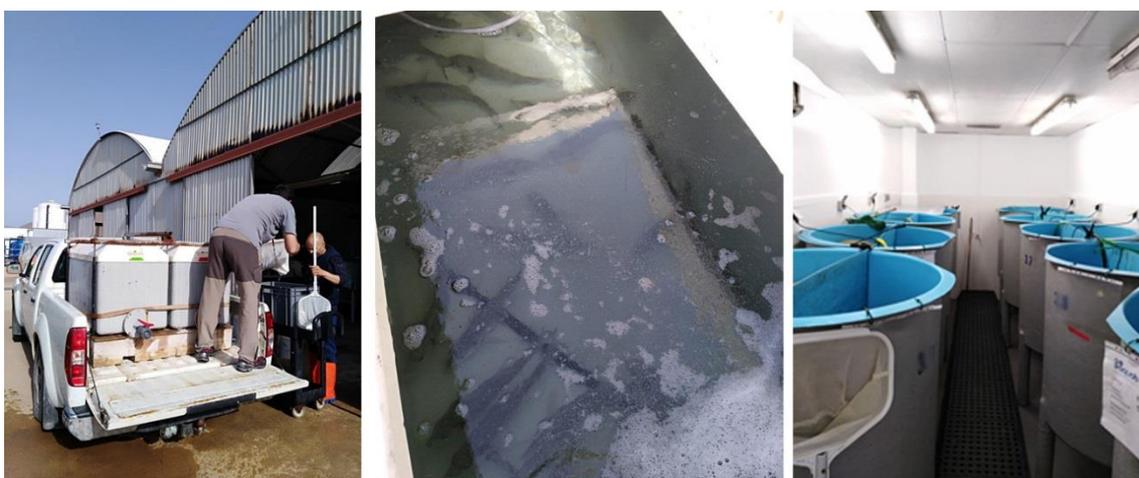


Figura 157. Imágenes de la carga de los peces en el vehículo de transporte en el IRTA de San Carlos de la Rápita, de los peces dentro de la cuba de transporte y de los tanques donde fueron depositados para estudiar su recuperación en el tiempo una vez llegados a las instalaciones de la UAB.

Resultados preliminares

Como se ha comentado anteriormente, la presente Tarea no estaba contemplada en el proyecto inicial DIETApplus presentado al MAPAMA, y como consecuencia de ello y con el fin de priorizar la finalización del resto de actividades y tareas del proyecto, el procesado de las muestras derivadas del ensayo ha sido relegado a un segundo plano con el fin de dar cumplimiento a las otras actividades del proyecto y, por lo tanto, sólo se presentan algunos resultados preliminares de algunas variables medidas. El resto de resultados será entregado a la empresa promotora del estudio TECNOVIT-FARMFAES una vez estén disponibles (primer semestre 2020; Doctorado Industrial).

Condiciones de transporte: los valores de temperatura y oxígeno disuelto en el agua se recogen en la Tabla 60. Durante el transporte se produjo un aumento de la temperatura del agua como resultado de la insolación de las cubas de transporte de los peces y a que dicho transporte se realizó durante el mes de abril. Los niveles de oxígeno disuelto estuvieron por encima de los valores de 100% de saturación, no encontrándose diferencias entre los grupos experimentales ya que la difusión de oxígeno en las cubas de transporte no fue controlada.

Supervivencia: a las 24 horas después del transporte no se observaron bajas en el grupo de peces que había sido transportado con el sedante de *Opuntia ficus indica*, mientras que en grupo control se observaron 4 bajas (9,3% de mortalidad).

Tabla 60. Valores de temperatura y oxígeno disuelto en el agua de los tanques de transporte donde fueron transportadas doradas durante 4 horas y 45 minutos de viaje. Los valores de la derecha corresponden al tanque con el sedante y los de la izquierda al tanque control (sin sedante).

	Temperatura (°C)	Oxígeno (ppm)
Punto origen (km 0); t = 0 h	19,0 - 19,1	24,5 – 25,2
Punto intermedio (km 330); t = 2 h	19,3 – 19,4	23,1 – 23,0
Punto Final (km 510); t = 4 h 45 min	21,1 – 21,3	19,3 – 19,0

Apariencia externa de los animales: en términos generales los peces del grupo control presentaron un color ligeramente más oscuro que los del grupo transportado con el sedante, así como una incidencia mayor de lesiones en la piel (85%), lesiones que fueron observadas a lo largo de la línea lateral y pedúnculo caudal del animal y que consistieron en una descamación de la piel y presencia de pequeñas zonas petequiales, tal y como se puede apreciar en la Figura 158. La incidencia de dichas lesiones en los peces transportados con el sedante fue mucho menor (30%) y su severidad también fue reducida.



Figura 158. Ejemplo de una dorada transportada durante 4 h 45 minutos a una elevada densidad (35 kg/m³). En la imagen se puede observar una zona con una importante descamación por debajo de la línea lateral y por encima del

límite de la aleta pectoral, así como ligeras petequias en la zona afectada. La imagen corresponde a una dorada del grupo control.

Marcadores de estrés en mucus epidérmico: los resultados de las variaciones de proteína, glucosa y lactato en moco epidérmico en peces transportados con y sin un sedante extraído de *Opuntia ficus indica* se muestran en la Figura 159.

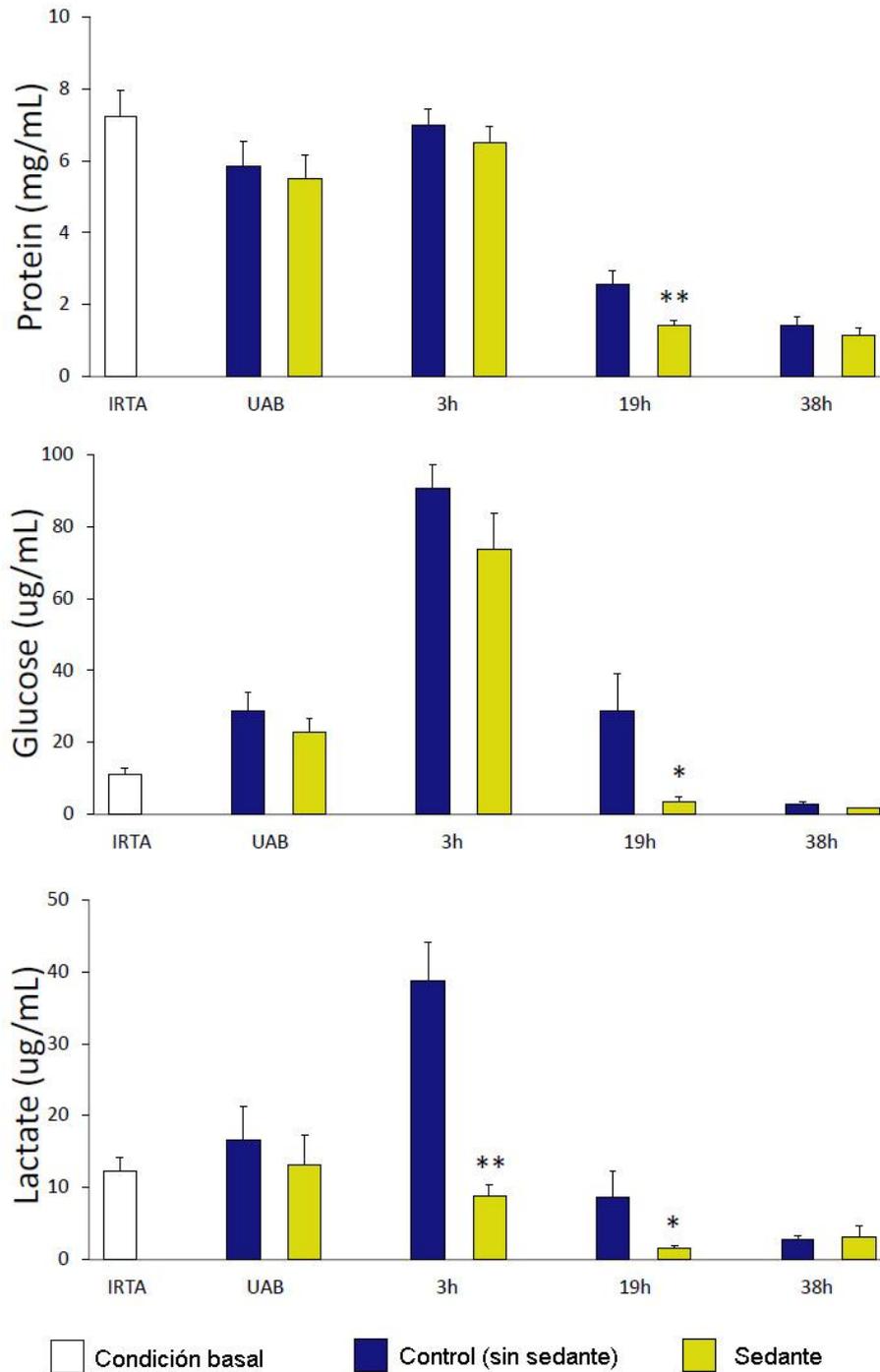


Figura 159. Niveles de proteína, glucosa y lactato medido en mucus epidérmico de dorada transportada con y sin la presencia de un sedante derivado de *Opuntia ficus indica* durante 4 horas y 45 minutos. Análisis estadístico: ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tal y como se puede apreciar en la Figura 159, como resultado de las más de cuatro horas de transporte se observa un incremento en los niveles de glucosa y lactato en el mucus epidérmico de los peces de ambos tratamientos, cambios que no van asociados a variaciones en los niveles de proteína.

A las 3 h después de la llegada de los peces a su destino final, se observa un importante aumento significativo en los niveles de lactato en los peces transportados con y sin el sedante en relación a los niveles de este marcador de estrés tras su llegada al destino final ($P < 0,05$). Sin embargo, es importante destacar que, en los peces transportados con el sedante, los niveles de lactato son inferiores a los del grupo control ($P < 0,05$), resultados que indican una respuesta atenuada frente al estrés en comparación con el grupo control. Los niveles de proteína y glucosa se mantuvieron estables entre ambos grupos ($P > 0,05$), si bien se observó también un importante aumento de los niveles de glucosa a las 3 horas post-transporte.

