

**UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**NUEVOS PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS PARA
DORADA (*SPARUS AURATA* L.).**

Rebeca Cerezuela Cabrera

2012

ÍNDICE

I. RESUMEN	11
II. INTRODUCCIÓN.....	19
III. OBJETIVOS.....	23
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	27
1. Sistema inmunitario de teleósteos	29
<i>1.1. Órganos y tejidos implicados en la inmunidad.....</i>	<i>30</i>
<i>1.2. Respuesta inmunitaria.....</i>	<i>31</i>
<i>1.3. La barrera epitelial intestinal y la inmunidad de la mucosa.....</i>	<i>36</i>
2. Inmunoestimulación en peces.....	38
<i>2.1. Definición y efectos.....</i>	<i>39</i>
<i>2.2. Empleo de inmunoestimulantes en acuicultura</i>	<i>40</i>
3. Probióticos y prebióticos.....	44
<i>3.1. Definición y propiedades</i>	<i>45</i>
<i>3.2. Empleo de probióticos y prebióticos en acuicultura</i>	<i>50</i>
V. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Peces	59
2. Bacterias	59
3. Preparación de dietas.....	60
4. Obtención de muestras	60
5. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en presencia de inulina y microalgas.....	61
6. Sistema inmunitario	62
<i>6.1. Actividad hemolítica del complemento.....</i>	<i>62</i>
<i>6.2. Niveles de IgM en suero.....</i>	<i>63</i>
<i>6.3. Explosión respiratoria.....</i>	<i>64</i>
<i>6.4. Actividad peroxidasa.....</i>	<i>65</i>
<i>6.5. Fagocitosis.....</i>	<i>65</i>
7. Estudio microscópico	66

7.1. Óptico.....	66
7.2. Electrónico.....	67
7.3. Examen histológico y morfométrico.....	67
8. Infecciones experimentales.....	68
9. Microflora intestinal.....	69
9.1. Extracción del DNA.....	69
9.2. Amplificación y análisis por DGGE.....	70
9.3. Análisis de los patrones de DGGE.....	70
10. Expresión de genes.....	71
11. Análisis estadístico.....	74
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
<u>CAPÍTULO 1: Administración de inulina en dieta.....</u>	<u>77</u>
1. Introducción.....	77
2. Objetivos.....	79
3. Hipótesis de trabajo.....	79
4. Diseño experimental.....	79
5. Resultados.....	81
6. Discusión.....	83
<u>CAPÍTULO 2: Administración de microalgas en dieta.....</u>	<u>85</u>
1. Introducción.....	85
2. Objetivos.....	87
3. Hipótesis de trabajo.....	88
4. Diseño experimental.....	88
5. Resultados.....	89
5.1. Parámetros del sistema inmunitario.....	89
5.2. Expresión de genes.....	92
6. Discusión.....	94
<u>CAPÍTULO 3: Administración de inulina y <i>Bacillus subtilis</i> en dieta.....</u>	<u>97</u>
1. Introducción.....	97
2. Objetivos.....	99
3. Hipótesis de trabajo.....	99

4. Diseño experimental	99
5. Resultados.....	101
5.1. <i>Crecimiento de B. subtilis en presencia de inulina.....</i>	101
5.2. <i>Parámetros del sistema inmunitario</i>	101
5.3. <i>Estudio microscópico.....</i>	104
5.4. <i>Microflora intestinal.....</i>	109
5.5. <i>Expresión de genes.....</i>	110
5.6. <i>Infección experimental.....</i>	112
6. Discusión	113
<u>CAPÍTULO 4: Administración de microalgas y <i>Bacillus subtilis</i> en dieta.....</u>	<u>121</u>
1. Introducción.....	121
2. Objetivos	121
3. Hipótesis de trabajo	121
4. Diseño experimental	122
5. Resultados.....	123
5.1. <i>Crecimiento de B. subtilis en presencia de microalgas.....</i>	123
5.2. <i>Parámetros del sistema inmunitario</i>	124
5.3. <i>Estudio microscópico.....</i>	125
5.4. <i>Microflora intestinal.....</i>	130
5.5. <i>Expresión de genes.....</i>	132
5.6. <i>Infección experimental.....</i>	134
6. Discusión	135
<u>CAPÍTULO 5: Efectos de la inulina, <i>P. tricornutum</i>, <i>T. chuii</i> y <i>B. subtilis</i> sobre la expresión de genes en el intestino de dorada.....</u>	<u>143</u>
1. Introducción.....	143
2. Objetivos	143
3. Hipótesis de trabajo	143
4. Diseño experimental	143
5. Resultados.....	144
6. Discusión	148

VII. RESULTADOS GLOBALES.....	153
VIII. CONCLUSIONES	161
IX. ABSTRACT	165
X. CONCLUSIONS	173
XI. ANEXOS	177
Anexo 1. <u>Curvas de crecimiento <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Photobacterium damsela</i></u>.....	179
1. Introducción.....	179
2. Procedimiento	180
3. Resultados.....	182
Anexo 2. <u>Determinación DL50 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i></u>.....	185
1. Introducción.....	185
2. Diseño experimental	185
3. Procedimiento y resultados.....	185
XII. BIBLIOGRAFÍA	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de los inmunoestimulantes.....	40
Figura 2. Esquema del diseño experimental planificado para los experimentos 1 y 2 del capítulo 1.....	80
Figura 3. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con distintas concentraciones de inulina	82
Figura 4. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con distintas concentraciones de inulina	83
Figura 5. Esquema del diseño experimental planificado para el capítulo 2.....	89
Figura 6. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas.....	91
Figura 7. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas	93
Figura 8. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas.....	94
Figura 9. Diseño experimental planteado para los dos experimentos del capítulo 3.....	100
Figura 10. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en PBS estéril suplementado con glucosa o inulina	101
Figura 11. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con inulina y/o <i>B. subtilis</i>	103
Figura 12. Histología comparativa (tinción PAS) del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas experimentales.....	105
Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas experimentales	107
Figura 14. Análisis de agrupamientos basados en el índice de similitud de los patrones de PCR-DGGE.....	110
Figura 15. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con las dietas experimentales	111
Figura 16. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales	112
Figura 17. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las doradas alimentadas con las dietas experimentales C, I, B y BI durante la infección experimental con <i>P. damselae</i> subsp <i>piscicida</i>	113
Figura 18. Mortalidad acumulada (%) en los grupos experimentales C, I, B y BI.....	113

Figura 19. Diseño experimental planteado para los dos experimentos del capítulo 4	123
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> en PBS estéril suplementado con glucosa o los productos de digestión de <i>T. chuii</i> o <i>P. tricornutum</i>	124
Figura 21. Histología comparativa del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas experimentales C, T, P, B, BT y BP.....	126
Figura 22. Micrografías electrónicas de transmisión del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas C, T, P, B, BT y BP.....	128
Figura 23. Análisis de agrupaciones basados en el índice de similitud de los patrones de PCR-DGGE obtenidos con las dietas C, T, P, B, BT y BP.....	132
Figura 24. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con las dietas experimentales T, P, B, BT y BP.....	133
Figura 25. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales T, P, B, BT y BP.....	134
Figura 26. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las doradas alimentadas con las dietas C, T, P, B, BT y BP durante la infección experimental con <i>P. damselae</i> subsp <i>piscicida</i>	135
Figura 27. Expresión de genes en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales I, B y BI	145
Figura 28. Expresión de genes en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales T, P, B, BT y BP.....	147
Figura 29. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana en cultivo líquido.....	180
Figura 30. Curvas de crecimiento de <i>B. subtilis</i>	182
Figura 31. Curvas de crecimiento de <i>P. damselae</i>	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inmunoestimulantes más relevantes estudiados en peces	42
Tabla 2. Estudios recientes, ordenados cronológicamente, sobre inmunoestimulantes en peces	44
Tabla 3. Características deseables y criterios de seguridad de los probióticos	47
Tabla 4. Probióticos estudiados para su aplicación en alimentación animal.....	48
Tabla 5. Funciones intestinales atribuidas a los prebióticos.....	49
Tabla 6. Estudios recientes (ordenados cronológicamente) sobre probióticos, prebióticos y simbióticos en peces.....	55
Tabla 7. Cebadores empleados para la PCR a tiempo real en la presente Tesis Doctoral.....	73
Tabla 8. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre los efectos de la inulina en peces ordenados cronológicamente.....	78
Tabla 9. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre administración de algas (micro y macroalgas) en peces	87
Tabla 10. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre la administración de <i>B. subtilis</i> en peces.....	98
Tabla 11. Medidas intestinales de ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales C, I, B y BI.....	108
Tabla 12. Resultados histológicos para el intestino anterior de peces alimentados con las dietas experimentales C, I, B y BI.....	109
Tabla 13. Valores de riqueza específica (R), índice de Shannon (H') y habitabilidad (Rr) obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de intestinos de doradas alimentadas con las dietas experimentales C, I, B y BI.....	110
Tabla 14. Medidas intestinales de ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales C, T, P, B, BT y BP.....	129
Tabla 15. Resultados histológicos para el intestino anterior de peces alimentados con las dietas experimentales C, T, P, B, BT y BP.....	130
Tabla 16. Valores de riqueza específica (R), índice de Shannon (H') y habitabilidad (Rr) obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de intestinos de doradas alimentadas con las dietas experimentales C, T, P, B, BT y BP.....	131
Tabla 17. Suplementos adicionados al pienso comercial (Skretting, Burgos) para obtener las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.....	155

Tabla 18. Parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante dos semanas	156
Tabla 19. Parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante cuatro semanas.....	157
Tabla 20. Parámetros intestinales de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante cuatro semanas.....	157
Tabla 21. Resultados histológicos (en intestino anterior) e índices de la microflora intestinal de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales	158
Tabla 22. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales	158
Tabla 23. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales	159
Tabla 24. Expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias en intestino de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales.....	159
Tabla 25. Expresión de genes que codifican proteínas del citoesqueleto, de unión, enzimas digestivas y proteínas de transporte en intestino de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales	160
Tabla 26. Tiempos de incubación y diluciones que se sembraron en cada caso para determinar las curvas de crecimiento de <i>B. subtilis</i> y <i>P. damselae</i>	181
Tabla 27. Mortalidades observadas en doradas durante los seis días posteriores a la infección por inyección intraperitoneal con <i>P. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	186
Tabla 28. Cálculo del porcentaje de infectividad de <i>P. damselae</i> para cada una de las dosis administradas en la segunda infección experimental.....	186

I. RESUMEN

La acuicultura es el sector productivo de la alimentación que más rápidamente crece en el mundo. Debido a ello, durante los últimos 30 años se han dedicado muchos esfuerzos a mejorar la eficiencia del crecimiento de los peces mediante la manipulación de las dietas (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012). En la actualidad, la optimización de las dietas y el control de las enfermedades son dos objetivos principales para garantizar la continua expansión de la acuicultura. Una nueva área de gran interés para mejorar la eficiencia del crecimiento y prevenir y/o controlar las enfermedades de peces es la aplicación de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes como aditivos en la dieta, constituyendo una alternativa muy prometedora al uso de antibióticos (Magnadóttir, 2010; Dimitroglou y col., 2011). La optimización de las dietas incluye el uso de fuentes vegetales de proteínas tales como soja u otras plantas (Kumar y col., 2011; Lech y Reigh, 2012). Según la bibliografía consultada, la sustitución de la proteína de pescado por proteínas de microalgas en las dietas de peces no se ha investigado todavía.

La información existente del efecto de la inulina (un prebiótico) sobre el sistema inmunitario de los peces es todavía muy escasa (Ringø y col., 2010) y los datos respecto a la microflora intestinal demuestran que se altera tras la alimentación con inulina (Mahious y col., 2006; Ringø y col., 2006). Entre los probióticos, se ha demostrado que *Bacillus subtilis*, cuando se utiliza como suplemento en las dietas de peces, tiene diferentes propiedades beneficiosas (Salinas y col., 2005, 2008; Nayak y col., 2007; Newaj-Fyzul y col. 2007; Aly y col., 2008a; Kumar y col., 2008). Por otra parte, las microalgas han emergido como una interesante fuente natural de nuevos compuestos con actividad biológica que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales en las dietas de peces (Plaza y col., 2009, 2010; Christaki y col., 2011; Guedes y col., 2011).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto potencial *in vivo* de la administración en dieta de inulina, microalgas y *B. subtilis*, combinados o por separado, sobre diferentes parámetros de la respuesta inmunitaria de la dorada (*Sparus aurata*), la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino, y la protección conferida frente a una infección experimental con *P. damselae* subsp. *piscicida*. Al mismo tiempo, se evaluaron también los efectos sobre la morfología y la microflora intestinal y la expresión intestinal de genes de proteínas proinflamatorias, del citoesqueleto, de uniones estrechas, de proteínas digestivas y de otras implicadas en el transporte.

Los diferentes experimentos realizados para llevar a cabo este gran objetivo han sido organizados en cinco capítulos en la presente Tesis Doctoral. En el primer capítulo, se estudia la administración oral de diferentes concentraciones de inulina (0 (control), 5, 10, 15 y 30 g/kg)

para determinar así el tiempo y la concentración óptima para estimular el sistema inmunitario de la dorada. Al finalizar el tratamiento (una, dos y cuatro semanas), los peces fueron muestreados y se determinaron varios parámetros inmunitarios. La inulina produjo una inhibición significativa de la fagocitosis y de la explosión respiratoria de los leucocitos de peces alimentados con 5 o 10 g/kg de inulina durante una semana. Sin embargo, en peces alimentados con 10 g/kg de inulina durante dos y cuatro semanas, se observó un aumento significativo del complemento y de la fagocitosis. Por otra parte, la dieta suplementada con 30 g/kg de inulina solo aumentó significativamente la capacidad fagocítica, mientras que la administración de 15 g/kg de inulina no tuvo efectos sobre las actividades estudiadas.

En el segundo capítulo, se evaluaron los efectos de la administración oral de tres microalgas (*Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chunii* y *Phaeodactylum tricornutum*). Los peces fueron alimentados con la dieta control (sin suplementar) o una de las seis dietas experimentales (*N. gaditana*, *T. chunii* o *P. tricornutum* a dos concentraciones, 50 y 100 g/kg pienso) y muestreados tras dos y cuatro semanas de tratamiento. Al final del experimento, se midieron diferentes actividades del sistema inmunitario (actividad hemolítica del complemento, niveles de IgM en suero, fagocitosis, actividad peroxidasa y explosión respiratoria). Además, fueron analizados en riñón cefálico e intestino los niveles de expresión de diferentes genes del sistema inmunitario (EF-1 α , IgM_H, TCR- β , MHC I α , MHC II α , CSF-1R y β -defensina). La administración de *N. gaditana* y *T. chunii* produjo un incremento significativo en la actividad hemolítica el complemento y en la capacidad fagocítica, así como sobre la expresión de β -defensina y MHC II α y CSF-1R respectivamente. La dieta suplementada con *P. tricornutum* produjo también inmunoestimulación, mientras que se observó un efecto muy poco marcado sobre la expresión de genes. Estos resultados sugieren que las microalgas en dieta incrementan la actividad defensiva de la dorada, lo que puede ser muy importante a la hora de considerar estas microalgas como posibles aditivos en las dietas de peces. El presente trabajo constituye el primer estudio que evalúa la capacidad inmunomoduladora de las microalgas *N. gaditana*, *T. chunii* y *P. tricornutum*.

En el tercer capítulo, se evaluaron los efectos de la inulina y *B. subtilis*, por separado o combinados, sobre los parámetros inmunitarios, la expresión de genes (relacionados con el sistema inmunitario), la protección frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y la morfología y microflora intestinal de la dorada. Con el objetivo de comprobar la capacidad de *B. subtilis* de crecer empleando la inulina como fuente de carbono y energía, se diseñó un experimento *in vitro* en el que se demostró que este carbohidrato soporta el crecimiento de *B. subtilis* de manera similar a la glucosa. Para el experimento *in vivo*, los peces se distribuyeron en

cuatro grupos iguales: control (dieta no suplementada), inulina (10 g/kg), *B. subtilis* (10^7 ufc/g) e inulina+*B. subtilis* (10 g/kg y 10^7 ufc/g respectivamente). La administración de inulina o *B. subtilis* durante dos semanas estimuló la actividad del complemento y los niveles de IgM en el suero, así como la actividad fagocítica de los leucocitos. Cuando la inulina y *B. subtilis* se administraron juntos (como un simbiótico) solo el complemento y el nivel de IgM mostraron un aumento significativo. Además, la actividad del complemento mostró un incremento significativo en los peces alimentados con las dietas experimentales durante cuatro semanas. La expresión de genes en el riñón cefálico de la dorada no se vio afectada significativamente por las dietas ensayadas. Sin embargo, en el intestino, aumentó significativamente la expresión de ciertos genes. La infección experimental mostró que los peces alimentados con inulina o con la dieta simbiótica presentaron una mortalidad acumulada menor y mayor respectivamente comparados con el grupo control, aunque las diferencias solo fueron significativas en el segundo caso. Cabe destacar que los peces alimentados con las dietas experimentales (inulina, *B. subtilis*, o *B. subtilis*+inulina) mostraron las mismas alteraciones morfológicas cuando se estudiaron mediante microscopía óptica y electrónica, mientras que el estudio morfométrico permitió detectar diferencias significativas en los signos de daño intestinal. Las alteraciones se observaron en la mucosa intestinal, mientras que el estudio morfométrico reveló que la inulina y *B. subtilis* no tuvieron efecto sobre el área de absorción del intestino. Además, las dietas experimentales causaron importantes alteraciones en la microflora intestinal, disminuyendo significativamente la diversidad bacteriana, como demostraron los índices de riqueza específica y de Shannon y la habitabilidad. Las alteraciones observadas demostraron que los peces alimentados con las dietas experimentales presentaron diferentes signos de edema e inflamación intestinal que pueden comprometer la homeostasis corporal, que se mantiene principalmente por el revestimiento epitelial del tracto digestivo. Estos resultados sugieren que la inulina y *B. subtilis* modulan la respuesta inmunitaria de la dorada, aunque la administración combinada incrementa la susceptibilidad a la infección por *P. damselae* subsp. *piscicida*, lo que podría estar relacionado con los daños observados en el intestino. Según la bibliografía consultada, este es el primer estudio in vivo que evalúa las implicaciones del uso de simbióticos (combinación de probióticos y prebióticos) sobre la morfología y la microflora intestinal de los peces.

