

Respuesta inmune en mucosas de piel y branquias de *Solea senegalensis* tras la alimentación con una dieta conteniendo *Ulva ohnoi* (5%)

Di Zeo, D.E.; Fumanal, M.; Cerezo, I.M.; Dominguez-Maqueda, M.; Núñez-Díaz, J.A.; Anguís, V.; Fernández-Díaz, C.; Moriñigo, M.A.; Balebona, M.C.

Abstract

In the search of the improvement of the feeding of the fish in the aquaculture, macroalgae seem to be a promising source of nutrients and bioactive substances. In the case of the genus *Ulva*, the effect of its inclusion in feed on the growth, tissues composition and the stress response of some fish species has been evaluated. However, it is necessary to evaluate the effects on the immune system, as its inclusion could modify the resistance to pathogens. In the present work, we have studied the response of the immune system at lysozyme expression level, cellular immune response genes, and inflammatory response genes in mucous of skin and sole gills (*Solea senegalensis*) fed with a diet supplemented in *Ulva ohnoi* (5%). Results obtained indicate absence of significant changes in the expression of assayed immune genes.

Resumen

En la búsqueda de la mejora de la alimentación de los peces en la acuicultura, las algas se presentan como una prometedora fuente de nutrientes y sustancias bioactivas. En el caso del género *Ulva*, se ha publicado el efecto de su inclusión en piensos sobre el crecimiento, la composición de los tejidos y la respuesta al estrés de algunas especies de interés acuícola. Sin embargo, es necesario evaluar los efectos en el sistema inmune, puesto que su inclusión podría modificar la resistencia a patógenos. En el presente trabajo se ha estudiado la respuesta del sistema inmune a nivel de expresión de lisozimas, genes de respuesta inmune celular, y genes de la respuesta inflamatoria en piel y branquias de lenguados (*Solea senegalensis*) alimentados con una dieta suplementada en *Ulva ohnoi* (5%). Los resultados indican que no se produce un cambio significativo en la expresión de estos grupos de genes.

Justificación

La acuicultura representa el 50% del pescado destinado a la alimentación nivel mundial y es, probablemente, el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento. El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es un pez plano con un gran potencial para la acuicultura marina debido a su alto valor de mercado y la demanda del consumidor. No obstante, todavía hay cuestiones sin resolver con respecto a la nutrición de esta especie en condiciones de cultivo (Morais et al., 2016).

En los últimos años, las algas están siendo consideradas como fuentes potenciales de ingredientes dietéticos para los alimentos acuícolas. Entre ellas, las especies de *Ulva* son una buena fuente de proteínas, minerales y vitaminas (Mustafa y Nakagawa, 1995). Además, se han descrito beneficios como mejora del crecimiento, eficiencia de la alimentación, utilización de nutrientes y resistencia a enfermedades en varias especies de peces cuando se añaden en bajos porcentajes a la harina de pescado (Norambuena et al., 2015; Moutinho et al., 2018). El sistema inmune a nivel de mucosas ejerce un importante papel en la resistencia a infecciones, previniendo la adhesión del patógeno con la secreción de mucus y contribuyendo a la protección con los péptidos antimicrobianos, proteínas del complemento e inmunoglobulinas. Las funciones de las células presentadoras de antígenos en los órganos de la mucosa son debidas, en parte, a una amplia gama de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas presentes en órganos como piel, branquias e intestino (Munnig'andu et al., 2015). Este trabajo se centra en el estudio de la respuesta inmune a nivel de mucosas (piel y branquias) de *S. senegalensis* tras la incorporación del alga *Ulva ohnoi* (5%) en la dieta.

Material y métodos

El alga *U. ohnoi* (cepa Hiraoka y Shimada UOHN120810) se cultivó y liofilizó antes de su incorporación en la dieta experimental. Los ejemplares de *S. senegalensis* (10,7±2,9 g) se alimentaron con dos dietas experimentales: dieta de control (dieta C) y dieta conteniendo *U. ohnoi* (dieta Ulva) a una tasa del 2% de su peso corporal. La dieta Ulva incluyó un 5% de biomasa de *U. ohnoi* seca; y como dieta control se usó la misma dieta libre de algas. Tras 45 y 90 d de alimentación, los peces se mantuvieron en ayunas (24 h), para su posterior eutanasia con aceite de clavo (200 ppm). Se extrajeron asépticamente muestras de piel y branquias de seis peces por dieta (2 por tanque) y se almacenaron en Trisure, -80°C, hasta su análisis.

Tras la extracción del ARN de piel y branquias, se realizó la transcripción inversa ajustando a 1 µg de ARN total. Se emplearon cebadores específicos para la cuantificación de la expresión relativa de los genes implicados en las siguientes actividades del sistema inmune: lisozimas (LysC y LysG), componentes de la

respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-6, IL-8, IL1B, IL-10 y TGF- β) y respuesta celular (MHCI, MHCII, CD4, CD8 y CD36). Para la normalización, las muestras de piel se analizaron en paralelo con dos genes de referencia, beta-actina (ACTB2) y proteínas ribosomales S4 (RPS4), y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH1) y RPS4 para muestras de branquias. Valores de amplificación umbral (Cq) superiores a 40 ($Cq \geq 40$) se consideraron negativos. La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak y Schmittgen, 2001), normalizando con un promedio geométrico de los dos genes de referencia y en relación con los peces de cada grupo de control.