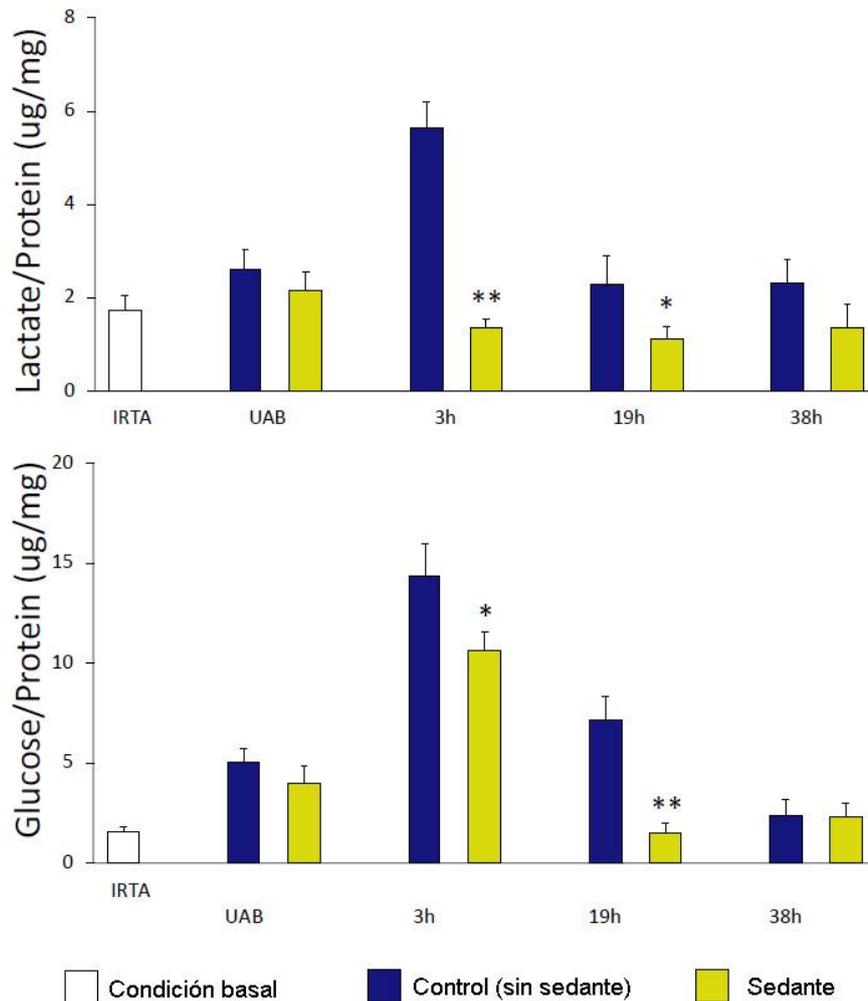


Figura 160. Valores de las ratios glucosa/proteína y lactato/proteína medidos en mucus epidérmico de dorada transportada con y sin la presencia de un sedante derivado de *Opuntia ficus indica* durante 4 horas y 45 minutos. Análisis estadístico: ** P < 0,01; * P < 0,05.

A las 19 horas tras el transporte, los niveles de proteína, glucosa y lactado en el mucus epidérmico se ven reducidos en todos los tratamientos en comparación con los valores medios a las 3 h, siendo los niveles de glucosa y lactato significativamente menores en los peces transportados con el sedante disuelto en agua que en los del grupo control (P < 0,05).

A las 38 h post-traslado de los peces ya no se observaron diferencias entre ambos grupos experimentales (P > 0,05) y se considera la situación de estrés derivada del transporte de los peces como normalizada al recuperarse los niveles basales medidos antes del transporte.

Al representar los valores de glucosa y lactato estandarizados con los niveles de proteína en el moco, se observan unos resultados similares a los presentados anteriormente cuando los parámetros medidos no eran corregidos. Sin embargo, los datos de la Figura 160 indican que ya a las 3 horas después del transporte los niveles de glucosa/proteína eran significativamente más

bajos en el grupo transportado con el sedante. En el caso del lactato, la estandarización de los niveles del citado metabolito no afectó los resultados anteriormente presentados.

Los resultados derivados del estudio de los marcadores de estrés en moco indican que en los animales transportados con el sedante se observa una atenuación en los marcadores de estrés (glucosa y lactato), así como también una recuperación mucho más rápida de los niveles basales de los mismos.

Otros parámetros: en relación al resto de muestras tomadas para el análisis de marcadores de estrés en cerebro e hipófisis, estudio de la respuesta transcriptómica en tejidos diana (bazo e intestino) y niveles de estrés oxidativo en intestino, branquias e hígado se están procesando en la actualidad, y por lo tanto todavía no se disponen de resultados sobre dichos análisis.

Conclusiones preliminares

El uso de un extracto del nopal (*Opuntia ficus indica*) disuelto en agua ha resultado ser una estrategia positiva para atenuar el estrés derivado del transporte en ejemplares de dorada, tal como los marcadores de estrés en mucus epidérmico (glucosa y lactato) muestran, así como también favorecen que los animales recuperen antes su condición basal. Además, la aplicación del sedante reduce las lesiones en piel y aletas ocasionadas derivadas del transporte y reduce la mortalidad de los peces durante las horas posteriores al transporte. El análisis del conjunto de datos y variables que se encuentran en curso permitirá esclarecer con certeza los mecanismos de acción del citado producto y sus beneficios sobre el organismo.

Referencias bibliográficas Actividad 2

Akter, M.N, Sutriana, A., Talpur, A.D., Hashim, R. 2016. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture International*, 24: 127-144.

Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 62-72.

Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164: 321–329.

Bogolino, A., Darias, M.J., Estévez, A., Andree, K.B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J.B., Gisbert, E. 2014. The effect of dietary oxidized lipid levels on growth performance, antioxidant enzyme activities, intestinal lipid deposition and skeletogenesis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 20: 692-711.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

Califano, G., Castanho, S., Soares, F., Ribeiro, L., Cox, C.J., Mata, L., Costa, R. 2017. Molecular Taxonomic Profiling of Bacterial Communities in a Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Hatchery. *Frontiers in Microbiology*, 8: 204.

Campoverde, C., Milne, D. J., Estévez, A., Duncan, N., Secombes, C.J., Andree, K.B. 2017. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish & Shellfish Immunology*, 69, 200-210.

Carballo, C., Pinto, P.I.S., Mateus, A.P., Berbel, C., Guerreiro, C.C., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Mantecon, L., Power, D.M., Manchado, M. 2019. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish and Shellfish Immunology* 92: 31–39

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Moriñigo, M.Á., Esteban, M.Á. 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 1063-1070.

- Chaikiang, C., Wichienchot, S., Youravoug, W., Graidis, P. 2015. Evaluation on prebiotic properties of β -glucan and oligo- β -glucan from mushrooms by human fecal microbiota in fecal batch culture. *Functional Foods in Health and Diseases*, 5: 395-405.
- Chen, L.Q., L.M. Zhan, Z.F. Fang, Y. Lin, T.H. Yan, D. Wu. 2012. Effects of dietary protein sources on growth performance and immune response of weanling pigs. *Livest. Sci.*, 148: 1–9.
- Choi, S.H., Park, K.H., Yoon, T.J., Kim, J.B., Jang, Y.S., Choe, C.H. 2008. Dietary Korean mistletoe enhances cellular non-specific immune responses and survival of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 67-73.
- Cole, B., Tamaru, C.S., Bailey, C., Brown, R.C., Ako, H. 1999. Shipping Practices in the Ornamental Fish Industry CTSA Publication No. 131, Purdue University - USA.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Biochim. Biophys. Acta*, 554: 264–267.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 101: 203-210.
- Dhabhar, F.S. 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16: 300-317.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Andersen, G. L. 2006. Green genes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5069-5072
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies S.J. 2010. Effects of mannan oligosaccharides (MOS) supplementation on growth performance feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300: 182-188.
- Duncan N., Estevez A., Padros F., Aguilera C., Montero F.E., Norambuena F., Carazo I., Carbo R., Mylonas C. 2008. Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium*, 32: 332-333.
- El-Galil Mohamed A.A. Shawky M. 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Veterinary Parasitology*, 185: 57–63.
- Encarnaç o, P. 2016. 5 – Functional feed additives in aquaculture feeds. Editor(s): Sergio F. Nates, *Aquafeed Formulation*, Academic Press, 217-237.

- Estruch, G., Collado, M.C., Peñaranda, D.S., Tomás Vidal, A., JoverCerdá, M., Pérez Martínez, G., Martínez-Ilorens, 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: e0136389.
- Fanouraki, E., C.C. Mylonas, N. Papandroulakis, M. Pavlidis. 2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, 173: 313-322.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Rossi, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4: 634-643.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernandez, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex*, during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381–387.
- Gisbert, E., Skalli, A., Campbell, J., Solovyev, M.M., Rodríguez, C., Dias, J., Polo, J. 2015. Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and enhances the immune status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Journal of Animal Science*, 93: 278-286.
- Gonçalves, A.T., Gallardo-Escárate, C. 2017. Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre- and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 122: 1333-1347.
- Graham, S., A.H. Jeffries y C.J. Secombes. 1988. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 11: 389-396.
- Guardiola, F.A., A. Cuesta, E. Abellán, J. Meseguer, M.A. Esteban. 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 40: 24-31.
- Guz, L., Puk, K., Walczak, N., Oniszczuk, T., Oniszczuk, A. 2014. Effect of dietary supplementation with *Echinacea purpurea* on vaccine efficacy against infection with *Flavobacterium columnare* in zebrafish (*Danio rerio*). *Pol. J. Vet. Sci.*, 17:583-586.
- Hirazawa N Ohtaka T. Hata K. 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 188: 1–13.

Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.*, 118: 515–520.

Hugenholtz, F., Mullaney, J.A., Kleerebezem, M., Smidt, H., Rosendale, D.I. 2013. Modulation of the microbial fermentation in the gut by fermentable carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2: 133-142.

Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 59–69.

Jung-Schroers, V., Adamek, M., Jung, A., Harris, S., Dóza, O.S. 2016. Baumer, A., Steinhagen, D. 2016. Feeding of β -1,3/1,6-glucan increases the diversity of the intestinal microflora of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*, 22: 1026–1039

Kühlwein, H., Emery, M.J., Rawling M.D., Harper G.M., Merrifield D.L., S.J. Davies S.J. 2013. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 115: 1091-1106

Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Beiko, R. G. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31: 814.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

Macedo I T.F. Bevilaqua C M.L. de Oliveira. L M.B. Camurça-Vasconcelos A.L.F., Nascimento, N.R.F. 2010. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173: 93–98.

Maggiore, M.A., Albanese Liesel, A.A., Gende Martín, B., Eguaras, J., Denegri, G.M., Elisondo M.C. 2012 Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitology Research*, 110: 1103–1112.

Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O.A., Ramírez Saad, H.C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012.

Martínez, G., Shaw, E. M., Carrillo, M., Zanuy, S. 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24: 238-239.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10 : 1571-1581.

Medina-Córdoba, NN., Reyes-Becerril, MM., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdoba, A.I., Angulo, C. 2018. Immunostimulant effects and potential application of β -glucans derived from marine yeast *Debaryomyces hansenii* in goat peripheral blood leucocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116: 599-606.

Merella P., Cherchi S., Garippa G., Fioravanti M.L., Gustinelli A., Salati F. 2009. Outbreak of *Sciaenacotyle panceri* (Monogenea) on cage-reared meagre *Argyrosomus regius* (Osteichthyes) from the western Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Organ.*, 86: 169-173.

Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.*, 26: 133-142.

Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B.H. 2016. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. *Fish & Shellfish Immunology*, 48: 94-104.

Militz, T.A., Southgate, P.C., Carton, A.G., Hutson, K.S. 2014. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 37: 451-461.

Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A., Peres, H. 2017. Meat and bone meal as partial replacement for fishmeal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture*, 468: 271-277.

Nakano, T., Afonso, L.O., Beckman, B.R., Iwama, G.K., Devlin, R.H. 2013. Acute physiological stress down-regulates mRNA expressions of growth-related genes in coho salmon. *PLoS One*, 8: e71421.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 2-14.

Observatorio Español de Acuicultura (OESA). 2017. Consulta online en http://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/acuicultura_en_esp2016.pdf, fecha de acceso 13/06/2017.