El capítulo cuarto fue diseñado para investigar los efectos de dos microalgas (*P. tricornutum* y *T. chuii*) y *B. subtilis* sobre los parámetros inmunitarios, la expresión de genes (relacionados con el sistema inmunitario), la protección frente a *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* y la morfología y microflora intestinal de la dorada. Con el objetivo de evaluar la

capacidad de *B. subtilis* de crecer empleando los polisacáridos de las microalgas como fuente de carbono y energía, se diseñó un experimento *in vitro* que demostró que los productos de la digestión de las microalgas, principalmente de *P. tricornutum*, soportan el crecimiento de *B. subtilis* mucho mejor que la glucosa. Para el experimento *in vivo*, los peces fueron distribuidos en seis grupos iguales y recibieron una de las siguientes dietas: control, dieta no suplementada; *T. chuii* 100 g/kg; *P. tricornutum* 100 g/kg; *B. subtilis* 10⁷ ufc/g; *B. subtilis* 10⁷ ufc/g+*T. chuii* 100 g/kg; y *B. subtilis* 10⁷ ufc /g+*P. tricornutum* 100 g/kg. Tras dos y cuatro semanas de tratamiento, se evaluó la actividad del complemento, los niveles de IgM en suero, la actividad fagocítica, la explosión respiratoria, la actividad peroxidasa y la expresión de varios genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino. Al final del experimento, los peces fueron infectados experimentalmente con *P. damselae* subsp. *piscicida*. La administración en dieta de *B. subtilis*, *T. chuii*, y *P. tricornutum*, solos o en combinación puede tener efectos inmunoestimulantes en dorada. Tras dos semanas de tratamiento, se observaron incrementos significativos en la actividad del complemento, los niveles de IgM en suero, la explosión respiratoria y la fagocitosis. Tras cuatro semanas, los efectos observados permanecieron solo en la actividad del complemento y en la fagocitosis. En las condiciones ensayadas, no se observó un efecto aditivo entre las microalgas y el probiótico, ya que no hubo diferencias significativas entre la administración combinada y la administración de los ingredientes por separado. En cuanto a la expresión de genes, en el riñón cefálico solo aumentó su expresión el gen de la β-defensina tras la administración de *B. subtilis*+*P. tricornutum* durante dos semanas. *P. tricornutum* ocasionó la mayor actividad inmunoestimulante sobre los parámetros estudiados. Sin embargo, no se observaron efectos de estas dietas sobre la mortalidad tras la infección experimental en comparación con el grupo control. Por otra parte, los peces que recibieron las dietas experimentales mostraron alteraciones similares cuando se estudiaron mediante microscopía óptica y electrónica y se detectaron signos significativos de daño intestinal. No se observaron efectos de las microalgas o *B. subtilis* sobre el área absortiva intestinal, mientras que el número de células caliciformes y leucocitos intraepiteliales fue significativamente menor en los peces alimentados con las dietas *T. chuii*, *P. tricornutum*, *B. subtilis* y *B. subtilis*+*T. chuii* diets y *T. chuii*, *P. tricornutum*+*B. subtilis* y *B. subtilis*+*T. chuii*, respectivamente. Cabe destacar que solo las dietas que contenían *B. subtilis* provocaron una reducción significativa de la altura de las microvellosidades. En el intestino de peces alimentados con las dietas *T. chuii*, *B. subtilis*, *B. subtilis*+*T. chuii*, y, en menor grado, *P. tricornutum*, se observaron amplios espacios intercelulares y grandes vacuolas en los enterocitos. Estas observaciones demostraron que los peces alimentados con las dietas experimentales presentaron diferentes signos de edema e

inflamación que pueden comprometer su homeostasis. Además, las dietas experimentales causaron importantes alteraciones en la microflora intestinal mediante un descenso significativo de la diversidad bacteriana, como demostraron los índices estudiados. Nuestros resultados demuestran el potencial de las microalgas como inmunoestimulantes para peces, aunque son necesarios más estudios para evaluar las implicaciones y efectos de un sistema inmunitario estimulado. Según la bibliografía consultada, este es el primer estudio in vivo que estudia las implicaciones del uso de probióticos en combinación con inmunoestimulantes sobre la morfología y la microflora intestinal.

Por último, el capítulo cinco fue llevado a cabo con el objetivo de determinar el efecto de las dietas administradas en los capítulos tres y cuatro sobre la expresión de distintos genes en el intestino de la dorada tras cuatro semanas de tratamiento. Estos genes se agruparon en cinco categorías: genes implicados en la inflamación (genes que codifican proteínas proinflamatorias: interleucinas 1, 6 y 8, caspasa 1 y ciclooxigenasa 2); genes relacionados con el citoesqueleto (β -actina, tubulina y vimentina); proteínas de los complejos de unión (occludina, tricelulina y zonula-occludens 1), genes implicados en procesos digestivos (amilasa, tripsina y fosfatasa alcalina) y genes de proteínas transportadoras (transportador de péptidos 1 y transferrina).

En cuanto a los genes proinflamatorios, la expresión de IL-8 mostró un aumento significativo en los peces alimentados con todas las dietas excepto la *B. subtilis*+inulina, mientras que la expresión de caspasa-1 aumentó también con las dietas *B. subtilis* y *B. subtilis*+*T. chuii*. La expresión de la ciclooxigenasa 2 solo aumentó en los peces alimentados con la dieta suplementada con *B. subtilis*.

Entre los genes de proteínas del citoesqueleto y complejos de unión, solamente la β -actina y la occludina se vieron afectadas por las dietas empleadas. La expresión de β -actina aumentó tras la administración de las dietas con inulina (inulina y *B. subtilis*+inulina), mientras que la expresión de occludina aumentó en los peces alimentados con todas las dietas excepto en la dieta suplementada con *P. tricornutum*. Finalmente, la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras demostró que la dieta suplementada con inulina y todas las dietas que contenían *B. subtilis* provocaron un aumento en la expresión de transferrina, mientras que las enzimas digestivas no se vieron afectadas por las dietas experimentales.

Para concluir, nuestros resultados demostraron que la inulina, *B. subtilis* y las microalgas pueden mejorar ciertos parámetros inmunitarios de la dorada, aunque este hecho no implicó un aumento de la resistencia frente a la infección con *P. damselae* en las presentes condiciones. Además, estos suplementos dietéticos también causaron importantes alteraciones en la

morfología, microflora y expresión de genes intestinal, que, en el caso de la morfología y la microflora, pueden ser considerados negativos para la salud del pez, aunque son necesarios más estudios morfofuncionales para relacionar los aspectos nutricionales e inmunitarios del intestino de los peces y comprender las implicaciones fisiológicas del aumento de la expresión de genes en el intestino.

II. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es, en la actualidad, el sector de producción de alimentos que más rápidamente crece en el mundo, constituyendo hoy día aproximadamente el 50% de la producción acuática total (acuicultura y pesca) (FAO, 2010). Además, la dorada (*Sparus aurata* L.), especie objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, representa la mitad de la producción piscícola marina y es, junto con la lubina, el cultivo por excelencia en la zona sur atlántica y mediterránea de España.

En la actualidad, la acuicultura se enfrenta a tres retos de los que depende su expansión: la diversificación de especies, la mejora y optimización de la nutrición y el control de las patologías. Una de las áreas más importantes de investigación en acuicultura es la producción de dietas comerciales de bajo coste que no tengan efectos adversos para el crecimiento y la salud de los peces y que, a la vez, contribuyan a obtener un producto saludable y de calidad para los consumidores. En consecuencia, durante los últimos años se ha apostado por la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas y de lípidos para sustituir a la harina y al aceite de pescado empleados en los piensos para peces (Cruz-García y col., 2011; Karalazos y col., 2011; Kumar y col., 2011; Lech y Reigh, 2012).

Por otra parte, el rápido desarrollo de la acuicultura en los últimos años ha favorecido la aparición de enfermedades y problemas asociados al cultivo intensivo, que conllevan importantes pérdidas económicas y continúan siendo el principal escollo para la expansión de la acuicultura (Verschuere y col., 2000; Subasinghe, 2005; Torrecillas y col., 2007). En el cultivo intensivo, los animales están sometidos a condiciones de estrés que debilitan su sistema inmunitario, aumentando la susceptibilidad a los patógenos y favoreciendo así la emergencia de enfermedades. Tradicionalmente, las estrategias de control y prevención de enfermedades en acuicultura se han basado en el uso de vacunas, antibióticos y quimioterapéuticos, estando ya ampliamente aceptado que es más aconsejable la prevención que el tratamiento.

La administración de antibióticos puede favorecer el desarrollo de cepas bacterianas resistentes e incluso afectar negativamente el estado de salud de los peces, además de causar otros problemas como el deterioro del medio ambiente (Austin y Austin, 2007). Por otra parte, a menudo se añaden al alimento de los peces dosis subterapéuticas de antibióticos para estimular el crecimiento, lo que ha contribuido en gran medida a la aparición de resistencias (Hernández, 2005). En los últimos años ha ido gestándose en Europa una presión creciente para intentar disminuir el empleo de agentes quimioterapéuticos (fundamentalmente antibióticos y promotores del crecimiento) en la producción animal, junto a una creciente demanda, por parte

del consumidor, de productos cada vez más naturales y cuya obtención altere lo menos posible el medio ambiente.

Por todo ello, los objetivos de optimizar la nutrición y controlar las patologías en acuicultura confluyen en la manipulación de las dietas con productos naturales (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012). De ahí que los esfuerzos en la investigación se centren en buscar una formulación de las dietas óptima y asequible para el productor, que cubra los requerimientos nutricionales del animal y aumente el crecimiento y la resistencia a enfermedades, y que mantenga al mismo tiempo el valor nutricional de los peces sin causar efectos no deseados en su organismo.

En este contexto, el fortalecimiento de los mecanismos de defensa de los peces a través de la administración profiláctica de inmunoestimulantes, probióticos, prebióticos y otras sustancias naturales es uno de los métodos más prometedores para la mejora de la rentabilidad de la acuicultura (Nayak, 2010). Estos ingredientes, que pueden ser de origen muy diverso, aumentan la respuesta inmunitaria de los peces, confieren protección frente a diferentes patógenos y minimizan el riesgo asociado con el uso de productos químicos (Magnadóttir, 2010), encontrando también ingredientes que aumentan el crecimiento, favorecen la digestión y/ absorción de nutrientes, o mejoran el equilibrio de la flora intestinal (Yin y col., 2009; Dimitroglou y col., 2011; Harikrishnan y col., Heo, 2011; Heidarieh y col., 2012).

Hasta hace pocos años los efectos de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes habían sido estudiados mayoritariamente por separado. Sin embargo, ahora se intuye que la aplicación combinada de inmunoestimulantes diferentes puede tener un mayor efecto positivo que la aplicación por separado, debido a su posible efecto aditivo o sinérgico, lo que ha abierto recientemente otra nueva área de investigación (Nayak y col., 2007; Harikrishnan y col., 2011). Tanto la inulina como el probiótico *Bacillus subtilis* han sido estudiados en peces, aunque la información relativa a sus efectos sobre la dorada es muy escasa. Por otra parte, debido a su composición bioquímica, las microalgas han emergido en los últimos años como interesantes fuentes de sustancias inmunoestimulantes y promotoras de la salud, por lo que se consideran interesantes candidatos para la inmunoestimulación en peces y una posible fuente de lípidos y proteínas para enriquecer las dietas comerciales (Atalah y col., 2007).

III. OBJETIVOS

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar el efecto de la inulina, *B. subtilis* y las microalgas *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chunii* y *Phaeodactylum tricornutum*, solos o combinados, sobre el sistema inmunitario, la expresión de genes, la morfología y la microflora intestinal y la resistencia a la infección frente a *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* en la dorada. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar el efecto de la administración en dieta de la inulina y tres microalgas individualmente sobre el sistema inmunitario innato de la dorada.
2. Evaluar el efecto de la administración en dieta de tres microalgas individualmente sobre el sistema inmunitario innato y la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario de la dorada.
3. Determinar el efecto de la administración en dieta de la inulina y *B. subtilis*, por separado o en combinación, sobre el sistema inmunitario innato y la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario de la dorada.
4. Determinar el efecto de la administración en dieta de la inulina y *B. subtilis*, por separado o combinados, sobre la microflora y la morfología intestinal de la dorada.
5. Determinar el efecto de las microalgas *T. chunii* y *P. tricornutum*, solas o combinadas con *B. subtilis*, sobre el sistema inmunitario innato, la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario y la resistencia a la infección frente a *P. damsela* de la dorada.
6. Determinar el efecto de las microalgas *T. chunii* y *P. tricornutum*, solas o combinadas con *B. subtilis*, sobre la microflora y la morfología intestinal de la dorada.
7. Determinar el efecto de la inulina y las microalgas *T. chunii* y *P. tricornutum*, solas o combinadas con *B. subtilis*, sobre la expresión de genes en el intestino de dorada.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Sistema inmunitario de teleósteos

En los últimos años, la investigación en el campo de la inmunología de peces y, más concretamente de los peces teleósteos, puesto que son los que se cultivan, se considera de gran interés debido a dos razones fundamentales. La primera de ellas, que ha dado lugar a investigación básica, es que los peces se consideran actualmente un importante modelo para estudiar la evolución del sistema inmunitario adaptativo, así como para estudiar la comunicación entre el sistema inmunitario adaptativo y el innato (Du Pasquier, 2001, 2004; Flajnik y Du Pasquier, 2004; Sullivan y Kim, 2008), lo que ha favorecido la realización de estudios con la perspectiva filogenética. La segunda razón, que ha dado lugar a investigación aplicada, se ha centrado en cubrir las demandas de las industrias dedicadas al cultivo de peces. De hecho, el gran crecimiento mundial que ha experimentado la acuicultura en las últimas décadas ha favorecido el interés por el conocimiento del sistema inmunitario de algunas especies de peces de importancia comercial, con dos objetivos principales: asegurar una actividad óptima de la defensa inmunitaria natural de los peces durante las condiciones de cultivo y la selección de stocks; y el desarrollo y mejora de las medidas profilácticas o terapéuticas tales como la vacunación o el uso de inmunomoduladores (Vadstein, 1997; Ellis, 2001; Alvarez-Pellitero, 2008; Van Muiswinkel, 2008).

El término inmunidad se emplea para designar una reacción frente a agentes extraños, entre los que se incluyen los microorganismos (virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares) y las macromoléculas (proteínas y polisacáridos), sin implicar la consecuencia patológica de tal reacción (Abbas y col., 2002). El sistema inmunitario está formado por las células y las moléculas que son responsables de dicha inmunidad, mientras que la respuesta coordinada y colectiva de los componentes del sistema inmunitario frente a sustancias extrañas constituye la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria se inicia siempre con el reconocimiento del patógeno o del material extraño y su finalidad es desarrollar un mecanismo capaz de eliminarlo (Male y Roitt, 2001; Abbas y col., 2002).

El sistema inmunitario de los peces es, en términos generales, muy similar al de vertebrados superiores, aunque presenta algunas diferencias importantes que iremos señalando a lo largo de esta revisión. En todos los vertebrados, incluidos los peces, la respuesta inmunitaria puede ser de dos tipos: innata (también conocida como natural o inespecífica) y adaptativa (también conocida como adquirida o específica), mientras que los invertebrados solo poseen respuesta inmunitaria innata (Abbas y col., 2002). Los peces constituyen pues el primer grupo de vertebrados, y en ellos aparece por primera vez la respuesta adaptativa. Esta diferenciación, sin

embargo, es artificial, ya que siempre que un agente interactúa con el huésped, éste reacciona activando la mayoría de elementos que configuran su sistema inmunitario, ya sean pertenecientes a la respuesta inmunitaria innata o a la adaptativa. El mayor o menor potencial de cada uno de estos tipos de respuesta depende de la situación del organismo en la escala filogenética: al ascender en la línea evolutiva, la importancia de la respuesta adaptativa se va haciendo mayor. Por tanto, en los peces la respuesta inmunitaria innata está muy desarrollada mientras que la adaptativa lo está menos, en contraste con lo que ocurre en vertebrados superiores, en los que el máximo potencial de respuesta inmunitaria corresponde al tipo adaptativo (Tort y col., 2003).

1.1. Órganos y tejidos implicados en la inmunidad

Hay diferentes órganos y tejidos implicados en la inmunidad de peces teleósteos. El tegumento y las mucosas de los peces son los que constituyen una primera barrera de defensa, que es extremadamente importante frente a la entrada de patógenos, ya que los peces se encuentran constantemente inmersos en un medio acuático con el que interactúan de modo mucho más directo que los organismos aéreos lo hacen con el suyo, medio que puede contener agentes potencialmente perjudiciales (Magnadóttir, 2010). El tegumento presenta escamas, espinas y secreciones tóxicas que contribuyen a la defensa del organismo y el moco (presente en la piel, el intestino y las branquias) contiene diversas sustancias de defensa que incluyen péptidos antimicrobianos, factores del complemento e inmunoglobulinas (Aranishi y Mano, 2000; Smith y col., 2000; Ellis, 2001; Fast y col., 2002; Suzuki y col., 2003; Magnadóttir, 2006; Subramanian y col., 2007, 2008; Whyte, 2007).

Un componente importante del tejido linfoide está asociado a las mucosas, formando el denominado MALT (del inglés *mucosa associated lymphoid tissue*). En los peces, el tejido linfoide asociado a mucosas está constituido por poblaciones de células dispersas que incluyen linfocitos T y B, macrófagos, células plasmáticas, granulocitos y células cebadas. Este tejido linfoide aparece principalmente en las mucosas de la piel, el tracto digestivo y las branquias, aunque el más estudiado ha sido el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *gut associated lymphoid tissue*) (Press y Evensen, 1999). A él y al papel del intestino como primera barrera de defensa frente a patógenos, dedicaremos un apartado especial en la presente revisión.

Los órganos del sistema inmunitario de peces son también esencialmente similares a los de mamíferos, comprendiendo tejido hematopoyético (lugar donde se forman las células

sanguíneas de la línea mieloide: eritrocitos, leucocitos y trombocitos), tejido linfoide (lugar donde se forman las células sanguíneas de la línea linfoide: linfocitos), órganos primarios (donde se produce la maduración de los linfocitos) y órganos secundarios (lugares donde, principalmente, los linfocitos maduros entran en contacto con los antígenos) (Manning, 1998). En peces, no obstante, todos los tejidos y órganos muestran capacidad hematopoyética y linfoide, por lo que son denominados tejidos y órganos linfomieloideos (Zapata y col., 1996).

Una de las principales diferencias con los mamíferos es la carencia, en los peces, de médula ósea y de ganglios linfáticos. Las funciones propias de la médula ósea en los peces se localizan en el riñón cefálico, que se considera el principal órgano linfomieloide primario de teleósteos. Estructuralmente, el riñón de peces está dividido en tres porciones: la anterior o cefálica, con función hematopoyética y linfoide, la posterior o caudal, con función renal y la intermedia, que comparte ambas funciones. El segundo órgano primario en importancia es el timo, que aparece próximo a las branquias y está constituido fundamentalmente por linfocitos T, siendo considerado como la principal fuente de linfocitos T maduros (Zapata y col., 1996).

El bazo es el principal órgano secundario de los peces teleósteos. Aunque presenta pocos linfocitos, tras la administración de antígeno su número aumenta considerablemente, habiéndose hallado en él linfocitos T y B (Zapata y col., 1996).

1.2. Respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, está mediada en peces por una serie de factores solubles y de células que constituyen la respuesta humoral y celular, respectivamente. Enumeramos ahora los principales factores solubles y las principales células implicadas en dicha respuesta.

Entre los factores humorales del sistema inmunitario innato, que pueden ser formas solubles o receptores de membrana, el más importante es el sistema del complemento. Este sistema está constituido por una compleja cascada enzimática de glicoproteínas, y actúa señalizando la presencia de patógenos potenciales y contribuyendo a su degradación a través de la quimiotaxis y la opsonización. El sistema del complemento está bien desarrollado en peces y comprende las vías de activación clásica, alternativa y la vía de las lectinas. Estas tres vías pueden desembocar en la formación del complejo de ataque de membrana y la lisis celular o aumentar la fagocitosis mediante la opsonización del patógeno y la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa a través de la vía clásica (Nonaka y Smith, 2000; Boshra y col., 2006). En el suero de peces se ha observado una elevada actividad hemolítica, atribuida a la vía alternativa

del complemento y una alta actividad lisozima (enzima glicósido hidrolasa que actúa degradando las paredes celulares bacterianas) (Lange y col., 2001; Saurabh y Sahoo, 2008).

Otros factores humorales importantes son las lectinas, proteínas de alta especificidad que se unen a azúcares y que intervienen en procesos de reconocimiento tanto a nivel molecular como celular. Destaca la lectina que une manosa (MBL), que puede actuar como opsonina o aglutinina (Russell y Lumsden, 2005) y las pentraxinas (proteínas compuestas por cinco subunidades idénticas, entre las que destacan la proteína C-reactiva y la proteína amiloide sérica P), todos ellos factores centrales en la respuesta de fase aguda e importantes proteínas de reconocimiento de patógenos (Bayne y Gerwick, 2001). Además de los ya mencionados, destacan como elementos clave en la defensa innata los péptidos antimicrobianos que, como su nombre indica, son proteínas que tienen propiedades antibióticas (Smith y col., 2000; Fernandes y Smith, 2004; Maier y col., 2008); los inhibidores de proteasas como la α 2-macroglobulina y la α 1-antitripsina, que bloquean enzimas líticas de bacterias (Bowden y col., 1997), los inhibidores del crecimiento como la transferrina, que impide o retrasa el crecimiento bacteriano (Stafford y Belosevic, 2003), y el interferón, que actúa contra infecciones virales (Ellis, 2001; Schultz y col., 2004; Furnes y col., 2009).

Entre los factores humorales expresados como receptores de membrana destacan los receptores tipo toll (TLRs), una familia de proteínas transmembrana de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato. En los últimos años, varios estudios en peces han revelado una destacable especificidad de la respuesta innata que no había sido observada antes (Akira y Hemmi, 2003; Heine y Lien, 2003; Takeda y Akira, 2004). Los TLRs se han identificado en varias especies de peces, mostrando una organización, expresión y características similares a las encontradas en mamíferos (Bricknell y Dalmo, 2005).

Muchos de los factores innatos mencionados anteriormente, muestran una mayor diversidad estructural y funcional que sus equivalentes de mamíferos. Esta diversidad tiene un papel decisivo en el aumento de la capacidad de reconocimiento del sistema inmunitario de peces (Magnadottir, 2010).

