

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 acogedora 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 expresión génica de la proteína Mx.....	32
2.5.1 Material Biológico.....	32
2.5.2 Condiciones experimentales.....	32
2.5.3 Inoculación de inmunoestimulante y de la suspensión 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 proteína 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 proteína 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 fagocítica 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 difícil de conseguir. El futuro de este sector podrá continuar entonces sólo si se desarrollan 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 damsela* 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 sustitución, 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 lipídica 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 fagocítica 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 homogénea 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 docosaenoico (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 lisozimica, 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 desempeñado 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 varía entre 12 y 25  $\mu$ , tienen una vida media bastante larga (75 días o más) y se originan a partir de la médula ósea mientras que en los peces, al carecer de médula, 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 sustancias 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 sustancias tales como 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 (Robertson 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 al menos 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- $\gamma$  corresponde al dicho "Interferón Inmune" siendo producido por las células Natural Killer (NK) y por los linfocitos-T activados por estímulos antigénicos y mitógenos, 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 Rickettsia, Listeria etc.

De hecho el IFN- $\gamma$  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 M $\alpha$

El IFN es una proteína perteneciente a la clase de las citoquinas (mediadores de la comunicación entre células) pero su actividad antiviral es indirecta, siendo ejecutada por otras sustancias. De hecho bajo el estímulo 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 estímulo 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 citoquinas-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 citoquinas 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 consiguiente una reducción en la producción de dicha citoquina.

Otros autores (Hara et al. 2003) demostraron que algunos ácidos grasos como el araquidónico, el oleico y el linoléico pueden afectar también a la producción de Interferón gama (IFN- $\gamma$ ) 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 produjeran 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 citoquinas y entre ellas del interferón. Los resultados demostraron que ninguna de las dos dietas influía negativamente sobre la actividad de las células mononucleadas y por consiguiente sobre la producción de IFN.

# Experimento 1

## 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 duración 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

$$FCR = \text{alimento seco ingerido (g)} / \text{peso ganado (g)}$$

Se formularon seis dietas experimentales isoenergéticas e isoprotéicas.

#### Dietas experimentales:

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 esencial 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$ ) de la suspensión celular con 10  $\mu\text{l}$  de tripan blue y se realizó un contaje en una cámara de Neubauer.

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

Se preparó una suspensión de *Vibrio alginolyticus* 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  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular con 500  $\mu\text{l}$  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 (10 $\mu\text{l}$ ) 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  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  en manta calefactora para que se produjera 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 los 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 a cabo 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 proteína Mx se realizó en el hígado, debido a que en este tejido la expresión génica de tipo constitutivo es muy débil 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 inmunostimulante (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 inculó 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 .