Ohno, Y., Kawano, F., Hirazawa, N. 2009. The effect of oral antibiotic treatment and freshwater bath treatment on susceptibility to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection of amberjack (*Seriola dumerili*) and yellowtail (*S. quinqueradiata*) hosts. *Aquaculture*, 292: 248-251.

Oskoi, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P., Sadeghi, E. 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Physiol Biochem.*, 38: 1029-1034.

- Øverli, Ø., Winberg, S., Pottinger, T.G. 2005. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout—a review. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 463-474.
- Ortiz-Delgado, J. B., Behrens, A., Segner, H., Sarasquete, C. 2008. Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B (a) P and TCDD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69: 80-88.
- Ortuño, J., M. A. Esteban, V. Mulero, and J. Meseguer. 1998. Methods for studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.) serum. In *Methodology of Fish Disease Research*. Edited by A. C. Barnes, G. A. Davidson, M. Hiney and D. McInthos. Fisheries research service, Aberdeen pp. 97-100.
- Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S. 2002 Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 109: 59–63.
- Piazzon, M.C., Calduch-Giner, J.A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto, M., Karalazos, V., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J. 2017. Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, 5: 164.
- Pickering, A.D. 1993. Growth and stress in fish production. En: *Genetics in Aquaculture*, Elsevier, pp. 51-63.
- Quilichini Y., Foata J., Marchand B. 2009. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Microcotyle pancerii* (monogenea: polyopisthocotylea: microcotylidae), parasite of meagre *Argyrosomus regius* (Pisces: teleostei). *J. Parasitol.*, 95: 261-270.
- Reddy, J. 2015. Probiotics in aquaculture: importance, influence and future perspectives. *International Journal of Bioassays*, 4 : 3710-3718.
- Redman, C.A., Robertson, A.P., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J., Martin, R.J., 1996. Plaziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today*, 12: 14–20.
- Robertson, S.J., Martin, R.J., 1993. Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasites *Ascaris suum*. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 170–178.
- Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D.; Ascencio-Valle, F., Esteban, MA. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 731-739
- Rimoldi, S., Gliozheni, E., Ascione, C., Gini, E., Terova, G. Effect of a specific composition of short- and medium-chain fatty acid 1-Monoglycerides on growth performances and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *PeerJ*, 6: e5355.

Ringø, E. , Zhou, Z. , Vecino, J. , Wadsworth, S. , Romero, J. , Krogdahl, Å. , Olsen, R. , Dimitroglou, A., Foey, A. , Davies, S. , Owen, M. , Lauzon, H. , Martinsen, L. , De Schryver, P. , Bossier, P. , Sperstad, S. and Merrifield, D. 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, 22: 219-282.

Ross, N.W., K.J. Firth, A. Wang, J.F. Burka, S.C. Johnson. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 43-51.

Salles C.M.C, P. Gagliano, S.A.T. Leitao, J.B Salles, H.L.M. Guedes. V.P.F. Cassano, S. Giovanne De-Simone. 2007. Identification and characterization of proteases from skin mucus of tambacu, a Neotropical hybrid fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 33: 173–179

Sanahuja I., A. Ibarz. 2015. Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators. *Fish and Shellfish Immunology*, 46: 426-435.

Sarasquete, C. 2005. New tetrachromic VOF stain (Type III-GS) for normal and pathological fish tissues. *European Journal of Histochemistry*, 49: 211-220.

Serra, C.R., Magalhães, F. Jr., Couto, A., Oliva-Teles, A., Enes, P. 2018. Gut microbiota and gut morphology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles are not affected by chronic oxide as digestibility marker. *Aquaculture Research*, 49: 1347–1356.

Sitjà-Bobadilla, A., Felipe, M. C., Alvarez-Pellitero, P. 2006. In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261: 856–864.

Shannon, C.E., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication—University of Illinois Press. Urbana, 117.

Shinn, A.P., Bron, J.E. 2012. Chapter 8: Considerations for the use of anti-parasitic drugs in aquaculture. En: Austin, B. (Ed.) *Infectious Disease in Aquaculture*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 190-216.

Soares F., Quental Ferreira H., Moreira M., Cunha E., Ribeiro L., Pousão-Ferreira P. 2012. First report of *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*). *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.*, 32: 30-33.

Sutili, F. J., Gatlin III, D. M., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B. 2017. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture* 0, 1–11.

Swain, P., Dash, S., Sahoo, P., Routray, P., Sahoo, S., Gupta, S., Meher, P., Sarangi, N. 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 38-43.

Tapia-Paniagua, S. T., Chabrellón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I. G., Lobo, C., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology*, 60: 310-319.

- Tapia-Paniagua, S.T., Reyes-Becerril, M.R., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.A., Clavijo, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. 2011. Modulation of the Intestinal Microbiota and Immune System of Farmed *Sparus aurata* by the Administration of the Yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in Conjunction with Inulin. *Journal of Aquaculture Research & Development*, S1: 012.
- Ternengo S., Agostini S., Quilichini Y., Euzet L., Marchand B. 2010. Intensive infestations of *Sciaenocotyle pancerii* (Monogenea, Microcotylidae) on *Argyrosomus regius* (Asso) under fish-farming conditions. *J. Fish Dis.*, 33: 89-92.
- Toksen E., Buchmann K., Bresciani, J. 2007. Occurrence of *Benedenia sciaenae* van Beneden, 1856 (Monogenea: Capsalidae) in cultured meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) (Teleost: Sciaenidae) from western Turkey. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.*, 27: 250-253.
- Torrallardona, D., M. R. Conde, I. Badiola, J. Polo, J. Brufau. 2003. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J. Anim. Sci.*, 81: 1220–1226.
- Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M. 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 525-544.
- Tort, L., Padros, F., Rotllant, J., Crespo, S. 1998. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 37-47.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234: 415-427.
- Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300: 142-147.
- Wang, Y., Ames, N.P., Tun, H.M., Tosh, S.M., Jones, P.J., Khafipour, E. 2016. High molecular weight barley β -glucan alters gut microbiota toward reduced cardiovascular disease risk. *Frontiers in Microbiology*, 7: 129.
- Wang, H., Zhang, X., Wang S., Li, H., Lu, Z., Shi, J., Xu, Z. 2018. Mannan-oligosaccharides modulates the obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *Food & Nutrition*, 9: 3916-3929.
- Wen, H., W. Jiang, Y. Liu, J. Jiang, S. Li, L. Tang, Y. Zhang, S. Kuang y X. Zhou. 2014. Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 40: 275-287.

Wooster, G. A., Martinez, C. M., Bowser, P.R. 2005. Human Health Risks Associated with Formalin Treatments Used in Aquaculture: Initial Study. North American Journal of Aquaculture, 67: 111–113.



ACTIVIDAD 3. COORDINACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL PROYECTO

Durante la ejecución del proyecto DIETApplus, el consorcio ha mantenido un estrecho contacto entre sus miembros con el fin de organizar y coordinar el trabajo, así como también gestionar el intercambio de muestras entre grupos y valorar los resultados de los distintos ensayos de forma coral. El IFAPA y el IRTA se han encargado de ejecutar y organizar los ensayos biológicos de las Actividades 1 y 2, respectivamente, pues toda la parte relacionada con ensayos nutricionales y de cultivo se ha realizado en las instalaciones de dichos centros públicos de investigación. Una vez ejecutados dichos ensayos, las muestras de los distintos tejidos fueron repartidas entre los miembros del consorcio con el fin de que cada grupo investigador realizara los análisis correspondientes. Una vez realizados dichos análisis, los resultados de los mismos eran compartidos y discutidos entre el equipo investigador y posteriormente comunicados a las empresas privadas implicadas en los ensayos. Este tipo de comunicación, que podemos considerar más del día a día, se ha llevado a cabo mediante conductos normales como son el correo electrónico, llamadas telefónicas y mensajes en grupo de WhatsApp. La discusión de los resultados se ha realizado mediante reuniones presenciales entre los miembros del consorcio cuando su proximidad geográfica así lo permitía.

Además de la gestión diaria del proyecto, el consorcio se ha reunido de forma conjunta en tres ocasiones, coincidiendo con el inicio, parte intermedia y final del proyecto. Estas reuniones siempre se han realizado coincidiendo con eventos científicos en los que participaran todos los miembros del consorcio, de esta manera se usaba de forma más eficiente el presupuesto para viajes del proyecto. Durante la primera anualidad el proyecto se han realizado dos reuniones presenciales de todos los miembros del consorcio. La primera reunión (25/01/2017) se celebró en la Universidad de Murcia (Figura 161) y fue organizada por la Dra. María Ángeles Esteban, en ella se trataron aspectos organizativos relacionados con el inicio del proyecto, revisión de protocolos experimentales e intercambio de muestras entre miembros del consorcio y cómo proceder con las subcontrataciones vinculadas al proyecto.



Figura 161. Foto del consorcio en la reunión inicial del proyecto; reunión a la que fueron invitados los grupos de investigación que potencialmente podían ser contratados.

La segunda reunión presencial de todos los miembros del consorcio se celebró en Zaragoza (7/10/2017, Hotel NH Sport; Figura 162) coincidiendo con la celebración de XVI Congreso Nacional de Acuicultura en el que el proyecto presentaba sus avances en una sesión sobre los Planes Nacionales. Durante esta reunión se trataron temas relacionados con la justificación

económica y técnica del proyecto, solicitud de cambios en las partidas y plazos de justificación a la entidad financiadora, así como también temas técnicos relacionados con la evolución del proyecto, incidencias y estado de ejecución de las distintas tareas.



Figura 162. Fotos del consorcio en la segunda reunión del proyecto celebrada coincidiendo con la celebración del XVI Congreso Nacional de Acuicultura en Zaragoza.

La tercera y última reunión del consorcio se celebró coincidiendo con el XVII Congreso Nacional de Acuicultura (Cartagena). La reunión tuvo lugar el 8 de mayo y tuvo como objetivo principal la evaluación de la Sesión del congreso dedicada al proyecto DIETApplus, hacer un seguimiento de los trabajos (publicaciones) en curso y preparación del informe técnico-científico del proyecto y justificación económica del mismo (Figura 163).



Figura 163. Foto de los miembros del consorcio en la reunión inicial del proyecto durante la celebración del XVII Congreso Nacional de Acuicultura en Cartagena.

Finalmente mencionar que, en casos de incidencias en el desarrollo de las experiencias, el coordinador del proyecto junto con los responsables de cada entidad valoraron y aplicaron un plan de contingencia, tal y como está descrito para algunas de las tareas de las Actividades 1 (Tarea A1.4) y 2 (Tareas A2.1 y A2.2). Además del seguimiento científico y técnico del proyecto, DIETApplus ha contado con la ayuda inestimable de la Oficina de Proyectos del IRTA quien ha dado apoyo en la gestión y justificación económica global del proyecto, gestión que también se ha visto apoyada por las oficinas respectivas del IFAPA, UAB y Universidad de Murcia.

ACTIVIDAD 4. DIFUSION DE LOS RESULTADOS

La presente actividad tiene como objetivo el comunicar a la sociedad y comunidad científica sobre los resultados más relevantes generados por el proyecto. Esta actividad tiene distintos objetivos específicos según el destinatario final de la información.

