

LA INCLUSIÓN DE ACEITES VEGETALES EN EL PIENSO: EFECTO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS DEL SISTEMA INMUNE DE JUVENILES DE DORADA (*SPARUS AURATA*, L.)

La escasa disponibilidad y el alto coste del aceite de pescado han impulsado a los científicos a buscar fuentes alternativas a este recurso, como por ejemplo los aceites vegetales. En este estudio hemos evaluado el efecto de dos diferentes fuentes lipídicas vegetales (lino y soja) sobre el estado de salud de la dorada.

V. Grasso
D. Montero
F. Acosta

Los resultados indicaron que tanto una elevada (70%) como la total (100%) sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de juveniles de dorada influyen negativamente en el crecimiento y conversión del alimento. Todas las dietas, con excepción de la del 70% de sustitución, presentaron un menor crecimiento y un peso final significativamente menor ($p < 0,05$) que el control. La composición lipídica dietética se reflejó en los ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior, aunque se observó una incorporación selectiva de ARA y EPA. La expresión de Mx en respuesta a ambos estímulos (bacteria y Poli I: C) fue homogénea en todos los grupos, pero los niveles basales fueron más altos en los peces alimentados con dieta vegetal. Este resultado podría indicar un posible efecto beneficioso de los lípidos vegetales sobre el sistema inmune de los peces.

Relative poor availability and high cost of fish oil induce the scientists to evaluate the use of alternative lipid sources, such as vegetable oils, in aquaculture. In this study we evaluate the effect of two vegetable oils (linseed and soybean) on gilt-head sea bream health.

The present results suggest that the high (70%) or total (100%) substitution of fish oil for vegetable oils affects growth and feed utilization in gilthead sea bream juveniles. All diets, except for the 70% substitution, present a minor growth with a final body weight significantly lower ($p < 0.05$) than control. Dietary lipid composition was reflected in the fat acids composition of head kidney macrophages; however, a selective incorporation of ARA and EPA was observed. Mx expression in response by both stimuli (bacteria and Poli I: C) was homogeneous in all groups but the basal levels were higher in fishes fed with vegetable diets. This result may suggests a possible beneficial effect of vegetable lipids on fish Interferon system.

PRESENTACIÓN

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.

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

Los aceites vegetales parecen ser los candidatos ideales para sustituir parcialmente el aceite de pescado en la formulación de dietas para peces

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 desarrollan 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, pues los lípidos contenidos en las semillas de muchas plantas contienen una discreta cantidad de ácidos grasos insaturados. 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%).

El aceite de lino se presenta como el mejor candidato para sustituir parcialmente el aceite de pescado como fuente lipídica, ya que, entre todos los aceites vegetales, parece ser el que menos afecta al 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 de 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

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.

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.

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).

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

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.

Muestreo del riñón anterior:

Para el estudio de la capacidad fagocítica 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 essential medium). Finalmente se pasó a filtrar el tejido para el análisis de la capacidad fagocítica que se llevó a cabo según cuanto descrito por Siwiki *et al.* (1993).

Métodos analíticos de composición:

El análisis de la composición de ácidos grasos de las diferentes dietas se llevó a cabo según el método descrito por Folch *et al.* (1957). Se procedió a la transesterificación según 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° para que se produjera la reacción. Sucesivamente se separaron las dos fases utilizando una mezcla de hexano: éter etílico (1:1) y centrifugando a 2000 rpm durante 5 min en 2 fases.

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

RESULTADOS EXPERIMENTO 1

Resultados de crecimiento

En la Fig.1 (pág. siguiente) 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. 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.