Los tipos celulares implicados en la respuesta inmunitaria inespecífica de los peces son los monocito-macrófagos, los granulocitos, los trombocitos y las células citotóxicas naturales (Secombes, 1996; Manning, 1998; Ellis, 2001; Fischer y col., 2006). Todos estos tipos celulares presentan una clara homología funcional con respecto a los leucocitos de mamíferos, aunque existen diferencias morfológicas y ultraestructurales, que también se dan entre las distintas especies de peces, sobre todo en el caso de los granulocitos (Meseguer y col., 1991, 1993). Los monocito-macrófagos son las células fagocíticas por excelencia y son especialmente

abundantes en el riñón. Funcionalmente, pueden actuar como células accesorias en respuestas mediadas por linfocitos, son altamente fagocíticas, pueden secretar radicales libres de oxígeno y nitrógeno y son capaces de matar una amplia variedad de patógenos (Secombes, 1996).

Los granulocitos se pueden dividir en neutrófilos, eosinófilos y basófilos, siendo los dos primeros los más abundantes, mientras que los basófilos están ausentes en muchas especies. Los granulocitos, especialmente los neutrófilos, presentan actividad fagocítica y producen especies reactivas de oxígeno, pero su capacidad bactericida es relativamente baja comparada con la de los macrófagos (Meseguer y col., 1994; Secombes, 1996).

Los trombocitos de peces teleósteos son células multifuncionales implicadas en el proceso de coagulación sanguínea (Jagadeeswaran y col., 1999) que parecen desempeñar además un papel activo en la inmunidad, ya que tienen capacidad de interacción con bacterias, virus y parásitos y responden a la opsonización (Meseguer y col., 2002). La capacidad de estas células de actuar como verdaderos fagocitos en la respuesta inflamatoria de peces ha sido objeto de controversia, ya que los resultados son confusos, incompletos y a veces contradictorios (Meseguer y col., 2002). Se ha sugerido que en peces los trombocitos no son verdaderas células fagocíticas y que podrían representar un puente entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo (Passantino y col., 2005).

Las células citotóxicas naturales (NCC, del inglés *non-specific cytotoxic cells*) son equivalentes funcionalmente a las células agresoras naturales (NK, del inglés *natural killer*) de mamíferos, y forman una población heterogénea de células que presentan características morfológicas típicas de monocito-macrófagos, granulocitos y linfocitos (Meseguer y col., 1996; Cuesta y col., 1999).

Los factores humorales implicados en la respuesta inmunitaria específica son las inmunoglobulinas (Ig, anticuerpos), expresados como moléculas de membrana de los linfocitos B o secretadas en el plasma. Hasta hace poco, se creía que los peces solo presentaban dos clases de inmunoglobulinas, la IgM y la IgD. Además, estaba generalmente aceptado que la IgM era la única inmunoglobulina capaz de responder frente a un antígeno, tanto en las mucosas como de forma sistémica, careciendo los peces, por tanto, de una inmunoglobulina especializada en las superficies mucosas (equivalente a la IgA de mamíferos) (Zhang y col., 2011). Sin embargo, en 2005, tras el análisis de varios genomas de peces teleósteos, se descubrió un nuevo isotipo de inmunoglobulinas, denominado IgT en trucha (Hansen y col., 2005), IgZ en pez cebra (Danilova y col., 2005; Flajnik, 2005) e IgH en pez globo (Savan y col., 2005). La estructura proteica, producción y papel potencial en la inmunidad de la IgT se ha estudiado recientemente (Zhang y col., 2010), poniendo de manifiesto que la IgT de trucha es

una inmunoglobulina especializada en las respuestas inmunitarias de la mucosa del intestino, mientras que la IgM parece estar especializada en la inmunidad sistémica.

Los linfocitos, de los tipos B y T, son los responsables del reconocimiento específico del patógeno y el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos B están implicados en la respuesta humoral (se transforman en células plasmáticas que segregan Ig), mientras que los T son responsables de las respuestas mediadas por células y de la secreción de citoquinas, además de actuar como células ayudantes de los linfocitos B (Magnadóttir, 2010).

Todos estos tipos celulares, cuando son estimulados, reaccionan e interactúan entre sí dando lugar a distintas respuestas inmunitarias, tanto innatas como adaptativas, que pasamos a esbozar a continuación (Secombes, 1996).

- **Inflamación.** Ante una lesión celular, provocada por un estímulo fisiológico excesivo o por un estímulo patológico, se desencadena una respuesta protectora destinada a eliminar tanto la causa de la lesión (como microorganismos o toxinas) como las células y tejidos necrosados que se originan como consecuencia de la lesión. La inflamación comienza con un aumento de la vascularización y migración de granulocitos y monocitos/macrófagos hacia la zona lesionada. Estas células aumentan sus actividades enzimáticas y fagocíticas para eliminar los agentes patógenos que hubieran podido entrar al organismo. La inflamación puede ser aguda o crónica y, en este último caso, intervienen también linfocitos. Los leucocitos presentes en la zona lesionada liberan una serie de factores como aminas vasoactivas, icosanoides y citocinas, moléculas que median el proceso de inflamación y de eliminación del agente invasor. Tras la eliminación del agente patógeno se produce la reparación tisular de la zona dañada (Manning, 1998; Mitchell y Cotran, 1999).

- **Migración de fagocitos.** Los monocitos/macrófagos y los granulocitos tienen la capacidad de moverse de forma unidireccional, llamada quimiotaxis, hacia una serie de estímulos quimioatrayentes derivados tanto del patógeno como del hospedador, entre los que destacan algunos factores del complemento, las citocinas, los lipopolisacáridos de las paredes bacterianas y las toxinas (Kalmar y Van Dyke, 1994).

- **Fagocitosis.** La fagocitosis es un proceso dependiente de Ca^{2+} mediante el cual las células interiorizan, matan y digieren microorganismos y otras partículas como factores solubles o restos celulares. Los fagocitos (monocito-macrófagos, granulocitos y trombocitos) se unen a la partícula a través de receptores, la interiorizan formando primero un fagosoma y luego un fagolisosoma y, a veces, la destruyen. La destrucción de la partícula puede ser por mecanismos independientes de oxígeno (lisozima, enzimas lisosomales, citocinas) o dependientes de él (formación de H_2O_2 , anión superóxido, radicales de nitrógeno). La formación de metabolitos del

oxígeno se llama explosión respiratoria o estallido respiratorio y es una respuesta cuantificable por distintos métodos. Otro mecanismo, menos usual, es la liberación al medio extracelular del contenido de las enzimas lisosomales y lisis del agente patógeno. La opsonización de la partícula a fagocitar con C3 o con anticuerpos aumenta considerablemente esta actividad (Secombes y Fletcher, 1992; Esteban y Meseguer, 1994; Secombes, 1996).

- **Citotoxicidad.** La citotoxicidad, innata o adaptativa, es la respuesta celular encargada de eliminar células tumorales, células infectadas por virus o protozoos (Graves y col., 1984). En peces está mediada por las NCC que han sido identificadas en sangre, exudado peritoneal, timo, bazo y riñón cefálico. Son una población celular heterogénea con características morfológicas típicas de monocito-macrófagos, granulocitos y linfocitos. Las NCC contactan con las células diana y forman un conjugado entre ambas, provocando la muerte de la célula diana mediante apoptosis o necrosis. El reconocimiento y unión de las NCC a las células diana se realiza mediante receptores de membrana capaces de reconocer los determinantes antigénicos presentes en la célula diana (Meseguer y col., 1996; Cuesta y col., 1999).

- **Producción de anticuerpos.** Los linfocitos B van a producir anticuerpos siempre que existan macrófagos como células accesorias, que producen interleucina (IL)-1, necesaria para esta respuesta. Los anticuerpos se encargan de la neutralización de antígenos, de la precipitación y aglutinación, de la opsonización y de la activación de la ruta clásica del complemento. Un aspecto crucial de la respuesta inmunitaria específica es la memoria inmunológica. La producción secundaria de anticuerpos en teleósteos es a menudo más amplia y rápida que la primaria, pero esta memoria inmunológica no está tan desarrollada como en mamíferos (Kaattari y Piganelli, 1996; Manning y Nakanishi, 1996; Manning, 1998).

- **Presentación de antígeno.** Los linfocitos T reconocen los antígenos solo cuando son presentados de forma adecuada. Esto ocurre cuando una célula presentadora de antígeno, como los macrófagos o los linfocitos B, tras fagocitar el antígeno, rompen polipéptidos antigénicos y los convierten en pequeños fragmentos peptídicos. Estos se asocian a glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) formando un complejo que se sitúa en la superficie de la célula presentadora de antígeno, pudiendo entonces ser reconocido por los linfocitos T. En los peces, aunque no se conocen tantos detalles como el caso de mamíferos, parece existir también presentación de antígeno y restricción por MHC (Vallejo y col., 1992; Secombes, 1996).

1.3. La barrera epitelial intestinal y la inmunidad de la mucosa

El intestino de peces se ve constantemente bombardeado por múltiples agentes presentes en el ambiente acuático y en el alimento, y es una vía de entrada relativamente sencilla para muchos patógenos. Se ha comprobado que los microorganismos patógenos pueden penetrar en los peces a través de las branquias, la piel o el tracto digestivo (Wang y Leung, 2000; Birkbeck y Ringø, 2005), así como que los daños en los epitelios de revestimiento pueden facilitar el acceso de patógenos oportunistas (Yano, 1996; Zapata y col., 1996). Los patógenos necesitan adherirse y penetrar a través de las células epiteliales para propagarse sistémicamente, lo que lleva asociados una serie de mecanismos de adherencia de los patógenos a las células de peces y unos cambios morfológicos en el epitelio tras la adhesión, que no han sido muy estudiados. En condiciones fisiológicas normales, la integridad de la barrera intestinal se mantiene gracias a diversos factores como la secreción de moco, agua y cloruro y la actuación de las células que forman las uniones estrechas (Ng y col., 2009). Se ha observado que patógenos de peces como *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* y *Vibrio anguillarum* actúan sobre el epitelio causando un daño extensivo y rompiendo la integridad de la barrera intestinal, lo que facilitaría la translocación bacteriana (Ringø y col., 2007). Por este motivo, la mejora de la integridad de la barrera epitelial intestinal puede ser un factor determinante para la protección de los animales frente a las enfermedades.

La existencia de la inmunidad de las mucosas en peces fue demostrada por primera vez en los 80, al administrar a los peces antígenos particulados y observar que eran captados por las células intestinales (Rombout y col., 1985; McLean y col., 1990) y, desde entonces, el GALT ha sido descrito tanto en peces cartilaginosos como en óseos (es decir, teleósteos) (Hart y col., 1988). Histológicamente, el tejido del intestino, llamado barrera intestinal, está compuesto por cuatro capas que, desde dentro de la luz del digestivo hacia fuera son: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa mucosa está formada por un epitelio con su correspondiente membrana basal y bajo ella una capa de tejido conectivo denominada lamina propia. La submucosa está constituida por fibras de tejido conectivo, y la muscular se divide a su vez en dos, la muscular interna (fibras musculares dispuestas longitudinalmente) y la externa (fibras musculares dispuestas de forma circular). Por último, la serosa está compuesta por fibras de tejido conectivo laxo y un epitelio plano simple. Las células linfoides encontradas en el intestino de peces se localizan tanto en el epitelio (y se denominan leucocitos intraepiteliales, IELs) como en la lámina propia (denominándose leucocitos de la lámina propia o LPLs) (Temkin y McMillan, 1986; Rombout y col., 1989, 1993).

En los teleosteos, el nivel de organización del GALT es menor que en mamíferos, ya que no aparece formando agregados estructurados como son las placas de Peyer características de los vertebrados superiores, sino que se distribuye de manera difusa a lo largo de todo el intestino y presenta numerosas células linfoides B y T, macrófagos y granulocitos neutrófilos y eosinófilos (Rombout y col., 2011). De los tres isotipos de inmunoglobulinas presentes en peces, en el GALT se ha demostrado la presencia de IgM (Bernard y col., 2006), también presente en el moco cutáneo (Morrison y Nowak, 2002) y de IgT, siendo esta última la inmunoglobulina especializada en la inmunidad de la mucosa, como ya fue comentado (Zhang y col., 2010). La IgD no ha sido relacionada, por el momento, con la inmunidad de la mucosa (Flajnik, 2002).

La superficie intestinal de la mucosa está en estrecho contacto con una comunidad compleja constituida por la microflora. Aunque la composición de la microbiota intestinal depende de factores genéticos, nutricionales y ambientales, en general se acepta que el intestino de peces alberga aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc/g, mientras que en humanos llega a alcanzar niveles de 10^{14} ufc/g en el intestino grueso. La comunidad microbiana del intestino de los peces está fuertemente influida por el medio y, dentro de este complejo ecosistema, los microorganismos compiten para su supervivencia tanto por el espacio como por los nutrientes. Las bacterias son los microorganismos dominantes en el intestino de peces, siendo *Proteobacteria* el principal tipo filogenético (Cahill, 1990; Huber y col., 2004; Romero y Navarrete, 2006; Dhanasiri y col., 2011). La microecología intestinal de los peces es un aspecto relativamente poco estudiado, pero a lo largo de los últimos años se han acumulado una gran cantidad de datos (Nayak, 2010). Los microorganismos residentes y los patógenos ocasionales, así como aquellos microorganismos administrados artificialmente (probióticos, de los que se hablará en la presente revisión) pueden tener un papel significativo en las respuestas inmunitarias intestinales (Rombout y col., 2011), coexistiendo en un equilibrio dinámico dentro del intestino a través de una señalización activa continua entre patógenos, microflora y hospedador (Falkow, 2006).

Esta simbiosis de microorganismos comienza a desarrollarse con la primera toma de alimento en la fase larvaria, alcanzando una composición estable posiblemente en la etapa juvenil (Hansen y Olafsen, 1999; Raz, 2010). Los cambios en la composición de la microbiota están muy influenciados durante las etapas tempranas del desarrollo de los peces, cuando está teniendo lugar la colonización intestinal y el desarrollo del sistema inmunitario. Por ejemplo, la ausencia de microbiota durante las etapas de desarrollo del pez cebra conlleva una detención de la diferenciación y una alteración de la función del intestino (Bates y col., 2006). Al igual que en mamíferos, no se conocen en profundidad las interacciones entre el hospedador y las

bacterias comensales y los beneficios derivados de estos procesos. El sistema inmunitario innato protege al hospedador manteniendo la integridad de la barrera intestinal, empleando para ello los receptores de reconocimiento de patógenos (tipo TLR). El lipopolisacárido genérico de bacterias (LPS) podría servir como ligando para el TLR y regular la fosfatasa alcalina, un marcador de la maduración de enterocitos y de la absorción de lípidos (Jault y col., 2004; Meijer y col., 2004; Rombout y col., 2011).

La microbiota beneficiosa emplea múltiples señales independientes para interactuar con el hospedador y coexistir con bacterias patogénicas. Se ha sugerido que un desequilibrio en la microbiota, que favorezca a las variedades menos tradicionales, podría conducir potencialmente a inconvenientes relacionados con el sistema inmunitario del hospedador, incluyendo el desequilibrio entre células T reguladoras y efectoras y el aumento de la diferenciación de células inflamatorias efectoras (Raz, 2010; Rombout y col., 2011). El análisis mediante *microarrays* de peces cebra gnotobióticos (animales criados en condiciones de esterilidad a los que se les introduce intencionadamente microorganismos específicos) ha mostrado cambios transcripcionales en genes relacionados con el sistema inmunitario innato, como son la proteína C-reactiva o el factor del complemento C3 (Lefrançois y Olson, 1997). En pez cebra, además, solo la microbiota procedente de los peces (dominada por *Aeromonas* y *Pseudomonas*, seguida de *Vibrio* y *Lactococcus*) y no aquella transplantada desde ratones, conlleva un aumento en la expresión de biomarcadores de la respuesta inmunitaria innata (Rawls y col., 2006).

Aunque ya se han llevado a cabo algunos estudios, es evidente que el comensalismo hospedador-bacteria, así como la etiología de los estados patogénicos en el intestino de peces requiere una mayor atención y, como ya se ha mencionado, especialmente por la aplicación de probióticos, que parecen ser una poderosa herramienta para mejorar la resistencia de los peces a las enfermedades (Rombout y col., 2011).

2. Inmunoestimulación en peces

Los inmunoestimulantes constituyen una muy buena alternativa al uso de agentes quimioterapéuticos, vacunas y antibióticos. Los antibióticos han sido de uso generalizado en acuicultura debido a que son potentes herramientas para luchar contra las enfermedades, ya sea como métodos de tratamiento o de prevención en situaciones de estrés. Sin embargo, el uso indiscriminado de los antibióticos en la acuicultura puede conllevar importantes inconvenientes tales como la aparición de cepas resistentes, la contaminación del medio acuático, la toxicidad

para el organismo y la acumulación de residuos en órganos y tejidos, así como otros efectos potencialmente negativos sobre la salud humana.

Por otra parte, aunque la vacunación es un método profiláctico que ha dado buenos resultados frente a algunas enfermedades, parece ser un método menos efectivo de lo esperado, debido al poco desarrollo del sistema inmunitario adaptativo de los peces (Sakai, 1999). El empleo de inmunoestimulantes tiene un valor principalmente profiláctico, con la ventaja de tener un rango de acción más amplio, ya que su uso puede ser útil frente a todo tipo de infecciones. Sin embargo, su principal inconveniente es la corta duración de su acción, ya que estas sustancias suelen actuar sobre el sistema inmunitario innato, que carece de memoria (Sakai, 1999).

2.1. Definición y efectos

Un inmunoestimulante es un compuesto natural que potencia el sistema inmunitario incrementando la resistencia del hospedador frente a enfermedades, que en su mayor parte están causadas por patógenos (Bricknell y Dalmo, 2005). Este término cubre un amplio rango de sustancias y agentes capaces de activar el sistema inmunitario, a través de distintos tipos de receptores, y de aumentar la resistencia a diferentes enfermedades. Existe una gran variedad de sustancias naturales y sintéticas capaces de estimular el sistema inmunitario de los vertebrados, muchas de las cuales han demostrado tener efecto inmunoestimulante en peces, consiguiendo aumentar principalmente los mecanismos de respuesta innatos, paliar los efectos negativos producidos por los inmunodepresores (situaciones de estrés, contaminantes...) y reducir la aparición o impacto de infecciones bacterianas, víricas o protozoarias, todas ellas causantes de importantes pérdidas económicas en peces sometidos a cultivo intensivo.

Los inmunoestimulantes pueden ser derivados de plantas, bacterias, virus o parásitos, así como algunos compuestos sintéticos, vitaminas y hormonas (Sakai, 1999; Ringø y col., 2011; Kiron, 2012). Entre estas sustancias se encuentran los β -glucanos, un grupo de polímeros de glucosa que constituyen el principal componente estructural de las paredes celulares de hongos, plantas y algunas bacterias (Brown y Gordon, 2003).

Los efectos biológicos de los inmunoestimulantes dependen en gran medida de los receptores de las células diana que los reconocen, ya que pueden desencadenar diversas vías de señalización. En peces, se han identificado diferentes receptores de tipo TLR (*Toll-like receptor*) que parecen estar relacionados con la respuesta a los inmunoestimulantes, tal y como ya se ha mencionado (Bricknell y Dalmo, 2005). En peces, también se ha demostrado que los

inmunoestimulantes pueden actuar sobre la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico, la activación de macrófagos, la actividad lisozima, la actividad hemolítica del complemento, la actividad fenoloxidasa, la fosfatasa ácida, la concentración de anticuerpos en suero y el número de leucocitos (Ringø y col., 2011).



Figura 1. Modo de acción de los inmunoestimulantes (adaptado de (Kiron, 2012)).