Así, por ejemplo, DIETApplus a través de noticias en prensa locales y páginas web generalistas ha acercado el sector de la acuicultura al ciudadano de pie y potencial consumidor de los productos acuícolas, promoviendo una imagen del pescado de crianza como un producto sano y sostenible mediante la explicación de cuáles eran los objetivos del proyecto y los beneficios del uso de aditivos en dietas funcionales. DIETApplus a través de revistas sectoriales y páginas web específicas (p.ej. www.mispecies.com; www.ipacuicultura.com) ha ido difundiendo los avances del proyecto y sus resultados más relevantes, con el fin de comunicar al sector información que podría ser de su interés.

Este tipo de estrategia comunicativa también ha sido usada para informar a la comunidad científica de los avances y novedades del proyecto, información que ha sido complementada con distintas publicaciones científicas derivadas del proyecto y de una página específica del mismo dentro de Researchgate (103 seguidores y 762 lecturas de contenido; datos descargados el 01/07/2019).

<https://www.researchgate.net/project/DIETplus-Nutritional-strategies-for-the-improvement-of-the-productive-yield-the-use-of-functional-feeds-in-aquaculture>

Esta estrategia ha sido complementada con una participación muy activa de todos los miembros del consorcio en distintos congresos científicos de ámbito nacional e internacional con el fin de divulgar y promover el conocimiento generado por el proyecto DIETApplus, tal y como se indica a continuación.

➤ Artículos científicos

Los autores del presente informe científico quieren destacar que el listado de artículos que se enumera a continuación sólo hace referencia a aquellos trabajos que han sido publicados antes de la fecha de redacción del presente informe, pero que la lista de trabajos que finalmente derivará del presente proyecto será mucho más amplia, si bien muchos de estos trabajos se encuentran todavía en fase de redacción y preparación debido a su complejidad y a la elevada cantidad de datos que contienen.

1. Asencio-Alcudia, G., Andree, K.B., Giráldez, I., Tovar-Ramirez, D., Alvarez-González, A., Herrera, M., Gisbert, E., 2019. Stressors due to handling impair gut immunity in meagre (*Argyrosomus regius*): the compensatory role of dietary L-tryptophan. *Frontiers in Physiology* 10, 547.
2. Firmino, J., Furones, M. D., Andree, K. B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Asencio-Alcudia, G., Gisbert, E., 2019. Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 511, 734210.
3. Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., Ibarz, A., 2019. Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus. *Aquaculture* 499, 185-194.
4. Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., Ibarz, A., 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of the Total Environment* 644, 1323-1335.
5. Gisbert, E., Fournier, V., Solovyev, M., Skalli, A., Andree, K.B., 2018. Diets containing shrimp protein hydrolysates provided protection to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected by a *Vibrio pelagius* natural infection outbreak. *Aquaculture* 495, 136-143.
6. González, D., Herrera, M., Giráldez, I., Esteban, M.A., 2018. Effects of the Dietary Tryptophan and Aspartate on the Immune Response of Meagre (*Argyrosomus regius*) after Stress. *Fishes* 3, 6.



➤ Participación en congresos científicos

Comunicaciones orales

1. Herrera, M., 2018. DIETAPLUS: Estrategias nutricionales para la mejora del rendimiento productivo: el uso de piensos funcionales en la acuicultura. Jornada Día de la Acuicultura – Investigar para crecer (Universidad de Cádiz, noviembre 2018).
2. Fernández-Alacid, L., Gisbert, E., Herrera, M., Sanahuja, I., Firmino, J.P., Ordóñez-Grande, B. Sánchez-Nuño, S., Ibarz, A., 2019. Buscando marcadores en el mucus epidérmico para el estudio de dietas funcionales. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 54-55.
3. Gisbert, E., Esteban, M.A., Tort, L., Sarasquete, M.C., Moriñigo, M.A., Ibarz, A., Herrera, M., Mancera, J.M., 2017. Estrategias nutricionales para la mejora en el rendimiento productivo: uso de piensos funcionales y dietas salud en acuicultura. PNA DIETApplus. Libro de Actas del XVI Congreso Nacional de Acuicultura, Zaragoza (3-5 octubre), pp. 144-146.
4. Gisbert, E., 2018. Ponencia: Cuando el tamaño no siempre es lo que importa: la relevancia de los piensos funcionales en acuicultura, el proyecto DIETApplus; IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico (Cartaya Huelva). p. 19.

5. Sarasquete, C., Úbeda-Manzanaro, M., Ortiz-Delgado, J.B., 2019. Efecto de las isoflavonas de la soja, genisteína y daidzeína, en la metamorfosis del lenguado senegalés, *Solea senegalensis*: modulación de las proteínas de la matriz- MGP- y ósea-BGP. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena (mayo 2019), pp. 172-173.
6. Firmino, J., E. Vallejos-Vidal, K. Andree, M. A. Esteban, F. E. Reyes-López, R. Salomón, J. M. Pinilla, J. C. Quintela, L. Tort, E. Gisbert, 2018. Nuevos subproductos de la agricultura como inmunomoduladores en dietas para peces; Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena (mayo 2019), pp. 50-51.
7. Firmino, E. Vallejos-Vidal, F. Reyes-López, L. Fernández-Alacid, A. Ibarz, L. Tort, A. Estevez, E. Gisbert, 2019. AROTEC-G® as an effective nutritional strategy for the control of *Sparicotyle chrysophrii* in gilthead seabream (*Sparus aurata*); EAS Conference - Berlin (octubre 2019).



Pósteres

1. Herrera, M., Salamanca, N., Mancera, J.M., Astola, A., 2019. Respuesta molecular al estrés crónico en corvinas (*Argyrosomus regius*) alimentadas con suplementos aminoacídicos. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 92-93.
2. Cerezo, I.M., Bautista, R., Di Zeo, D., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M.C., Gisbert, E., Moriñigo, M.A., 2019. Cambios en la microbiota intestinal de *Sparus aurata* tras la administración de dietas suplementadas con *D. hansenii* e IMMUNOTEC. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 52-53.
3. Firmino, J., Vallejos-Vidal, E., Sarasquete, C., Reyes-López, F., Ortiz-Delgado, J.B., Fernández-Alacid, L., Salomón, R., Ibarz, A., Tort, L., Estévez, A., Gisbert, E., 2019. Estrategias nutricionales para el control de ectoparásitos (*Sparicotyle chrysophrii*) en dorada. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 48-49.
4. Herrera, M., Salamanca, N., Giráldez, I., Morales, E., 2019. Metabolismo del triptófano y respuesta al estrés crónico de corvinas (*Argyrosomus regius*) alimentadas con dietas suplementadas. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 109-110.
5. Sarasquete, C., Martínez, C., Palazón, J.L., Firmino, J., Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., 2019. Efecto de Polifenoles, hemoderivados e Inmunoestimulantes funcionales--DIETApplus- en juveniles cultivados de dorada, *Sparus aurata*: células mucosas como biomarcadores de bienestar y salud. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 22-23.

6. Asencio-Alcudia, G., Andree, K.B., Giraldez, I., Tovar-Ramirez, D., Alvarez-González, A., Herrera, M., Gisbert, E., 2019. Stressors due to handling impair gut immunity in meagre (*Argyrosomus regius*); the compensatory role of dietary L-tryptophan. Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (ISBN: 978-84-09-11292-0), Cartagena (mayo 2019), pp. 202-203.
7. Herrera, M., Herves, M.A., Roca, J.L., López, J.R., Giráldez, I., 2018. Influence of tryptophan concentration and feeding time for meagre (*Argyrosomus regius*) fed stress-attenuating diets. Abstracts of AQUA 2018 (Montpellier, agosto 2018), pp. 348-348.
8. Herrera, M., Herves, M.A., Roca, J.L., Morales, E., Giráldez, I., 2018. Stress-attenuating diets with amino acid supplements do not alter the energy metabolism in meagre (*Argyrosomus regius*). Abstracts of the 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (Las Palmas de Gran Canaria, 3-7 de Junio).
9. Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Herrera, M., Ibarz, A., 2018. Mucus metabolites to determine the netting stress in meagre: effects of preventive supplementation with specific amino acids. Abstracts of the 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (Las Palmas de Gran Canaria, 3-7 de Junio).
10. Asencio, G., Andree, K.B., Giráldez, I., Firmino, J., Herrera, M., Gisbert, E., 2018. Effect of tryptophan supplementation and handling stressors in meagre (*Argyrosomus regius*). Abstracts of the 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (Las Palmas de Gran Canaria, 3-7 de Junio).
11. Astola, A., Millán, A., Herrera, M., Mancera, J.M., 2018. La adición de aminoácidos en la dieta modula la expresión de hormonas adenohipofisarias del eje de estrés en corvina (*Argyrosomus regius*). En: Cordero, M., Herrera, M., López, M., Alaminos, F.J. (eds) La Acuicultura Progresiva. Libro de Actas de las IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Ed. Junta de Andalucía, D.L. SE 647 2018, pp. 86-87.
12. Gisbert, E., Reyes, F., Rodríguez, C., Polo, J., Tort, L., 2018. Estudio transcriptómico del uso de SDP (spray-dried plasma) en dietas para dorada. En: Cordero, M., Herrera, M., López, M., Alaminos, F.J. (eds.) La Acuicultura Progresiva. Libro de Actas de las IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Ed. Junta de Andalucía, D.L. SE 647 2018, pp. 90-91.
13. Ortiz-Delgado, J. B., Martínez, C., Palazón, J.L., Herrera, M., Fernández-Alacid, L., Ibarz, A., Firmino, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., 2018. Las lectinas como biomarcadores de salud y estrés nutricional y zootécnico: efecto de polifenoles y triptófano en dorada, *Sparus aurata*, y en corvina, *Argyrosomus regius*. En: Cordero, M., Herrera, M., López, M., Alaminos, F.J. (eds) La Acuicultura Progresiva. Libro de Actas de las IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Ed. Junta de Andalucía, D.L. SE 647 2018, pp. 86-86.
14. Sanahuja, I., Ordóñez, B., Sánchez, S., Pascual, A., Espinilla, B., Herrera, M., Gisbert, E., Ibarz, A., 2017. Caracterización de la actividad proteasa en el mucus epidérmico de especies marinas de interés productivo. Libro de Actas del XVI Congreso Nacional de Acuicultura, Zaragoza (3-5 octubre), pp. 356-358.
15. López, J.R., Lorenzo, L., Alcántara, R., Marcelino-Pozuelo, C., Herrera, M., 2017. Primera descripción de cepas de *Winogradskyella sediminis* asociadas a enfermedad en peces. Libro de Actas del XVI Congreso Nacional de Acuicultura, Zaragoza (3-5 octubre), pp. 348-349.