Composición de ácidos grasos de las dietas

La Tabla 1 muestra el perfil de ácidos grasos de las diferentes dietas experimentales. En el caso de la dieta control se nota como los ácidos grasos predominantes son los saturados mirístico (14:0) y palmítico (16:0) y los n-3 EPA y DHA procedentes del aceite de pescado. La dieta 100% aceite de pescado presentó también discretas cantidades de ácido oleico (OA) y linoleico (LA) mientras que las concentraciones de linolenico (LNA)

En las dietas vegetales se notó un considerable aumento de las concentraciones de ácido oleico, linoléico y una disminución de los ácidos grasos ARA, DHA y EPA

y araquidónico (ARA) se mantuvieron bajas.

En las dietas vegetales se notó un considerable aumento de las concentraciones de ácido oleico, linoléico 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 LNA, mientras que las dietas 100% soja y la mezcla 50 L/50 S tenían las concentraciones más altas de ácido LA y oleico OA respectivamente.

Composición de los ácidos grasos de los macrófagos

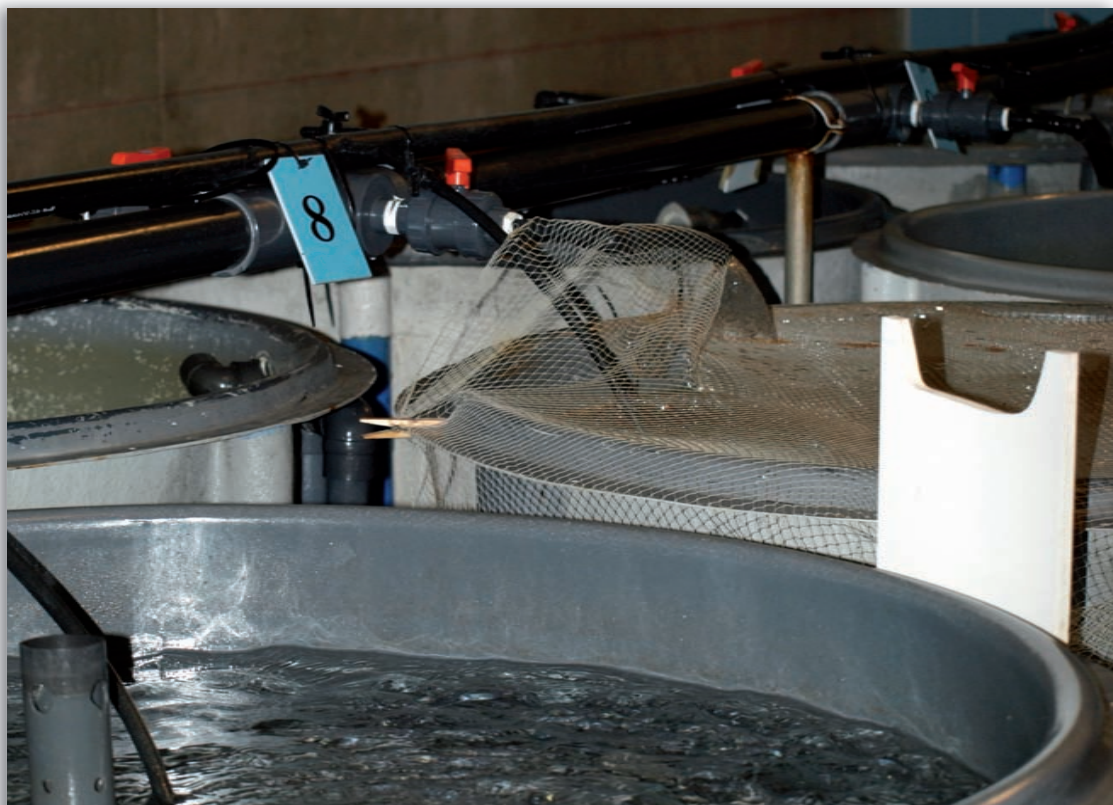
En la tabla 2 se expresan las concentraciones de los ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior. Éstos presentaron en todas las dietas valores elevados de ácidos grasos saturados, sobre todo 16:0 (ácido palmítico) y 18:0.

