IV MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

2006

La inclusión de aceites vegetales en el pienso: Efecto sobre algunos parámetros del sistema inmune de juveniles de dorada (*Sparus aurata,* L.)

VALENTINA GRASSO

La inclusión de aceites vegetales en el pienso: Efecto sobre algunos parámetros del sistema inmune de juveniles de dorada (*Sparus aurata*,L.)

Trabajo realizado en el Instituto Canario de ciencias marinas, España, bajo la dirección del Dr. Daniel Montero Vitores y Dr.Felix Acosta Arbelo y presentado como requisito parcial para la obtención del Título de Máster Universitario Internacional en Acuicultura, otorgado por la Universidad de Las Palmas de gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), y el centro Internacional de Altos Esudios Agronómicos de Zaragoza (CIHEAM).

Agradecimientos:

Ringrazio e dedico questo lavoro alla mia famiglia per avermi appoggiato sempre nonostante la distanza.

Agradezco al Dr Daniel Montero y al Dr Felix Acosta por su dirección en este trabajo.

Al Instituto Canario de Ciencias Marinas, Marisol, Rachid, Tatiana, Carmen y todos los demás.

A la Facultad de Veterinaria de las Palmas, agradezco sinceramente al Dr Fernando Real y a Jimena.

A mis compañeros de Máster por vivir juntos esta experiencia.

All'Istituto Talassografico di Messina: Ermanno, Lucrezia, Valeria, Marcella, Manu.

A todos mis amigos y a la acojedora gente de Canarias.

Indice

1. INTRODUCCIÓN.....11

1.1 Inmunidad celular.....14

1.2 Inmunidad Humoral.....16

1.3 Interferón.....17

1.4 Proteínas Mx.....20

1.5 La nutrición sobre el sistema interferón.....22

1.6 Objetivos.....24

2. MATERIALES Y METODOS

Experimento 1

2.1 Material Biológico.....25

2.1.1.Condiciones experimentales.....25

2.2 Muestreo de peso.....27

2.3 Estudio de la capacidad fagocítica.....27

2.3.1 Muestreo de riñón anterior.....27

2.3.2 Capacidad fagocítica.....28

2.4 Métodos analíticos de composición.....30

Experimento 2

2.5 Estudio de la expressión génica de la proteina Mx.....32

2.5.1 Material Biológico.....32

2.5.2 Condiciones experimentales.....32

2.5.3 Inoculación de inmunoestimulante y de la suspención bacterica.....33

2.5.4 Muestreo de hígado.....33

2.5.5 Extracción de ARN.....34

2.5.6 c- Dna.....35

2.5.7 PCR.....36

2.5.8.Estadística.....38

3. RESULTADOS.....39

3.1 Resultados de crecimiento.....39

3.2 Composición de ácidos grasos de la dieta.....41

3.3 Composición de ácidos grasos de los macrófagos.....43

3.4 Actividad fagocítica.....46

3.5 Expresión génica de la proteina Mx.....49

4. DISCUSIÓN.....53

5. CONCLUSIONES.....63

6. BIBLIOGRAFÍA.....65

Lista de figuras

Fig. 1 Curva de crecimiento de los peces alimentados con las dietas experimentales.....39

Fig 2 Peso medio final expresado como porcentaje de ganancia de peso.....40

Fig.3 Macrófagos activados (dietas 1 y 6).....48

Fig.4 Macrófagos con una sola vacuola (dietas 3 y 4).....48

Fig.5 Dieta 6 macrófagos con varias vacuolas (dietas 7 y 13).....48

Fig.6 Cinética de expresión de Mx en la dieta control.....49

Fig.7 Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% Lino.....49

Fig.8 Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% Soja.....49

Fig.9 Cinética de expresión de Mx en la dieta 50% lino/50 % soja.....49

Fig.10 Cinética de respuesta frente poly I:C.....50

Fig.11 Cinética de respuesta frente p.d.s.p.....51

Fig.12 Incremento de producción de Mx respecto a los valores basales.....52

Lista de esquemas

Esquema 1. estudio de la expresión génica de la proteina Mx.....37

Lista de Tablas

Tabla I. Cantidades de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados expresados en % sobre ácidos grasos totales.....12

Tabla II. SGR y FCR de los peces alimentados con las diferentes dietas durante el periodo experimental.....40

Tabla III. Composición de ag de las dietas expresado en gr/100gr de ácido graso determinado.....42

Tabla IV. Composición de ag de los macrófagos expresado en gr/100gr de ácido graso determinado.....44

Tabla V. Relación entre los ácidos grasos de los macrófagos y los de las respectivas dietas.....45

Tabla VI Actividad fagocitica de las diferentes dietas experimentales.....46

Resumen

La dorada es una especie de fundamental importancia en la acuicultura, su producción en los últimos años ha alcanzado las 80.000 tm. Pero el aceite de pescado, única fuente lipídica para el pienso de engorde de esta especie es cada vez más caro y dificil de conseguir. El futuro de este sector podrá continuar entonces sólo si se desarollan e introducen fuentes lipídicas alternativas como los aceites vegetales.

En este trabajo se analizó el efecto de la sustitución de aceite de pescado por aceites de lino y soja a niveles de inclusión muy elevados (70 y 100%) así como una mezcla 50:50 de los dos aceites sustituyendo el aceite de pescado al 100%. Para los estudios de crecimiento, las doradas de peso medio inicial de 37 gr fueron engordadas hasta 240 g, se calcularon las ingestas diarias y una vez al mes la tasa específica de crecimiento (SGR) y la tasa de conversión del alimento (FCR). La composición de ácidos grasos de la dieta y de los macrófagos del riñón anterior fue medida y comparada. La actividad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior fue también analizada.

Para los estudios de interferón los peces fueron infectados con una dosis subletal de *Photobacterium damselae* subespecie *piscicida* y con una dosis de RNA sintético inmunoestimulante (Poli I:C). La cinética de respuesta a ambos fue analizada con un método semiquantitativo de cálculo de expresión del gen Mx en el hígado.

Todas las dietas vegetales, excluidas las 70% de sustición, afectaron negativamente al crecimiento de juveniles de dorada con valores de peso medio final significativamente menores ($p<0,05$) y de hasta 26,82 gramos menos que el control. La composición lipidíca de la dieta determinó el perfil de ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior, aunque hubo una incorporación selectiva de ARA y DHA, la actividad fagocitíca resultó afectada a todos los niveles de sustitución excepto en la mezcla 50:50. La expresión de gen Mx bajo ambos estímulos (Poly I:C y bacteria) fue homogenea en todas las dietas, pero se observó un nivel basal de Mx más alto en las dietas que utilizaron aceites vegetales.

I.-INTRODUCCIÓN

El sector de la Acuicultura actualmente utiliza más del 60 % de la producción global de aceite de pescado y se calcula que en el 2010 consumirá alrededor del 100 %, pero hoy en día las industrias que abastecen los requerimientos mundiales de aceite de pescado se encuentran estancadas, en declive y sobretodo dependientes de fenómenos naturales tipo "el Niño" (Sargent y Tacon 1999).

Por ello la futura expansión de este sector, en particular del cultivo de las especies más rentables como el salmón, podrá continuar sólo si vendrán desarrolladas e introducidas alternativas al aceite de pescado (Bell 2003).

La dorada (*Sparus aurata*) es objeto de este estudio por la importancia de su producción en la acuicultura marina. En Europa se producen más de 80.000 Tm (datos FAO) de esta especie que constituye el 25% de la producción de peces en el Mediterráneo.

Los aceites vegetales parecen ser los candidatos ideales para sustituir parcialmente el aceite de pescado en la formulación de dietas para peces, los lípidos contenidos en las semillas de muchas plantas contienen una discreta cantidad de ácidos grasos insaturados (tabla 1) por ejemplo el aceite de lino contiene un 68,6% de ácidos grasos poliinsaturados, el aceite de oliva es rico (72,3%) en ácidos grasos monoinsaturados (White, 1992), mientras que los aceites de coco y palma contienen un 92 y 81,5 %

respectivamente de ácidos grasos saturados de cadena inferior a 15 átomos de carbono, (Wood 1992).

El aceite de lino, a diferencia de los otros aceites vegetales ricos en ácidos grasos omega-6, contiene grandes cantidades (hasta un 58%) de ácido linolénico (omega-3). El aceite de Soja al contrario es más rico en ácido linoléico (hasta un 50%) y pobre en linolénico (8%).

Tabla I-Cantidades de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y polinsaturados expresados en % sobre ácidos grasos totales (Fuente: White, 1992) y del aceite de arenque (fuente: Bimbo, 1990)

	Oliva	Lino	Soja	Colza	Coco	Maíz	Palma	Pescado
Saturados totales	17,1	9,7	15,5	6,8	92	14,5	51,4	20,5
Monoinsaturados Totales	72,3	21,7	23,5	65,3	6,5	27,6	38,9	51,8
Polinsaturados totales	10,6	68,6	61,0	27,9	1,5	57,9	9,7	27,7

Hasta el día de hoy se han hecho muchos estudios sobre los efectos de la utilización de los aceites vegetales en las dietas para peces de acuicultura.

Sin embargo el uso de dichos aceites como única fuente lipídica para peces marinos está limitada debido a la baja capacidad de estas especies en convertir el ácido linoléico y linolénico, abundantes en muchos aceites vegetales, en ácidos grasos araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosaexaenoico (DHA) esenciales para peces marinos y abundantes en el aceite de pescado (Izquierdo et al.2005).

Los aceites vegetales para ser considerados buenos sustitutos deberán, por lo tanto, cubrir los requerimientos de n-3 hufa de cada especie y no afectar el estado de salud del animal.

Estudios efectuados en doradas (Montero et al. 2004) demuestran que, en peces alimentados con niveles de n-3 hufa por debajo de los requeridos, se disminuye el crecimiento, se reduce el volumen de los eritrocitos y la actividad de los neutrófilos circulantes y también se presentan importantes alteraciones renales.

Pero a veces, los niveles de inclusiones muy altos de aceites vegetales en la dieta afectan el estado de salud del animal no obstante se cubran los requerimientos esenciales de n-3 hufa.

En el pez gato americano (Klinger et al., 1996) la inclusión de altos porcentajes (60 y 80%) de aceite de soja en la dieta pueden producir una disminución de la respuesta inmune y de la resistencia a enfermedades.

En la dorada (Montero et al., 2003) la inclusión de soja y colza en la dieta (80 y 60 % respectivamente) provocó una disminución de la capacidad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior y el aceite de soja también afectó la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento.

El aceite de lino se presenta como el mejor candidato para sustituir parcialmente el pescado como fuente lipídica ya que, entre todos los aceites vegetales, parece ser el que menos afecta el sistema inmune. Algunos autores (Bell et al.2001, Caballero et

al.2002) lo consideran como una buena fuente lipídica alternativa al pescado en dietas para salmónidos y peces de agua dulce.

En estudios anteriores (Montero et al.2003) se demostró que niveles de inclusión de aceite de lino un 60 y 80 % en dietas de engorde para dorada no afectan parámetros inmunológicos como actividad lisozímica, actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento, producción de radicales oxígeno y capacidad fagocítica. Queda por conocer cual es el nivel de sustitución más adecuado y hasta que punto se puede sustituir el aceite de pescado por aceite de lino sin provocar efectos indeseados sobre el sistema inmune.

INMUNIDAD CELULAR

Monocitos/macrófagos

Entre los factores que participan en la defensa inespecífica del organismo prevalente es el papel desempeñando por las células.

En algunos casos la resistencia a enfermedades es debida únicamente a la acción de células con capacidad fagocítica tales como los macrófagos, los monocitos (macrófagos inmaduros) y los granulocitos.

En peces, los elementos de esta última línea tienen una actividad menor y muy escasa en comparación con los monocitos y macrófagos, aunque ha sido demostrado que los

granulocitos neutrófilos del pez gato del canal (*Ictalurus punctatus*) poseen una gran capacidad fagocítica (Finco Kent and Thune 1987, Ainsworth and Dexiang 1990).

En mamíferos los macrófagos tienen un tamaño que varia entre 12 y 25 µ, tienen una vida media bastante larga (75 días o más) y se originan a partir de la medula ósea mientras que en los peces, al carecer de medula, se originan en el riñón anterior, órgano linfo y hemopoiético por excelencia en estos animales.