16. Herrera, M., Moreira, M., Herves, M.A., Matias, A.C., Roca, J.L., Cordero, M.L., Ribeiro, L., 2017 Respuesta fisiológica al estrés comparada de dos dietas suplementadas con aminoácidos en la corvina (*Argyrosomus regius*). Libro de Actas del XVI Congreso Nacional de Acuicultura, Zaragoza (3-5 octubre), pp. 346-347.
17. González, D., Herrera, M., Esteban, M.A., 2017. Triptófano, aspartato y estrés: efecto en la inmunidad humoral de corvinas (*Argyrosomus regius*). Libro de Actas del XVI Congreso Nacional de Acuicultura, Zaragoza (3-5 octubre), pp. 344-345.
18. Firmino, J., E. Gisbert, A. Estévez, M. Sastre, D. Gonzalez-Silvera, M. Gyftea, M.A. Esteban, C. Rodriguez, J. Polo, 2018. Use of porcine byproducts as fishmeal replacement in feed for gilthead seabream on-growing: effects on growth, fillet composition and immune status; WAS-AQUA2018, Montpellier (France), Agosto, 2018.
19. Firmino, J., M.A. Esteban, G. Asencio, F. Reyes-López, L. Tort, E. Gisbert, 2018. Effects of dietary immunostimulants on the immune condition in gilthead sea bream (*Sparus aurata*); International Symposium of Fish Nutrition and Feeding, Las Palmas de Gran Canaria (Spain), Junio, 2018.
20. Firmino, J., E. Vallejos-Vidal; C. Sarasquete; F. E. Reyes-López; J. B. Ortiz-Delgado; L. Fernández-Alacid; R. Salomón; A. Ibarz; L. Tort; A. Estévez; E. Gisbert, "Estrategias nutricionales para el control de ectoparásitos (*Sparicotyle chrysophrii*) en dorada"; Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena (mayo 2019), pp 48-49.
21. Firmino, J., E. Vallejos-Vida; K. B. Andree; M. A. Esteban; F. E. Reyes-López; R. Salomón; C. Rodriguez; J. Polo; L. Tort; E. Gisbert, "Efecto inmunomodulador de subproductos porcinos en dietas con alto nivel de sustitución de harina de pescado en dorada"; Libro de Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena (mayo 2019), pp. 60-61.
22. Firmino, E. Vallejos-Vidal, F. Reyes-López, L. Fernández-Alacid, A. Ibarz, L. Tort, A. Estevez, E. Gisbert, 2019. AROTEC-G® as an effective nutritional strategy for the control of *Sparicotyle chrysophrii* in gilthead seabream (*Sparus aurata*); Fish Veterinary Society Conference, Edinburgh (Scotland), Marzo, 2019.



➤ Artículos divulgativos

1. Mancera, J.M., Gisbert, E., Herrera, M., 2018. Proyecto DIETApplus: Una oportunidad de mejorar el cultivo de la corvina (*Argyrosomus regius*). Ruta Pesquera y Naval 127, 1-2
2. Firmino, J., Arredondo, M., Martínez, P., 2019. Resultados exitosos de AROTEC-G, una solución natural de TECNOVIT para luchar contra el *Sparicotyle*. IPAC ACUICULTURA, junio 2019.
3. Firmino, J., 2019. AROTEC-G® a dietary and sustainable strategy for the control of the ectoparasite *Sparicotyle chrysophrii* in gilthead seabream farming. AQUA FEED, artículo de divulgación sometido en Julio de 2019.



➤ **Actividades de formación y capacitación**

El proyecto DIETApplus ha servido para que varios estudiantes se hallan aproximado al mundo científico a través de trabajos de fin de grado o de maestría, y prácticas profesionales. A continuación, se enumeran los estudiantes y sus universidades de origen que han participado en el proyecto:

- Trabajo final de grado: Aleix Castellvi Homs (Grado de Ingeniería en Sistemas biológicos); Universitat Politècnica de Catalunya.
- Prácticas profesionales: Sara Urquizu Rojo, Marc Ramón Moreno y Albert Vidal García - (Grado de Ingeniería en Sistemas Biológicos; Universitat Politècnica de Catalunya); Gloria Ascencio (Centro de Investigaciones Biológicas del Nordeste, México).
- Trabajo de Maestría: Celestino Martínez Martínez (Título de Máster en Acuicultura y Pesca); CSIC y Universidad de Cádiz. Fecha defensa: septiembre 2018. Carolina Fernández Gonzalez; Universidad de Cadiz (en ejecución; fecha prevista de lectura: septiembre-octubre 2019). Federica Navarra Alma; Universita di Bologna y Universidad de Cádiz (en ejecución; fecha prevista de lectura: septiembre-octubre 2019).
- Tesis Doctoral: Joana P. Firmino (Doctorado Industrial IRTA-UAB y la empresa TECNOVIT FARM FAES); Universitat Autònoma de Barcelona (en ejecución; fecha prevista de lectura: 2020).



➤ **Divulgación del proyecto en páginas web del sector y medios generalistas**

A continuación, se presentan algunos de los enlaces aparecidos en la Red sobre el proyecto DIETApplus (búsqueda no exhaustiva realizada el 17/07/2019):

- 1) http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/53490/dietapplus_o_como_mejorar_la_produccion_de_dorada_y_corvina_con_piensos_funcionales.html
- 2) <http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Expertos-del-proyecto-DIETApplus-organizan-sus-estrategias-para-mejorar-las-dietas-de-la-dorada-y-la-corvina/#.WhshCWeWxZc>
- 3) <https://www.agrodigital.com/2017/01/31/dietapplus-proyecto-de-mejora-de-dietas-funcionales-para-dorada-y-corvina/>
- 4) <https://www.lavanguardia.com/local/sevilla/20170506/422327334159/proyecto-de-4-comunidades-trabaja-para-eliminar-estres-en-peces-en-cautividad.html>
- 5) <http://ucc.um.es/noticias/1049/la-umu-participa-en-el-proyecto-dietapplus-para-mejorar-el-alimento-la-salud-y-el-bienestar-de-las-doradas-y-corvinas-de-crianza>

- 6) <http://agrodiariohuelva.es/2017/01/29/investigadores-catalaes-y-andaluces-estudian-como-mejorar-dietas-funcionales-para-dorada-y-corvina/>
- 7) <https://nutricionanimal.info/la-mejora-la-produccion-dorada-corvina-gracias-piensos-funcionales/>
- 8) <http://biotech-spain.com/en/articulos/la-umu-participa-en-el-proyecto-dietaplus-para-mejorar-el-alimento-la-salud-y-el-bienestar-de-las-doradas-y-corvinas-de-crianza/>
- 9) <http://www.farodevigo.es/mar/2017/01/28/gobierno-impulsa-mejora-productividad-acuicola/1612847.html>
- 10) <http://www.laopinioncoruna.es/mar/2017/01/28/gobierno-central-impulsa-mejora-productividad/1147319.html>
- 11) <http://foroagroganadero.com/news/new/ldNew/596/Option/3>
- 12) <http://www.elpuntavui.cat/territori/article/11-mediambient/1079099-l-irta-posa-els-peixos-a-dieta.html>
- 13) <http://www.aguaita.cat/noticia/8379/irta/lidera/projecte/millora/dietes/moixarra/reig/cultiu>
- 14) <http://www.europapress.es/esandalucia/huelva/noticia-ifapa-agua-pino-huelva-evalua-aditivos-alimentacion-peces-mejorar-salud-bienestar-animal-20170506101541.html>
- 15) <http://www.tecnovit.net/noticias-tecnovit/avances-en-acuicultura>
- 16) http://www.huelvainformacion.es/provincia/lfapa-Aguas-Pino-investigaciones-acuicultura_0_1177682784.html
- 17) <https://www.researchgate.net/project/DIETplus-Nutritional-strategies-for-the-improvement-of-the-productive-yield-the-use-of-functional-feeds-in-aquaculture>
- 18) http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/61187/dietaplus_un_proyecto_para_mejorar_la_competitividad_de_la_acuicultura_a_traves_de_la_alimentacion_.html
- 19) <https://www.interempresas.net/Agricola/Articulos/215941-incorporacion-aminoacido-triptofano-piensos-reduce-estres-mejora-marcadores-inmunologicos.html>
- 20) <http://www.d-andalucia.csic.es/es/noticia/icman-participa-en-dietaplus-para-uso-piensos-funcionales-en-acuicultura>
- 21) <https://www.laverdad.es/ababol/ciencia/analizan-primeros-resultados-20180421025626-ntvo.html>
- 22) <https://vrteit.uca.es/noticia/a-traves-de-un-contrato-otri-en-el-marco-del-proyecto-dietaplus-los-expertos-de-la-universidad-de-cadiz-analizan-como-el-uso-del-aminoacido-triptofano-es-positivo-para-la-alimentacion-de-la-dorada-y/>
- 23) <http://edit.um.es/campusdigital/los-pasos-del-proyecto-dietaplus-en-seguimiento/>
- 24) <http://www.irta.cat/es/suplementar-con-triptofano-disminuye-el-impacto-inmunosupresor-del-estres-asociado-al-manejo-en-los-peces/>



➤ Vídeos

Se ha realizado un video de los resultados más relevantes de la Actividad 1.
<https://www.youtube.com/watch?v=-SGge0HHWjI>

➤ **Jornada de Transferencia con el sector**

Uno de los objetivos de esta actividad fue el de organizar una **Jornada de Transferencia**, es decir, un evento en el que la comunidad científica y el sector privado pudiera reunirse con los investigadores del consorcio DIETApplus y escuchar los resultados más relevantes del proyecto. En este contexto, aprovechando la celebración del XVII Congreso Nacional de Acuicultura (Cartagena, 7-10 mayo 2019), se organizó una sesión específica dedicada al proyecto dentro del Congreso.



La sesión fue un éxito absoluto en la que participaron representantes de varias empresas fabricantes de alimentos y aditivos (Skretting España, Biomar, TECNOVIT – FARM FAES; Laboratorios CENAVISA, entre otras), así como investigadores de la mayor parte de centros de investigación y universidades españolas. El aforo de la sala estuvo completo, generándose una provechosa discusión al final de las presentaciones.