Las concentraciones de ácidos grasos EPA, DHA, ARA, oleico y linoleico 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. En lo que se refiere al ácido graso linolenico este se presentó en grandes cantidades en los macrófagos de las dietas 70 L (12,827) y 100 L (18,697), mientras que en los macrófagos del control su concentración fue muy baja (0,4).

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

Actividad fagocítica

La Tabla 3 muestra los resultados de la actividad fagocítica de los macrófagos de las diferentes dietas experimentales. Dicha actividad se calculó como porcentaje de células que presentaban vacuolas en el citoplasma.



Tanques experimentales

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
16:0 iso	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
n-3/n-6	4,6	2,42	2,85	0,26	0,73

Tabla 1

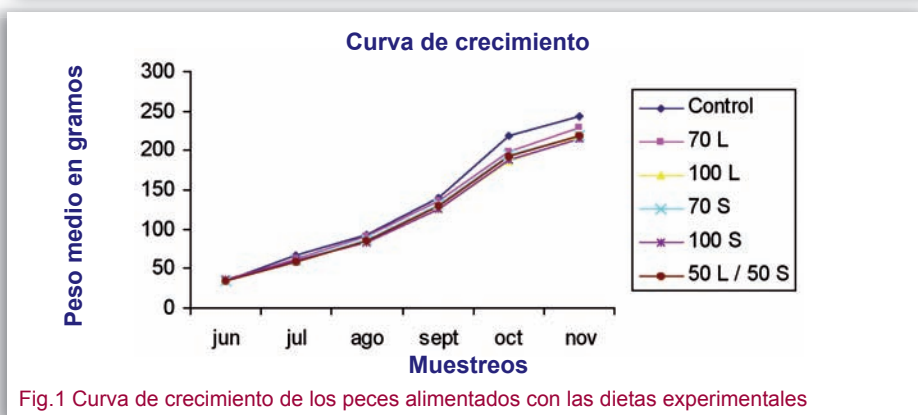
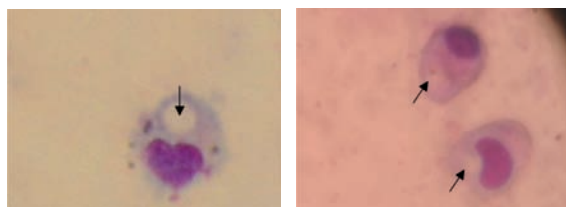


Fig.1 Curva de crecimiento de los peces alimentados con las dietas experimentales

Fig. 2. Macrófagos con varias vacuolas (la flecha (→) indica vacuolas citoplasmática)



Ac. grasos	Control	70L	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
n-3/n-6	2,18	2,06	1,81

Tabla 2

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

Tabla 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 2

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. 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 fueron 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).

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.

Una vez aclimatados se procedió a inocular intraperitonealmente 12 peces por dieta con una suspensión de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* y la otra mitad con el dsRNA sintético ácido polyinosinico polycytidylico (Poly I:C) según como lo describe 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 bacteriana fue calculada a través de un espectrofotómetro Biophotometer eppendorf que midió la absorción a 600 nm (a valores de absorción iguales a 0.073 correspondían 10^3 ufc/ml.) La dosis de Poly I:C inoculada fue de 500 μ g/pez que se diluyó en un volumen de 1 ml.

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 μ l 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.

Extracción ARN:

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

c-DNA:

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

PCR:

Se efectuaron dos PCR, una para la β actina y otra para el gen Mx. Las

mezclas utilizadas fueron las mismas con la única diferencia en los primers utilizados. Se corrieron las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

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

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% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Expresión génica de la proteína Mx

En las Fig. 4 a 7 se muestra la cinética de la expresión del gen Mx en las diferentes dietas experimentales.