Monocitos y macrófagos se caracterizan por la capacidad de adherirse a las superficies sólidas, de moverse activamente, de reaccionar de forma intensa a los estímulos quimiotácticos y de ingerir sustancias muy variadas sean estas de naturaleza orgánica o inorgánica. La fagocitosis ocurre en diferentes fases (reconocimiento de la partícula extraña, ingestión y digestión) y defectos o alteraciones en cualquiera de estas afectan a la respuesta inmune (MacArthur y Fletcher, 1985).

El mantenimiento de la correcta composición lipídica de la membrana celular de los macrófagos es determinante para el buen funcionamiento de la misma.

Los ácidos grasos n-3 HUFA en particular el EPA y el DHA son indispensables para asegurar a la membrana de los macrófagos permeabilidad y elasticidad, esta última característica es de fundamental importancia para que la célula pueda fagocitar cuerpos extraños. Ha sido comprobado que en condiciones dietéticas carenciales de estos ácidos grasos, los macrófagos incorporan selectivamente el DHA en los

fosfoglicéridos de sus membranas (Kanazawa, 1985; Izquierdo, 1996; Montero et al. 2001).

También el ácido araquidónico (ARA) y el EPA son incorporados en los macrófagos en grandes cantidades ya que estas células los utilizan para producir prostaglandinas y otros eicosanoides como leucotrienos y tromboxanos.

Deficiencias o desajustes de estos ácidos grasos esenciales para peces marinos pueden provocar alteraciones en la flexibilidad, viscosidad y hasta en la actividad enzimática de las membranas celular y por lo tanto en la fagocitosis.

Inmunidad Humoral

El suero, mucus y huevos de los peces contienen una variedad de sustancias que inhiben de forma no-específica el crecimiento de microorganismos patógenos. Estas substancias de naturaleza proteicas y glicoproteica son específicas ya que reaccionan con un determinado grupo de compuestos químicos pero han sido definidas "no-específicas" por el hecho que actúan contra antígenos muy comunes y contra varios tipos de microorganismos.

Estas sustancias son, para citar algunas, las Cytoquinas, el Interferón, el sistema complemento, la Lysozima, las proteínas en fase aguda, las lectinas, las aglutininas, etc.

Dichas proteínas actúan con los mecanismos más variados, por ejemplo provocando la aglutinación, precipitación y opsonización de los compuestos extraños o bien como simples mensajeros o como atrayentes y movilizadores de fagocitos.

También otras sustancias No proteicas como el anión superóxido, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el óxido Nítrico entran en esta clase de inmunidad siendo su acción bactericida muy potente.

En este capítulo nos centraremos sobre el sistema interferón (IFN).

INTERFERON

Desde hace tiempo se sabe que una célula animal puede sufrir una infección viral doble o múltiple, cuando dos o más virus de tipo diferente la infectan simultáneamente.

Sin embargo si pasan unos ciertos números de horas, por Ej.24, tras la inoculación de un primer virus y la de un segundo de otro tipo, la multiplicación de este último será total o parcialmente inhibida.

Este fenómeno es conocido como "Interferencia viral", una condición por la que en un hospedador, que ya tiene una infección viral en curso, se ve obstaculizada la multiplicación de un segundo virus superinfectante homólogo o heterólogo.

Isaacs y Lindelmann (1957) demostraron que el primer virus, aunque inactivado por rayos U.V., induce en la célula huésped la producción de una sustancia no-viral responsable de la interferencia y por ello llamada "Interferón" (IFN).

Hoy se sabe que la estimulación de la respuesta inmune vía interferón que en principio se consideraba una propiedad exclusiva de los virus, puede ser inducida también por otras substancias cuales los lipopolisacáridos bacterianos (Finter, 1973, Johansen et al., 2004, Salinas et al. 2004) el ADN bacteriano así como vacunas inactivadas frente a bacterias (Acosta et al. 2004).

El IFN es una sustancia antiviral producida por células, que actúa de forma independiente y distinta respecto a otros mecanismos inmunes.

Teóricamente puede ser producida por cualquier célula del organismo (aunque con eficiencia distinta) y no sólo por parte de células especializadas. Tiene una actividad absolutamente inespecífica, en el sentido de que actúa contra cualquier virus.

De hecho la mayoría de los estudios sugieren que el IFN sea especie específico (no obstante la especie-especificidad no sea muy estricta) pero no virus específico (Gordon *et al.* 1981; Johnson *et al.* 1994).

El IFN representa la primera defensa del organismo contra una infección viral, siendo su pico de producción a las 12-24 horas de la multiplicación del virus (Robertsen 2005).

Por otra parte los anticuerpos específicos no aparecen en la sangre antes de algunos días post-infecciones algunas especies como el Salmón, la producción de Ac puede tardar hasta 4-6 semanas incluso a temperaturas ideales y muchos patógenos pueden provocar la muerte del pez en un par de días. La protección ofrecida por la respuesta específica por lo tanto sería eficaz sólo en peces ya inmunizados (Ellis 2001). Como

consecuencia de la producción de IFN se observa una gran reducción de la infección en los tejidos, así que se puede afirmar que esta proteína desempeña un papel esencial en la primera defensa frente a un virus, o sea cuando todavía no han aparecido los anticuerpos específicos.

En mamíferos se pueden distinguir tres familias de IFNs (IFN Tipo I, IFN tipo II e tipo IFN lambda) dependiendo de la estructura génica, proteica y de las propiedades funcionales. Los IFN tipo I incluyen almenos 8 subclases (entre ellos los IFN alfa y beta) y son proteínas codificadas por un gen que carece de intrones. El tipo II se identifica con el IFN gama, mientras que el IFN lambda presenta características similares a los IFN I con la diferencia que está codificada por un gen que contiene intrones (Robertsen, 2005).

El IFN alfa y el IFN-beta representan la primera línea de defensa frente un virus. Son estables a PH 2 y tienen un peso molecular entre 16 y 26KDalton. Corresponden a los estudiados en mamíferos por Isaacs y Lindelmann en 1957, es decir son producidos por células infectadas por un virus o incubadas con dsRNA (Poly I:C).

El IFN-γ corresponde al dicho "Interferón Inmune" siendo producido por las células Natural Killer (NK) y por los linfocitos-T activados por estímulos antigénicos y mitogenos,o en respuesta a la interleukina-12 (IL-12) y 18 (IL-18) y presenta actividad antiviral inferior a los dos precedentes pero resulta más eficaz a la hora de inhibir microorganismos intracelulares como Rickettzia, Listeria etc.

De hecho el IFN-γ es un potente MAF (macrophages-activating factor) induciendo la activación de células como las natural Killer y los macrófagos.

La existencia de una sustancia IFN-like ha sido demostrada en muchas especies de peces. Gravell y Malsberger en el 1965 observaron que el virus de la IPN (necrosis pancreática infecciosa) no se replicaba en cultivos mantenidos a 34 C°, mientras que sí replicaba a 23 C°. Se consideró que el fenómeno fuese debido a la existencia de una sustancia IFN-like y no como un efecto directo de la temperatura sobre la replicación viral. También en el pez gato la infección de las células del ovario (CCO) inducida por un Reovirus inactivado por rayos U.V., provocó la aparición de un factor que bloqueaba el efecto citopático del Herpes virus (CCV) (Cinchar V.G.et al 1998).

PROTEINA Mx

El IFN es una proteína perteneciente a la clase de la citoquinas (mediadores de la comunicación entre células) pero su actividad antiviral es indirecta, siendo ejecutada por otras sustancias. De hecho bajo el estimulo IFN las células sintetizan nuevas proteínas y aumentan el nivel de las que ya se estaban produciendo (Stark, 1998).

Una vez producido, el IFN se une a un receptor específico presente en la membrana plasmática de varias células, el complejo IFN-receptor es transportado en el citoplasma donde, a nivel de la membrana nuclear, activa una serie de reacciones bioquímicas que tienen como resultado final la producción de otras proteínas.

No se sabe a que estadio se bloquea la replicación viral, sin embargo el IFN actuaría sobre un gen de la célula, localizado en el cromosoma 21, capaz de sintetizar proteínas antivirales que inhiben la replicación del virus en el interior de la célula (RNAm).

El IFN induce la activación de alrededor de 100 genes incluyendo los que codifican por la 2,5 oligoadenilato sintetasa (OAS), la proteína kinasa dependiente del dsRNA (PKR) y las proteínas Mx (proteínas de resistencia a myxovirus). Estas proteínas sintetizadas por el estimulo IFN pueden mediar, suprimir o ampliar la respuesta inmune.La ampliación de la respuesta inmune es debida a la degradación, o prevención de la síntesis, del ARN viral (Sen, 1992).

Los genes que codifican por Mx han sido clonados en diferentes especies como la trucha arco iris (Trobridge et al., 1995, Trobridge et al., 1997), salmón atlántico (Robertsen et al., 1997), el halibut atlántico (Jensen et al., 2000), la platija japonesa (Lee et al., 2000), el putterfish (Yap et al., 2003) y dorada (Tafalla et al., 2004).

Las proteínas Mx pertenecen a la familia de GTPasas y son proteínas inducidas por el IFN tipo I en vertebrados. La presencia y conservación de estas proteínas en mamíferos, aves, y peces teleosteos, sugiere su importancia en los mecanismos de defensa frente a virus. Su acción antiviral en peces ha sido confirmada en Salmón: el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) resulta fuertemente inhibido cuando las células de esta especie expresan elevadas concentraciones de proteínas Mx en respuesta a IFN o Poly I: C (Jensen et al.2002, Larsen Ret al.2004).

LA NUTRICIÓN SOBRE EL SISTEMA INTERFERÓN

El efecto de la nutrición sobre el sistema inmune no-específico de peces ha sido, hasta la fecha, ampliamente estudiado. Sin embargo, poco o nada se sabe sobre el efecto que ejerce la alimentación sobre el sistema de defensa cytoquinas-mediado.

En medicina humana este argumento es de gran interés ya que la mayoría de los estudios sobre la inclusión de altos niveles de EPA y DHA en las dietas han demostrado que estos ácidos grasos disminuyen la proliferación de linfocitos y reducen la producción de interleuquina 2 (IL2), de Interferón gama y de TNF alfa. También se sabe que muchas patologías dietéticas del hígado pueden provocar una depleción de las células natural Killer (NK) y por lo tanto una disminución de la producción de cytoquinas y entre ellas del Interferón (Li et al.,2005).

Estudios efectuados en ratones (Fritsche et al. 1998) han demostrado que los animales alimentados con altos niveles de omega 3 pufa presentan valores significativamente menores ($p < 0,05$) de interferón gama en la sangre respecto a ratones alimentados con omega 6 o con bajos niveles de pufa en la dieta. Feng et al. en 1999 demostraron que dietas ricas en omega tres de origen marino provoca en ratones una disminución del número de receptores para IFN gama (IFNGR) expresados sobre la superficie celular y por consecuente una reducción en la producción de dicha cytoquina.

Otros autores (Hara et al. 2003) demuestraron que algunos ácidos grasos como el araquidónico, el oleico y el linoléico pueden afectar también a la producción de Interferón gama (IFN-γ) por parte de los linfocitos intraepiteliales del intestino. En dicho estudio los linfocitos fueron cultivados en medios enriquecidos con los distintos ácidos grasos y expuestos a diferentes estímulos para que producieran IFN gama. A iguales concentraciones los ácidos grasos linoléico y oleico dieron mejores resultados (mayor producción de IFN) respecto al araquidónico. Wallace et al. 2003 compararon el efecto de la inclusión dietética de aceite de lino rico en ácido alfa-linolénico (ALNA) con dietas ricas en EPA y DHA sobre la producción de cytoquinas y entre ellas del interferón. Los resultados demuestraron que ninguna de las dos dietas influía negativamente sobre la actividad de las células mononucleadas y por consecuente sobre la producción de IFN.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Material biológico

Los peces experimentales fueron suministrados por la empresa local Alevines y Doradas S.A. (ADSA, Gran Canaria, España) y fueron mantenidos en la nave de cultivo del Instituto Canario de Ciencias Marinas durante toda la durada del experimento 1.