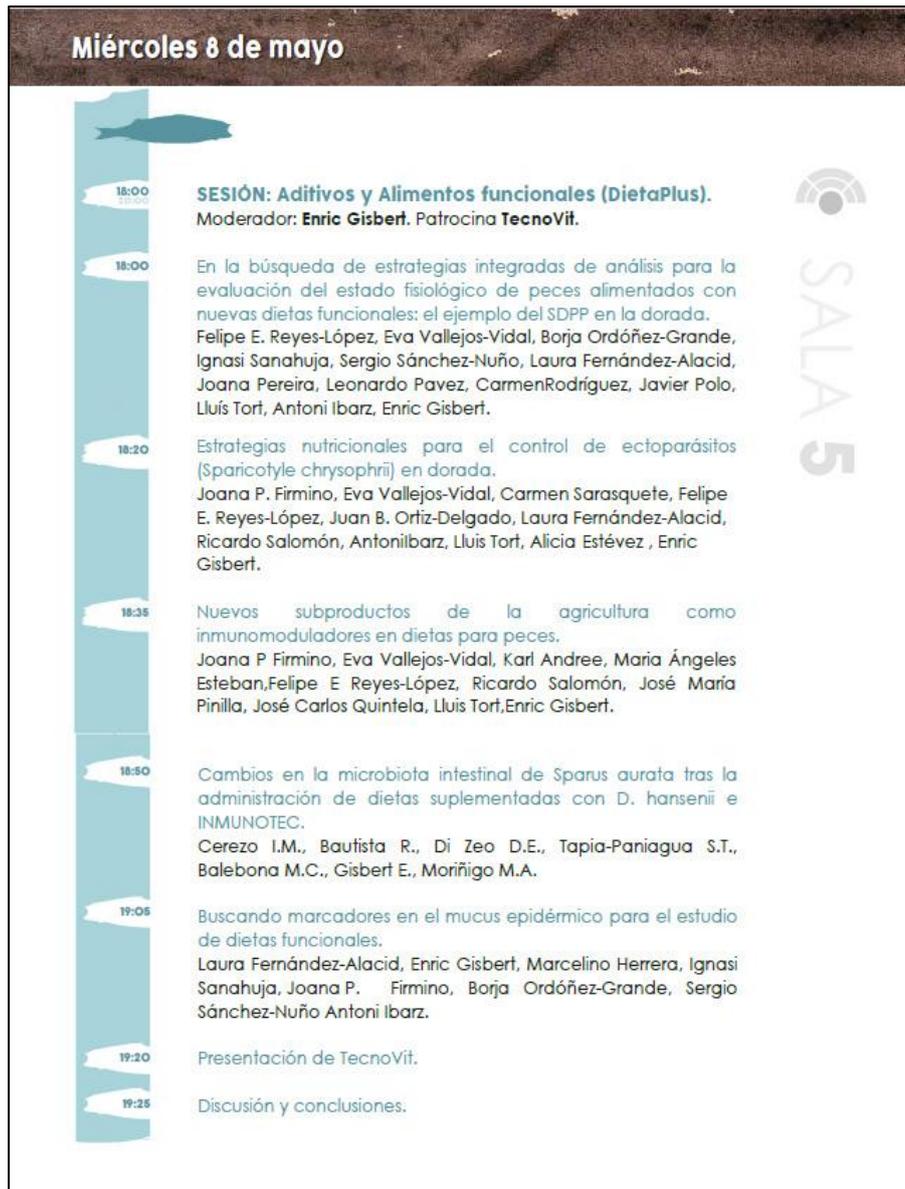


Figura 164. Programa del XVII Congreso Nacional de Acuicultura relacionado con la sesión del congreso dedicada al proyecto DIETApplus celebrada el 8 de mayo de 2019.

➤ **Doctorado Industrial (UAB – TECNOVIT FARMFAES)**

Uno de los hitos más destacados del proyecto DIETApplus en relación con el sector privado es la estrecha vinculación de la industria en el proyecto.

En este sentido, gracias a DIETApplus se está realizando un Doctorado Industrial cofinanciado entre la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR) de la Generalitat de Cataluña y la TECNOVIT – FARMFAES (núm. de expediente: 2017 DI 017; doctoranda: Joana Pereira Firmino). El objetivo principal de dicho Doctorado Industrial es el de utilizar la plataforma experimental y consorcio de investigadores que representa el proyecto DIETApplus para adaptar el catálogo de productos de esta empresa al sector acuícola, pues si bien TECNOVIT – FARMFAES es un referente a nivel nacional en relación a la nutrición y aditivos para animales terrestres, y en especial en el ámbito del porcino, la citada empresa quería validar el potencial de parte de su cartera de productos y aditivos (IMMUNOTEC®, BUTYTEC®, ACITEC®, AROTEC® en la nutrición de peces. Además, el proyecto ha permitido a la empresa conocer de forma solvente el modo de acción de algunos de sus productos de mayor éxito, siendo esta información de gran valor para la empresa en su estrategia de innovación y expansión comercial en el mundo de la acuicultura.



➤ **Otras colaboraciones con el sector privado**

Además de la estrecha colaboración con TECNOVIT – FARMFAES, el proyecto DIETApplus ha colaborado estrechamente con otras empresas fabricantes de ingredientes y aditivos para la nutrición de peces. En este contexto, han participado en el proyecto la empresa APC EUROPE S.L. (Granollers), empresa líder en derivados de la sangre porcina para su uso como ingredientes en nutrición animal. Así, dentro de DIETApplus se han evaluado y validado el uso de dos de sus productos APETEIN® y PEPTEIVA®. DIETApplus también ha colaborado con la empresa NUTRIAD España S.A. (Barbastro, Huesca), empresa emergente en el desarrollo de aditivos para la industria acuícola, siendo su colaboración con el proyecto actual la prueba de distintos aditivos para combatir ectoparásitos en la dorada. NATAC S.A. (Alcobendas) ha participado en la tarea de aditivos de origen vegetal, aportando los aditivos a evaluar (mezcla de ácido ursólico y verbascósido), y participando en la discusión de las propiedades de dichos compuestos y su aplicación en nutrición animal. Finalmente mencionar que también se ha colaborado en trabajos en granja con ANDROMEDA GROUP, y en particular en sus instalaciones de Villajoyosa (Alicante) donde se evaluaron distintos aceites esenciales como agentes terapéuticos frente a ectoparásitos monogénea que afectan el cultivo de la corvina y seriola.

4.4. ADECUACIÓN AL CRONOGRAMA DE TRABAJO

El cronograma inicial de la propuesta se ha cumplido casi en su totalidad y es similar al presentado en el Anexo IV de la solicitud. Sin embargo, la ejecución de algunas actividades se ha visto afectada por la disponibilidad de peces con fines experimentales, si bien dichas desviaciones no han supuesto ningún inconveniente en el desarrollo normal de la propuesta. Es importante destacar que dentro de la Tarea A2.2 se ha realizado actividad vinculada al proyecto durante el primer semestre del 2019. Las razones de dicha actividad se vincular al fin de ajustar mejor los resultados y ejecutar una nueva prueba de validación (reto bacteriano con agentes patógenos en dorada alimentada con dieta inmunomoduladora) para poder verificar los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto. En este contexto, la nueva prueba de validación se ha realizado con fondos propios y sin afectar a la justificación económica del proyecto, por lo que no ha tenido ningún impacto sobre el balance económico del mismo.

El consorcio de equipos de investigación quisiera destacar que la mayor parte de desviaciones en los planes de ejecución del proyecto han sido debidas a la gran cantidad de muestras que se han tenido que procesar y a la complejidad, en muchos de los casos, de su tratamiento e interpretación. Por estas razones, el poder gozar de la prórroga solicitada ha permitido poder completar la mayor parte de analíticas comprometidas en la propuesta y alcanzar así una visión holística del rol que juegan los distintos ingredientes y aditivos evaluados sobre el organismo.

4.5. SEGUIMIENTO DE INDICADORES DE EJECUCIÓN Y EVALUACIÓN DEL PROYECTO

Las valoraciones cuantificadas de los indicadores de ejecución del proyecto se resumen en la siguiente Tabla 61. Si tenemos en cuenta la siguiente tabla es importante destacar que se han ejecutado en algunos casos más tareas y analíticas que las inicialmente planteadas, actividad investigadora que surge como fruto de la interacción entre los miembros del consorcio y la transversalidad y complementariedad de sus herramientas de análisis, así como también del interés del sector privado en los trabajos que se desarrollan dentro del proyecto DIETApplus.

En términos globales se considera que el grado de ejecución del proyecto ha sido muy alto, realizándose todas las actividades planteadas inicialmente en la memoria del mismo (Anexo IV de la solicitud) y habiéndose alcanzado satisfactoriamente todos los hitos de la propuesta. En este contexto, el consorcio quiere destacar que en relación al hito “Publicación de artículos científicos derivados del proyecto”, éste sólo ha sido valorado con una calificación de 7 ya que existen todavía un importante número de trabajos científicos que se encuentran en fase de preparación y que por lo tanto, el hito no puede considerarse como del 100% satisfactorio, si bien desde la presentación de la memoria final del proyecto a la defensa de la tesis doctoral vinculada al Doctorado Industrial que se ha realizado dentro de DIETApplus, el resto de trabajos científicos pendientes verán la luz.

Tabla 61. Valoración cuantitativa del grado de cumplimiento de los indicadores de ejecución del proyecto DIETApplus.

Hito	Valoración (1-10)
Ejecución de los ensayos y pruebas de validación	10*
Distribución de muestras entre socios del consorcio	10
Análisis de las muestras biológicas	9*
Integración global de los resultados	10
Difusión del proyecto en artículos divulgativos	10
Difusión de los resultados en Redes Sociales	10
Realización jornada de transferencia de resultados al sector	10
Publicación de artículos científicos derivados del proyecto	7
Participación de la industria en el proyecto	10
Aplicabilidad de los resultados por parte de la industria	8
Transferencia de conocimiento entre miembros del consorcio	10
Formación y capacitación de jóvenes investigadores	10
Realización de reuniones de coordinación del consorcio	10

Nota: el asterisco indica que se han ejecutado más ensayos y analizado más muestras de los previstas inicialmente en la memoria. Las tareas realizadas y resultados de las mismas se encuentran detallados en la sección 4.2 de la presente memoria.

4.6. TRANSFERENCIA DE RESULTADOS AL SECTOR

El conjunto de las actuaciones dirigidas a las pruebas de validación relativas al uso de los distintos aditivos bajo condiciones de cultivo industrial (Tarea A1.4) y bajo condiciones de estrés y/o presencia de organismos patógenos y ectoparásitos (Tareas A2.1, A2.2, A2.3 y A2.5) se encuentran descritas en la memoria de las actividades (Sección 4.2 de la presente memoria). Las tareas relacionadas con la transferencia de resultados al sector y empresas que directamente han participado en el proyecto DIETApplus se encuentran descritas en la Tarea A2.4.

En relación al grado de implicación y colaboración de las empresas en el proyecto DIETApplus, el consorcio investigador considera que ésta ha sido plenamente satisfactoria, tanto en el intercambio de información sobre la composición y características de aditivos que podían ser usados en acuicultura, como en relación al seguimiento, interpretación y potencial aplicación de los resultados derivados del proyecto. En este sentido destacan las empresas TECNOVIT-FARMFAES, NATAC SA y APC Europe SL las cuales a partir de los resultados obtenidos dentro de DIETApplus han reforzado sus campañas de márketing y promocionado sus productos dentro del sector, y en particular, las empresas fabricantes de piensos y grandes productores. Asimismo, en el caso de TECNOVIT-FARMFAES los resultados derivados de la Tarea A2.3 han hecho que la citada empresa esté desarrollando un programa de investigación con dicho aditivo en otras especies distintas a las contempladas dentro del proyecto DIETApplus, como es el salmón del Atlántico. En este caso particular, los resultados positivos del producto AROTEC G® evaluado en dorada y sus beneficios frente a una parasitación frente a *Sparicotyle* sp. han hecho que la empresa fabricante del citado aditivo esté interesada en su validación en salmón frente al

ectoparásito *Calligus* sp. En este contexto, varios socios del consorcio DIETApplus están dando apoyo a TECNOVIT-FARMFAES a desarrollar el citado proyecto de investigación en Escocia (UK). El resto de resultados derivados del uso de otros aditivos proporcionados y reformulados por la empresa TECNOVIT-FARMFAES dentro del proyecto DIETApplus ha permitido a la empresa validar su funcionalidad y establecer una estrategia de desarrollo y mejora de dichos productos, así como también mejorar su comercialización, como en el caso del IMMUNOTEC®.

En otro contexto, los resultados obtenidos dentro de la Tarea A2.1 sobre el uso de los ácidos verbascósido y ursólico han permitido reforzar el conocimiento de los beneficios de la incorporación de dichos compuestos polifenólicos y triterpénicos en dietas para peces a la empresa NATAC SA. Estos resultados obtenidos en dorada son de gran importancia para la empresa pues acaba de iniciar una prueba en salmones dentro de un proyecto financiado por la dentro del Programa PYME H2020 (AQUAOLIVE: “Mejora de la producción acuícola con bioactivos a partir de subproductos de procesamiento de aceite de oliva”), y la información obtenida dentro de DIETApplus será complementaria para el desarrollo del producto objeto de estudio del proyecto AQUAOLIVE. Es importante destacar que varios miembros del consorcio también participan dentro del equipo científico-técnico que apoya a la empresa en los ensayos que está realizando en Noruega.