Resultados y discusión

Tras el análisis de la expresión génica, no se observaron cambios significativos en la expresión de los genes de inmunidad relacionados con la actividad lisozima, respuesta inflamatoria o respuesta celular analizados, exceptuando la citoquina IL8b que aumentó sus niveles de expresión en muestras de piel tras 90 días de alimentación con el alga (Tabla 1). No obstante, estos resultados podrían indicar que la incorporación de *U. ohnoi* a la dieta de *S. senegalensis*, no estaría produciendo un efecto de inmunosupresión a nivel de la piel y branquias.

Tabla1. Niveles de transcripción, normalizados con genes *rps4*, *actb2* y *gadph*, y relativos a los peces control para genes relacionados con actividad lisozima, respuesta inflamatoria y respuesta celular en piel y branquias tras 45d y 90d de alimentación con una dieta conteniendo *U. ohnoi* (5%).

		Lisozimas		Respuesta inflamatoria					Respuesta celular						
		<i>lysc</i>	<i>lysg</i>	<i>tnf-α</i>	<i>il-6</i>	<i>il-8b</i>	<i>il-1β</i>	<i>il-10</i>	<i>tgf-β</i>	<i>mchI</i>	<i>mhcII</i>	<i>cd4</i>	<i>cd8</i>	<i>cd36</i>	
Branquias	45d	Media	0,79	1,83	1,43	1,83	2,16	1,71	-	1,71	3,21	1,34	1,09	1,11	1,30
		Desv	0,17	0,49	0,24	0,75	0,86	0,47	-	0,12	1,81	0,39	0,21	0,17	0,42
	90d	Media	1,37	1,93	1,89	1,10	1,09	1,22	-	0,72	1,86	1,06	1,81	2,18	2,13
		Desv	0,33	0,45	1,03	0,27	0,06	0,35	-	0,14	0,63	0,28	0,66	0,85	0,71
Piel	45d	Media	0,93	0,74	0,67	0,90	0,40	0,96	-	0,93	0,75	1,06	1,28	2,20	1,55
		Desv	0,43	0,06	0,12	0,20	0,09	0,13	-	0,04	0,08	0,09	0,30	0,50	0,29
	90d	Media	1,26	1,89	1,48	2,10	2,27*	1,66	1,95	2,97	1,54	1,50	1,44	1,55	0,94
		Desv	0,45	0,32	0,16	0,33	0,52	0,21	0,38	0,62	0,18	0,20	0,31	0,38	0,24

Los resultados obtenidos no muestran cambios en la respuesta inmune de mucosas de piel y branquias tras la alimentación con *U. ohnoi*; sin embargo, no permiten descartar efectos a nivel de la mucosa intestinal. La ausencia de cambios en los niveles de transcripción en piel y branquias podría deberse al modo de administración del alga (asociada al pienso y por vía oral), así como a la dosis utilizada (5% en pienso). Por último, la presencia de células presentadoras de antígenos en las mucosas de los peces, así como su capacidad de activar el sistema inmune adaptativo (Munnig'andu, et al., 2015), sugieren la necesidad del estudio de otros componentes implicados en la inmunidad como las inmunoglobulinas y los receptores TLR, esenciales en la protección frente a patógenos.

Bibliografía

1. Mustafa, M.G. y Nakagawa, H. (1995), A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. Israel Journal of Aquaculture-Bamid 47:155-162.
2. Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. Methods 25: 402-408
3. Morais, S., C. Aragao, E. Cabrita, L.E.C. Conceicao, M. Constenla, B. Costas, J. Dias, N. Duncan, S. Engrola, A. Estevez, E. Gisbert, M. Yúfera y M.T. Dinis. 2016. New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. Reviews Aquaculture 8: 227-263.
4. Moutinho, S., F. Linares, J.L. Rodríguez, V. Sousa y L.M.P: Valente. 2018. Inclusion of 10% seaweed meal in diets for juvenile and on-growing life stages of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Journal of Applied Phycology 30: 3589-3601.
5. Munnig'andu, H M., S. Mutoloki. y O. Evensen. 2015. A review of the immunological mechanisms following mucosal vaccination of finfish. Frontiers Immunology 6: 1-11.

6. Norambuena, F., K. Hermon, V. Skrzypczyk., J.A. Emery, Y. Sharon, A. Beard y G.M. Turchini. 2015. Algae in fish feed: performances and fatty acid metabolism in juvenile Atlantic salmon. PLoS ONE, 10(4), 1-17.

Agradecimientos: los autores agradecen la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA) y FEDER (Ref. RTA2014 00023 C0202)