2.2. Empleo de inmunoestimulantes en acuicultura

En acuicultura, los inmunoestimulantes generalmente se incluyen como suplementos dietéticos en momentos puntuales del engorde, tales como de aumento de estrés (por ejemplo, por manejo, separación por tallas o vacunación) o durante periodos cruciales del desarrollo, con el fin de ayudar al animal a protegerse contra los patógenos y a mantener una buena salud (Kiron, 2012). Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente distintos inmunoestimulantes y su uso se ha generalizado, de algún modo. Uno de las primeras

aplicaciones de inmunoestimulantes empleados en acuicultura fue la inclusión de glucanos en las dietas de salmón, en los que demostraron su eficacia contra los brotes de enfermedades tras situaciones de estrés (Brattgjerd y col., 1994). Las propiedades de los β -glucanos como inmunoestimulantes en peces han sido ampliamente estudiadas, tanto introducidas en la dieta como administradas mediante inyección intraperitoneal o como adyuvante en vacunas (Dalmo y Børgwald, 2008; Das y col., 2009; Kudrenko y col., 2009). Estos azúcares parecen tener un potente efecto inmunoestimulante, fundamentalmente sobre los mecanismos de defensa inespecíficos, aunque también sobre algunos de los específicos, además de inducir resistencia frente a infecciones. En corvina amarilla se ha demostrado un aumento de la actividad lisozima, la fagocitosis y la explosión respiratoria tras la administración en dieta de β -glucanos procedentes de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que confirió además una protección adicional frente a la infección con *Vibrio harveyi* (Ai y col., 2007). En tilapia se ha observado que los β -glucanos pueden emplearse como inmunoestimulantes en condiciones de estrés inmunosupresor, aumentando la resistencia de los animales a la infección con *Aeromonas hydrophila* (El-Boshy y col., 2010).

Otros inmunoestimulantes estudiados en peces han sido plantas y derivados, vitaminas y levanos (Amar y col., 2004; Rairakhwada y col., 2007; Gupta y col., 2008; Cerezuela y col., 2009; Immanuel y col., 2009; Yin y col., 2009; Ibrahim y col., 2010), RNA de cadena doble (Fernandez-Trujillo y col., 2008; Das y col., 2009) y oligodeoxinucleótidos (ODNs, moléculas sintéticas de DNA monocatenario no metilado) entre los que destacan los CpGs (que contienen una citosina seguida de una guanina) (Tassakka y Sakai, 2005; Cheng y col., 2011). Entre los efectos de estos inmunoestimulantes se encuentran la reducción de la respuesta al estrés, el incremento de la actividad de diferentes parámetros inmunitarios innatos y la mejora de la resistencia frente a enfermedades. En la tabla 1 se resumen algunos de los inmunoestimulantes más relevantes estudiados en peces.

Tabla 1. Inmunoestimulantes más relevantes estudiados en peces.

Origen	Tipo	Inmunoestimulante	Referencia
Natural	Bacterias y derivados	Lipopolisacárido Muramil dipéptido Peptidoglicano β -glucanos	Dalmo y Bøggwald, 2008 Swain y col., 2008 Das y col., 2009 Kudrenko y col., 2009 Rodríguez y col., 2003
	Extractos de algas, plantas y animales	Propóleo EF-203 <i>Ecteinascida turbinata</i> <i>Haliotis discus</i> <i>Watasemia scintillans</i> Saponina Hierbas chinas	Cuesta y col., 2005 Sahoo, 2007 Talas y Gulhan, 2009 Galina y col., 2009 Harikrishnan y col., 2011 Enis Yonar y col., 2011
	Citocinas y hormonas	Hormona del crecimiento Interferón Interleuquinas Lactoferrina Prolactina Factor de necrosis tumoral Triyodotironina	Cuesta y col., 2006 Sahoo, 2007 Cuestan y col., 2008 Zhang y col., 2009
	Ácidos nucleicos y nucleótidos	Oligonucleótidos CpGs RNA cadena doble	Li y Gatlin, 2006 Carrington y Secombes, 2006 Cuesta y col., 2008 Strandskog y col., 2008 Fernandez-Trujillo y col., 2008 Das y col., 2009
	Factores nutricionales	Vitaminas C, E, A y D Elementos traza (I, F, Zn, Ca, Mg, Fe, Se) Proteínas Lípidos Carbohidratos	Ortuño y col., 2000 Cuesta y col., 2001 Cuesta y col., 2002a Sahoo, 2007 Rajanbabu y Chen, 2011
	Polisacáridos	Quitina Quitósán No almidones (fibras, celulosa...)	Sahoo, 2007 Sinha y col., 2011 Esteban y col., 2001
	Sintético	Levamisol	Cuesta y col., 2002b Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004 Alvarez-Pellitero y col., 2006 Sahoo, 2007
FK-565		Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004	
Adyuvante de Freud		Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004 Sahoo, 2007	

Como se deduce de los estudios realizados hasta ahora, los inmunoestimulantes parecen ser un método de gran interés para controlar las enfermedades y mantener a los peces en un estado de salud óptimo. Sin embargo, la influencia que pueden tener los inmunoestimulantes administrados oralmente sobre la microflora intestinal ha sido muy poco estudiada. Hasta la fecha, solo dos trabajos han tenido en cuenta esta interacción y ambos se han llevado a cabo en bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*). En el primero de ellos, Gildberg y

Mikkelsen (Gildberg y Mikkelsen, 1998) evaluaron el efecto de la suplementación de bacterias ácidolácticas solas o en combinación con péptidos inmunoestimulantes obtenidos a partir de un hidrolizado de proteínas de peces. Tras tres semanas de alimentación, los peces fueron infectados con *Vibrio anguillarum* por inmersión. A los doce días, la mortalidad acumulada se redujo significativamente respecto al control en los peces alimentados tanto con las bacterias ácidolácticas como con los péptidos inmunoestimulantes. Sin embargo, no se observó un efecto sinérgico o acumulado cuando se combinaron ambos ingredientes. A las cuatro semanas, la mortalidad acumulada fue similar en todos los grupos.

El segundo estudio realizado, ha evaluado el efecto de los β (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucanos procedentes de una diatomea marina (*Chaetoceros müller*) sobre la comunidad microbiana del intestino de larvas. El recuento de viables totales se realizó sobre placas de agar marino y las de tipo *Vibrio* y *Pseudomonas* en agar selectivo. El efecto del inmunoestimulante sobre estos recuentos bacterianos fue nulo o muy leve. Los autores centraron su interés en caracterizar estos dos géneros, y no emplearon métodos moleculares para estudiar la comunidad bacteriana completa, métodos que son los empleados en el presente trabajo. En la tabla 2 se recogen algunos de los trabajos más recientes sobre la aplicación de inmunoestimulantes en peces.

Tabla 2. Estudios recientes (ordenados cronológicamente) sobre inmunoestimulantes en peces.

Inmunoestimulante	Especie	Efectos observados	Referencia
Extractos de hierbas	<i>Carassius auratus</i>	↑ explosión respiratoria ↑ fagocitosis ↑ lisozima	Harikrishnan y col., 2010a
Lipopolisacárido	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	→ crecimiento ↓ mortalidad frente a <i>A. Hydrophila</i> ↑ fagocitosis ↑ lisozima ↑ actividad bactericida y antiproteasa	Nya y Austin, 2010
Alginato	<i>Epinephelus brneus</i>	↓ % macrófagos ↑ % neutrófilos y linfocitos ↑ complemento, ↑ hemoaglutinación ↑ fagocitosis ↑ lisozima y SOD ↑ explosión respiratoria	Harikrishnan y col., 2011
Vitamina C y E Nucleótidos Glucano	<i>Thunnus maccoyii</i>	↑ lisozima (vitaminas) ↑ supervivencia ↓ % prevalencia e intensidad de parásitos ↑ complemento ↑ cortisol	Kirchhoff y col., 2011
β-1,3glucano, chitosan y rafinosa	<i>Cyprinus carpio koi</i>	↑ crecimiento (glucano) → complemento ↑ leucocitos en sangre ↑ explosión respiratoria ↑ capacidad fagocítica ↑ lisozima y SOD ↓ mortalidad frente a <i>A. veronii</i>	Lin y col., 2011
Alginato (Ergosan®)	<i>Oreochromis niloticus</i>	→ microflora intestinal → morfología del intestino	Merrifield y col., 2011
β-glucano (MacroGard®)	<i>Cyprinus carpio</i>	↓ citoquinas proinflamatorias frente a <i>A. salmonicida</i>	Falco y col., 2012
β-glucano	<i>Cyprinus carpio</i>	↑ expresión Muc5B en piel ↑ expresión β-defensina en piel y branquia	Marel y col., 2012

Los símbolos representan un incremento (↑), un descenso (↓) o no efecto (→) sobre la respuesta especificada.

3. Probióticos y prebióticos

La necesidad de disponer de alternativas viables para estimular los mecanismos naturales de defensa de los animales y reducir así el uso masivo de antibióticos, ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias de inmunoestimulación. En este sentido, ha tenido especial relevancia el uso de aditivos alimenticios específicos para promover el bienestar animal, particularmente a través de la modulación de la microflora intestinal, que se sabe que juega un papel crítico en el mantenimiento de la salud del hospedador (Tuohy y col., 2005). Una microflora intestinal equilibrada constituye una barrera eficaz frente a la colonización por

patógenos, produce sustancias aprovechables por el hospedador (como por ejemplo, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta) y estimula el sistema inmunitario de un modo no-inflamatorio (Gaggia y col., 2010).

En este contexto, actualmente los probióticos, prebióticos y simbióticos constituyen una opción muy interesante. Sus principales efectos son la mejora de la resistencia frente a la colonización por bacterias patógenas y la estimulación de la inmunidad de la mucosa del hospedador, lo que resulta en una reducción de la carga patogénica y una mejora en la salud del animal (Williams y col., 2001; Choct, 2009).

3.1. Definición y propiedades

Los probióticos han sido definidos de muchas formas a lo largo de los años. Una de las primeras definiciones fue la de Lilly y Stillwell (1965) (Lilly y Stillwell, 1965), en la que se consideran antónimos de los antibióticos, definiéndose como sustancias secretadas por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros.

En 1974, Parker (Parker, 1974) incluyó dentro de los probióticos a los microorganismos, e introdujo en la definición su papel en la estabilidad de la microflora intestinal, definiéndolos como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal.

Los probióticos según Fuller en 1989 (Fuller, 1989) son aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son suministrados como suplemento en la dieta y que benefician al huésped mejorando el equilibrio microbiano de su flora intestinal. Esta definición contempla el hecho de que los microorganismos están vivos, que se emplean como suplemento alimenticio y que deben beneficiar al hospedador para ser considerados probióticos.

En 1992, Havenaar y Huis extienden esta definición a la mezcla de microorganismos, al definirlos como cultivos vivos de una bacteria o una mezcla que, aplicado a un animal o al hombre, mejora las propiedades de su microflora indígena.

La Comisión Europea los definió en 1998 como ingredientes microbianos vivos de la dieta que son beneficiosos para la salud y la FAO (2001) (FAO, 2001) como microorganismos vivos que cuando se administran en la cantidad adecuada confieren beneficios al huésped.

Como vemos, las definiciones de probiótico son múltiples pero, en general, se consideran microorganismos vivos o mezclas de ellos que empleados como suplemento alimenticio en la dieta proporcionan beneficios al huésped. Estos beneficios pueden deberse a distintos mecanismos de acción: regulación de la homeostasis microbiana intestinal, estabilización de la barrera gastrointestinal (Salminen y col., 1996), expresión de bacteriocinas

(Mazmanian y col., 2008), producción de enzimas que inducen la absorción y mejoran la nutrición (Hooper y col., 2002; Timmerman y col., 2005), efectos inmunomoduladores (Salzman y col., 2003), inhibición de enzimas procarcinogénicas e interferencia con la habilidad de los patógenos para colonizar e infectar la mucosa (Gill, 2003). Se ha demostrado que los probióticos incrementan la secreción de moco activando la inflamación en los enterocitos del intestino (Chichlowski y col., 2007). Según Chichlowski y col. (Chichlowski y col., 2007), los probióticos pueden mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal a través de dos mecanismos. En primer lugar, la estimulación de la producción de moco por parte de las células caliciformes, distribuidas por todo el epitelio, y en segundo lugar, el mantenimiento de las uniones estrechas. Estas uniones forman una barrera biológica continua que previene la entrada de macromoléculas y bacterias patógenas. Las proteínas que las constituyen son estructuras dinámicas sujetas a cambios que modifican su función, y que por tanto son susceptibles a la actuación de agentes externos (Brown, 2011).

Estos microorganismos, ingeridos a través de la alimentación, han de tener unas propiedades determinadas para ser considerados probióticos y, a la vez, que hagan que su uso sea un método seguro (Tabla 3). En concreto, han de formar parte de la flora bacteriana "normal" del hospedador y deben llegar al intestino posterior viables y metabólicamente activos (Tamura, 1983), de modo que una vez allí, pueden proporcionar los beneficios ya descritos (Kageyama y col., 1984; Pochart y col., 1992; Elmer y col., 1996). Estas últimas características de los probióticos son difíciles de cumplir debido, por un lado, a la disponibilidad de sustratos, al potencial redox, al bajo pH, a la presencia de bilis y a la tensión de oxígeno en el colon y, por otro, a la amplia distribución de bacterias ya presentes en él. Todo ello hace que la supervivencia y la efectividad de los microorganismos ingeridos para producir la modulación de la microflora intestinal sea muy variable. En alimentación animal, los géneros de bacterias probióticas más estudiados son *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Enterococcus* y algunas levaduras como *Saccharomyces* (Gaggia y col., 2010) (Tabla 4).

Tabla 3. Características deseables y criterios de seguridad de los probióticos (adaptado de Gaggia y col., 2010).

No tóxico y no patogénico
Identificación taxonómica exacta
Habitante normal de la especie hospedadora
Supervivencia, colonización y actividad metabólica en el lugar de destino, lo que implica:
Resistencia al jugo gástrico y a la bilis
Persistencia en el tracto gastrointestinal
Adhesión al epitelio o al mucus intestinal
Competencia con la microbiota residente
Producción de sustancias antimicrobianas
Antagonismo con bacterias patógenas
Modulación de respuestas inmunitarias
Habilidad de ejercer al menos una propiedad promotora de la salud avalada científicamente
Genéticamente estable
Sensibilidad de la cepa y estabilidad de las características de interés durante el procesado y almacenamiento
Elevada viabilidad
Propiedades organolépticas y tecnológicas deseables cuando se incluyen en procesos industriales

Aunque todas las definiciones de probiótico hacen hincapié en la característica de microorganismos vivos, muchos de los efectos obtenidos al ser empleados como células viables se han obtenido también para poblaciones de células muertas, es decir, tanto células vivas como muertas pueden generar respuestas biológicas beneficiosas (Salinas y col., 2005, 2006; Díaz-Rosales y col., 2006; Adams, 2010). Además, la creciente preocupación por los problemas de seguridad derivados del uso extensivo de células vivas ha aumentado el interés por el uso de microorganismos no viables y/o de sus extractos celulares. Así, el uso de probióticos muertos como moduladores de las respuestas biológicas tiene importantes ventajas, ya que pueden ser muy seguros y tienen una vida útil más larga (Adams, 2010), además de eliminar los problemas de contaminación del medio con microorganismos vivos y reducir los riesgos de translocación bacteriana e infección (Taverniti y Guglielmetti, 2011). Siguiendo la línea de la FAO/WHO en la definición de probiótico, indicando que este término debe referirse a productos que contienen microorganismos vivos y considerando la evidencia científica de que microorganismos inactivados pueden afectar positivamente a la salud, Taverniti y Guglielmetti (2011) han propuesto recientemente el nuevo término "paraprobiótico" para indicar el uso de células microbianas inactivadas o fracciones celulares para conferir un beneficio en la salud del consumidor.

Un prerrequisito para la supervivencia de los probióticos en el tracto digestivo es la disponibilidad de carbohidratos fermentables que no hayan sido metabolizados en el sistema digestivo hasta llegar al colon. De aquí surge el concepto de prebiótico, definidos como ingredientes alimenticios no digeribles que benefician al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un número limitado de bacterias en el intestino (Gibson y Roberfroid, 1995).

Tabla 4. Probióticos estudiados para su aplicación en alimentación animal (adaptado de Gaggia y col., 2010).

Género	Especie
<i>Aspergillus</i>	<i>A. orizae</i> <i>A. niger</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> <i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. farmicinis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. murinus</i> <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. amylovorus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pastorianus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> <i>S. thermophilus</i>

Para que una sustancia sea clasificada como prebiótico debe cumplir al menos estos tres criterios: 1) no debe ser hidrolizado ni absorbido en el estómago o el intestino, 2) debe ser selectivo para bacterias comensales beneficiosas, y 3) su fermentación debe inducir efectos beneficiosos locales o sistémicos en el hospedador (Manning y Gibson, 2004). Comparados con los probióticos, que introducen bacterias exógenas en el intestino del hospedador, los

prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas ya existentes en el intestino. Los efectos atribuidos a los prebióticos en el tracto gastrointestinal se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Funciones intestinales atribuidas a los prebióticos (adaptado de Gaggia y col., 2010).

Fibras dietéticas y funciones gastrointestinales	
Efectos en el tracto gastrointestinal anterior	Resistencia a la digestión Vaciado gástrico retardado Incremento del tiempo de tránsito oro-cecal Reducción de la absorción de glucosa y menor glucemia Hiperplasia del epitelio en el intestino delgado Estimulación de la secreción de hormonas peptídicas intestinales
Efectos en el tracto gastrointestinal posterior	Actuación como alimento para microflora intestinal Sustrato para la fermentación por la microflora Producción de productos finales de fermentación Estimulación de la fermentación sacarolítica Hiperplasia del epitelio intestinal Estimulación de la secreción de hormonas peptídicas intestinales Regulación de la producción de heces (frecuencia y consistencia) Aceleración del tránsito ceco-anal

De entre todos los prebióticos que existen en la naturaleza, los que tienen un uso potencial como posibles aditivos de los alimentos deben ser, además de no digeribles, muy estables químicamente, no precisar refrigeración para su conservación y de fácil y rápida incorporación a los alimentos procesados. La mayoría de los prebióticos identificados son carbohidratos y oligosacáridos con diferentes estructuras moleculares, presentes habitualmente en la dieta, como las fibras, aunque los más prometedores son los oligosacáridos no digeribles (ODNs). Hasta la fecha, los prebióticos más ampliamente estudiados son los fructanos inulina y oligofructosa, derivados de las raíces de la achicoria (Roberfroid, 2005; Bosscher y col., 2006, 2009; Seifert y Watzl, 2007; Kelly, 2009). Sin embargo, otros oligosacáridos como los xilo-oligosacáridos, derivados de materiales ricos en xilano, constituyen carbohidratos no digeribles emergentes que pueden presentar las mismas o incluso más propiedades deseables que los prebióticos establecidos, aunque su producción y uso no están ampliamente distribuidos (Vázquez y col., 2000; Drakoularakou y col., 2004).

Otros oligosacáridos con propiedades prebióticas potenciales incluyen los transgalactooligosacáridos, lactulosa, isomalto-oligosacáridos, lactosacarosa, oligosacáridos de la soja y gluco-oligosacáridos (Mikkelsen y Jensen 2004; Vulevic y col. 2004). Recientemente, se han añadido a la lista de prebióticos un nuevo β -glucano, obtenido por la hidrólisis parcial de β -glucano de la cebada y los arabinoxilo-oligosacáridos, producidos por hidrólisis de cereales

ricos en arabinosilanos (Grootaert y col., 2007). También se han estudiado las propiedades prebióticas de los carbohidratos procedentes de macroalgas marinas (O'Sullivan y col., 2010).

Los prebióticos ejercen su acción a través del impacto positivo que tienen sobre la microflora intestinal, aunque otros efectos de los prebióticos, como la modulación del metabolismo de la flora intestinal y las propiedades inmunomoduladoras son indirectos, es decir, mediados por la microflora intestinal (de Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Por último, los simbióticos se definen como una combinación de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al hospedador mejorando la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de la dieta en el tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Los probióticos y prebióticos al combinarse en un simbiótico pueden tener un efecto sinérgico, mejorando el efecto que tienen al administrarse por separado. El uso de simbióticos como promotores de la salud está aún poco definido y los estudios son escasos. En humanos, la aplicación de simbióticos ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de determinadas enfermedades (Firmansyah y col., 2011; Quigley, 2011), mientras que en individuos sanos, se ha observado que el consumo de un producto simbiótico mejora la percepción subjetiva del bienestar gastrointestinal y podría mejorar el perfil de las moléculas de adhesión en el intestino (Nova y col., 2011).

En ratones, se ha observado que la administración conjunta de *Lactobacillus helveticus* M92 e inulina ejerce un mayor efecto positivo sobre la microflora intestinal simbiótica y fecal y el sistema inmunológico de los ratones que la administración de la bacteria y el prebiótico por separado (Frece y col., 2009). Un estudio reciente en ratas ha demostrado que la administración de un simbiótico compuesto por *Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium lactis* e inulina incrementa el número de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino, además de aumentar la concentración plasmática de calcio (Naughton y col., 2011).