Finalmente mencionar que los resultados derivados de DIETApplus en cuanto al uso de derivados de la sangre porcina en peces ha permitido consolidar el conocimiento de la empresa APC EUROPE SA en relación al potencial uso de dichos ingredientes en dietas para peces. A partir de los trabajos que se publiquen derivados del proyecto, la empresa pretende promover el uso de sus productos dentro del sector.

En cuanto a la mejora en la eficiencia de la transferencia de los resultados e información generada por el proyecto a la industria hay que tener presente que el tiempo de duración del proyecto no es suficiente para que alguno de los aditivos evaluados acabe siendo aceptado por la industria, pues normalmente estos procesos requieren de un número mayor de estudios con los que las empresas fabricantes de alimentos o granjas de cultivo realizan segundas validaciones y/o pruebas de campo propias sobre la eficacia de dichos aditivos. Aun así, la estrategia de transferencia de resultados a los socios privados que han participado en el proyecto DIETApplus la consideramos como exitosa pues ha permitido a las citadas empresas tener la oportunidad de colaborar con un amplio elenco de los mejores investigadores de nuestro país y acceder a herramientas analíticas a las que no hubieran tenido acceso sin una fuente de financiación como la gozada dentro de DIETApplus. Esta estrategia de colaboración con el sector privado y la validación de aditivos que originalmente eran usados en nutrición terrestre en el ámbito acuícola han permitido un avance sustancial en las empresas que han apoyado y colaborado con el proyecto en el desarrollo y validación de sus productos, quedando ahora en sus manos el conocimiento generado por DIETApplus.

4.7. ACTUACIONES DE DIFUSIÓN Y PUBLICIDAD DE LAS AYUDAS

El conjunto de actividades destinadas a divulgar y publicitar los trabajos llevados a cabo dentro del proyecto DIETApplus se encuentran enumerados y referenciados dentro de la descripción de la Tarea A2.3 (Sección 4.2 de la presente memoria).

4.8. VALORACIÓN DEL COORDINADOR SOBRE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

En cuanto a la valoración del proyecto DIETApplus en relación a la consecución de objetivos y generación de nuevo conocimiento para la industria y la ciencia en general, el coordinador, así como también todos los miembros del consorcio, consideran que el proyecto DIETApplus ha representado un paso muy importante en el avance del conocimiento sobre el uso de nuevos aditivos en el sector acuícola y en el estudio de su mecanismo de acción en el organismo, tanto a nivel de una respuesta sistémica como local. Además, el poder ejecutar este proyecto teniendo a la empresa privada como compañera de viaje nos ha permitido avanzar de forma considerable en las estrategias de aplicación de ciertos aditivos que anteriormente eran usados en ganadería y que se exploraba por primera vez su uso en acuicultura, estableciéndose en este contexto un fuerte vínculo colaborativo y de intercambio de información y conocimientos entre la industria fabricante de estos productos y el sector académico nacional. En este contexto, este proyecto puede considerarse como muy satisfactorio para todas las partes.

El coordinador valora muy positivamente este tipo de iniciativas pródidas por el MAPAMA pues permite establecer un marco de trabajo transversal en el que distintos grupos y centros de investigación junto con empresas privadas pueden aunar sus capacidades en un mismo proyecto, aproximación que normalmente no puede ser abordada a través de otras convocatorias de financiación nacionales de tipo competitivo. En este sentido, poder formar un consorcio de investigación en el que distintos grupos aúnen sus competencias y conocimientos complementarios en pro de un objetivo común es de gran importancia y más cuando dicha actividad puede desarrollarse en un amplio marco temporal. Aun así, el tiempo de ejecución de este tipo de proyectos, dada su complejidad, interrelación con el sector privado y potencial relevancia de los resultados se considera como algo limitada, considerándose que un periodo de ejecución más amplio hubiera facilitado el trabajo reduciendo la presión sobre el equipo investigador en relación a la justificación de la ayuda otorgada. Además, el proyecto DIETApplus ha permitido generar nuevas sinergias y colaboraciones entre los miembros del mismo, promoviendo la creación de nuevas complicidades y grupos de trabajo transversales que esperamos que tengan continuidad en el futuro. Así, por ejemplo, a partir del trabajo ejecutado en DIETApplus se ha solicitado a la Agencia Estatal de Investigación dentro de la convocatoria 2018 de Acciones de dinamización «Redes de Investigación» una propuesta titulada “Red española de investigación sobre salud y condición de mucosas en producción animal”, red en la que participan varios miembros del equipo de investigación y empresas privadas del consorcio DIETApplus. En caso de tener éxito en la solicitud presentada, la Red podrá considerarse como una continuación del proyecto, aunque abierta a otros grupos de investigación nacionales y a otros animales, pues se contempla que en la Red no sólo se aborden temas relacionados con la acuicultura sino también con la ganadería.

Si bien la gestión científica del proyecto ha sido sencilla, pues los grupos de investigación que han participado en el proyecto DIETApplus están habituados a participar en proyectos del Plan Nacional o proyectos europeos, la gestión y justificación económica del proyecto no lo ha sido tanto, así como tampoco el cumplimiento de una Orden de Bases compleja y de difícil seguimiento. Dado que en proyectos como el ejecutado participan distintas entidades pertenecientes a distintas administraciones públicas (CCAA) y con reglamentaciones y capacidad de gestión del presupuesto otorgado muy distintas, la gestión administrativa (subcontrataciones, contratación de personal de nueva incorporación al proyecto, entre otras)

no ha resultado sencillo, y en algún caso particular, como el caso del IFAPA ha impactado negativamente en la ejecución del presupuesto, que no se ha podido justificar en algunos casos al no existir una armonización de los tiempos de la convocatoria con los tiempos de la CA de Andalucía (publicación en el Boletín Oficial de la Junta de Andalucía). Sería quizás aconsejable que la financiación destinada a la partida de personal cubriera además de los costes salariales los de la Seguridad Social, ya que es difícil disponer de fondos que permitan cubrir este tipo de gastos. Una justificación y gestión del presupuesto similar al de otras convocatorias de investigación nacionales pertenecientes a la Agencia Española de Investigación facilitarían el proceso, tanto por parte de la entidad financiadora como por parte de los beneficiarios de la ayuda.

El consorcio y sobre todo las oficinas de gestión de proyectos de las entidades participantes al preguntárseles por recomendaciones y sugerencias relacionadas con la ejecución del proyecto mencionan que se encontraron con problemas en el acceso a la sede electrónica del MAPAMA en el momento de la solicitud, así como también que durante todo el periodo de presentación el canal de comunicación fue el correo electrónico, aunque después se debía presentar a través de la Sede Electrónica de nuevo dicha documentación. Las enmiendas de documentación se debían de realizar por mail a Secjacumar y posteriormente subirla a la Sede Electrónica, lo que duplicaba cada acción que se debía de hacer. En este contexto, se debería de buscar alguna vía de comunicación única para evitar duplicidades. Es francamente mejorable el tema de que no se propusieron plantillas para las declaraciones responsables que se tuvieron que presentar (7 en total) ni tampoco para el acuerdo de consorcio que había que presentarse firmado por todos los socios junto con la solicitud del proyecto, con lo cual se tuvieron que hacer enmiendas en los documentos porque no cumplían los requisitos esperados por la Subdirección. Aun así, el coordinador del proyecto DIETApplus, así como los responsables de las distintas entidades que han participado en el mismo quieren destacar la gran predisposición, ayuda y flexibilidad por parte del personal del Ministerio para facilitar todos los trámites relacionados con la ejecución, seguimiento y ejecución del proyecto, actitudes que han ayudado de forma muy importante el buen desarrollo del proyecto.

Finalmente, el consorcio de entidades investigadoras participantes en el proyecto DIETApplus financiado por el MAPAMA hace constar de forma unánime que este tipo de actividades promovidas por la Secretaría General de Pesca son necesarias y representan una gran oportunidad de avance e innovación para el sector acuícola nacional gracias a la estrecha colaboración entre la academia y la industria, y que, por consiguiente, es muy recomendable que tengan continuidad en el futuro.

4.9. CONCLUSIONES

Si bien las conclusiones de las distintas Tareas que se han ejecutado dentro del proyecto DIETApplus han sido descritas al final de cada una de ellas; a continuación, se enumeran las principales conclusiones que se derivan del proyecto:

1. El uso de los aditivos en la formulación de dietas funcionales en acuicultura es una realidad para toda la industria de alimentación animal, dadas las restricciones en el uso de agentes antimicrobiales y la búsqueda de estrategias de producción que sea sostenibles y respetuosas con el medioambiente. En este contexto, el proyecto DIETApplus ha permitido dar respuesta a las inquietudes del sector acuícola nacional permitiendo generar nuevo conocimiento del uso y modo de acción de distintos aditivos en alimentación y manejo de peces de cultivo como la dorada (*Sparus aurata*) y la corvina (*Argyrosomus regius*).
2. En términos generales, el proyecto DIETApplus ha permitido compartir y desarrollar modelos abiertos de experimentación, y la búsqueda de sinergias y complementariedades entre distintos grupos de investigación y áreas del conocimiento (nutrición, salud, microbiología, biología molecular y celular, inmunología, entre otros), que han permitido a través de una estrategia de vasos comunicantes generar un importante polo de conocimiento en el campo de la nutrición acuícola.
3. La participación del sector privado en el proyecto ha sido clave para garantizar que la propuesta tuviera un impacto directo sobre la industria fabricante de aditivos acuícolas, tal y como se demuestra con el Doctorado Industrial cofinanciado por la AGAUR (Generalitat de Cataluña) y la empresa TECNOVIT-FARMFAES que se ha llevado a cabo dentro de DIETApplus en el que se ha establecido el desarrollo, prueba y validación de un catálogo de aditivos para la alimentación de peces. Además de la citada empresa, también han participado en el proyecto otras empresas fabricantes de ingredientes y aditivos (NUTRIAD S.A., APC EUROPE S.A., NATAC S.A.) y productoras de peces (ANDROMEDA GROUP y Mariscos de Estero S.A.).
4. A nivel particular y en cuanto a los resultados sobre los aditivos evaluados dentro de DIETApplus, podemos concluir lo siguiente: la suplementación con triptófano (1%) en dietas comerciales para peces permite mejorar la respuesta frente al estrés por manejo de los animales, resultados que han sido visible tanto a nivel molecular como fisiológico. La alimentación a corto plazo (menos de 5 días) a concentraciones de 0,5-1% Trp en la dieta es la estrategia alimenticia que mejores resultados ofrece en cuanto a la atenuación del estrés por exposición al aire en la corvina.