II 1.1 Condiciones experimentales

Las doradas utilizadas, con peso medio inicial de 35,99 gr., fueron mantenidas en tanques de 1000 l y alimentadas con la dieta control durante un tiempo necesario a la aclimatación, sucesivamente se hizo una criba y se seleccionaron sólo aquellas con peso comprendido entre 35 y 50 gramos con el fin de evitar una posible dispersión de talla. Los peces seleccionados fueron distribuidos de forma homogénea (50 peces por tanque en triplicado por cada dieta) en tanques de polietileno de 500 l con aireación continua, circuito de renovación de agua abierto y fotoperiodo natural. La alimentación fue hasta saciedad aparente (*ad libitum*) y las tomas diarias fueron en número de tres por seis días a la semana durante 6 meses (Junio-Noviembre).

Cada día se recogía el alimento no comido y se calculaban las ingesta.

Los peces fueron pesados al principio y final del experimento y una vez al mes para el cálculo del FCR (Tasa de conversión alimentaria) y SGR (Tasa específica de crecimiento) según las siguientes formulas:

$SGR = ((Ln\ P_{fin} - Ln\ P_{ini})/\ d)*100$

Donde, P_{fin} =Peso final (g)

P_{ini}=Peso inicial (g)

d= días de experimento

FCR = alimento seco ingerido (g)/ peso ganado (g)

Se formularon seis dietas experimentales isoenergéticas e isoprotéicas.

<u>Dietas experimentales:</u>

Dieta Control: 100% aceite de pescado

Dieta 70 L: 70% aceite de lino y 30% aceite de pescado

Dieta 100 L: 100% aceite de Lino

Dieta 70 S: 70% aceite de soja y 30%aceite de pescado

Dieta 100 S: 100% aceite de Soja

Dieta 50 L/50 S: 50 aceite de Soja y 50% aceite de Lino

II.2 Muestreo de peso

Para la obtención de los datos de peso se muestrearon todos los peces de cada tanque una vez por mes. Los peces fueron previamente anestesiados por inmersión en un baño de clorbutanol al 0,09%. Una vez pesados individualmente se pasaron a un cubo con agua limpia para su recuperación y finalmente se devolvieron a los respectivos tanques.

II. 3 Estudio de la capacidad fagocítica

II 3.1 Muestreo de riñón anterior

Para la obtención del riñón anterior se sacrificaron 6 peces por tanque, 3 de estos se utilizaron para los análisis bioquímicos y los restantes 3 para la capacidad fagocítica. Los peces se sacrificaron en hielo y sucesivamente se diseccionaron según el normal protocolo de necropsia. Los riñones extraídos se pasaron a tubos con medio Mem (Minimum essencial medium). Finalmente se pasó a filtrar el tejido para el análisis de la capacidad fagocítica.

II 3.2 Capacidad fagocítica de los macrófagos del Riñón anterior

Se analizó la capacidad fagocítica de los peces alimentados con la dieta control y con las dietas 70L y 100L

La siguiente técnica se llevó a cabo según cuanto descrito por Siwiki et al. (1993)

Los reactivos utilizados fueron:

- Medio MEM (minimum esencial medium) suplementado:

(se prepararon 500ml)

-10ul Heparina/ml

-100ul penicilina/estreptomicina/ml

-2% suero fetal vacuno descomplementado

- Gradiente de Percoll 51 y 34%

51 ml de percoll, 10ml de solución salina de Hanks y 39 ml de agua destilada
34 ml de percoll, 10ml solución salina de Hanks y 56 ml de agua destilada
(El gradiente de Percoll sirve para separar las células que se depositan en la interfase del gradiente).

Método:

El riñón anterior extraído de 3 peces por tanque se filtró a través de una membrana de nylon de 100 µm con la ayuda de un mortero. Se limpiaron los restos con medio MEM y la suspensión obtenida se pasó a un nuevo tubo previamente preparado con el gradiente de percoll (primero se colocó el gradiente con mayor densidad y luego con mucho cuidado el de menor densidad para que las dos fases quedasen bien separadas).

Durante todo el procedimiento se trabajó con hielo para evitar una posible lisis celular

Se centrifugó a 1400 g min. durante 30 min. a 4 C° y se recolectó la interfase.

Se limpió a través de centrifugación a 1200 rpm durante 5 min. a 4 C°.

A este punto las células aparecían como un coagulo pegado al fondo del tubo, se quitó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio MEM.

Se tiñó una alícuota (60 µl) de la suspensión celular con 10 µl de tripan blue y se realizó un contaje en una cámara de Neubauer.

Se ajustó la concentración a 2×10^7 macrofagos/ml con medio MEM.

Se preparó una suspensión de *Vibrio algynoliticus* ajustando la concentración a 10^7 ufc/ml a través de un espectrofotómetro (a valores de absorbancia iguales a 0.036 corresponden 10^7 ufc/ml).

Se puso a incubar 500 µl de la suspensión celular con 500 µl de la suspensión bacteriana durante una hora (Esteban y Mesenger, 1997) a temperatura de 20 C°.

Pasado el tiempo de incubación se realizó un frotis de de la suspensión obtenida poniendo en un portaobjeto una gota (10µl) que luego se tiñó con el panóptico rápido

(disolución metilica de triarilmetano, disolución tamponada de xanteno y solución tamponada de tiazina). Se dejó el portaobjeto 1 min. en cada componente.

Se contaron cien macrófagos por frotis y se evaluó el porcentaje de fagocitosis, para evitar el confundir bacterias pegadas al macrófago con aquellas que realmente fueron ingeridas se consideraron activados y con la bacteria en su interior solo aquellos que tenían el citoplasma vacuolado.

II.4 Métodos analíticos de composición

El análisis de la composición de ácidos grasos de la diferentes dietas se llevó acabo según el método descrito por Folch et al. (1957).

A una muestra de aproximadamente 200 mg de pienso se le añadió una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) (v:v) con BHT y se homogenizó con ultraturrax durante 5 minutos. Sucesivamente se añadió KCL y se centrifugó a 2000rpm durante 5 minutos.

Se filtró, se evaporó a sequedad con N_2 y se procedió a la transesterificación con el método descrito por Christie (1982) para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES). Se dejó incubar durante 16 horas a 50 C° en manta calefactora para que se produciera la reacción. Sucesivamente se separaron las dos fases utilizando una mezcla de hexano: dietil eter (1:1) y centrifugando a 2000rpm durante 5 minutos en

dos pases. Los FAMES así obtenidos fueron separados, identificados y cuantificados por cromatografía de gases.

Para los análisis de la composición lípidicas de los macrófagos se filtraron lor riñones anteriores extraídos de tres peces por tanque. La obtención de macrófagos se hizo de la misma manera que para la actividad fagocítica mientras que la extracción de lípidos se llevó acabo utilizando el método ácido descrito por Folch (1957). Sucesivamente se transesterificaron los FAMES con el método de Christie (1982) y se cuantificaron los ácidos grasos de la misma manera que para las dietas.

Experimento 2

II.5 Estudio de la expresión génica de la proteína Mx

El estudio de la proteina Mx se realizó en el hígado, debido a que en este tejido la expresión génica de tipo constitutivo es muy debil y por lo tanto no interfiere con la expresión inducida objeto de nuestro estudio.

II 5.1 Material biológico

120 peces de la experiencia anterior con un peso medio inicial de 200 gramos, fueron trasladados a la nave de patología de la facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria y ahí mantenidos hasta el final de la experiencia. Se utilizaron las doradas engordadas con 5 de las 6 dietas anteriores (dieta control, 50L 50S, 100L y 100S).

II 5.2 Condiciones experimentales

Las doradas de cada dieta fueron divididas en 2 grupos y distribuidas de forma homogénea (12 peces por tanque) en tanques circulares de polietileno de 500 litros de capacidad, con aireación continua, fotoperiodo de 12 horas y circuito de agua cerrado. La alimentación fue hasta saciedad aparente y las tomas diarias en número de dos.

El periodo de aclimatación fue de 5 días.

II 5.3 Inoculación del inmunoestimulante (Poly I:C) y de la suspensión bacterica

Una vez aclimatados se procedió a inocular intraperitonealmente 12 peces por dieta con una suspensión de *Photobacterium damselae* subespecie *piscicida* y la otra mitad con el dsRNA sintético ácido polyinosinico polycytidylico (Poly I:C) según como descrito por Acosta et al. (2004)

La suspensión bacteriana procedía de una cepa liofilizada que se cultivó a través de un pase en agar sangre más sal (1%)

La cantidad de bacteria que se inoculó a cada pez de la experiencia fue una dosis subletal de 10^3 ufc/pez.

La concentración de la suspensión bacterica fue calculada a través de un espectrofotómetro Biophotometer eppendorf que midió la absorbancia a 600 nm

(a valores de absorbancia iguales a 0.073 correspondían 10^3 ufc/ml.)

La dosis de Poly I:C inoculada fue de 500 µg/pez que se diluyó en un volumen de 1 ml .

II 5.4 Muestras de hígado

Las muestras de hígado se obtuvieron sacrificando 2 peces por tanque en diferentes tiempos (día 0,1, 3, 5, y 7) .El método de sacrificio fue por baño en anestésico.

Con una hoja de bisturí estéril se efectuó un corte longitudinal por detrás del opérculo y se sacó una muestra del hígado. Este fue guardado en un eppendorf con 500 µl de RNA-later y sucesivamente pasado en la misma cantidad de Tripure y almacenado a -80 C° hasta su posterior análisis. El RNA later es un conservante que evita la degradación del ARN a temperatura ambiente, mientras que el Tripure sirve para digerir el tejido hepático liberando así el ARN celular.

II 5.5 Extracción ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo según el protocolo descrito por Tafalla et al. (2004) y Acosta et al. (2004).

Al tejido homogenizado de forma mecánica se le añadió un 10% de Cloroformo (50 µl) y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. a 4 C°. Se recolectó el sobrenadante y se pasó a un eppendorf limpio, se le añadió la misma cantidad (300 µl) de Isopropanol mezclando por inversión para precipitar el ARN y se dejó incubar durante 5 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. a 4 C°. A este

punto el ARN aparecía como un coagulo blanco pegado al fondo. Se quitó el sobrenadante y se lavó con Etanol frío 75% dos veces. Se secó a través de centrifugación a vacío durante 4 min.

Sé resuspendió en 100 µl de agua DEPC y se extrajo una alícuota de 5 µl que se diluyó un 995 µl de agua DEPC. El ARN diluido se utilizó para él cálculo de la absorbancia a 260 y 280 nm a través de un espectrofotómetro y posterior cuantificación de la concentración de ARN.

II 5.6 c-DNA

Se añadieron 2 µl de Oligodinucleotido (ODT) a 2 µl de ARN diluido y se calentó en el termociclador durante 10 min. a 70 C° y luego se colocó en hielo.

Para la producción de la transcripción inversa se preparó la siguiente mezcla:

1. 5 µl de 5xTampón/muestra
2. 1,25 µl de 10mM de dNTP
3. 13,25 µl de agua DEPC
4. 1 µl de 200und/µl de transcriptasa

se añadieron 21 µl de la reacción anterior a la muestra colocada en hielo.