3.2. Empleo de probióticos y prebióticos en acuicultura

En acuicultura, estos tratamientos están destinados principalmente a mejorar el sistema inmunitario y la resistencia a enfermedades, siendo por tanto importantes medidas de prevención con las que se pretende reducir el empleo de antibióticos y mejorar el estado de salud de los animales en cultivo (Merrifield y col., 2010). Su empleo es de especial interés en larvicultura, sobre todo en especies que presentan una aparición tardía del sistema inmunitario adaptativo, como muchas especies marinas (Bricknell y Dalmo, 2005), pero también se han demostrado efectos beneficiosos sobre parámetros del sistema inmunitario adaptativo y sobre

la producción de anticuerpos en peces inmunocompetentes (Kesarodi-Watson y col., 2008; Ringø y col., 2010). Esta estrategia ofrece innumerables ventajas, permitiendo superar las limitaciones y los efectos secundarios derivados del uso de antibióticos y otras drogas, favoreciendo una mayor producción a través de un incremento en el crecimiento y la resistencia a enfermedades (Mishra y col., 2001; Das y col., 2008; Sahu y col., 2008; Mehrim, 2009).

Generalmente, la administración de estos aditivos se realiza por vía oral, incluyéndolos en el alimento, aunque en el caso de administrar el probiótico o prebiótico como adyuvante para una vacuna se emplea la inoculación (Kamilya y col., 2006). El uso de este tipo de aditivos en acuicultura también puede ser de interés en periodos de estrés, por ejemplo durante la maduración sexual y la puesta, o durante la manipulación y el transporte de ejemplares (Jeney y col., 1997; Bagni y col., 2005).

Dada la naturaleza del cultivo de peces y la estrecha relación de estos animales con su ambiente, el término probiótico tuvo que ser modificado para ser aplicado a la acuicultura. Los peces, al ingerir agua constantemente, poseen una microflora intestinal transitoria que puede cambiar rápidamente con la inclusión de microorganismos provenientes tanto del agua como del alimento (Moriarty, 1998).

La evolución de la definición de probiótico durante los años 90 ha sido discutida por Gómez-Gil y col. (2000) (Gomez-Gil y col., 2000). Durante este periodo, la definición se fue refinando y se propusieron nuevos conceptos para la aplicación de microorganismos en acuicultura. Los microorganismos antagónicos a patógenos aplicados en el medio, pero que no aparecen en la microflora intestinal transitoria ni residente, se han definido como agentes de biocontrol (Maeda y col., 1997; Moriarty, 1998), mientras que las aplicaciones de microorganismos que mejoran la calidad del agua mediante la descomposición de los residuos o contaminantes se ha denominado biorremediación (Moriarty, 1997, 1998; Gatesoupe, 1999). A partir de entonces, muchos autores han propuesto definiciones de probióticos para acuicultura que incluyen la administración a través del agua de cultivo pero tienden a restringir las aplicaciones a microorganismos que de algún modo son promotores de la salud (Spanggaard y col., 2001; Irianto y Austin, 2002). Contrariamente a estas definiciones, algunas otras no se centran solamente en los beneficios para la salud (Moriarty, 1998; Gram y col., 1999; Verschuere y col., 2000; Farzanfar, 2006). Verschuere y col. (2000) (Verschuere y col., 2000) definen los probióticos como microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso sobre el hospedador modificando la comunidad microbiana relacionada con el hospedador o con el ambiente, a través de una mejora del uso del alimento o de su valor nutricional, de la respuesta del hospedador a las enfermedades, o de la calidad de su ambiente.

Combinando todas las definiciones propuestas, un probiótico en acuicultura es un microorganismo vivo, muerto o un fragmento de ellos que, cuando se administra a través de la alimentación o del agua de cultivo, beneficia al hospedador mejorando su resistencia a enfermedades, estado de salud, crecimiento, utilización del alimento, respuesta al estrés o vigor general, lo que se logra, al menos en parte, debido a la mejora del balance microbiano del hospedador o del entorno ambiental (Merrifield y col., 2010).

El uso de probióticos está bien establecido en el cultivo de muchos animales domésticos y ha sido introducido en los últimos años en acuicultura. Los probióticos que se han probado han sido un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas y levaduras entre las que destacan especies de *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Saccharomyces* y bacterias lácticas, generalmente con buenos resultados (Merrifield y col., 2010; Nayak, 2010; Dimitroglou y col., 2011; Rombout y col., 2011). Además, están disponibles comercialmente para su uso en acuicultura algunos probióticos en forma de suplementos de una o varias especies (Gatesoupe, 1999; Decamp y Moriarty, 2006).

La búsqueda de bacterias probióticas para su uso en acuicultura implica el mapeo de la flora bacteriana asociada con el pez bajo estudio y/o su ambiente. Se debe examinar la actividad antimicrobiana frente a patógenos de peces, la patogenicidad en el hospedador y, finalmente, los efectos sobre el crecimiento y la supervivencia de larvas o peces infectados experimentalmente (Kesarodi-Watson y col., 2008). En la literatura se han descrito varios experimentos de este tipo en los que el producto utilizado ha demostrado tener efectos beneficiosos para el pez (Fjellheim y col., 2007; Gatesoupe, 2007; Lauzon y col., 2008, 2010; Sharifuzzaman y Austin, 2009). Así mismo, hay algunas evidencias que indican que las bacterias probióticas aisladas del hospedador o de su ambiente son más beneficiosas que muchos productos disponibles comercialmente (Lauzon y col., 2010).

Aún no se conoce completamente el modo de acción de las bacterias probióticas. Numerosos microorganismos han sido identificados como probióticos para la acuicultura, muchos de los cuales difieren bastante en su modo de acción. Hay, sin embargo, algunos mecanismos de acción comunes que han sido descritos para la mayoría de las cepas probióticas. Los probióticos mejoran la eficiencia de conversión alimenticia y la ganancia de peso vivo y confieren protección frente a patógenos mediante la competencia por los sitios de adhesión, la producción de ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico), peróxido de hidrógeno y otros compuestos como antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisozima y modulan respuestas fisiológicas e inmunológicas en los peces (Nayak, 2010).

Entre los numerosos efectos beneficiosos de los probióticos, la modulación del sistema inmunitario es uno de los beneficios más interesantes. Se han llevado a cabo numerosos estudios inmunológicos en varias especies de peces empleando diferentes probióticos y su capacidad para estimular el sistema inmunitario (de forma local o sistémica) tanto *in vivo* como *in vitro* es ampliamente aceptada (Merrifield y col., 2010; Nayak, 2010; Dimitroglou y col., 2011; Rombout y col., 2011).

Cuando la inclusión de probióticos cesa, éstos desaparecen del sistema digestivo del hospedador en unos días o unas pocas semanas. Sin embargo, en ocasiones, los efectos beneficiosos pueden ser de larga duración (Nikoskelainen, 2003; Planas y col., 2006). Además de los efectos nutricionales y otros beneficios sobre la salud determinados probióticos administrados como aditivos en el agua juegan un papel significativo en la descomposición de materia orgánica, reducción de los niveles de fósforo y nitrógeno, así como el control de amonio, nitratos y sulfuro de hidrógeno (Boyd y Massaut, 1999).

El uso de probióticos en muchos casos puede plantear dificultades en la acuicultura comercial. Como una alternativa, o también para ser administrados conjuntamente (simbióticos) se han evaluado las propiedades de diferentes prebióticos en peces. Los prebióticos comenzaron a estudiarse en peces en el año 1995 (Hanley y col., 1995) y, desde entonces, se han llevado a cabo diversos estudios que han demostrado algunos efectos beneficiosos (Burr y col., 2005; Ringø y col., 2010). Los prebióticos estudiados en peces hasta la fecha incluyen inulina, fructooligosacáridos, fructooligosacáridos de cadena corta, mananoligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, arabinosilooligosacáridos e isomaltooligosacáridos. Aunque estos prebióticos son mayoritariamente aditivos y fibras derivados de plantas, no están presentes en la dieta de peces de manera natural, especialmente en peces carnívoros, el potencial prebiótico de los oligosacáridos y otras fibras dietéticas pueden tener interesantes aplicaciones en acuicultura, con el objetivo de estimular la salud intestinal y la presencia de bacterias intestinales beneficiosas, así como eliminar las bacterias potencialmente perjudiciales (Ringø y col., 2010). Entre los efectos beneficiosos que se han descrito para los prebióticos en peces se encuentran el incremento en la tasa de crecimiento, la estimulación del sistema inmunitario, cambios en la microflora intestinal y alteraciones de la morfología del intestino (Olsen y col., 2001; Bakke-McKellep y col., 2007; Torrecillas y col., 2007).

A pesar de los numerosos estudios que evalúan la eficacia de los probióticos y prebióticos en peces, la aplicación combinada de ambos aditivos (simbióticos) ha recibido hasta ahora muy poca atención y los datos disponibles son todavía muy escasos. Hasta la fecha, solo cinco estudios han investigado el efecto de los simbióticos en peces. En ellos, se han evaluado

simbióticos en los que se emplean como probióticos dos géneros de bacterias, *Enterococcus* spp y *Bacillus* spp y como prebióticos fructooligosacáridos y mananoligosacáridos, en cuatro especies de peces: trucha arco iris, lenguado japonés, corvina y cobia (Rodríguez-Estrada y col., 2009; Ai y col., 2011; Geng y col., 2011; Ye y col., 2011; Mehrabi y col., 2012). En estos estudios se ha demostrado la capacidad sinérgica de algunas combinaciones simbióticas, así como efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la utilización del alimento, el aumento de la supervivencia, la mejoría en el sistema inmunitario y la resistencia a enfermedades. En la tabla 6 se recogen algunos de los estudios más recientes sobre probióticos, prebióticos y simbióticos en peces.

En conclusión, muchos de los efectos descritos para estos aditivos dependen en gran medida de la especie de pez, la duración del tratamiento y la dosis, así como del tipo de probióticos y prebióticos evaluados. Por otra parte, aspectos como los efectos sobre la microflora intestinal, las barreras mucosas, la morfología celular y los mecanismos que median estos efectos (tales como la expresión génica) han sido muy poco estudiados. Por tanto, es necesario realizar nuevos estudios, especialmente para determinar los niveles adecuados y las condiciones específicas de administración, con el objetivo de obtener las respuestas esperadas en peces.

Tabla 6. Estudios recientes (ordenados cronológicamente) sobre probióticos, prebióticos y simbióticos en peces.

Prebiótico/probiótico /simbiótico	Especie	Efectos observados	Referencia
AXOS	<i>Acipenser baerii</i>	Modulación de la flora intestinal	Delaedt y col., 2008
AXOS	<i>Clarias gariepinus</i> <i>Acipenser baerii</i>	→ crecimiento ↑ producción acetato, propionato y SCFA → producción de butirato	Rurangwa y col., 2008
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	↑ células T y granulocitos acidófilos en intestino ↓ IL-1 β , IL-10, Cox-2, TGF- β ↑ TcR- β	Abelli y col., 2009
<i>Lactobacillus fructivorans</i> + <i>L. plantarum</i>	<i>Sparus aurata</i>	↑ células Ig ⁺ y granulocitos acidófilos en intestino	Abelli y col., 2009
<i>Enterococcus faecalis</i> /MOS, PHB	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	↑ crecimiento ↑ hematocrito, fagocitosis, producción de moco ↑ resistencia frente a <i>Vibrio anguillarum</i>	Rodriguez-Estrada y col., 2009
XOS	<i>Carassius auratus</i>	↑ crecimiento ↑ enzimas digestivas	Xu y col., 2009
GroBiotic-A, inulin, MOS, GOS	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	↑ proteína total con GroBiotic-A Alteraciones en la microflora intestinal	Burr y col., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P13	<i>Epinephelus coioides</i>	↑ crecimiento ↑ resistencia frente a <i>Streptococcus</i> sp. e iridovirus ↑ fagocitosis, explosión respiratoria, superóxido dismutasa, lisozima y complemento	Chiu y col., 2010
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Modulación de la flora intestinal Estimulación de respuestas inmunitarias inespecíficas	Ferguson y col., 2010
<i>Lactobacillus sakei</i> BK19	<i>Epinephelus bruneus</i>	↑ resistencia frente a <i>Streptococcus iniae</i> y <i>Streptococcus parauberis</i> ↑ fagocitosis, peroxidasa, lisozima y proteína total sérica	Harikrishnan y col., 2010b
Pdp 11	<i>Solea senegalensis</i>	Cambios en la microflora intestinal: ↑ especies de <i>Vibrio</i>	Tapia-Paniagua y col., 2010
<i>Bacillus subtilis</i> /FOS	<i>Larimichthys crocea</i>	↑ crecimiento y resistencia frente a <i>Vibrio harveyi</i> ↑ eficiencia alimenticia ↑ lisozima y SOD	Ai y col., 2011
<i>Bacillus subtilis</i> /Chitosan	<i>Rachycentron canadum</i>	↑ crecimiento ↑ lisozima, actividad del complemento, fagocitosis y explosión respiratoria ↑ resistencia frente a <i>Vibrio harveyi</i>	Geng y col., 2011
Biomim IMBO (<i>Enterococcus faecium</i> /FOS)	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	↑ crecimiento y supervivencia ↑ eficiencia alimenticia ↑ proteína total sérica → globulina, triglicéridos	Mehrabi y col., 2012
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑ resistencia frente a <i>Lactococcus garvieae</i> ↑ expresión genes inmunitario	Pérez-Sánchez y col., 2011
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Clarias gariepinus</i>	↑ actividad bactericida ↑ granulocitos	Reneshwary y col., 2011
<i>Bacillus clausii</i> /MOS, FOS	<i>Paralichthys olivaceus</i>	↑ crecimiento ↑ proteasa, amilasa ↑ lisozima	Ye y col., 2011

Los símbolos representan un incremento (↑), un descenso (↓) o no efecto (→) sobre la respuesta especificada. MOS: mananoligosacáridos, FOS: fructooligosacáridos, GOS: galactooligosacáridos, PHB: polihidroxitirato, SOD: superóxido dismutasa.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Peces

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron un total de 774 ejemplares de dorada (*Sparus aurata* L.) de un peso medio comprendido entre los 50 y 175 g, procedentes de las piscifactorías CULMAREX S.A. (Águilas, Murcia) y PREDOMAR S. L. (Carboneras, Almería). Los peces fueron recogidos y transportados en un tanque de 500 litros con aireación continua.

Los ejemplares fueron mantenidos en acuarios de 200-260 litros de capacidad, provistos de un sistema de aireación, filtro biológico, filtro de carbón activo y un circuito cerrado de agua con una velocidad de flujo de 1500 litros/hora. Los parámetros y la calidad del agua fueron controlados semanalmente y mantenidos constantes. Así, el pH se mantuvo entre 7'5-8'0, la temperatura entre 20-22° C y el fotoperiodo fue de 12h luz/12h oscuridad. Las concentraciones de amoníaco y de nitritos se mantuvieron por debajo de 0'02 mg/l y 0'1 mg/l respectivamente.

Todos los peces utilizados fueron sometidos a un baño preventivo de formaldehído (37%, 30 min, Panreac) y mantenidos en cuarentena durante al menos 15 días, sin que se pusiera de manifiesto ninguna enfermedad.

Durante el tiempo de experimentación, los animales fueron alimentados con pienso comercial sin suplementar o pienso comercial suplementado, a razón de un 1% de su biomasa por día. Los ejemplares permanecieron en ayunas durante 24 h previamente a la obtención de muestras.

2. Bacterias

En el presente trabajo se emplearon dos cepas bacterianas diferentes. Por un lado, el probiótico *Bacillus subtilis*, y por otro, el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

La cepa de *B. subtilis* empleada fue la número 35 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 35, Valencia, España). En primer lugar, la bacteria se cultivó en placas de agar nutritivo (Laboratorios Conda, Madrid) (ph 6.8) durante 2-3 días a una temperatura de 30°C. A continuación, las colonias de estas placas fueron subcultivadas en 750 ml de caldo nutritivo (Laboratorios Conda, Madrid), con agitación continua durante 15 h (ver Anexo 1).

La cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Lg_{h41/01}, aislada de lenguados enfermos (*Senegalese sole*) y cortesía del Dr. Moriñigo (Málaga, Spain), fue seleccionada para comprobar la capacidad protectora de las dietas ensayadas. Esta bacteria fue cultivada en placas de agar soja-triptona (Laboratorios Conda, Madrid) suplementado con 1.5% NaCl (TSAs) durante

24 h a 22°C y subcultivada en 750 ml de caldo soja-triptona (Laboratorios Conda, Madrid) también suplementado con 1.5% NaCl (TSBs) en agitación continua durante 24 h (ver Anexo 1).

Ambos cultivos fueron centrifugados a 6000 g durante 15 min a 4°C y lavados en tampón fosfato salino estéril (PBS, pH 7.4). Las bacterias fueron contadas en un contador de partículas (Z2 Coulter) y ajustadas a la concentración requerida, que será detallada en los apartados correspondientes.

3. Preparación de dietas

Para la elaboración de las dietas empleadas en la presente Tesis Doctoral, se seleccionó como base un pienso comercial (Skretting, Burgos) específico de dorada. Este pienso fue disgregado con la ayuda de un molinillo y se adicionó la cantidad de inulina, microalgas o probiótico requerida para obtener las concentraciones finales deseadas. La mezcla se agitó hasta obtener una distribución homogénea del aditivo en el pienso. Posteriormente, se adicionó agua y se continuó mezclando con una amasadora con el fin de obtener una masa compacta de la cual se obtuvieron granos de pienso con un tamaño similar al de partida. Los piensos se dejaron secar y se conservaron a 4°C durante el tiempo de experimentación.

4. Obtención de muestras

Los muestreos consistieron en la extracción de sangre, riñón cefálico e intestino. Las muestras de sangre fueron recogidas mediante punción en la vena caudal con una jeringuilla de 1 ml sin heparinizar. Las muestras se dejaron coagular a 4°C durante al menos 4 horas y, a continuación, fueron centrifugadas (10.000 g, 5 min). El suero se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la obtención del riñón cefálico y del intestino, los peces fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico (MS222, Sandoz, 100 mg/ml de agua) (Esteban y Meseguer, 1994) y desangrados mediante punción en la vena caudal para evitar la contaminación de las muestras por eritrocitos. Tanto el riñón cefálico como el intestino fueron extraídos mediante disección en condiciones de esterilidad.

Un pequeño fragmento de riñón cefálico fue reservado para el análisis de la expresión de genes (se detalla posteriormente). El resto del órgano se puso en 8 ml de medio de cultivo sRPMI-1640 [RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 0'35% de cloruro sódico, con el fin de ajustar la osmolaridad del medio (280 mOsm) a la del suero de dorada (366 mOsm), 100 µg/ml

de penicilina (Flow), 100 µg/ml de estreptomycin (Flow) y un 3% de suero bovino fetal (SBF, Gibco)], con 10 µg/ml de heparina (Sigma) (medio de aislado). A continuación, se obtuvieron suspensiones celulares mediante el tamizado de los fragmentos de riñón cefálico a través de mallas de nylon de un tamaño de poro de 100 µm. Las suspensiones celulares obtenidas fueron centrifugadas (482 g, 10 min, 25°C) (Minifugue T, Heraeus), tras lo cual se obtuvo un poso celular correspondiente, muy mayoritariamente, a los leucocitos. Dichos leucocitos fueron recogidos, resuspendidos en medio sRPMI-1640 sin heparina (medio de lavado) y centrifugados nuevamente (482 g, 10 min, 25°C). Se realizaron tres lavados, tras lo cual los leucocitos fueron recogidos, resuspendidos, contados en un hemocitómetro de Neubauer y ajustados a 10^7 células/ml en sRPMI-1640. La viabilidad celular fue siempre superior al 90% y se determinó mediante el test de exclusión del azul tripano (Sigma) (Phillips, 1973). Las suspensiones celulares obtenidas se emplearon en los ensayos funcionales posteriores.

De cada uno de los ejemplares estudiados, se extrajo el intestino completamente, desde el estómago hasta el ano. Varios fragmentos de medio centímetro del intestino anterior fueron procesados para microscopía óptica (LM), microscopía electrónica y análisis de la expresión de genes, mientras que el intestino restante se conservó a -20°C para el análisis de la microflora intestinal.