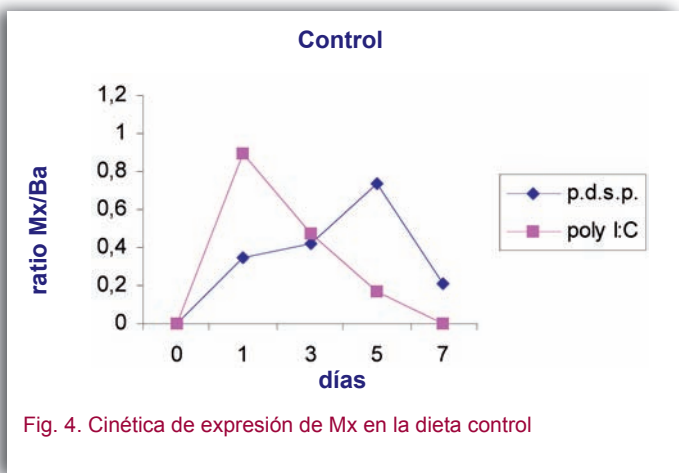


Fig. 4. Cinética de expresión de Mx en la dieta control

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

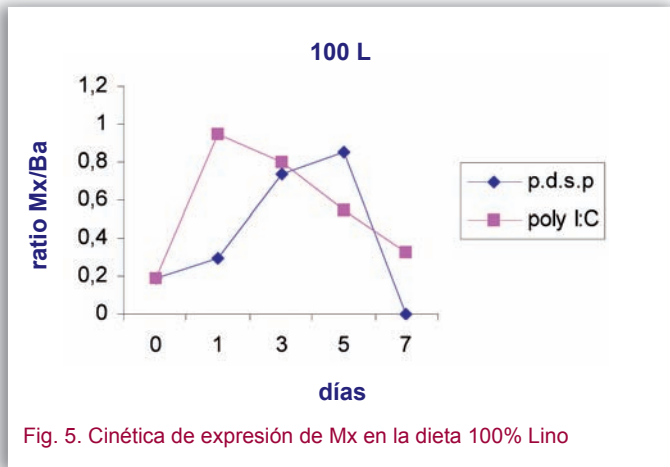


Fig. 5. Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% Lino

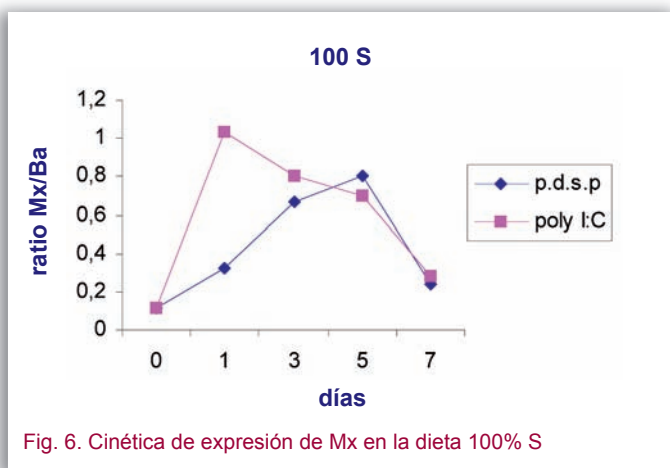


Fig. 6. Cinética de expresión de Mx en la dieta 100% S

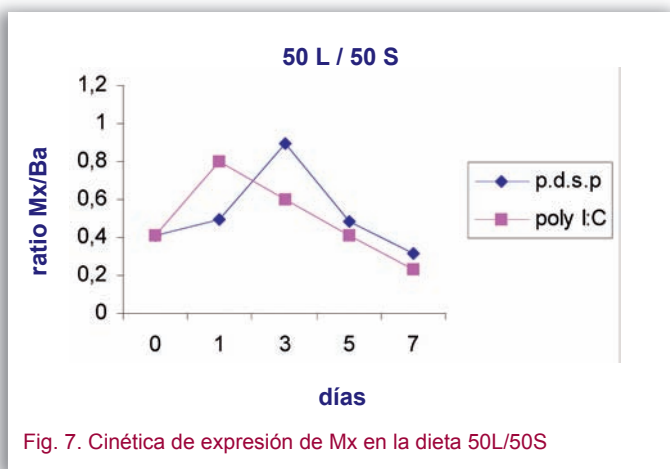


Fig. 7. Cinética de expresión de Mx en la dieta 50L/50S

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/ba también resultaron muy parecidos entre dietas.