Se calentó la muestra en un termociclador Robocycler gradient 96 Stratagene según el siguiente esquema:

1. 60 min a 42 C°
2. 15 min a 70 C°
3. Se colocó en hielo

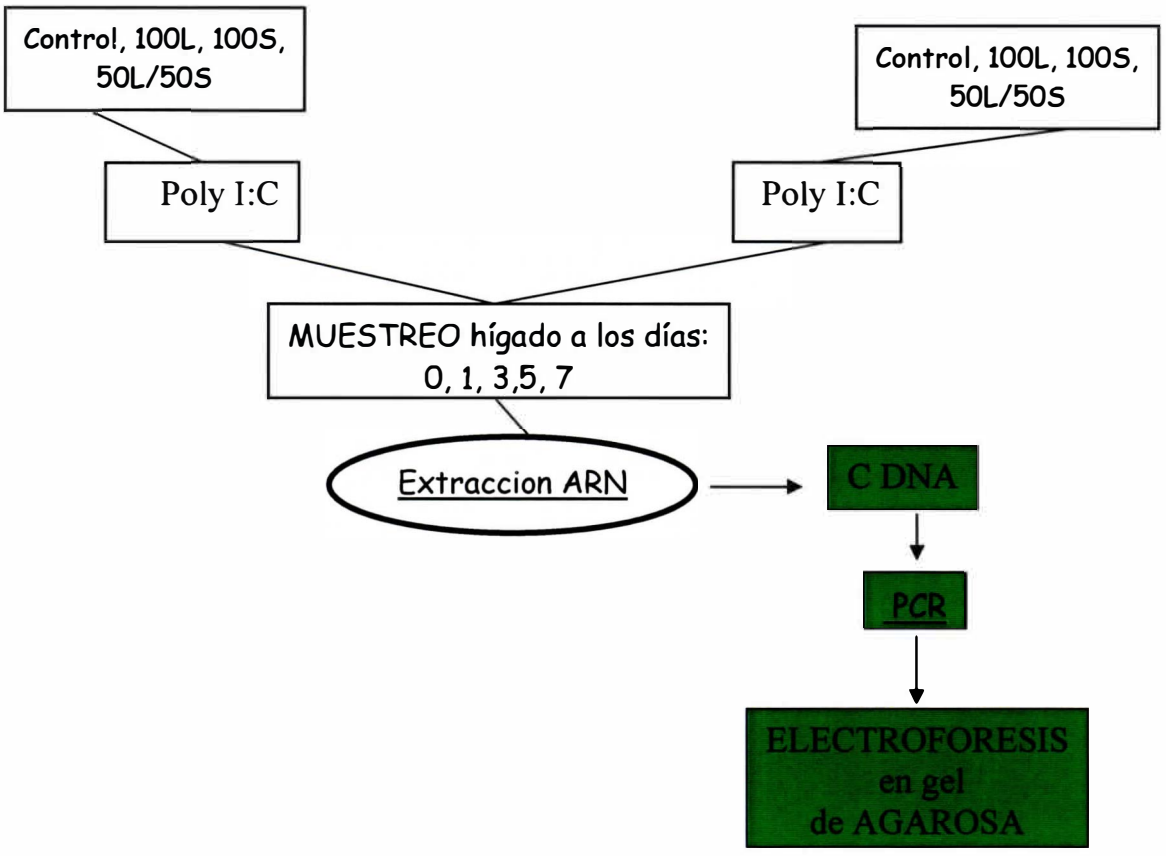
II 5.7 PCR:

Se efectuaron dos PCR, una para la ß actina y otra para el gen Mx. Las mezclas utilizadas fueron las mismas con la única diferencia en los primers utilizados.Se siguió el siguiente el esquema:

ß ACTINA	GEN MX
MEZCLA : • 2,5 µl de 10 Xtampón/muestra • 0,5 µl de 10 mM de dNTP • 0,75 µl de 50 mM de Mgcl2 • 1µl de ß-actin 1 • 1µl de ß-actin 2 • 17,625 µl de agua DEPC • 0,125 µl de 0,5und/ul de Taq polimerasa	MEZCLA : • 2,5 µ¸Āl de 10 Xtampón/muestra • 0,5 µl de 10 mM de dNTP • 0,75 µl de 50 mM de Mgcl2 • 1µl de Mx 1 • 1µl de Mx 2 • 17,625 µl de agua DEPC • 0,125 µl de 0,5und/ul deTaq polimerasa
Termociclador : 1. 2 min. a 94 C° 2. 45 seg. a 94 C°(x30 ciclos) 3. 45 seg. a 55 C°(x 30 ciclos) 4. 20 seg. a 72 C°(x30ciclos) 5. 2 min a 72 C°	Termociclador : 1. 2 min a 94 C° 2. 45 seg. a 94 C° } (x35 ciclos) 3. 45 seg. a 60 C° } (x35 ciclos) 4. 30 seg a 72 C } (x35 ciclos) 5. 2 min. a 72 C°

Se corrieron las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 2 %

El ADN se tiño con Bromuro de Etidio que se visualizó con luz ultravioleta y se cuantificó con el programa informático Quantity One.



Esquema 1: Estudio de la expresión de la proteína Mx

II 5.8 ESTADÍSTICA

Para los datos de crecimiento y de índice fagocítico se utilizó un análisis de la varianza de una entrada (ANOVA de un factor). Mientras que en los resultados de interferón las curvas fueron analizadas con un modelo lineal general de medidas repetidas. En ambos casos las diferencias entre medias se compararon con el test de Duncan con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

III.- RESULTADOS

III.1 RESULTADOS DE CRECIMIENTO

En la Fig.1 se muestran los resultados de crecimiento de los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales. Los valores de peso final fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los peces alimentados con la dieta control respecto a los peces alimentados con las dietas 100% de sustitución y con la mezcla 50/50. Las dietas 70% de sustitución no presentaron al contrario diferencia significativa con el control. De entre los aceites vegetales, los peces alimentados con la dieta 70L muestran los mayores pesos finales, mientras que los más bajos fueron aquellos de los peces alimentados con la dieta 100 S que alcanzaron un peso medio final de 215,72 g respecto a los 242,54 g. del control.

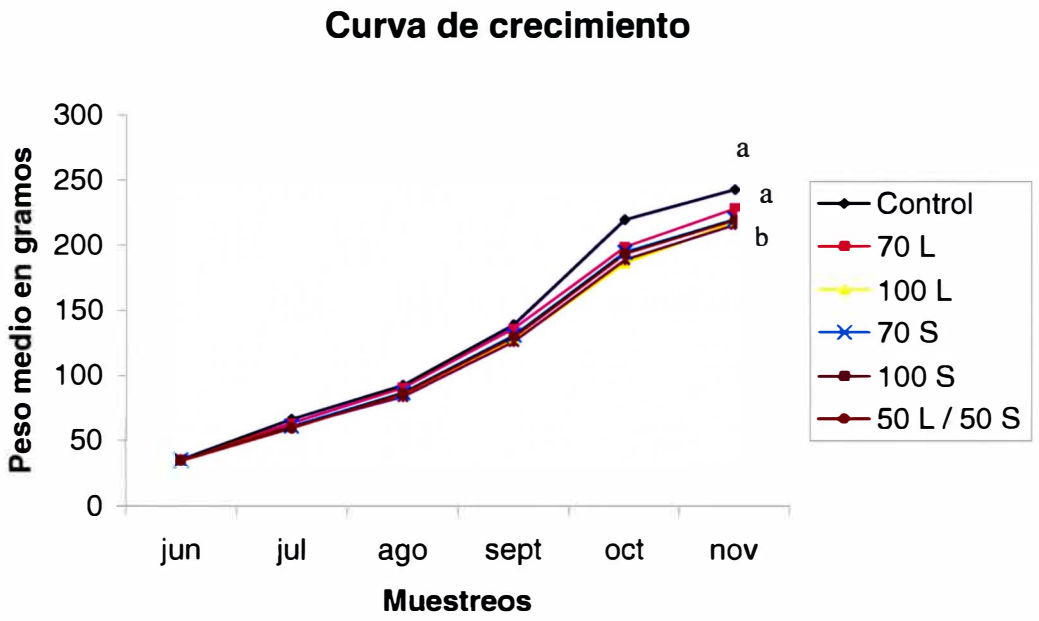


Fig.1 Curva de crecimiento de los peces alimentados con las dietas experimentales
(*) denota diferencias significativas ($p<0,05$) entre el control y las dietas experimentales

Diferencias significativas se observaron también en el parámetro porcentaje de ganancia de peso, donde la dieta de 100% aceite de pescado mostró mejor porcentaje ($p<0,05$)(Fig.2)respecto a las dietas experimentales. En la Tabla II se muestran los FCR y SGR de los peces alimentados con las dietas vegetales a lo largo del periodo experimental.

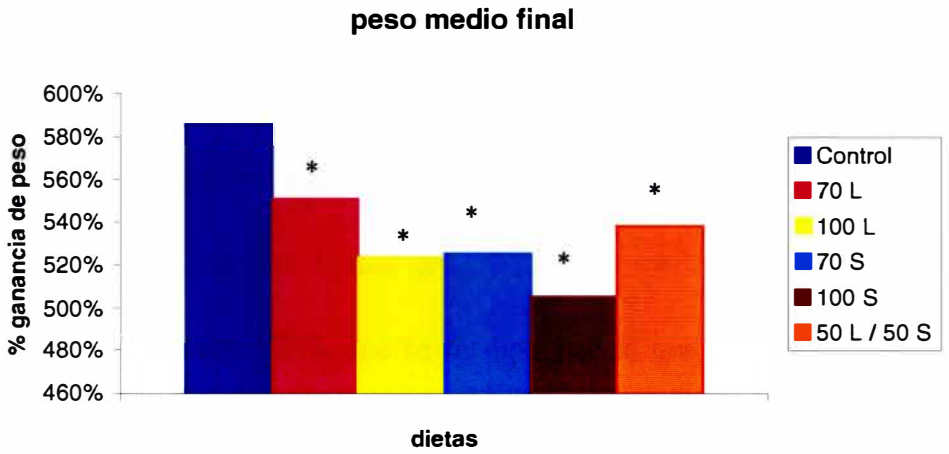


Fig.2 peso medio final expresado como porcentaje de ganancia de peso

(*)denota diferencia significativa con el control

Tabla II. SGR y FCR de los peces alimentados con las diferentes dietas durante el periodo Experimental

	JUNIO		JULIO		AGOSTO		SEPT		OCT		NOV	
	SGR	FCR	SGR	FCR	SGR	FCR	SGR	FCR	SGR	FCR	SGR	FCR
Control	1,88	0,98	1,07	1,26	1,46	1,43	1,33	1,3	0,47	1,7	0,38	2,7
70 L	1,82	1,12	1,12	1,47	1,47	1,47	1,25	1,5	0,1	1,6	0,55	3,73
100 L	1,60	1,26	1,12	1,77	1,42	1,57	1,20	1,6	0,43	2,3	0,71	1,55
70 S	1,72	1,21	1,20	1,52	1,49	1,49	1,07	1,9	0,5	1,8	0,58	1,34
100 S	1,51	1,34	1,14	1,96	1,52	1,55	1,24	1,73	0,42	1,9	0,66	2,14
50 L 50 S	1,50	1,49	1,29	1,88	1,47	1,59	1,29	1,68	0,37	3,6	0,53	2,80

III.2 Composición de ácidos grasos de las dietas

La Tabla III muestra el perfil de ácidos grasos de las diferentes dietas experimentales. En el caso de la dieta control se nota como los ácidos grasos predominates son los saturados mirístico (14:0) y palmítico (16:0) y los n-3 EPA y DHA. La dieta 100% aceite de pescado presentó también discretas cantidades de ácido oleico y linoléico mientras que las concentraciones de linolénico y araquidónico se mantuvieron bajas.

En las dietas vegetales se notó un considerable aumento de las concentraciones de ácido oleico, linoléico y linolénico y una disminución de los ácidos grasos ARA, DHA y EPA. Estos últimos dos ácidos grasos presentaron los valores más bajos en la mezcla Lino/Soja. La dieta 100% aceite de lino fue la que presentó los niveles más elevados de linolénico (LNA) mientras que las dietas 100% soja y la mezcla 50 L/50 S tenían la concentraciones más altas de ácido linoleico (LA) y oleico (OA) respectivamente.