5. Crecimiento de *Bacillus subtilis* en presencia de inulina y microalgas

Con el objetivo de evaluar la capacidad de *B. subtilis* para crecer empleando la inulina o las microalgas como fuentes de carbono y energía, se llevó a cabo un experimento *in vitro*.

En primer lugar, las microalgas fueron sometidas a un proceso de digestión *in vitro* para simular el que tendría lugar en el tracto digestivo de los peces. Para ello, se siguió el protocolo propuesto por Domínguez-González y col. (Domínguez-González y col., 2010) basado en la simulación de la digestión gástrica e intestinal, sobre el que se hicieron algunas modificaciones.

Se pesaron 0.5 g de cada microalga (*Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricoratum*, EasyAlgae, España) y se colocaron en frascos Erlenmeyer con 20 ml de agua ultrapura. Estas muestras fueron incubadas en agitación a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se ajustó el pH a 2 con una solución 6 M de ácido clorhídrico (Sigma) y se añadió a cada muestra 0.15 g de una solución recién preparada de pepsina (6.0% m/v, Sigma) en ácido clorhídrico 0.1 M (digestión gástrica). Los frascos fueron tapados e incubados a 22°C con agitación orbital (150 rpm) durante 12 h. A continuación, se llevó a cabo la digestión intestinal, añadiendo a cada frasco 5 ml de solución de pancreatina (0.4% m/v, Sigma) y sales biliares (2.5%

m/v, Sigma) en hidrógeno-carbonato de sodio 0.1 M (digestión intestinal). Los frascos fueron incubados de nuevo a 22°C con agitación orbital (150 rpm) durante 12 h. La reacción enzimática se detuvo mediante la inmersión de los frascos en un baño de agua-hielo. La solución resultante de la digestión fue centrifugada (6.000 g, 15 min, 4°C) y el sobrenadante recogido para su uso en la prueba de crecimiento.

Los sobrenadantes obtenidos de la digestión de las dos microalgas se diluyeron al 1%, y se dispusieron 100 µl en placas de 96 pocillos. Disoluciones de inulina y glucosa (control positivo) al 1% fueron dispuestas del mismo modo.

Las bacterias se cultivaron como se ha expuesto anteriormente, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. A continuación, fueron lavadas en PBS estéril, contadas con una cámara de Neubauer e inoculadas en las placas de 96 pocillos a una densidad de 10^5 cfu/ml. Como control negativo, se incluyeron pocillos con las disoluciones de microalgas, inulina y glucosa pero sin bacterias. Las placas fueron incubadas a 22°C durante 48 horas y el crecimiento monitorizado cada 20 minutos midiendo la densidad óptica del cultivo (600 nm) con un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy).

6. Sistema inmunitario

Los parámetros del sistema inmunitario analizados correspondieron a actividades tanto de la respuesta humoral (actividad hemolítica del complemento, niveles de IgM y peroxidasa sérica) como de la respuesta celular (explosión respiratoria, peroxidasa intraleucocitaria y fagocitosis), para lo cual se emplearon las muestras de suero y de suspensiones celulares de leucocitos obtenidas en la disección de los ejemplares.

Los resultados cuantitativos obtenidos de todas estas actividades fueron expresados en el apartado de resultados como incremento relativo ($\text{media} \pm \text{error estándar}$), obtenido al dividir el valor obtenido para cada muestra entre el valor obtenido para el control correspondiente y restándole uno. De esta forma, el nivel del control queda establecido en 0, de modo que valores superiores a 0 expresan un incremento y valores inferiores a 0 un descenso en la actividad estudiada.

6.1. Actividad hemolítica del complemento

La actividad hemolítica del complemento, mediada por la ruta alternativa, fue cuantificada mediante el ensayo de la actividad hemolítica del suero, utilizando eritrocitos de

sangre de carnero (SRBC) como células diana (Ortuño y col., 1998). Para ello, se preparó una suspensión de sangre de carnero desfibrinada y esterilizada (Biomedics) al 3% en tampón de Hanks suplementado con Mg^{2+} (10 mM) y ácido N,N,N',N'-tetraacético (EGTA, Sigma) (10mM). Esta suspensión de SRBC al 3% fue lavada previamente en tampón de Hanks suplementado, mediante centrifugación a 400 g, 4°C, durante 10 min. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos.

Para cada muestra de suero se prepararon diluciones seriadas en tampón Hanks suplementado, siendo el volumen por pocillo de 100 μ l y las proporciones suero:tampón las comprendidas entre 1:4 y 1:512. Después, se adicionaron 100 μ l de SRBC al 3% a cada pocillo. Las muestras fueron incubadas durante 60 min a 25°C y centrifugadas (800 g, 5 min, 4°C), para eliminar los restos celulares y los eritrocitos sin lisar. A continuación, los sobrenadantes fueron recogidos y colocados en una placa nueva para la lectura de su absorbancia (debida a la hemoglobina liberada) a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy).

Como control negativo se prepararon muestras con tampón Hanks sin Mg^{2+} y suplementado con EGTA (10 mM), y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (20 mM). El valor máximo (100%) y mínimo de hemolisis (hemolisis espontánea) se obtuvo mediante la adición de agua destilada o tampón de Hanks suplementado en lugar de suero, respectivamente.

El porcentaje de hemolisis (Y) fue determinado mediante la ecuación:

$$Y = 100 \times \frac{\text{Abs P} - \text{Abs E}}{\text{Abs M} - \text{Abs E}}$$

Abs: Absorbancia a 540 nm

P: muestra problema

E: muestra de hemolisis espontánea (valor mínimo)

M: muestra de hemolisis máxima (valor máximo)

Los valores $Y/(100-Y)$ fueron representados frente al volumen de suero utilizando una escala logarítmica. De esta gráfica se extrapoló el valor ACH_{50} , que es el volumen del suero capaz de producir un 50% de hemolisis ($Y=50$). Los valores finales fueron expresados como número de unidades de ACH_{50} /ml de suero.

6.2. Niveles de IgM en suero

Los niveles totales de IgM en suero se analizaron mediante un ensayo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Cuesta y col., 2004). En primer lugar, el suero obtenido en los

muestras se diluyó a 1/100 en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9.6). Se colocaron 100 µl del suero diluido por triplicado en placas de 96 pocillos, y se fijaron las proteínas incubando la placa durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.05% Tween 20, pH 7.3) y se bloquearon los sitios de unión a proteína mediante la incubación con tampón de bloqueo (PBS-T con 3% de albúmina de suero bovino) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente con PBS-T (tres lavados, 5 min, 200 µl), las placas fueron incubadas durante 1 h con 100 µl por pocillo del anticuerpo primario, un anti-IgM de dorada hecho en ratón (Aquatic Diagnostics Ltd.) (1/100 en tampón de bloqueo). Tras lavar nuevamente, se incubaron las placas con el anticuerpo secundario (anti-ratón IgG-HRP, 1/1.000 en tampón de bloqueo). A continuación, se lavó exhaustivamente con PBS-T, y se reveló con 100 µl de una solución 0.42 mM de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) y 0.01% H₂O₂ preparada en el momento de usar. La reacción se dejó incubar durante 10 minutos, y se paró mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2M. Las placas se leyeron a 450 nm. Los controles negativos consistieron en muestras sin suero o sin anticuerpo primario, cuyos valores de absorbancia fueron restados del valor de cada muestra.

6.3. Explosión respiratoria

La explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico de dorada fue estudiada mediante quimioluminiscencia, siguiendo la metodología de Bayne y Levy (1991) (Bayne y Levy, 1991). Para ello, se prepararon disoluciones de trabajo de 1 mg/ml de forbol miristato acetato (PMA, Sigma) en etanol y de 10⁻² M de luminol (Sigma) en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), que fueron almacenadas a -20°C y 4°C, respectivamente. A partir de estas disoluciones se prepararon otras que contenían conjuntamente PMA y luminol a unas concentraciones finales de 1 µg/ml y 10⁻⁴ M, respectivamente, en tampón Hanks (HBSS) con Ca²⁺ y Mg²⁺. En presencia de los radicales de oxígeno producidos en la explosión respiratoria, el luminol se oxida y emite luminiscencia. Esta luminiscencia se detecta y cuantifica en un fluorímetro. Los ensayos de explosión respiratoria se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos.

En cada pocillo se dispensaron 100 µl de la suspensión de leucocitos y 100 µl de la disolución de PMA y luminol. Las placas fueron agitadas e inmediatamente leídas en un fluorímetro (BMG, Fluoro Star Galaxy) que fue programado para realizar mediciones en 30 ciclos de 2 minutos cada uno. La cinética de las reacciones fue analizada y la pendiente máxima de cada curva estimada. También se incluyeron controles consistentes en la adición a cada muestra

de una disolución que contenía luminol pero no PMA, y un control con todos los reactivos pero sin células.

6.4. Actividad peroxidasa

El contenido de peroxidasa presente en el interior de los leucocitos de riñón cefálico de dorada fue determinado siguiendo la metodología de Rodríguez y col., (2003) (Rodríguez y col., 2003). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, para ello, se colocaron 5 μ l de la suspensión de leucocitos por pocillo y cada muestra por triplicado. Los leucocitos fueron lisados mediante la incubación con 50 μ l de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma) en agitación a 40 ciclos/min en un agitador de placas (IUL) durante 10 min. Seguidamente, en cada pocillo se adicionaron 100 μ l de una solución 20 mM de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) y 5 mM de H₂O₂ (Sigma), ambos sustratos de la peroxidasa. Transcurridos 50 segundos, la reacción fue inmediatamente parada mediante la adición de 50 μ l de ácido sulfúrico (2 M). A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy). Se incluyeron muestras control que contenían TMB y H₂O₂ sin leucocitos.

El contenido de peroxidasa presente en las muestras de suero se determinó mediante el mismo protocolo con algunas modificaciones. Se partió de un volumen inicial de 15 μ l y se omitió el paso de lisado de las células con CTAB.

6.5. Fagocitosis

La actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de dorada fue estudiada mediante citometría de flujo, siguiendo la metodología de Esteban y col. (1998) (Esteban y col., 1998). Para estos ensayos se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) como partícula susceptible de ser fagocitada.

Las levaduras fueron liofilizadas e inactivadas por calor. Para marcar las levaduras con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se colocó una pequeña cantidad de estas levaduras en un tubo de 15 ml, que se llenó con medio de cultivo sRPMI-1640. A continuación, se agitó con ayuda de una jeringuilla para deshacer todos los grumos, y se contaron y ajustaron las levaduras presentes a 10⁸ levaduras/ml. Se preparó otro tubo con 15 ml de sRPMI-1640 con una concentración de 10 μ g/ml de FITC (Sigma). Se unieron las dos soluciones en un tubo de 50 ml que se mantuvo en oscuridad, agitando a 40 ciclos por minuto durante 15 minutos (22°C). La concentración final de FITC fue de 5 μ g/ml y la de levadura 0'5x10⁸ levaduras/ml. Pasado el

tiempo de agitación, la muestra se centrifugó (858 g, 5 min). Se descartó el sobrenadante, se añadieron 40 ml de sRPMI-1640 y se resuspendió. La muestra se centrifugó de nuevo y se lavó hasta 5 veces. En el último lavado, tras descartar el sobrenadante, se adicionaron 20 ml de medio y se resuspendió nuevamente. A continuación, se comprobó el marcado en el citómetro, se alicuotó y se congelaron las muestras a -80°C .

Para la realización de los ensayos de fagocitosis, se dispusieron 100 μl de la suspensión de leucocitos en tubos de citómetro, a los que se adicionaron 60 μl de la levadura marcada con FITC, resultando una proporción de 6'25 levaduras por cada leucocito. Las muestras fueron centrifugadas (482 g, 5 min), mantenidas en oscuridad 5 min, resuspendidas e incubadas a 25°C durante 25 min. Trascorrido este tiempo, se detuvo la fagocitosis adicionando 500 μl de tampón fosfato salino (PBS) frío a cada muestra y poniendo los tubos en hielo. La fluorescencia de las bacterias no ingeridas, es decir, libres o adheridas a la membrana de los fagocitos pero no interiorizadas, fue bloqueada por adición de 40 μl de una solución de azul tripano al 4% en PBS. Todas estas muestras fueron adquiridas y analizadas mediante un citómetro de flujo (FACsort, Becton Dickinson), equipado con un rayo láser de argón ajustado a una longitud de onda de 488 nm. Los datos fueron analizados mediante el programa FACscan (Becton Dickinson), donde los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad estructural (SSC) fueron representados en escala lineal, mientras que los de fluorescencia verde (FL1) y roja (FL2) lo fueron en escala logarítmica. Los datos fueron recogidos en diagramas de puntos (donde cada uno de ellos correspondería a una célula) o en histogramas. Se adquirieron 5000 células de cada muestra a una velocidad de 300 células/s. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Lysis Software Package (Becton Dickinson).

De cada muestra procedente de un ensayo de fagocitosis se analizó la habilidad fagocítica, definida como el porcentaje de leucocitos con una o más levaduras interiorizadas (leucocitos con fluorescencia verde) con respecto al total de células de la población, y la capacidad fagocítica, definida como el número medio de levaduras interiorizadas por leucocito (estimada como intensidad media de fluorescencia verde).

7. Estudio microscópico

7.1. Óptico

Para el estudio de microscopía óptica (LM) los fragmentos de intestino anterior se fijaron en formalina tamponada al 10% (Merck) a temperatura ambiente durante 24 h. Tras el periodo de fijación, las muestras fueron deshidratadas en una sucesión de alcoholes de menor a

mayor concentración (etanol (Merck) al 50, 70, 90 y 100%), con un tiempo medio de 40 minutos en cada solución. A continuación, las muestras fueron infiltradas en resina hidrofílica JB-4 (Polysciences) e incluidas en un bloque siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. Se cortaron secciones de 3 μm (microtomo Microm) y se montaron sobre portas cubiertos con silano (TESPA, 3-aminopro-pil-trietoxi-silano; Sigma). Las secciones se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) para el análisis histológico, y con Azul Alcian (AB, pH 2.5) y ácido peryódico de Schiff (PAS) para detectar diferencialmente las mucinas ácidas y neutras respectivamente (Mowry, 1963).

7.2. *Electrónico*

El procesado de las muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó según Reynolds (Reynolds, 1963). Los fragmentos de intestino anterior fueron fijados durante 5 h en tampón cacodilato con glutaraldehído al 4%, lavados (cacodilato-sacarosa al 4%, Sigma), toda la noche y post-fijados durante dos horas en tetraóxido de osmio (SPI-Chem, OsO_4) al 1%. A continuación, se tiñeron con acetato de uranilo veronal (Fluka) durante 2 h. Todo este proceso se realizó a 4°C.

Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas en una serie de alcoholes crecientes (etanol 30, 50, 70, 90, 100%) 10 min cada uno a temperatura ambiente, incluyendo dos pasos finales en etanol absoluto con sulfato de cobre. A continuación, se realizaron dos lavados con óxido de propileno (Sigma, 15 min) ya que la resina no es soluble en alcohol y se incluyó el tejido en resina Epon (SPI-Chem, dos pasos de 2 h en Epon+óxido de propileno 1/1, y uno en Epon puro durante toda la noche). Al día siguiente se hicieron las cápsulas en Epon puro.

Las secciones, semifinas y finas, se obtuvieron mediante un ultramicrotomo Reichert-Jung y se tiñeron con azul de toluidina (Sigma) y acetato de uranilo+citrato de plomo (SPI-Chem) respectivamente.

7.3. *Examen histológico y morfométrico*

El examen histológico y la morfometría a nivel de LM se realizaron en base a pérdida de la integridad epitelial, presencia de restos celulares en la luz, desintegración de las uniones celulares, presencia de células caliciformes, presencia de leucocitos intraepiteliales y en la lámina propia, y edema. Se realizaron las siguientes medidas morfométricas computerizadas: (1) área correspondiente a las vellosidades, pared y luz del intestino, (2) altura de las vellosidades (μm ,

medidas desde la base hasta el ápice), (3) número de células caliciformes por área de epitelio (totales, PAS+ y PAS+AB+), y (4) número de leucocitos intraepiteliales (IELs) y en la lámina propia (LPLs). Las medidas se realizaron utilizando el software de análisis de imagen MIP 4.5 (Consulting Image Digital, Barcelona) y el NewCAST (Visiopharm, Denmark). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Leica 6000B equipado con una cámara Leica DFC280 y el software de adquisición Leica Application Suite V 2.5.0 R1. Los resultados obtenidos fueron expresados como valores medios con sus errores estándar.

A nivel ultraestructural (TEM), el efecto de los diferentes tratamientos se evaluó en base a cambios morfológicos en el intestino: grado de vacuolización de los enterocitos, desorganización/alteración de las microvellosidades y altura de las mismas, y aumento del espacio intercelular. Las medidas de la altura de las microvellosidades (MVh) se realizaron utilizando el software de análisis de imagen ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, USA). Además, sobre las imágenes se realizó un puntaje histológico en base a las siguientes alteraciones en el epitelio: (1) vacuolización de los enterocitos, (2) desorganización/alteración de las microvellosidades, y (3) espacio intercelular. Estos signos fueron evaluados con unidades arbitrarias con el objetivo de obtener datos numéricos que permitieran analizar estadísticamente las diferencias observadas en las muestras de ejemplares tratados con respecto a las muestras de los ejemplares control. Cada alteración recibió una puntuación arbitraria de 0 a 3: 0– negativo/normal, 1– medio, 2– moderado y 3– marcado. Las puntuaciones totales en el intestino anterior fueron clasificadas como: 0-1–normal, 1-3– cambios patológicos moderados, >3-6 cambios patológicos severos (Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Bakke-McKellep y col., 2007). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Philips Tecnai-12 equipado con una cámara MegaView II. Los resultados obtenidos fueron expresados como valores medios con sus errores estándar.

8. Infecciones experimentales

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo utilizando la bacteria *P. damsela* subsp *piscicida* (Lg_{h41/01}). Los peces fueron infectados intraperitonealmente con una dosis de 2×10^9 ufc/ml (dosis letal 50 previamente determinada, ver Anexo 2) en 0.1 ml de PBS estéril. A los peces control se les inyectaron 0.1 ml de PBS estéril. Los peces fueron observados dos veces al día y las mortalidades registradas durante 15 días, considerando la infección como causa de la

muerte solo en los casos en los que la bacteria fue reaislada a partir de los órganos internos de los peces muertos.

La identificación de las bacterias reaisladas como *P. damselae* subsp. *piscicida* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rajan y col. (Rajan y col., 2003). El aislamiento se hizo a partir de hígado y bazo en agar soja triptona (Laboratorios Conda, Madrid) suplementado con 1.5% NaCl (TSAs) e incubación durante 24-48 h a 22°C. Las colonias aisladas fueron subcultivadas en agar tiosulfato-citrato con sales biliares (TCBS) e incubadas durante 24-48 h a 22°C. Estas colonias se identificaron mediante amplificación por PCR con primers específicos (Forward 5'-AGGGGATCCGATTACTG-3'; Reverse 5'-TCCCATTGAGAAGATTTGAT-3') para un gen de un polisacárido capsular de *P. damselae* subsp. *piscicida* (número de acceso en la base de datos GenBank AB074290).

9. Microflora intestinal

9.1. Extracción del DNA

El contenido del lumen de cada intestino (4 muestras por grupo) fue recogido con 1 ml de PBS y centrifugado (1.000 g durante 5 min). El DNA total fue extraído mediante el protocolo descrito por Martínez y col. (Martínez y col., 1998) con algunas modificaciones (Tapia-Paniagua y col., 2010). A cada muestra se adicionaron 300 µl de tampón de resuspensión (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8) y 300 µl de tampón de lisis (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1% SDS, pH 8.0), invirtiendo los tubos con suavidad. A continuación, las muestras fueron tratadas con 32 µl de una solución NaCl 6 M y proteinasa K (150 µg/mL) (P2308, Sigma) a 55°C 1 h. En el siguiente paso, las muestras se trataron con una RNAasa A (10 mg/ml) a 37 °C durante 1 h para eliminar los posibles restos de RNA. Se añadió a las muestras NaCl (Merck) 6M hasta una concentración final de 1.5 M. La solución obtenida se puso en hielo durante 10 min y se centrifugó (21.000 g, 3 min), obteniéndose un sobrenadante conteniendo el DNA que fue transferido a otro tubo con el mismo volumen de isopropanol (Sigma). Los tubos fueron agitados suavemente durante varios minutos. El DNA fue concentrado mediante centrifugación (21.000 g, 3 min), lavado en etanol al 70% y resuspendido en 100 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y conservado a 4°C. Las muestras fueron visualizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa (1.5% m/v) en presencia de bromuro de etidio para comprobar la calidad del DNA.