El control presentó un pico al día uno seguido por un rápido descenso hasta alcanzar ratios iguales a cero 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 de que el pico de producción fue más elevado en la dieta vegetal con valores de ratio Mx/ba al día 1 iguales a 1,03 (0,9 en la dieta control).

En el caso de la respuesta bajo estímulo *Photobacterium damsela*, subespecie *piscicida* la cinética de expresión génica, ésta 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 sí.

Analizando el incremento de la tasa Mx/ba 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

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 al crecimiento de juveniles de dorada. Al contrario la sustitución de un 70% de aceite de pescado por aceites vegetales no afectó al crecimiento.

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).

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.

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 5) 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 ce-

El perfil de ácidos grasos de los macrófagos del riñón anterior reflejó la composición bioquímica de las dietas experimentales

Peces alimentados con aceite de lino aumentan los niveles de estos ácidos grasos en los fosfolípidos de membranas de las células

lular permeabilidad y flexibilidad, esta última característica es de fundamental importancia para una correcta fagocitosis.

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.

Tras la inoculación del inmunestimulante 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 respondieron 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 linoleico (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 linoleico 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 concordó 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 a la 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 sino también a un control más exhaustivo de las enfermedades virales en acuicultura.

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, lipopolysaccharide 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. Advoca - de* 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 J.G., Ashton I, Secombes C.J., Weitzel B.R., Dick J.R., Sargent J.R. (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., Kjørvik E., Montero D., Socorro J., Fernandez A.J., Rosenlund G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225(2003) 325-340.

Caballero M.J., Obach A., Rosenlund G., Montero D., 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, *Oncorhynchus 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 gilt-

head seabream (*Sparus aurata*) *Comparative 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, Kamino-gawa, 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 punctatus*. *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 dou-

ble-stranded RNA of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 20: 701-710.

Kanazawa, A. (1985). Essential 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, *Paralichthys 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.* 2004 May; 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 vegetable oils: A time-course study on the effect of re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248 (2005): 121-134.

Mourete 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 E₂ and F_{2α}, 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.

Siwika A., Anderson D and Antychowicz J. (1993). Nonspecific defen-

ce 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 (*Oncorhynchus 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 immune system: Humoral defence. En: *the Fish Immune System: Organism, Pathogen 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.

BIOGRAFÍA

VALENTINA GRASSO

Licencia en Medicina Veterinaria en el año 2003 por la Universidad de Messina (Italia), obtuvo la calificación *cum laude* presentando una tesis experimental sobre el control sanitario de los mariscos. En el año 2004 trabajó en el CNR (Nacional Research Council), en Italia, donde llevó a cabo distintos proyectos de investigación en Acuicultura. En 2006 consigue el título de Especialista Universitario y Máster en Acuicultura otorgado por la ULPGC (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria), el CIHEAM (Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos del Mediterráneo) y el ICCM Instituto Canario de Ciencias Marinas. Además de su experiencia profesional, ha realizado diversos estudios sobre el sistema inmune de la dorada de cultivo, los cuales han sido publicados en revistas científicas de alto impacto y ha participado en simposios internacionales. En la actualidad está cursando el segundo año de doctorado en Sanidad Animal y desarrollando una tesis sobre vacunas para dorada de acuicultura bajo la supervisión del Dr. D. Félix Acosta.

valegra2002@yahoo.it

Patrocinador de esta investigación:

MEDIFONSA Y VIDRIERAS CANARIAS