Tabla III Composición de ag de las dietas expresado en gr/100gr de ácido graso determinado

Ac. grasos	Control	70L	100 L	100 S	50 L/50 S
14:0	6.868	2,7848	1,4933	1,1752	1,617
14:1n5	0,0251	0,0755	0,0455	0,0451	0,014
14:1n7	0,172	0,0110	0,018	0,0108	0,012
15:0	0,530	0,2369	0,1487	0,1256	0,179
15:1n5	0,0213	0,052	0,039	0,035	0,030
16 oiso	0,0765	0,0349	0,0226	0,0210	0,085
16:0	16,3745	9,8002	8,2375	10,0452	14,218
16:1n9	0,0113	0,012	0,015	0,0126	0,019
16:1n7	7,875	3,069	1,5713	1,406	1,853
Me 16:00	0,136	0,056	0,0313	0,0465	0,058
16:1n5	0,247	0,1100	0,0699	0,0553	0,078
16:2n6	0,0938	0,0412	0,026	0,0142	0,004
16:2n4	1,250	0,4783	0,2434	0,1268	0,124
17:0	0,657	0,3131	0,2206	0,2066	0,312
16:3n4	1,386	0,4978	0,2218	0,101	0,208
16:3n1	0,102	0,057	0,082	-------	0,048
16:4n3	0,0501	0,2143	0,008	0,053	0,004
16:4n1	0,499	0,2143	0,1257	0,045	0,037
18:0	3,1383	3,2534	3,2985	3,976	4,708
18:1n9 OA	5,7797	9,1634	11,1134	15,1423	21,180
18:1n7	2,2843	1,2636	1,0116	2.164	1,827
18:1n5	0,0651	0,033	0,0242	0.119	0,099
18:2n6 LA	2,3672	7,8088	10,4942	25,2902	26,751
18:2n4	0,2824	0,1059	0,0536	0,050	0,041
18.3n6	0,1879	0,0556	0,0262	-------	0,012
18:3n4	0,31	0,09	0,0222	-------	------
18:3n3 LNA	0,8377	19,4779	26,5510	3,5303	18,080
18:3n1	0,012	0,001	0,003	------	------
18:4n3	0,515	0,42	0,2537	0,168	0,175
18:4n1	0,052	0,04	0,0201	------	-------
20:0	0,617	0,1604	0,1579	0,333	0,288
20:1n9	0,08	0,0536	0,0343	0,212	0,170
20:1n7	0,809	0,4492	0,3568	1,938	1,986
20:4n6 AA	0,8270	0,3411	0,1991	0,149	0,140
20:4n3	0,6979	0,237	0,1113	0,0944	0,075
20:5n3 EPA	7,6625	2,9802	1,6266	1,1476	0,732
22:1n9	0,215	0,1846	0,2171	0,2002	1,956
22:1n11	0,2292	0,1442	0,1061	1,2928	0,439
22:4n6	0,2718	0,1252	0,0826	0,0509	0,042
22:5n6	0,0657	0,0223	-----	0,0107	0,052
22:5n3	1,4415	0,5408	0,2707	0,1691	0,082
22:6n3 DHA	6,5730	3,3074	2,3192	1,519	0,774
Saturados	27,204	15,7884	13,398	15,736	21,322
Monoenoicos	17,7425	11,5347	14,510	22,5768	29,663
n-3	17,777	27,1776	30,8868	6,6814	19,922
n-6	3,809	11,216	10,819	25,4892	26,955
n-9	6,462	13,708	11,3798	15,5543	23,306
n-3 HUFA	16,375	7,0654	4,327	2,5657	1,663
AA/EPA	0,108	0,114	0,122	0,129	0,19
OA/DHA	0,88	2,77	4,8	9,97	20,68
EPA/DHA	1,16	0,9	0,7	0,755	0,945
OA/n-3HUFA	0,35	1,3	2,57	5,9	0,9
n-3/n-6	4,6	2,42	2,85	0,26	0,73

III.3 Composición de los ácidos grasos de los macrófagos

En la tabla IV se expresan las concentraciones de los ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior. Éstos presentaron en todas las dietas valores elevados de ácidos grasos saturados sobre todo 16:0 (ácido palmítico) y 18:0.

Las concentraciones de ácidos grasos EPA, DHA, ARA, oleico y linoléico también resultaron muy elevadas.

El DHA y el ARA presentaron las concentraciones más elevadas en el control, mientras que el EPA fue mayor en la dieta 70L.

Por lo que se refiere al ácido graso linolénico este se presentó en grandes cantidades en los macrófagos de las dietas 70 L (12,827) y 100 L (18,697) mientras que en en los macrófagos del control su concentración fue muy baja (0,4).

El linoléico (18:2n6) y el oleico (18:1n9) se acumularon en grandes cantidades en los macrófagos de la dieta 100L.

La proporción n-3/n-6 se mantuvo parecida en todas las dietas con valores de 2,18 en el control, 2,06 en la dieta 70 L y 1,81 en la dieta 100 L.

Tabla IV. Composición de ácidos grasos de macrófagos de riñon anterior (expresado como g/100g de ácido graso determinado).Distintas letras en la misma linea denotan diferencia significativa (p<0,05).

Ac.grasos	**Control**	**70 L**	**100 L**
14:0	3.629 ab	3,93 a	1,657 b
14:1n5	0.066	-------	0,036
14:1n7	0.268	0,384	0,079
15:0	0,890	0,58	0,306
15:1n5	0,127	0,08	0,041
16 oiso	1,268	0,852	0,349
16:0	20,921 a	19,938 ab	15,357 b
16:1n9	0,375	0,325	0,187
16:1n7	5,362	5,210	2,955
Me 16:00	0,278	0,205	0,103
16:1n5	0,503	0,361	-----
16:2n6	0,304	0,441	0,099
16:2n4	0,485	0,332	0,141
17:0	0,0925	0,097	0,045
16:3n4	0,352	0,75	0,101
16:4n3	2,05	1,467	1,275
16:4n1	0,893	0,678	0,697
18:0	10,725 a	9,444 a	8,031 a
18:1n9 OA	7,737 b	8,874 ab	16,128 a
18:1n7	2,6605	2,327	1,911
18:1n5	0,096	------	0,035
18:2n6 LA	3,853 c	9,194b	14,383 a
18.3n6	0,086	-----	0,004
18:3n4	0,398	-----	0,003
18:3n3 LNA	0,4 c	12,827 ab	18,697a
18:4n3	1,481	-----	0,387
18:4n1	0,232	-----	0.392
20:1n9	0.09	0,756	0,919
20:1n7	0.899	-----	-----
20:3n6	0.133	-----	0,288
20:3n9	0.307	-----	0,257
20:4n6 AA	4.113 a	1,397 b	1,205 b
20:3n3	0,138	0,003	------
20:4n3	0,523	0,209	------
20:5n3 EPA	5,083 a	6,992 a	3,065 a
22:1n9	0,225	0,553	0,834
22:1n11	0,308	0,018	0,341
22:4n6	0,270	0,015	0,178
22:5n6	0,019	-----	-----
22:5n3	2,1575	1,537	0,714
22:6n3 DHA	9,925 a	7,657 a	5,836 a
Saturados	36,257	29,479	25,396
Monoenoicos	9,990	9,258	6,997
n-3	18,848	22,826	29,364
n-6	8,645	11,047	16,157
n-9	8,427	10,508	17,409
n-3 HUFA	17,303	16,395	9,615
AA/EPA	0,8	0,19	0,4
OA/DHA	0,77	1,16	2,76
EPA/DHA	0,512	0,913	0,52
OA/n-3HUFA	0,48	0,54	1,67
n-3/n-6	2,18	2,06	1,81

En la tabla IV se muestra la relación entre los ácidos grasos de los macrófagos y los de las dietas.

Las tasas macrófagos/dieta del ácido graso ARA fueron la más altas para todas las dietas con valores incluidos entre 4 y 6,05.

El DHA también presentó una tasa macrófago/dieta elevada con valores incluidos entre 1,5 del control y 2,5 de la dieta 100L.

A su vez el EPA, también presentó tasas mayores de uno, pero de menor magnitud que el DHA, excepto en la dieta control donde la tasa fue de 0,6.

Respecto al ácido oléico y linoléico estos presentaron tasas macrófagos/dieta alrededor de la unidad en todas las dietas analizadas mientras que el ácido linolénico presentó unos valores ligeramente más bajos (entre 0,47 y 0,7).

Tabla V. Relación entre los ácidos grasos de los macrófagos y los de las respectivas dietas

Ac.grasos	Control			70 L			100 L		
	Dieta	Macrof.	Tasas	Dieta	Macrof.	Tasas	Dieta	Macrof.	Tasas
Oléico	5,779	7,737	1,3	9,163	8,874	0,96	11,113	16,128	1,45
Linoléico	2,367	3,853	1,62	7,808	9,914	1,26	10,494	14,383	1,37
Linolénico	0,837	0,4	0,47	19,478	12,827	0,65	26,551	18,697	0,7
ARA	0,827	4,113	4,9	0,341	1,397	4,09	0,199	1,205	6,05
EPA	7,662	5,083	0,66	2,980	6,992	2,3	1,626	3,065	1,88
DHA	6,573	9,925	1,5	3,307	7,657	2,3	2,319	5,836	2,5

III.4 Actividad fagocítica

La Tabla VI muestra los resultados de la actividad fagocítica de los macrófagos de los diferentes dietas experimentales. Dicha actividad se calculó como porcentaje de células que presentaban vacuolas en el citoplasma.

Se denota diferencia significativa entre el control ($p<0,05$) y las dietas 70L, 100L, 70S, 100S. La dieta 50L/50S no presentó diferencia significativa con la dieta 100% aceite de pescado.

Tabla VI Actividad fagocitica de las diferentes dietas experimentales.
Valores con diferente letra respecto al control son significativamente diferentes($p<0,05$)(media ± SD)

DIETA	INDICE FAGOCITICO (%)
Control	21 ± 2 b
70 L	14 ±1 a
100 L	12 ±4 a
70 S	14 ±2 a
100 S	10 ±2 a
50 S /50 L	21,3 ± 1,53 b

En la Fig.3 se pueden ver macrófagos activados. Éstos se caracterizan por la presencia de membrana citoplasmática activada con pseudopodios que se empiezan a formar para rodear la bacteria.

la Fig.4 muestra macrófagos que presentan una vacuola en el citoplasma, el nucleo se desplaza a la periferia y pierde su forma redondeada .

La Fig.5 muestra macrófagos con varias vacuolas en su interior, también se puede apreciar la presencia de cocos Gram negativos ya fagocitados.

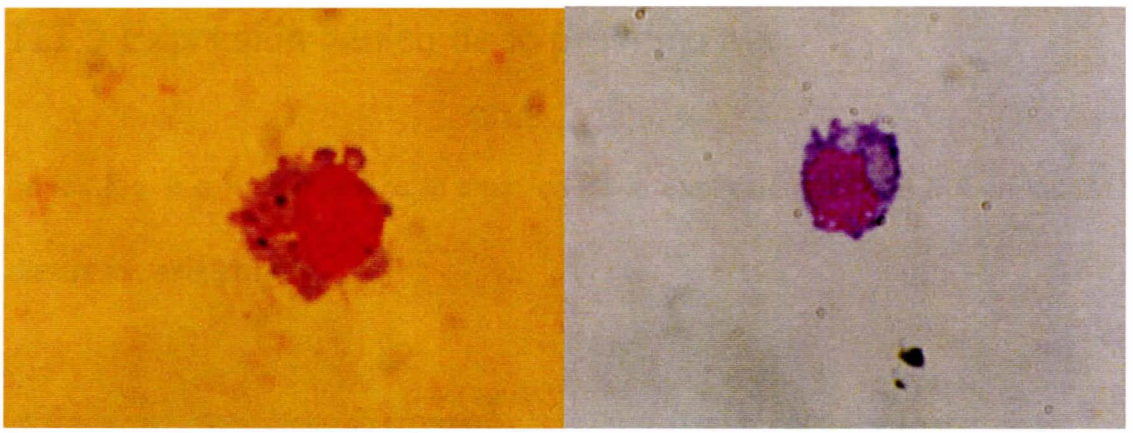


Fig.3. Macrófagos activados (dietas 1 y 6)

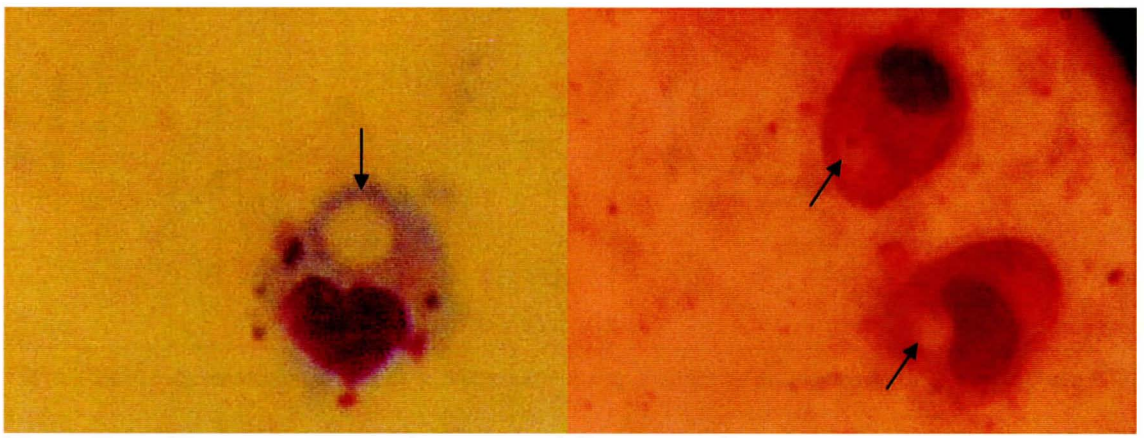


Fig.4. Macrófagos con una sola vacuola (dietas 3 y 4)