9.2. Amplificación y análisis por DGGE

Para comparar los patrones de DGEE obtenidos a partir de la microbiota intestinal de los ejemplares de doradas alimentadas con las distintas dietas, el DNA se amplificó usando los cebadores específicos del DNA ribosómico 16S (16S rDNA) 677-GC-R (5'CGGGGCGGGGCACGGGGGATMTCTACGCATTTCACCGCTAC-3') y el 309-F (5'ATCCCTACGGGAGGCWGCAG-3') (Steinum y col., 2009). Estos cebadores se utilizaron para amplificar las regiones V6-V8 del gen 16S rDNA y obtener amplicones de 470 pares de bases. Los mix de PCR (50 μ l) contenían 1 U Taq polymerase (Life Technologies Gaithersburg, MD, USA), 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTPs, 5 pmol de primers, 1 μ l de DNA, y agua químicamente pura estéril. La PCR se llevó a cabo en un termociclador T1 (Whatman Biometra, Göttingen, Germany). Los productos de la PCR (5 μ l) fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (w/v) conteniendo bromuro de etidio para comprobar el tamaño y cantidad del producto obtenido.

Los amplicones se separaron por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) siguiendo las especificaciones descritas por Muyzer y col. (Muyzer y col., 1993), empleando el sistema Dcode TM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 8% (37.5:1 acrilamida-bisacrilamida; dimensiones, 200 por 200 por 1 mm), usando un gradiente desnaturalizante de 30 a 55% para la separación de los productos de PCR. En los geles se incrementaba el gradiente de urea y formamida en la dirección de la electroforesis. Se aplicó a los geles una solución desnaturalizante 100% que contenía urea 7M y 40% (vol/vol) de formamida desionizada. Se cargaron 13 μ l de las muestras de PCR por cada calle, realizándose la electroforesis durante 16 h a 85 V en 0.5 X tampón TAE (20 mM Tris acetato [pH 7.4], acetato sódico 10 mM y Na₂-EDTA 0,5 mM) y a una temperatura constante de 60 °C (Sambrook y col., 1989), para después teñir con AgNO₃ (Sanguinetti y col., 1994).

9.3. Análisis de los patrones de DGGE

Los patrones de bandas obtenidos se analizaron empleando en FPQuest Software version 4.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). Se calculó una matriz de similitud para las curvas densitométricas de los patrones de bandas, usando para ello el coeficiente de Dice (Dice: $SD: 2n_{AB}/(n_A+n_B)$), donde n_A es el número de bandas de DGGE en la calle 1, n_B representa el número de bandas en la línea 2, y n_{AB} es el número de bandas

comunes). Para su representación se realizó un dendograma usando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages*). Para determinar la diversidad estructural de las comunidades microbianas correspondientes a los patrones de bandas, se calcularon los siguientes parámetros (Marzorati y col., 2008):

- **Riqueza específica (R)** calculada en base al número total de bandas observadas en los patrones de PCR-DGGE.

- **Índice de Shannon (H')**, que indica la distribución de individuos en cada uno de los grupos microbianos, se calcula aplicando la fórmula $H' = -\sum P_i \ln P_i$, donde P_i se define como (n_i/N) , siendo n_i el área de cada banda y N la suma total de la intensidad de todas las bandas. Su valor varía entre 0 y 5 para la máxima y mínima uniformidad en la distribución de los individuos totales entre todas las especies del sistema.

- **Habitabilidad del sistema (Rr)**, que valora la capacidad del sistema para soportar el crecimiento de distintos grupos microbianos, y que se calcula como el número total de bandas multiplicado por el porcentaje del gradiente desnaturizante necesario para describir la diversidad total de la muestra analizada, conforme a la fórmula $Rr = (N^2 \times D_g)$, donde N representa el número total de bandas del patrón, y D_g el gradiente desnaturizante comprendido entre la primera y la última banda del patrón.

10. Expresión de genes

El análisis de los patrones de expresión de genes se realizó mediante PCR a tiempo real (rt-PCR, *real time PCR*). En el momento de la disección, los fragmentos de tejido (riñón cefálico e intestino) fueron colocados en TRIzol (Invitrogen) y conservados a -80°C . El RNA total fue extraído a partir de 0.5 g de tejido mediante TRIzol utilizando el protocolo facilitado por el fabricante. El RNA fue cuantificado mediante espectrofotometría (260 nm) y la pureza estimada mediante la relación entre la absorbancia a 260 y a 280 (260:280). Los valores de pureza deben estar entre 1.8-2. El RNA obtenido fue tratado a continuación con DNasa I (Promega) para eliminar las posibles contaminaciones por DNA genómico. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 1 μg de RNA total utilizando la enzima SuperScript III transcriptasa reversa (Invitrogen) con un primer oligo-dT18. La expresión de los genes seleccionados (Tabla 7) fue analizada mediante PCR a tiempo real, llevada a cabo con el equipo ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) utilizando los reactivos SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). La mezcla de reacción (10 μl de 2xSYBR Green supermix, 5 μl de primers (0.6 μM cada uno) and 5 μl del cDNA muestra) fue incubada durante 10 min at 95°C , seguido de 40 ciclos de 15 s- 95°C , 1

min-60°C y finalmente 15 s-95°C, 1 min-60°C y 15 s-95°C. La expresión de cada gen fue corregida por el contenido del factor de elongación 1α (EF- 1α) de cada muestra.

Los cebadores empleados para la amplificación de los genes seleccionados fueron diseñados a partir de dos tipos de secuencias de RNA mensajero (RNAm). Por un lado, secuencias de RNAm identificadas con una proteína concreta en la base de datos de nucleótidos de GenBank sirvieron de base para el diseño directo de cebadores específicos. En el caso de proteínas cuya secuencia no aparecía en las bases de datos de nucleótidos, se realizó una búsqueda de secuencias de la proteína en otros peces, y se buscaron coincidencias en la base de datos de los marcadores de secuencia expresada o EST (acrónimo del inglés *expressed sequence tag*) de dorada, que contienen suficiente información para diseñar cebadores específicos. Este proceso de búsqueda, alineamiento y diseño de cebadores se llevó a cabo empleando las herramientas disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://expasy.org/> y <http://www.invitrogen.com>.

Los resultados de la expresión de genes se representaron en escala logarítmica como incremento relativo (media \pm error estándar), obtenido al dividir el valor correspondiente para cada muestra entre el valor obtenido para su control. De este modo, el valor del control queda establecido en 1, de manera que valores superiores a 1 representan un incremento y valores inferiores un descenso en la expresión del gen estudiado.

Tabla 7. Cebadores empleados para la PCR a tiempo real en la presente Tesis Doctoral.

Grupo	Gen	Abreviatura	GenBank ID	Secuencia primer (5'-3')
Sistema Inmunitario	Factor de elongación 1 α	EF-1 α	AF184170	CTGTCAAGGAAATCCGTCGT TGACCTGAGCGTTGAAGTTG
	Cadena pesada de la IgM ()	IgM _H	AM493677	CAGCCTCGAGAAGTGGAAAC GAGGTTGACCAGGTTGGTGT
	Receptor β de células T	TCR- β	AM261210	AAGTGCATTGCCAGCTTCTT TTGGCGTCTGACTTCTCTT
	Complejo mayor de histocompatibilidad I α	MHC I α	DQ211540	ATGAGGTTCTTGGTGTTTCTGG TGGAGCGATCCATGTCTCTGC
	Complejo mayor de histocompatibilidad II α	MHC II	DQ019401	CTGGACCAAGAACGGAAAGA CATCCCAGATCCTGGTCAGT
	Factor estimulante de colonias 1R	CSF-1R	AM050293	ACGTCTGGTCTATGGCATC AGTCTGGTTGGGACATCTGG
	Interleucina 1- β	IL-1	AJ277166	GGGCTGAACAACAGCACTCTC TTAACTCTCCACCCTCCA
	Interleucina 6	IL-6	AM749958	AGGCAGGAGTTTGAAGCTGA ATGCTGAAGTTGGTGAAGG
	Interleucina 8	IL-8	AM765841	GCCACTCTGAAGAGGACAGG TTTGGTTGTCTTTGGTCGAA
	Caspasa 1	CASP-1	AM490060	ACGAGGTGGTGAAACACACA GTCCGTCTCTCGAGTTTCG
	Ciclooxigenasa 2	COX-2	AM296029	GAGTACTGGAAGCCGAGCAC GATATCACTGCCGCTGAGT
	Factor de necrosis tumoral α	TNF α	AJ413189	TCGTTCAAGTCTCCTGCAG TCGCGCTACTCAGAGTCCATG
	β -defensina	β -def	FM158209	CCCCAGTCTGAGTGGAGTGT AATGAGACACGAGCACAAAG
Uniones y citoesqueleto	β -actina	β -act	X89920	GGCACCACCTTCTACAATG GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC
	Ocludina	Ocl	JK692876	GTGCGCTCAGTACCAGCAG TGAGGCTCCACCACACAGTA
	α -Tubulina	Tub	AY326430	AAGATGTGAACTCCGCCATC CTGGTAGTTGATGCCACCT
	Zona-occludens 1	ZO-1	FM159812	ACGACAAGCGCCTGTTAAGT TCCTGAGCTTCCGACATTTT
	Tricelulina	Tric	AM964055	CCAGAGATCAGCTGTGTGGA TGCTGTTCTCTTGGCTTTT
	Vimentina	Vm	FM155527	CGCTTACCTGTGAGGTGGAT GTGCTTGGTAACCGCCTGT
	Digestión y transporte	α -Amilasa	α Am	AF316854
Tripsina		Trip	AF316852	GGTCTGCATCTTACCAGACT AAAGGCAGCAGAGTGATGGT
Transportador 1 de péptidos		PepT-1	GU733710	TTGAACATAACGTCGGGTGA AATTTTGCATTTCCCTGTGG
Fosfatasa alcalina		ALP	AY266359	TTACTGGGCTGTTTGAACC ATCCTTGATGGCCACTTCCAC
Transferrina		Tf	JF309047	CAGGACCAGCAGACCAAGTT TGGTGGAGTCCTTGAAGAGG

11. Análisis estadístico

Los datos de los parámetros inmunitarios, morfometría intestinal y expresión de genes fueron analizados estadísticamente con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Science para Windows, versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) para identificar diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos, y el test de Student-Newman-Keuls (S.N.K.), cuando fue necesario, para determinar entre qué grupos de tratamiento se presentaban esas diferencias. Las asunciones de homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) y normalidad necesarias para aplicar el test ANOVA se comprobaron mediante las herramientas disponibles en el software empleado (test de Levene y tests Kolmogorov-Smirnov/Shapiro Wilk respectivamente).

En caso de no cumplirse el requisito de normalidad, los datos fueron transformados mediante una operación matemática simple, de manera que los transformados sí cumplieron el requisito de normalidad. En caso de no cumplirse la asunción de homocedasticidad, se aplicó el test no paramétrico T3 de Dunnet. Los datos de los análisis de la microflora intestinal fueron procesados mediante un análisis de la varianza empleando el programa STATGRAFICS Plus 5.0 (StatGraphics Corporation, Rockville, MD, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P \leq 0.05$.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1: Administración de inulina en dieta

1. Introducción

Algunos de los prebióticos más comúnmente utilizados en alimentación animal incluyen la inulina y los fructooligosacáridos. La inulina pertenece a una clase de carbohidratos denominados fructanos que están presentes como polisacáridos de reserva en diversas especies de la familia Compuestas como *Cichorium intybus* (achicoria), *Inula helenium* (helenio), *Taraxacum officinalis* (diente de león) y *Helianthus tuberosus* (alcachofa de Jerusalén). Los fructanos son polímeros de β -D-fructofuranosa, normalmente con una glucosa terminal, que en la inulina se encuentran unidos por enlaces glicosídicos β (2 \rightarrow 1). Estos enlaces hacen a la inulina resistente a las enzimas digestivas de mamíferos, de manera que alcanza el colon virtualmente inalterada (Oku y col., 1984). La inulina parece tener un efecto benedicioso sobre la microflora intestinal, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas como los lactobacilos y las bifidobacterias, a la vez que dificulta el desarrollo de bacterias patógenas y estimula el sistema inmunitario (Seifert y Watzl, 2007). Se ha sugerido que la forma insoluble de la inulina posee actividad adyuvante, ya que activa la vía alternativa del complemento (Silva y col., 2004) y es capaz de estimular el sistema inmunitario mediante la unión a receptores específicos (tipo lectina) presentes en los leucocitos y la activación de la proliferación de linfocitos (Seifert y Watzl, 2007). Por tanto, los dos componentes del sistema inmunitario, el innato y el adaptativo, están modulados por la inulina.

La aplicación de la inulina como prebiótico en peces comenzó hace relativamente pocos años, con el estudio realizado por Wang y Wang (1997) en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) y tilapia (*Tilapia aureus*). Desde entonces, la inulina se ha estudiado en diversas especies de peces, incluyendo rodaballo (*Psetta maxima*) (Mahious y col., 2006), salmón atlántico (*Salmo salar*) (Bakke-McKellep y col., 2007), lubina rayada híbrida (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Burr y col., 2010), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahem y col., 2010), esturión beluga (*Huso huso*) (Ahmdifar y col., 2011) y trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Olsen y col., 2001). Sin embargo, estos estudios, resumidos en la tabla 8, son escasos y de temática muy diversa, por lo que los resultados obtenidos son poco concluyentes.

En los estudios en que se ha evaluado sus propiedades inmunoestimulantes, la inulina ha mostrado cierta capacidad para modular algunas actividades del sistema inmunitario, como la fagocitosis y la explosión respiratoria (Ibrahem y col., 2010) o los niveles de leucocitos en sangre (Ahmdifar y col., 2011). Sin embargo, cuando los animales tratados con inulina han sido sometidos a infecciones experimentales, la inulina no ha resultado ser un buen agente

protector: a pesar de que la mortalidad acumulada fue menor que en los grupos control, no se consiguieron niveles estadísticamente significativos (Wang y Wang, 1997).

Tabla 8. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre los efectos de la inulina en peces (adaptada de Ringø y col., 2010).

Vía, dosis y tiempo de administración	Especie	Resultados	Referencia
Intraperitoneal, 10 mg/kg – 2 semanas	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	→ resistencia frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Edwardsiella tarda</i>	Wang y Wang, 1997
Intraperitoneal, 10 mg/kg – 2 semanas	<i>Tilapia aureus</i>	→ resistencia frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Edwardsiella tarda</i>	Wang y Wang, 1997
Oral, 150 g/kg – 4 semanas	<i>Salvelinus alpinus</i>	↑ daño celular intestinal	Olsen y col., 2001
Oral, 150 g/kg – 4 semanas	<i>Salvelinus alpinus</i>	Alteración de la microflora intestinal ↓ recuento viables totales	Ringø y col., 2006
Oral, 75 g/kg – 3 semanas	<i>Salmo salar</i>	→ daño celular intestinal ↑ crecimiento intestinal y masa relativa del intestino → capacidad hidrolítica y absorbiva	Refstie y col., 2006
Oral, 75 g/kg – 3 semanas	<i>Salmo salar</i>	↓ <i>Pseudoalteromonas</i> y <i>Micrococcus</i> → daño celular intestinal	Bakke-McKellep y col., 2007
Oral, 20 g/kg – 1 mes	<i>Psetta maxima</i>	↑ tasa de crecimiento Alteración de la microflora intestinal (<i>Bacillus</i> y <i>Vibrio</i>)	Mahious y col., 2006
Oral, 10, 30 g/kg, – 8 semanas	<i>Huso huso</i>	↓ ganancia de peso ↓ tasa de crecimiento ↓ eficiencia proteica ↑ lactobacilos	Reza y col., 2009
Oral, 10 g/kg – 8 semanas	<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>	Alteración de la microflora intestinal	Burr y col., 2010
Oral, 10, 20 y 30 g/kg – 8 semanas	<i>Huso huso</i>	→ enzimas séricas y parámetros bioquímicos y hematológicos ↑ leucocitos en sangre	Ahmdifar y col., 2011)
Oral, 5 g/kg – 4-8 semanas	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ tasa de crecimiento y ↑ ganancia de peso ↑ resitencia frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> ↑ explosión respiratoria ↑ actividad lisozima	Ibrahim y col., 2010

Los símbolos representan un incremento (↑), un descenso (↓) o no efecto (→) sobre la respuesta especificada.

Por otra parte, cabe señalar el efecto negativo que tiene la inulina sobre las células del intestino, puesto de manifiesto mediante el estudio microscópico de ejemplares de trucha alpina sometidos a tratamiento con elevadas dosis de inulina (Olsen y col., 2001). Este es, hasta la fecha, el único estudio que ha mostrado dichos efectos negativos, ya que las investigaciones

posteriores llevadas a cabo sobre otras especies con dosis menores de inulina no han revelado daños celulares en el intestino (Refstie y col., 2006; Bakke-McKellep y col., 2007).

En cuanto a los estudios realizados sobre la microflora intestinal, todos ellos han mostrado la capacidad de la inulina para influir en la composición de la microbiota. Sin embargo, en la mayoría de estas investigaciones se ha evaluado el recuento de viables totales mediante el uso de medios de cultivo, quedando al margen los microorganismos no cultivables. Las técnicas moleculares de detección de microorganismos, que permiten evaluar la población microbiana en su totalidad, han sido utilizadas solamente en uno de estos estudios (Burr y col., 2010). El análisis por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) reveló que todos los prebióticos produjeron un tipo diferente de comunidad microbiana comparados con los peces alimentados con la dieta control.

2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos de la inulina, un prebiótico, sobre el sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.), con la intención de comprobar si tiene actividad inmunoestimulante por sí misma. El interés último es suministrarla junto a probióticos, de ahí que en una primera aproximación se quiera conocer si produce efectos sobre el sistema inmunitario o no.

3. Hipótesis de trabajo

La inulina suministrada en dieta a ejemplares de dorada aumenta los parámetros del sistema inmunitario, es decir, puede ser considerada un inmunoestimulante.

4. Diseño experimental

Para desarrollar este estudio, se llevaron a cabo dos experimentos distintos. En el primero, 30 animales procedentes del mismo lote (175 g de peso medio) fueron distribuidos al azar en 3 grupos de 10 peces cada uno y dispuestos en 3 acuarios. Cada grupo fue alimentado con uno de los siguientes piensos:

- » C: pienso control, no suplementado.
- » I5: pienso suplementado con inulina a 5 g/kg.
- » I10: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg.

Cinco ejemplares de cada grupo fueron muestreados transcurridas una y dos semanas de iniciado el tratamiento. Los muestreos consistieron en la extracción de sangre y de riñón cefálico para el análisis de los parámetros del sistema inmunitario (Figura 2.1).

Los resultados obtenidos en el primer experimento hicieron que nos planteáramos el segundo, en el que se aumentaron las concentraciones y tiempos de administración respecto al primero. En este caso, se distribuyeron 96 peces (100 g peso medio) en 8 acuarios (dos réplicas por tratamiento) que fueron alimentados con una de las siguientes dietas:

- » C: pienso control, no suplementado.
- » I10: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg.
- » I15: pienso suplementado con inulina a 15 g/kg.
- » I30: pienso suplementado con inulina a 30 g/kg.

Los muestreos, de doce peces por grupo, se realizaron a dos y cuatro semanas de iniciado el tratamiento. Se obtuvieron muestras de sangre y riñón cefálico sobre las que se analizaron los parámetros del sistema inmunitario (Figura 2.2).