5. El uso del aspartato como aditivo para atenuar los efectos del estrés, también produjo variaciones, aunque no significativas en los niveles de los marcadores de estrés, por lo que no se descarta su posible uso como atenuante del estrés para determinados estresores y situaciones puntuales del ciclo de producción; si bien a diferencia del triptófano, los datos actuales no permiten que éste sea recomendado para su uso industrial.
6. Los resultados obtenidos de las distintas tareas en la que se han evaluado aditivos con distinta funcionalidad indican que los metabolitos del mucus epidérmico pueden considerarse como buenos biomarcadores no invasivos para evaluar las respuestas fisiológicas de los peces; siendo la relación glucosa / proteína la más valiosa y fiable de las variables analizadas.
7. Los hemoderivados de sangre porcina, plasma secado por esprayación (APPEIN GS®) como el hidrolizado de sangre porcina (PEPTEIVA®), así como los compuestos de naturaleza triterpénica como son el ácido ursólico y verbascósido extraídos de plantas medicinales como la salvia y la María Luisa, pueden ser usados como aditivos en piensos funcionales para peces, pues además de promover la salud y condición de las mucosas, también tienen un efecto global positivo sobre el organismo, promoviendo a la vez su crecimiento somático. Además, el hecho de haber probado su eficiencia en dietas con muy bajo nivel de harina de pescado (7%), pone todavía mucho más en valor su potencial uso en dietas para peces, donde en algunos casos se ha descrito que niveles altos de sustitución de este ingrediente proteico, si bien no afectan al crecimiento del animal, pueden comprometer su salud y respuesta inmunitaria.
8. En cuanto a los dos productos derivados de sangre porcina evaluados, su inclusión en dietas para dorada (niveles finales de harina de pescado de sólo el 2%) ha sido muy positiva, permitiendo dichos ingredientes promover el crecimiento y alcanzar tasas de crecimiento incluso superiores a las de la Dieta control con un 7% de harina de pescado, así como también promover una mejor integridad y condición de los tejidos mucosales analizados, tal y como demuestran los resultados de la histología y transcriptómica realizada. Además, la inclusión de los hemoderivados porcinos ha resultado en una promoción de la respuesta inmune, tal y como ha mostrado el análisis transcriptómico de tejidos y la prueba de validación *ex vivo* con cultivos primarios de células del bazo.
9. En relación a los compuestos de origen vegetal evaluados, los resultados del presente estudio proporcionan importantes datos sobre las actividades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos de naturaleza triterpénica (ácidos ursólico y verbascósido, UA-VB) de *L. citriodora* y *S. officinalis*. La alimentación de doradas con la dieta con un 0,1% UA-VB resultó en una mejora de la condición general del animal, aumentado el crecimiento y en su respuesta inmune, tal y como se demuestra en la prueba de validación *ex vivo* con los datos del patrón de expresión de los marcadores moleculares relacionados con citoquinas pro- y anti-inflamatorias, enzimas relacionados con el estrés

oxidativo, respuesta innata humoral y el marcador de células de superficie. Estos resultados muestran que el aditivo evaluado promueve un estricto control de la respuesta pro-inflamatoria lo que permitiría al organismo combatir una posible infección bacteriana, promoviendo su salud y bienestar. Los resultados histoquímicos y transcriptómicos muestran unos tejidos mucosales (piel, branquias e intestino) más activos y con una mejor condición tisular, lo que permitiría al animal combatir eficientemente una agresión externa o tolerar mejor un proceso infeccioso. Además, la inclusión de los compuestos evaluados mejora la calidad del filete en cuanto reduce los niveles de peroxidación lipídica, aumentando así su vida media en un lineal durante el proceso de comercialización.

10. El aditivo comercial evaluado dentro de DIETApplus con propiedades inmunoestimulantes IMMUNOTEC[®], aditivo probado por primera vez en peces y formulado con β -glucanos, *Echinacea purpurea*, MOS y vitamina C, demostró ser una estrategia eficaz para promover la respuesta inmune del organismo a nivel sistémico, tal y como indicaron las pruebas de validación realizadas (ensayos *ex vivo* y reto bacteriano frente a *Vibrio anguillarum*). En este contexto no es baladí resaltar que la estrategia de alimentación de los peces con dicho aditivo fue clave para lograr el efecto deseado sobre el organismo y una respuesta inmune que permitiera responder de forma efectiva a una infección bacteriana. Así, cuando el aditivo fue administrado de forma continua por un periodo largo de tiempo, más de dos meses, el resultado obtenido no fue el deseado, pues se observó una sobrestimulación del sistema inmune que no redundó en diferencias en los niveles de marcadores relacionados con la respuesta inmune sistémica del organismo. Sin embargo, una administración del aditivo en pulsos de 15 días, seguido por un periodo de descanso de una semana-diez días, permite al animal tener una respuesta inmunitaria equilibrada y responder satisfactoriamente a una infección bacteriana, tal y como se demostró en la prueba de validación con el segundo reto bacteriano. En este contexto, destacan los resultados histológicos y transcriptómicos que apoyarían un papel preponderante como promotor de la respuesta inmune sistémica del IMMUNOTEC[®], si bien su efecto a nivel local es más bien moderado, pero existente, tal y como indican los resultados del ensayo *ex vivo* llevado a cabo con cultivos primarios de esplenocitos.

11. La incorporación en la dieta de un aditivo con propiedades inmunomoduladoras (IMMUNOTEC[®]) y la levadura probiótica (*Debaromyces hansenii*), tuvo un efecto positivo en el crecimiento de los animales cuando dichos aditivos fueron incorporados a bajas dosis en la dieta. Estos resultados no vienen determinados por la presencia de compuestos promotores del crecimiento en dichos aditivos, sino que están debidos a una mejor condición y salud general de los animales alimentados con dichas dietas. En este sentido, es relevante mencionar que las dietas fueron formuladas con un 75% de sustitución de harina de pescado por fuentes proteicas vegetales (dietas con sólo un 7% de harina de pescado), por lo que estos resultados son de gran relevancia, pues permiten no sólo reducir de forma sustancial la inclusión de harina de pescado en la dieta en pro de un desarrollo de dietas sostenibles, sino que además, garantizan la promoción de una buena salud y condición de los animales, tal y como se demuestra con el conjunto de variables analizadas (parámetros de crecimiento, composición proximal, histología e histoquímica, transcriptómica y respuesta inmune no específica).

12. Los resultados de la tarea diseñada para evaluar el efecto de distintos aditivos basados en aceites esenciales para combatir la parasitación con el monogénea *Sparicotyle chrisophrii* en dorada indican que la inclusión de AROTEC-G® en la alimentación de esta especie mejora inequívocamente la salud de las branquias, su robustez y su capacidad inmunológica local, lo que indica su eficacia contra potenciales patógenos específicos de las branquias, tal y como ha sido demostrado en la prueba de validación en la que animales alimentados con la dieta experimental fueron expuestos al ectoparásito y en donde se observó una reducción de hasta el 78% de la prevalencia del ectoparásito en peces alimentados con la dieta suplementada con AROTEC-G®. Igualmente, la respuesta observada en piel sugiere que la inclusión de AROTEC-G® en la dieta promueve la inmunocompetencia de la primera barrera de defensa de los peces, apuntando a un potencial efecto de protección frente a ectoparásitos de piel.

13. Si bien el uso del citado aditivo no repercutió significativamente en el crecimiento somático de las doradas, sí que se observó una ligera tendencia a que los peces alimentados con la dieta que contenía el aditivo AROTEC-G® fueran algo más pequeños en peso que los de la Dieta control. A partir de estos resultados, la empresa está trabajando en mejorar el proceso de encapsulación del aceite esencial de ajo, pues se ha visto que este compuesto puede afectar negativamente el gusto del alimento y, por lo tanto, afectar su ingesta. Sin embargo, los resultados relativos a la disminución de la prevalencia del parásito y mejora de la condición e inmunidad de la piel y las branquias superan en creces la ligera disminución en el crecimiento observada y, por consiguiente, la empresa está desarrollando un plan comercial de envergadura para llevar este aditivo al mercado acuícola nacional e internacional.

14. En relación a otros aceites esenciales evaluados dentro de DIETApplus para ser incorporados en la dieta, los resultados de la prueba de validación realizada en corvina indican que el aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) es un buen aditivo para ser incorporado en dietas con fines terapéuticos frente al ectoparásito monogénea *Scianocotyle panzerii* que comúnmente afecta las granjas de cultivo de la corvina. Sin embargo, los resultados del proyecto indican que su uso como aditivo en la dieta requiere de mejoras en su forma de presentación e incorporación en la dieta, ya que dicho aceite no puede ser incorporado directamente sobre el pienso, sino que se recomienda que sea previamente microencapsulado con el fin de reducir su efecto sobre la palatabilidad del pienso y no afectar a su ingesta y crecimiento de los animales.

15. Cuando distintos aceites esenciales fueron evaluados en tratamientos por balneación y no incluidos en la dieta, los resultados fueron también muy satisfactorios, representando una estrategia sostenible y respetuosa en relación al medio ambiente para tratar las infestaciones de ectoparásitos que comúnmente afectan a la corvina y seriola en granjas de cultivo. Así, los aceites esenciales representan una buena alternativa para el control de

ectoparásitos en corvina y también en seriola debido a sus propiedades vermícidas. En este contexto, su uso para tratamientos por medio de balneación representa una estrategia viable y sostenible frente al uso actual de productos químicos que tienen un elevado impacto sobre el medio natural. En el caso particular del ectoparásito que afecta al cultivo de la corvina, el monogénea *Scianocotyle* sp, los aceites esenciales más efectivos en términos de concentración y tiempo de aplicación, son los de canela y menta, mientras que en el caso de *Zeuxapta* sp., el ectoparásito que afecta a la seriola, los aceites esenciales con mejores resultados fueron los de timo, pino y bergamota.

16. En relación a la evaluación de dos aditivos microencapsulados (ACITEC-MC® y BUTYTEC-PLUS®) con propiedades antiparasitarias y antimicrobianas derivadas de la inclusión de ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena media y aceites esenciales en los piensos de engorde para corvina, los resultados muestran que no se encontraron diferencias significativas sobre la microbiota del intestino posterior entre los distintos grupos experimentales, aunque la dieta ACITEC-MC® mostró menores valores de riqueza, diversidad y habitabilidad que la microbiota de los especímenes alimentados con la dieta BUTYTEC-PLUS®, resultados que podrían venir dados por su diferente composición. Sin embargo, estos resultados no se han correlacionado con diferencias de crecimiento y/o fisiología digestiva de los peces. En términos generales, la inclusión de estos dos aditivos en dietas para corvina no representó una mejora sustancial en términos de crecimiento, fisiología digestiva y salud de los animales, resultados a partir de los cuales la empresa responsable de dichos aditivos está re-evaluando su formulación y composición con el fin de que sean validados en futuros ensayos.

17. El último de los productos evaluados en el proyecto DIETApplus; si bien inicialmente esta tarea no estaba contemplada dentro del proyecto, pero por interés del sector privado y apoyo del consorcio investigador, sí que fue ejecutada; fue el extracto del nopal (*Opuntia ficus indica*) con el fin de evaluar sus efectos sedantes cuando se disolvía en agua. En este contexto, la prueba de validación realizada mostró que el extracto del nopal disuelto en agua resultó ser una estrategia positiva para atenuar el estrés derivado del transporte en ejemplares de dorada, tal como los marcadores de estrés en mucus epidérmico (glucosa y lactato) muestran, así como también favoreció que los animales recuperasen antes su condición basal y bienestar tras periodos prolongados de estrés como aquellos derivados de un transporte a altas densidades.