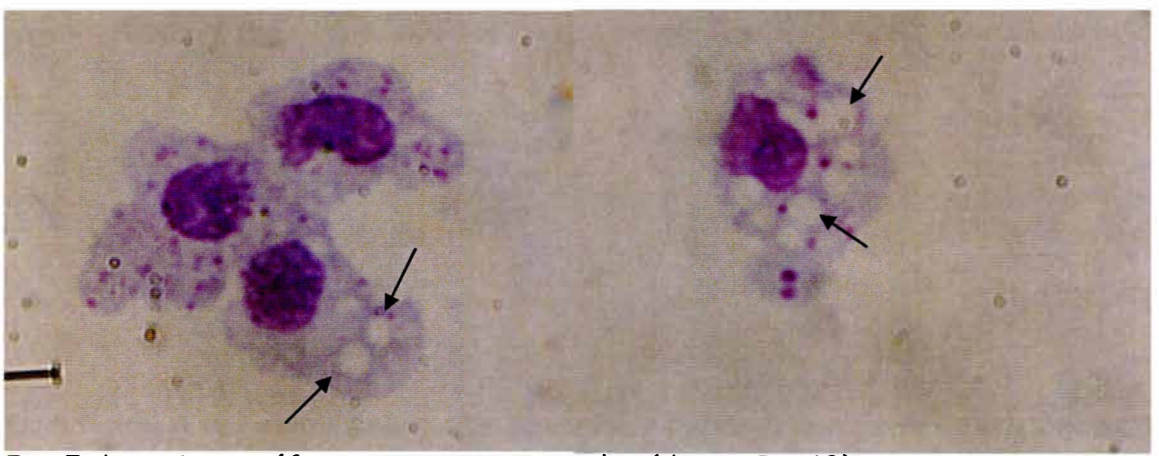
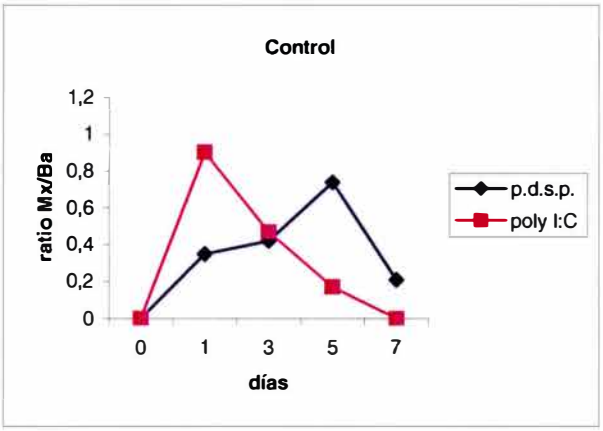


Fig. 5 dieta 6 macrófagos con varias vacuolas (dietas 7 y 13)
(La ⟶ indica vacuolas citoplasmática).

III.5 Expresión génica de la proteina Mx

En las Fig. 6 a 9 se muestra la cinética de la expresión del gen Mx en las diferentes dietas experimentales.



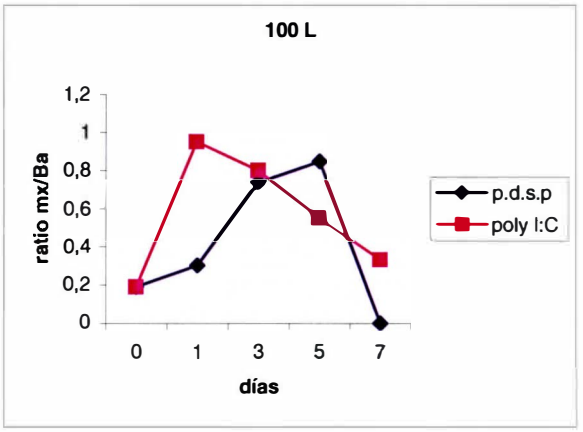
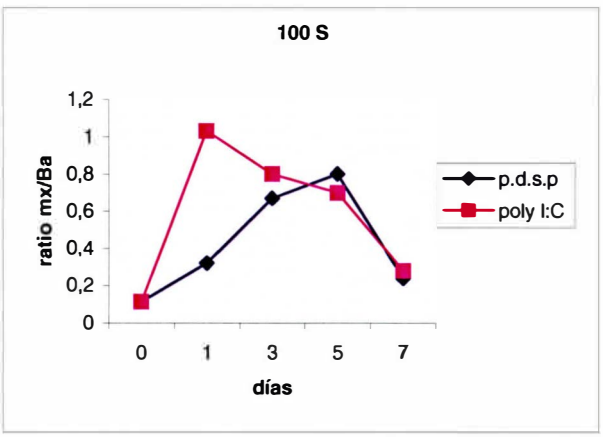


Fig.6 Cinética de expresión de Mx en la dieta control **Fig.7** Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% Lino



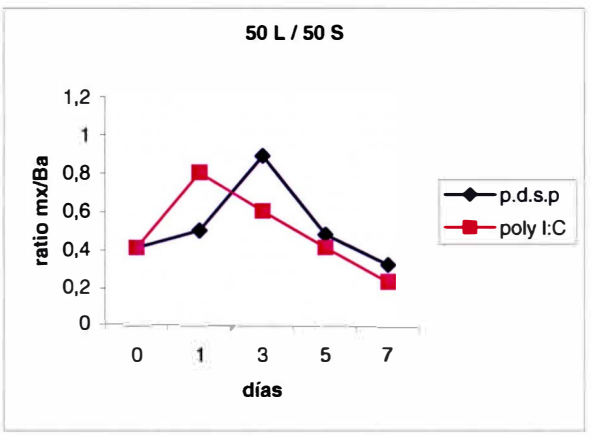


Fig.8 Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% S **Fig.9** Cinética de expresión de Mx en la dieta 50L/50S

Todas las dietas excepto el control presentaron una expressión basal de proteina Mx, más elevado en algunas dietas (dieta 50L/50S) que en otras (Fig.10)

En todas las dietas la expresión del gen Mx bajo estímulo Poly I:C presentó un pico de producción a las 24 horas post-inoculación (día 1).

Los valores del ratio Mx/βa también resultaron muy parecidos entre dietas.

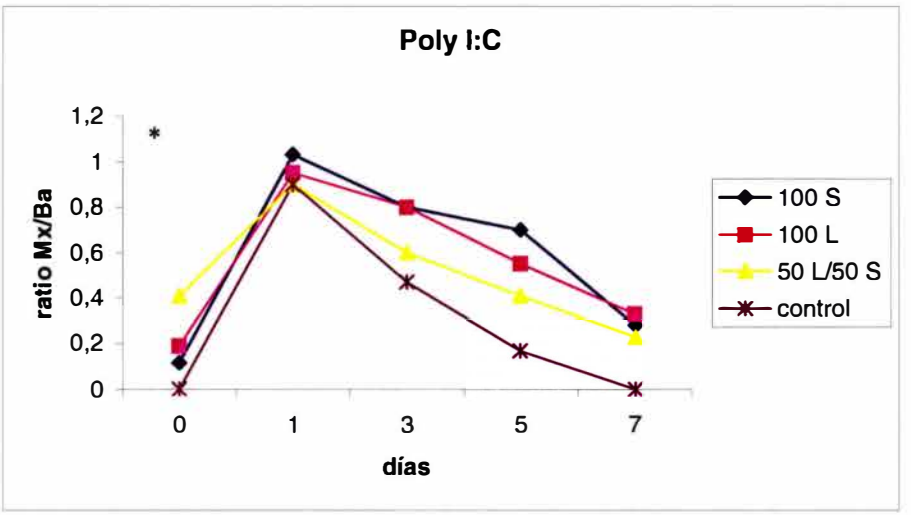


Fig.10. Cinética de respuesta frente poli I:C
(*)denota diferencias significativas (p<0,05)entre la curva 100S y el control

El control presentó un pico al día uno seguido por un rápido descenso hasta alcanzar ratios iguales a zero al día 7 post-inyección, la dieta Lino 100 también alcanzó el pico al día uno y se mantuvo por encima de los niveles basales hasta el día 7 produciendo por lo tanto una respuesta al igual que la dieta soja 100.

Al análisis estadístico la dieta 100S (Soja 100) resultó ser significativamente diferente ($P < 0.05$) respecto al control en la respuesta bajo estímulo Poly I:C, la diferencia se debió al hecho que el pico de producción fue más elevado en la dieta vegetal con valores de ratio Mx/βa al día 1 iguales a 1,03 (0,9 en la dieta control).

En el caso de la respuesta bajo estímulo *Photobacterium damselae* subespecie *piscicida* la cinética de expresión génica fue distinta respecto a la Poly I:C.

Mientras que para el inmunoestimulante la respuesta fue casi inmediata, en el caso de la bacteria ésta estimuló de forma más gradual, provocando picos máximos entre 3 y 7 días. La dieta 50L/50S presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control con un pico de producción de gen Mx más precoz (día 3) respecto al resto de las dietas, cuyo valor máximo se alcanzó al día 5 post-infección con valores de ratio muy cercanos entre si(Fig.11).

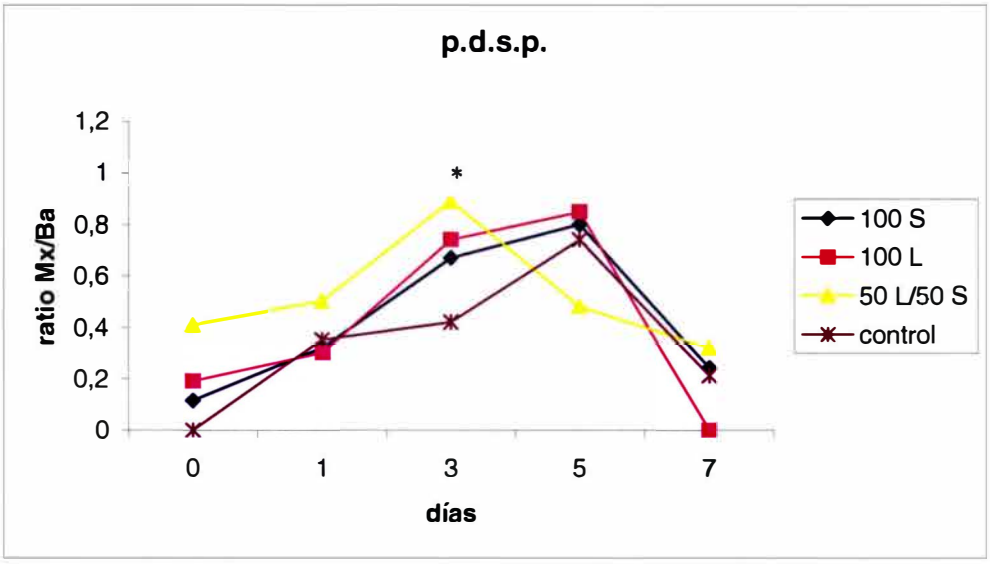


Fig.11. Cinética de respuesta frente p.d.s.p.
(*) denota diferencias significativas entre la curva 50L/50S y el control

Analizando el incremento de la tasa Mx/βa en función de los valores basales a tiempo 0, se observó que la dieta 100L y la mezcla 50L/50S presentaban valores de ratio al

día 7 inferiores a los basales, mientras que el incremento mayor lo tuvo el control al día 5 post-infección con un incremento de hasta 0,7 sobre los niveles basales al día cero (Fig.12)

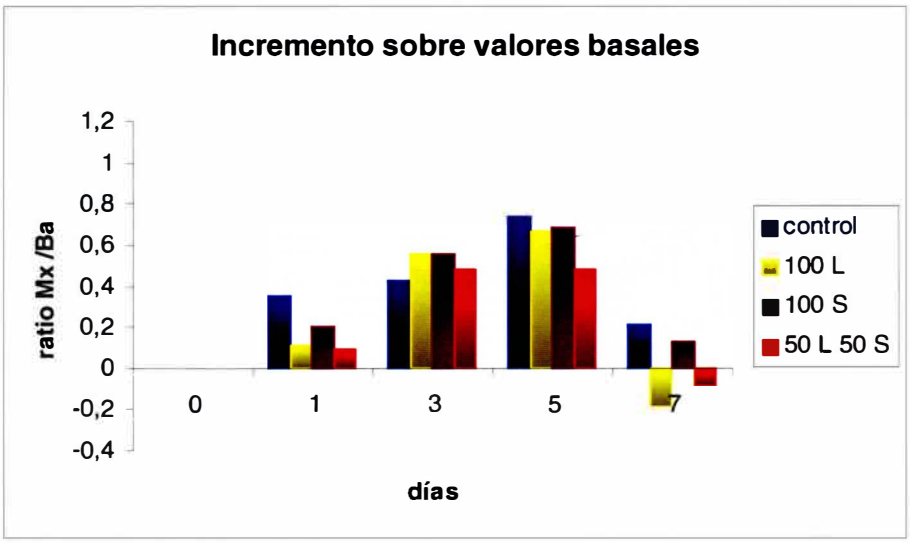


Fig.12. Incremento de producción de Mx respecto a los valores basales

V.-Discusión

En este trabajo la sustitución de un 100% de aceite de pescado por aceite de lino y soja, así como la sustitución total de aceite de pescado por una mezcla 50:50 de los dos aceites vegetales, resultó afectar negativamente el crecimiento de juveniles de dorada. Al contrario la sustitución de un 70% de aceite de pescado por aceites vegetales no afectó al crecimiento.

Este resultado concuerda con lo descrito en bibliografía, es decir, que la sustitución de hasta un 60% de aceite de pescado por aceites vegetales no afecta el crecimiento y la tasa de conversión de dorada (Izquierdo et al. 2005), trucha arco iris (Reinitz y Yu, 1980, Greene y Selivonchick, 1990), salmón (*Salmo salar*) (Hardy et al. ,1987, Bell et al.2003) salvelino (*Salvelinus fontinalis*) (Guillon et al.,1995) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Mourente et al.2005) nisiquiera durante largos periodos de alimentación.

Sin embargo, si se aumenta la sustitución hasta un 80%, el aceite de lino y soja provocan un aumento de la tasa de conversión del alimento (FCR) y reducen significativamente el crecimiento y el SGR de dorada (Menoyo et al. 2004, Montero et al.2003), lubina (Montero et al. 2005) y en caso de sustitución total del aceite de pescado también se reduce el crecimiento y SGR de rodaballo (*Psetta maxima*) (Regost et al. 2003).

La dependencia de la Acuicultura del aceite de pescado radica en el elevado requerimiento dietético de n-3 HUFA por parte de los organismos marinos (Sargent y

Tacon, 1999). Los juveniles de dorada tienen un requerimiento mínimo de n-3 hufa del 1,6% sobre alimento seco (Fernandez-Palacios et al., 1995) lo cual es bastante elevado si lo comparamos con los requerimientos de otras especies como por ejemplo la trucha arco iris (0,7- 1%) (Bell 1998).

Las fuentes lipídicas alternativas deben por lo tanto tener en su composición una cantidad de n-3 HUFA suficiente para satisfacer los requerimientos de las distintas especies, y al mismo tiempo no alterar el perfil lipídico de los diferentes tejidos lo cual perjudicaría no sólo el estado de salud del animal sino también la del consumidor.

Ha sido demostrado que la inclusión de aceites vegetales en la dieta induce modificaciones en la composición lipídica del filete, provocando una reducción de n-3 HUFA (sobre todo de EPA) en el músculo de dorada (Izquierdo et al.2003) y de salmónidos (Caballero et al.2002). Una reducción de EPA debida a alimentación con aceites vegetales también ha sido descrita en los lípidos del plasma de dorada (Ganga et al. 2005).

Si por un lado la alimentación con dietas vegetales disminuye los n-3 hufa en los tejidos, y por otro aumenta los niveles de otros ácidos grasos tiendiendo a reflejar su composición lipídica en los distintos tejidos animales. Es razonable creer, entonces, que si los ácidos grasos ingeridos alteran el perfil lipídico plasmático también la composición de los fosfolípidos de los macrófagos puede sufrir modificaciones en función de dichos lípidos dietéticos.

En el presente estudio el perfil de ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior reflejó la composición bioquímica de las dietas experimentales. La dieta control, como era previsible, resultó ser la más rica en EPA y AA n-3 hufa esenciales para peces marinos. La cantidad de DHA en los macrófagos de las dietas 70 L y 100 L resultó ser hasta 2,5 veces (Tabla V) más elevada que los valores encontrados en las dietas. Se puede afirmar por lo tanto que existe una incorporación selectiva en las células de algunos ácidos grasos y que dicha incorporación es independiente del nivel dietético de los mismos como ya describieron Waagboo et al. (1995) en bacalao, Farndale et al. (1999) en leucocitos de lubina y por Montero et al. (2003) en macrófagos de dorada.

Las dietas vegetales 70 L y 100 L también incorporaron elevadas cantidades de araquidónico en sus macrófagos y por consecuente también EPA. Los ratios AA macrófagos/AA dieta alcanzaron los valores de 6,05 (Tabla V) en la dieta 100 L confirmando la importancia que este ácido graso implica para el correcto funcionamiento de estas células y concordando con lo descrito en trabajos anteriores (Montero et al.2003)

Los niveles de 18:2 n-6 (ácido linoléico) y linolénico (18:3 n-3) resultaron muy altos en los macrófagos de las dietas vegetales confirmando lo descrito por Bell et. al (1996) en salmón atlántico, es decir, que peces alimentados con aceite de lino aumentan los niveles de estos ácidos grasos en los fosfolípidos de membranas de las células.

Con respecto a la capacidad fagocítica, todas las dietas, excepto la mezcla 50L/50S resultaron afectarlas negativamente para dicho parámetro,

La mezcla 50L/50S fue la que presentó un mejor balance entre los ácidos grasos de su composición, con la proporción LA/LNA más parecida al control y con la proporción ácidos grasos saturados/insaturados más equilibrada. Calder et al. (1990) demostraron que la actividad fagocítica está correlacionada linealmente con el índice de insaturación y con la proporción en ácidos grasos saturados/insaturados de los fosfolípidos de membrana. Macrófagos ricos en ácidos grasos saturados como el mirístico, steárico o palmítico disminuyen la fagocitosis.

La dieta soja 100% fue la que presentó índice fagocítico más bajo pero también fue la dieta con las concentraciones de n-3 HUFA más bajas y de oleico más altas. Los ácidos grasos n-3 HUFA en particular el EPA y el DHA aseguran a la membrana celular permeabilidad y flexibilidad, esta última característica es de fundamental importancia para una correcta fagocitosis. Ha sido comprobado que en condiciones dietéticas carenciales de estos ácidos grasos, los macrófagos incorporan selectivamente el DHA en los fosfoglicéridos de sus membranas (Kanazawa, 1985; Izquierdo, 1996; Montero et al. 2001). Por lo tanto, aunque no conocemos el perfil bioquímico de los macrófagos de la dieta soja 100, cabe pensar que la disminución de capacidad fagocítica no sea debida a bajos niveles de DHA en la dieta (ya que los macrófagos lo incorporarían de forma selectiva) si no que a altos niveles de ácido oleico. De hecho ha sido demostrado

que el ácido oleico tiende a reflejar los niveles dietéticos (ratio macrófago/dieta alrededor de la unidad) en los macrófagos de dorada (Montero et al. 2003).

La presencia de ácido oleico al ser de cadena más corta que el DHA y el EPA, podría estar afectando la flexibilidad de la membrana celular y por consecuente la fagocitosis.

Montero et al. (2003) encontraron que la sustitución de un 60 y 80% de aceite de pescado por aceite de lino no afecta la capacidad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior, en nuestro trabajo la inclusión de un 70% y 100% de aceite de lino en la dieta sí afectó el índice fagocítica. Dicha discordancia en los resultados puede ser debida a los niveles de linolénico encontrados en la membrana de los macrófagos, que en el trabajo de Montero et al. resultaron muy bajos (con valores de tasa macrófago/dieta alrededor de 0,3) mientras que en nuestro estudio resultaron ser más altos (tasa 0,65 para la dieta 70 L y 0,7 para la dieta 100L. Tabla V) demostrando una incorporación más abundante de dicho ácido graso en las células lo cual podría estar afectando la capacidad fagocítica. La mayor incorporación de linolénico en los macrófagos de nuestra experiencia podría ser debida a una escasa presencia dietética de n-3 hufa. Las concentraciones de n-3 hufa en las dietas fueron de 7,06 (gramos sobre 100g de ácido graso determinado) para la dieta 70L y de 4,03 para la 100L contra los 10,71 y 7,39 encontrados por Montero et. al en las dietas con aceite de lino al 60% y 80% respectivamente. Al carecer de estos ácidos grasos esenciales, los

macrófagos incorporarían otra clase de n-3 como por ejemplo el linolénico (18:3n-3) perjudicando así la flexibilidad de sus membranas.

Estudios efectuados en medicina humana (Hara et al.2003) demuestran que algunos ácidos grasos como el araquidónico el oleico y el linoléico pueden afectar también a la producción de Interferón gama (IFN-γ) por parte de los linfocitos intraepiteliales del intestino. En dicho estudio los linfocitos fueron cultivados en medios enriquecidos con los distintos ácidos grasos y expuestos a diferentes estímulos para que producieran IFN gama. A iguales concentraciones los ácidos grasos linoléico y oleico dieron mejores resultados (mayor producción de IFN) respecto al araquidónico.

Existe entonces una relación entre la composición bioquímica de la dieta y la producción de IFN, pero hasta el día de hoy poco o nada se sabe sobre como dicha relación afecte al sistema IFN en peces.

El sistema Interferón representa uno de los primeros y el más potente mecanismo de defensa frente una infección viral en vertebrados (Samuel, 1991), este tipo de respuesta empieza con la producción de interferón tipo I (IFN alfa y beta) una cytoquina que a su vez induce la producción de proteínas, entre ellas las proteínas de resistencia a mixovirus (Mx), que inhiben la replicación viral.

La expresión del gen que codifica por las proteínas Mx ha sido detectada en músculo, hígado, riñón anterior, bazo, cerebro, corazón y agallas de dorada aunque la expresión más elevada se observa en el hígado, cerebro, bazo y agallas. Una expresión de tipo constitutivo ha sido detectada también en peces sanos de distintas especies como

doradas (Tafalla et al. 2004), salmón atlántico (Jensen et al. 2002) y la platija japonesa (Lee et al. 2000).

Esto podría ser explicado con una producción basal de interferón (descrito en humanos que estimularía la expresión génica de otras proteínas entre ellas las Mx.

En nuestro trabajo hemos encontrado una expresión basal de gen Mx en doradas sanas alimentadas con las dietas vegetales, sin embargo los peces alimentados con la dieta control no presentaron expresión de Mx al día 0.

La hipótesis más probable es la que las dietas vegetales estimularían en cierta forma el sistema interferón y por consecuencia la expresión de las proteínas Mx.

Trabajos efectuados en medicina humana (Fritsche et al. 1998) afirman que dietas ricas en omega 6 pufa tienen como efecto una mayor producción de IFN gama respecto a dietas ricas en omega 3 pufa de origen marino y que entre los omega 6 el linoléico (Hara et al. 2003) es el que más estimula la producción de IFN. Esto podría explicar los resultados que presentó la dieta 100 % Soja (la más rica en ácido linoléico 18:2 n-6) al expresar Mx bajo estimulo Poly I:C con valores de pico al día 1 incluso más altos que el control (ratio=1.03 frente a 0,9 del control).

Lessard et al. (2004) suministraronn dietas enriquecidas con aceite de lino y soja a vacas en el periodo del parto y estudiaron el efecto de dichos aceites vegetal sobre las funciones linfocitarias medidas como producción de IFN gama.

La composición dietética resultó afectar la composición de los ácidos grasos plasmáticos también en mamiferos, con un aumento en n-3 en el plasma de los animales

alimentados con lino. Estos cambios en la composición sanguinea de n-3 y n-6 hufa, según Lessard et al., podrían haber influenciado la producción de mediadores como prostaglandinas y leucotrienos que están relacionados con la sintésis de cytoquinas y por consecuente con la respuesta celular a los diferentes estímulos.

La producción de IFN gama por parte de los linfocitos cultivados *in vitro* resultó más alta en las vacas multiparas alimentadas con aceite de lino concordando por lo tanto, con la hipótesis de un posible efecto estimulante de los aceites vegetales sobre el sistema interferón.

Tras la inoculación del inmunoestimulante Poly I:C todas las dietas presentaron un up-regulation a las 24 horas concordando con lo descrito por Tafalla et al. (2004). La mezcla de aceites presentó los niveles basales más altos pero al día 7 la expresión de gen Mx fue inferior a los niveles iniciales.

En el caso de la respuesta bajo estímulo bacteria los patrones también fueron parecidos en todas las dietas, en este caso el incremento de expresión Mx fue más lento y el pico de producción se alcanzó al día 5 post-inoculación.

No obstante todas las dietas respondieran bien, el control fue el que mejor cinética tuvo, alcanzando valores de pico similares a las otras dietas pero empezando por valores iniciales iguales a cero y permaneciendo en valores superiores a los basales hasta el día 7. Otra dieta que respondió muy bien fue la 100% soja probablemente debido al efecto estimulante del ácido linoléico (Hara et al. 2003), esta dieta

presentó un claro pico al día 5 y luego un descenso al día 7 pero manteniéndose siempre por encima de los valores basales.

La dieta 100% Lino también dio buena respuesta pero se agotó más rápido y no expresó Mx al día 7 presentando por lo tanto niveles inferiores a los basales, esto se podría explicar con el hecho de que las cantidades de linoléico en estas dietas no son tan elevadas como en el caso de la 100% soja y resultan insuficientes para mantener una estimulación duradera. Este resultado también concorda con lo descrito por Wallace et al. (2003) en humanos, es decir, que dietas enriquecidas con aceite de lino rico en ácido alfa-linolénico (ALNA) no afectan la producción de Interferón por parte de las células mononucleadas.

La mezcla 50:50 presentó un pico de expresión de Mx más precoz (al día 3) pero también fue la dieta con valores basales más elevados (r=0,4), puede que en la caso de la mezcla lino/soja los macrófagos, cuya capacidad fagocítica no resultó afectada por la dieta, hayan respondido de forma más eficaz al estimulación o simplemente que hayan alcanzado los valores de pico antes que las otras dietas ya que los valores basales también eran más altos.

Desde nuestro punto de vista esta última dieta (50L/50S) puede considerarse mejor respecto a las 100% de sustitución ya que fue la dieta que mantuvo una respuesta adecuada y más equilibrada a lo largo de toda la experiencia respecto a ambos parámetros, actividad fagocítica y expresión de Mx. Sin embargo, para estudios posteriores es aconsejable llegar hasta las clases lipídicas de los macrófagos del

riñón anterior para averiguar en detalle la relación entre ácidos grasos dietéticos y sistema interferón. Un conocimiento más completo del sistema interferón en peces y de su relación con las dietas vegetales podrá contribuir no sólo a un abaratamiento de los costes de producción si no también a un control más exhaustivo de las enfermedades virales en acuicultura.

IV.- Conclusiones

1. La sustitución de un 100% de aceite de pescado por aceites de lino y soja, así como la sustitución total del aceite de pescado por una mezcla 50:50 de los dos aceites, afecta negativamente al crecimiento de juveniles de dorada.

2. La composición lipidíca de la dieta determina el perfil de ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior, aunque hay una incorporación selectiva de ARA y DHA en los lípidos totales de estas células confirmando la importancia de estos ácidos grasos esenciales en el correcto funcionamiento de los macrófagos.

3. La sustitución al 100% del aceite de pescado por una mezcla 50:50 de aceite de lino y soja no afecta la actividad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior.

4. La sustitución por encima de un 70% del aceite de pescado por una única fuente vegetal (lino o soja) disminuye la respuesta fagocítica de los macrófagos del riñón anterior.

5. Los peces alimentados con dietas vegetales presentan niveles basales mayores de expresión de gen Mx que los peces alimentados con la dieta 100% aceite de pescado.

6. La presencia de altos niveles dietéticos de ácido linoleico parece estimular la producción de interferón y como consecuencia, mayores niveles de expresión del gen Mx.

7. La sustitución al 100% con aceite vegetal rico en linoleico (soja) provoca una respuesta de expresión del gen Mx de mayor intensidad y duración que otros aceites vegetales.

VI.- Bibliografía

- Acosta F., Lockhart K., Gahlawat S.K. , Real F.,Ellis A.E. Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lypopolisaccharide and chromosomal DNA. Fish & Shellfish Immunology 128 (2004) 255-263.

- Acosta, F. Petrie, A. Lockhart, K. Lorenzen, N. Ellis A.E. Kinetics of Mx expression in Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr and Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in response to VHS-DNA vaccination. Fish and Shellfish immunology (2004).

- Barlow S. 2000, Fishmeal and fish oil: sustainable feeds ingredients for aquafeeds. Glob. Aquacult. Advocade 4,85 88

- Bimbo A.P. (1990) Processing of fish oils.En: *Fish Oils in Nutrition*, (M.E.Stansby,ed) Van Nostrand Reinhold, New York, New York pp 181-225.

- Bell JG, Ashton I, Secombes CJ, Weitzel BR, Dick JR, Sargent JR. (1996) Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (Salmo salar). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1996 Mar; 54 (3):173-82

- Bell J.G.(1998). Current aspects of lipid nutrition in fish farming. En: Biology of farmed Fish, (K.D.Black & A.D. Pickering ed) Sheffield Academic Press.Sheffield, England, pp 114-145.

- Bell J.G., McGhee F., Campbell P., Sargent J.R. (2003) Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar)* : Changes in flesh fatty acids composition and effectiveness of subsequent fish oil "wash out".Aquaculture 218:515-528

- Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjorvik E., Montero D., Socorro J., Fernandez A.J., Rosenlund G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata)* fed diets containg diferent lipid sources. Aquaculture 225(2003) 325-340

- Caballero M.J.,Obach A., Rosenlund G.,MonteroD., Gisvold M.,Izquierdo M.S.(2002) Impact of different dietary lipid sources on growth,lipid digestibility,tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout,*Oncorhyncus mykiss.*Aquaculture 214:253=271

- Christie, W.W. 1982, Lipid Analysis.Pergamon Press, Oxford.

- Ellis.A.E. 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. Developmental y comparative immunology 25,827 839

- Fao (Food and agriculture organization) bases de datos http://www.fao.org/

- Farndale B., Bell g., Bruce M., Bromate N., Oyen F., Zanuy S. & Sargent 1999 Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid composition and plasma eicosanoid concentration in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)Aquaculture 179:335-350

- Feng C, Keisler DH, Fritsche KL. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce IFN-gamma receptor expression in mice. J Interferon Cytokine Res. 1999 Jan;19(1):41-8.

- Fernandez-Palacios H., Izquierdo M.S., Robaina L., Valencia A., Salhi M. & Vergara J.M.(1995)Effects of n-3 hufa level in broodstocks diets on eggs quality of gilthead seabream(*Sparus aurata*)Aquaculture 132:325-337

- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley, 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226,497-509

- Fritsche K.L., M. Byrge, C. Feng Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice Immunology Letters 65 (1999) 167–173.

- Ganga R., Bell J.G., Montero D., Robaina L., Caballero M.J. and M.S. Izquierdo Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*) Comparativee Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology Volume 142, Issue 4 , December 2005, Pages 410-418

- Guillon A.,Soucy P.,Khalil M. & Abambounou L.(1995) Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acids composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus Fontinalis*) Aquaculture 136:351-362

- Hara Y., Miura , Komoto, Inamura, Koseki , Watanabe , Hokari ,Tsuzuki, Ogino ,Nagata , Hachimura , Kaminogawa, Ishii Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes Immunology Letters 86 (2003) 139-148

- Hardy R.W., Scott T.M. & Harrell L.W.(1987) Replacement of herring oil with menhaden oil,soybean oil,or tallow in the diets of atlantic salmon raised in marine net-pens. Aquaculture 65:267-277.

- Izquierdo M.S., Montero D., Robaina L., Caballero M.J, Roselund G., Ginés R. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period .Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding.Aquaculture 250(2005) 431-444.

- Klinger R.C., Blazer V.S.& Echevarria C.(1996) Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus puntactus*. Aquaculture 147:225-233.

- Jensen, V. and Robertsen, B. (2000). Cloning of a Mx cDNA from Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 20: 701-710.

- Kanazawa, A. 1985 Essentiel fatty acids and lipid requirement of fish. En: Nutrition and Feeding in Fish. C.B. Cowey, A. M. Mackie y J.G. Bell (Eds.) Academic press, Londres: 281:298

- Lessard M., Gagnon N.,Godson. L. and H. V. Petit (2004) Influence of Parturition and Diets Enriched in n-3 or n-6 Polyunsaturated Fatty Acids on Immune Response of Dairy Cows During the Transition Period. J. Dairy Sci. 87:2197–2210

- Lee, J.Y., Hirono, I. and Aoki, T (2000). Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichtys olivaceus*. *Developmental and Comparative Immunology* 24 (4): 407- 415.

- Li Z., Mark J. Soloski, Anna Mae Diehl.2005 Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with non-alcoholic fatty liver disease. Liver Biology and Pathobiology 42 : 880-885

- Montero D, Socorro J, Tort L, Caballero MJ, Robaina LE, Vergara JM, Izquierdo MS. (2004) Glomerulonephritis and immunosuppression associated with dietary essential fatty acid deficiency in gilthead sea bream, Sparus aurata L., juveniles.J.Fish.Dis.2004May;27(5):297-306.

- Montero D., Kalinowski T., Obach A.,Robaina L., Tort L., Caballero M.J., Izquierdo M.S.(2003) Vegetable lipid source for gilthead seabream (*Sparus aurata*) : effects on fish health. Aquaculture 225 (2003), 353-370

- Montero D., Robaina L., Caballero M.J., Ginés R., Izquierdo M.S.(2005) Growth,feed utilization and flesh quality of European sea bass(*Dicentrarchus labrax*)fed diets containing vegetables oils: A time-course study on the effect of re-feeding period with a 100% fish oil diet. Aquaculture 248(2005),121-134

- Mourente G., Good J.E. and Bell J.G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E_2; and F_{2a}, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. Aquacul. Nutr. 11: 25-40

- Reintz G.L. & Yu T.C.(1981), Effects of dietary lipids on growth and fatty acids composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Aquaculture 22:359-366.

- Robertsen B. 2005. The interferon system of teleost fish. fish & shellfish immunology (in press)

- Salinas I, Lockhart K, Bowden TJ, Collet B, Secombes CJ, Ellis AE. An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Effect of temperature on the kinetics of the Mx responses. Fish Shellfish Immunol 2004.

- Samuel C. E.(2001) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular protein and their surprisingly selective antiviral activities. Virology 183,1-11

- Sargent J.R., Tacon A.G.J. 1999 Development of farmed fish: A nutritional necessary alternative to meat. Proc. Nutr. Soc 58,377 383

- Siwiki A., Anderson D and Antychowics J., 1993. Nonspecific defence mechanism assay in fish. Phagocytic index, adherence and phagocytic ability of neutrophils (NBT test) And myeloperoxidase activity test. En: Fish disease diagnostic and diagnostic and preventions methods.FAO project GPC /INT /526 /JPN: 95-103

- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, Figueras A, Novoa B. Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. Fish Shellfish Immunol 2004; 16:11–24.

- Trobridge G.D. and Leong J.C. (1995). Characterisation of a rainbow trout Mx gene. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 15: 691-702.

- Trobridge G.D., Chiou P.P. and Leong J.C. (1997). Cloning of the rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of Virology* 71: 5304 -5311.

- Waagbo R.,Hemre J. & Lie O.1995 Tissue fatty acid composition, haematology and immunity in adult cod, *Gadus morhua* L., fed three dietary lipid sources. Journal of Fish Disease 13:615-622

- Wallace Fiona A., Elizabeth A. Miles and Philip C. Calder Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. British Journal of Nutrition (2003), 89, 679–689

- White R.P.(1992) Fatty acids in oilseeds (vegetable oils) En: *Fatty acids in food and their health implications,*(C.K. Chow ed.)Marcel Dekker Inc.,New York pp 237-262

- Wood R.(1992)Biological effects of palm oil in humans. En: *Fatty acids in food and their health implications,*(C.K. Chow ed.)Marcel Dekker Inc., New York pp 647-661.

- Yano T., 1996. The nonspecific inmune system: Humoral defence. En: the Fish Inmune System: Organism, Phathogen and Environment (G.Iwama, & T. Nakanishi, eds) pp. 105-157. San Diego: Academic Press.

- Yap, W.H., tay, A., Brenner, S. and Venkatesh, B. (2003). Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes* L.) Mx gene and functional characterisation of its promoter *Immunogenetics* 54 (10): 705-713.