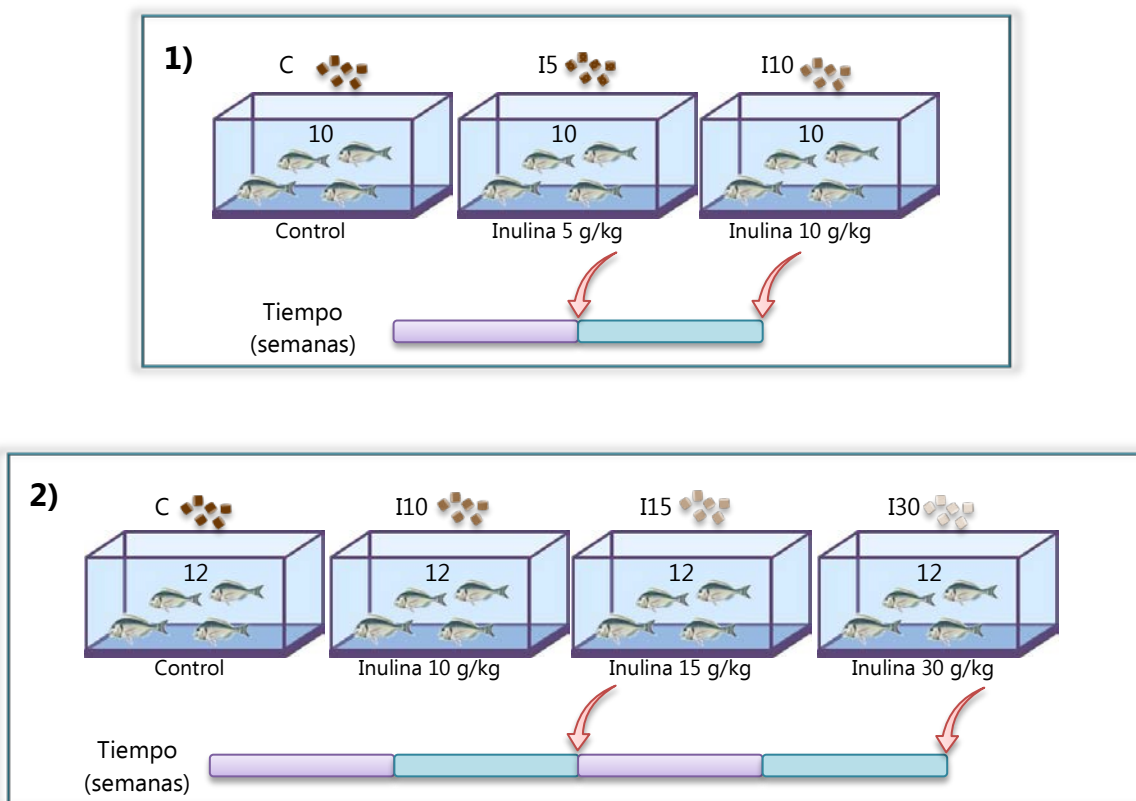


Figura 2. Esquema del diseño experimental planificado para los experimentos 1 y 2 del presente capítulo. Las flechas indican los tiempos de muestreo.

5. Resultados

En el primer experimento, la inulina no produjo incrementos estadísticamente significativos con respecto al control en las actividades del sistema inmunitario estudiadas. Sin embargo, hubo dos actividades que disminuyeron significativamente con respecto al control. La explosión respiratoria descendió en la primera semana de alimentación con 5 g/kg de inulina, mientras que la capacidad fagocítica lo hizo en el mismo tiempo con 10 g/kg de inulina. En la figura 3 se recogen los resultados obtenidos para los parámetros del sistema inmunitario estudiados.

En el segundo experimento, los parámetros humorales y celulares del sistema inmunitario innato de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con inulina se evaluaron tras dos y cuatro semanas de tratamiento. Entre las actividades humorales, destaca el incremento experimentado en la actividad hemolítica del complemento tras dos y cuatro semanas de alimentación con la dieta de 10 g/kg de inulina, comparado con los valores obtenidos en el grupo control (dieta no suplementada) (Figura 4A). En cuanto a las actividades celulares, solamente la fagocitosis resultó incrementada de manera significativa (Figuras 4C, 4D). En el caso de los peces alimentados con 10 g/kg de inulina, se observó un aumento estadísticamente significativo de la habilidad fagocítica tras dos y cuatro semanas de tratamiento, mientras que la capacidad fagocítica solo aumentó ligeramente a las dos semanas. La dieta de 30 g/kg provocó un incremento de la capacidad fagocítica a las dos semanas, mientras que a las cuatro semanas esta actividad descendió de manera significativa con respecto al control.

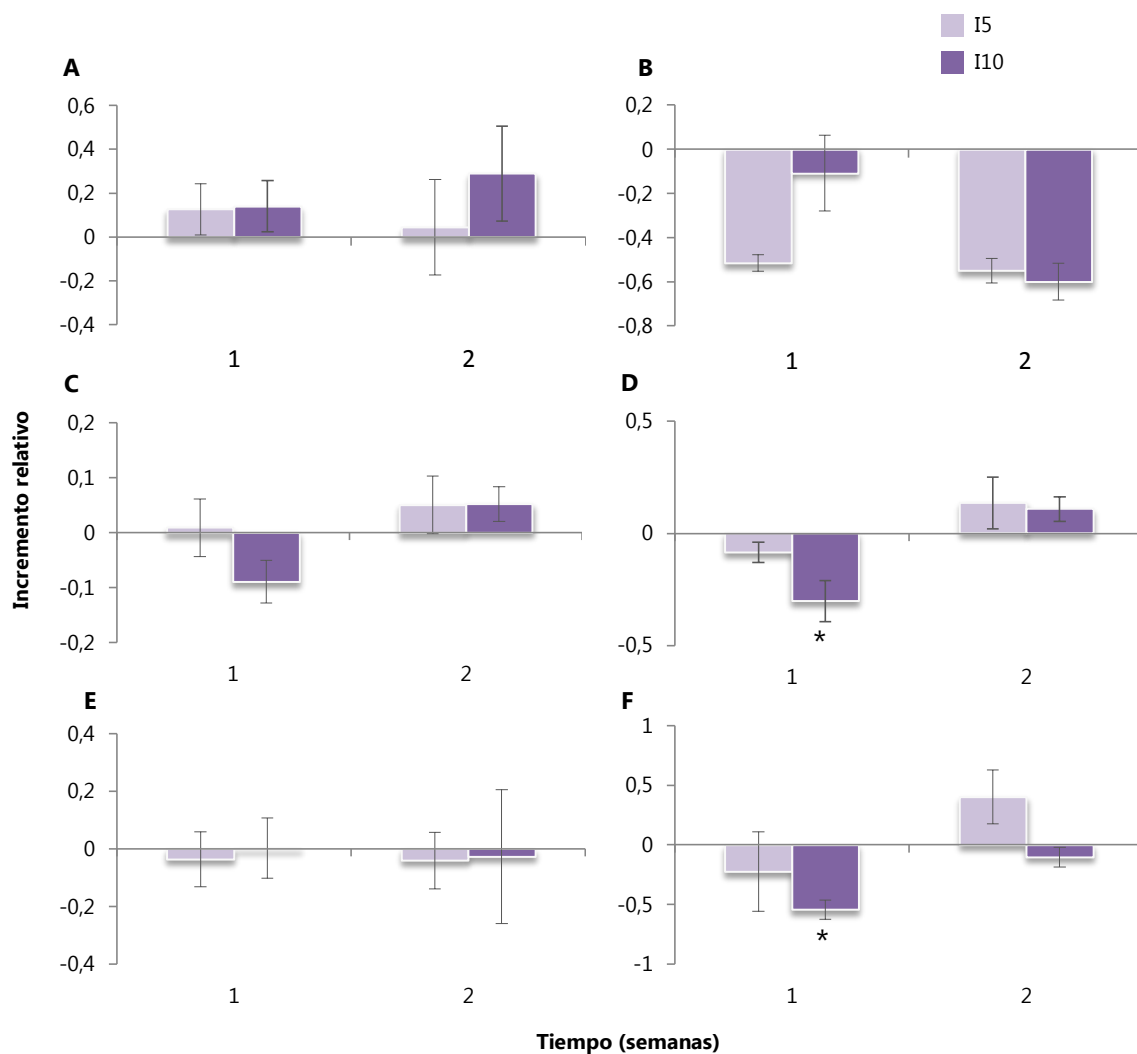


Figura 3. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con distintas concentraciones de inulina (I5: inulina a 5 g/kg; I10: inulina a 10 g/kg). A) Actividad hemolítica del complemento, B) peroxidasa sérica, C) habilidad fagocítica, D) capacidad fagocítica, E) peroxidasa intraleucocitaria, F) explosión respiratoria. Las barras representan la media ± error estándar (n=5). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

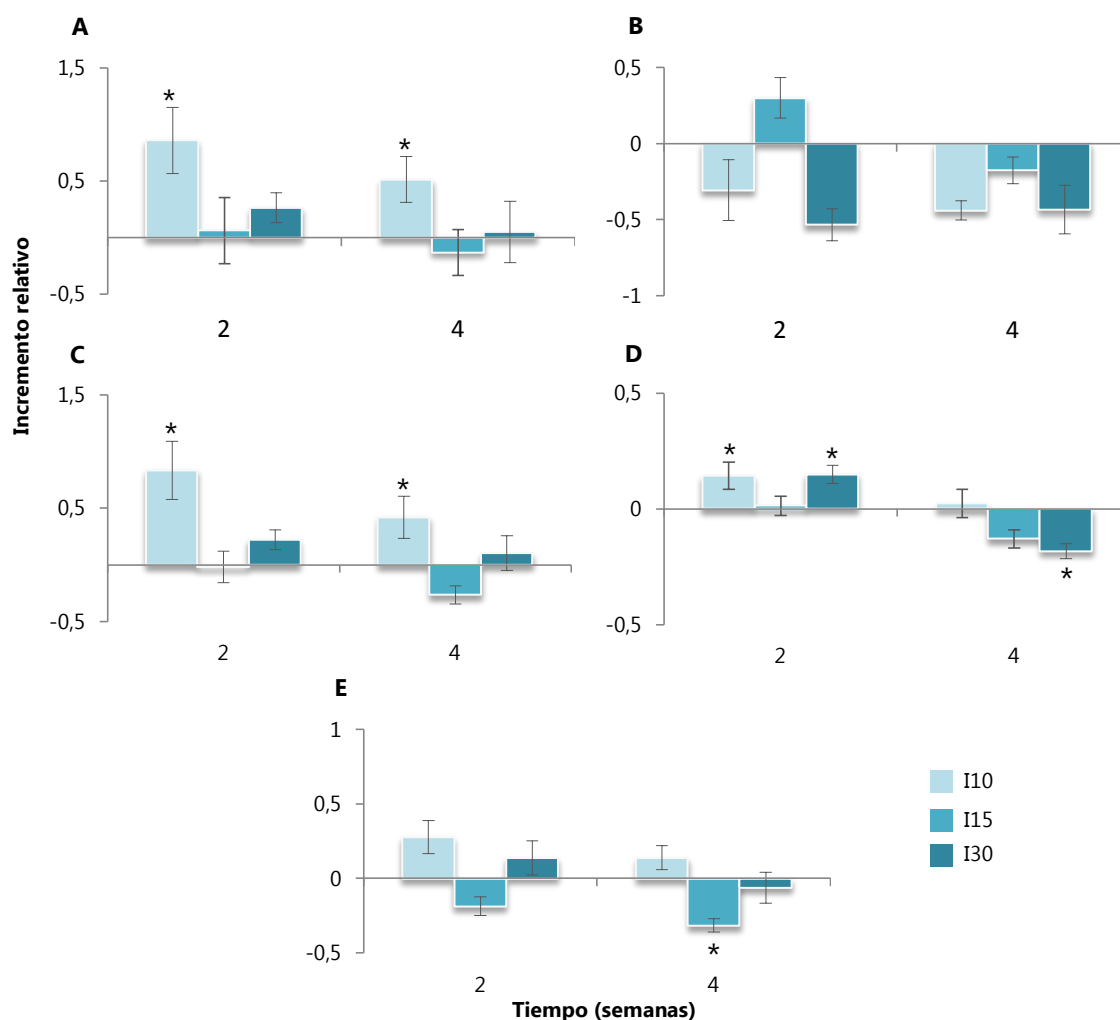


Figura 4. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con distintas concentraciones de inulina (I10: inulina a 10 g/kg; I15: inulina a 15 g/kg; I30: inulina a 30 g/kg). A) Actividad hemolítica del complemento, B) peroxidasa sérica, C) habilidad fagocítica, D) capacidad fagocítica, E) peroxidasa intraleucocitaria. Las barras representan la media \pm error estándar (n=12). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

6. Discusión

Las propiedades prebióticas de la inulina han sido ampliamente estudiadas en humanos y otros mamíferos, incluyendo su habilidad para modular las respuestas del sistema inmunitario (Vulevic y col., 2004; Seifert y Watzl, 2007). En los últimos años, se ha propuesto que la inulina puede tener interesantes aplicaciones en la acuicultura y su efecto ha sido estudiado en especies como el salmón atlántico (*Salmo salar*) (Bakke-McKellep y col., 2007), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahim y col., 2010) y la lubina rayada híbrida (*Morone chrysops* x

Morone saxatilis (Burr y col., 2010). Sin embargo, estos estudios no han arrojado luz suficiente sobre las propiedades inmunoestimulantes de la inulina en peces.

En el primer experimento del presente capítulo, la inulina no mostró efectos positivos sobre las actividades estudiadas, e incluso algunas de ellas se vieron afectadas negativamente. En el segundo, sin embargo, la inulina tuvo algunos efectos positivos, sobre todo cuando se administró a 10 g/kg. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo han demostrado que los leucocitos de dorada son capaces de interactuar con ciertos carbohidratos (Rodríguez y col., 2003; Esteban y col., 2004), mientras que en humanos se ha demostrado que la inulina es capaz de estimular el sistema inmunitario mediante la unión a receptores específicos de distintos tipos presentes en los leucocitos y en las células epiteliales intestinales (Seifert y Watzl, 2007). Nuestros resultados indican que los leucocitos de dorada son capaces de responder a la presencia de inulina, aumentando algunas de sus actividades cuando este carbohidrato se administra a la concentración adecuada. La administración de concentraciones excesivamente altas, puede llevar al agotamiento de las células y a una respuesta negativa.

De acuerdo con nuestros resultados, otros oligosacáridos como los manano-oligosacáridos (MOS), han demostrado tener un efecto positivo sobre el sistema inmunitario de peces. En el estudio llevado a cabo por Torrecillas y col. (2007) en lubina, se observó que la administración de MOS (en forma de preparado comercial) resultó en un incremento significativo de la fagocitosis y la explosión respiratoria, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad lisozima y en el complemento. En un estudio reciente, se ha demostrado que la administración de inulina (5 g/kg) durante dos meses a tilapia del Nilo provoca un aumento la explosión respiratoria y de la actividad lisozima (Ibrahim y col., 2010). En el presente trabajo, la explosión respiratoria resultó negativamente afectada con la misma dosis de inulina. Estas diferencias pueden deberse a factores como son la especie, tiempo de administración, edad o sexo de los ejemplares. Debido a estas variaciones, es necesario llevar a cabo más estudios que establezcan los niveles, concentraciones y tiempos de administración de inulina para cada especie en condiciones determinadas. Además, aunque la inulina puede actuar como inmunoestimulante por sí misma, la aplicación combinada con probióticos podría proporcionar mejores resultados.

CAPÍTULO 2: Administración de microalgas en dieta

1. Introducción

Las microalgas comprenden un amplio grupo de microorganismos heterótrofos fotosintéticos que constituyen la base de la cadena alimentaria en el ambiente marino. Su clasificación se realiza de acuerdo a varios aspectos tales como la estructura celular y los pigmentos y las sustancias que almacenan. Las microalgas tienen un elevado poder nutricional y han sido utilizadas para la nutrición larvaria de moluscos, crustáceos y peces, así como para el enriquecimiento de nauplios de artemia, rotíferos y copépodos que sirven como alimento para estados larvarios de peces y crustáceos (Lavens y Sorgeloos, 1996; Makridis y col., 2006; Spolaore y col., 2006; Becker, 2007).

Las propiedades nutricionales de las microalgas son amplias y bien conocidas. Tienen un elevado contenido proteico; son capaces de sintetizar todos los aminoácidos y proporcionar los esenciales al consumidor; contienen carbohidratos compuestos por almidón, glucosa, azúcares y polisacáridos no digeribles (agar, carragenato y alginato); lípidos en forma de glicerol y ácidos grasos de las familias $\omega 3$ y $\omega 6$; y un considerable contenido en muchas vitaminas esenciales (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico), minerales (fósforo, zinc, hierro, calcio, selenio, magnesio) y sustancias antioxidantes (Borowitzka, 1997; Duerr y col., 1998). Además de proporcionar alimento al zooplancton, las microalgas ayudan a estabilizar y mejorar las condiciones del medio de cultivo. En muchas especies acuáticas, tanto marinas como dulceacuícolas, la introducción de fitoplancton a los tanques de cría (técnica conocida como agua verde) conlleva resultados mucho mejores en términos de supervivencia, crecimiento e índice de transformación que los obtenidos con las técnicas de agua clara. Las razones de esta observación no han sido completamente esclarecidas, pero podrían estar relacionadas con la mejora de la calidad del agua por la producción de oxígeno y estabilización del pH, la acción de algunos compuestos bioquímicos excretados, la regulación de poblaciones bacterianas, efectos probióticos y la estimulación del sistema inmunitario (Spolaore y col., 2006).

Tetraselmis, *Phaeodactylum* y *Nannochloropsis*, los géneros administrados en la presente Tesis Doctoral, están entre las microalgas más utilizadas en la alimentación larvaria de especies de acuicultura. El género *Tetraselmis*, perteneciente a la clase Prasinophyceae, contiene elevadas cantidades de proteínas, lípidos, ácidos grasos esenciales y esteroides, así como clorofila a y b, caroteno, zeaxantina y violaxantina (Brown y Jeffrey, 1992). *Phaeodactylum* (Bacillariophyceae) es una diatomea rica en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 ω 3), fucoxantina, carotenos y clorofilas a y c. A diferencia de otras diatomeas, la pared de *Phaeodactylum* es muy

pobre en sílice, estando compuesta en su mayoría por compuestos orgánicos, especialmente glucuromanano. La pared de *P. tricornutum* se caracteriza por poseer casi exclusivamente compuestos orgánicos, principalmente polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Francius y col., 2008). Por último, *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) es una fuente reconocida de pigmentos como clorofila a, zeaxantina, cantaxantina y astaxantina, y de EPA (Carreto y Catoggio, 1976; Brown, 1991, 1997; Brown y col., 1999; Rocha y col., 2003; Cerón García y col., 2006; Ghezlbash y col., 2008).

Estas características en cuanto a composición bioquímica han favorecido el interés en la búsqueda de nuevos ingredientes funcionales procedentes de las microalgas, con el objetivo de proporcionar un beneficio adicional a la salud, además de los aspectos nutricionales y energéticos del alimento (Spolaore y col., 2006; Plaza y col., 2009, 2010; Christaki y col., 2011; Guedes y col., 2011). Hay una considerable evidencia de la importancia de los factores nutricionales como las proteínas, ácidos grasos esenciales, polisacáridos y vitaminas C y E así como los elementos traza para el mantenimiento de las funciones inmunitarias normales en los peces (Landolt, 1989). Además, como puede verse en el apartado de inmunoestimulantes de la presente revisión, muchos de los componentes de las microalgas han mostrado tener propiedades inmunoestimulantes o beneficiosas para la salud en peces u otros animales (Ortuño y col., 2000; Guzmán y col., 2003; Amar y col., 2004; Puangkaew y col., 2004; Morris y col., 2007; Yuan y col., 2011). La administración de microalgas podría generar una mayor inmunoestimulación, debido a su contenido en diferentes sustancias inmunoestimulantes.

En mamíferos, diferentes estudios han mostrado la capacidad inmunoestimulante de las algas (tanto macro como microalgas) o sus extractos (Guzmán y col., 2001, 2003; Leiro y col., 2007; Morris y col., 2007), e incluso han mostrado capacidad de reducir los daños provocados por determinadas enfermedades intestinales (Bedirli y col., 2009). Las macroalgas, además, se han estudiado como importantes fuentes de prebióticos para la aplicación en nutrición humana y animal (O'Sullivan y col., 2010).

En peces, los pocos estudios realizados hasta la fecha (recogidos en la Tabla 9) se han centrado en el uso de macroalgas como inmunoestimulantes y han sido llevados a cabo *in vitro* mediante la incubación de células inmunitarias con diferentes extractos de algas (Castro y col., 2004; Díaz-Rosales y col., 2007), mientras que la información sobre la administración de extractos de microalgas o microalgas completas es todavía muy escasa (Díaz-Rosales y col., 2008; Makridis y col., 2009). Según la literatura consultada, hasta la fecha solo se ha realizado un estudio sobre el efecto de la administración de microalgas completas (como un cóctel de sustancias inmunoestimulantes) sobre una actividad del sistema inmunitario de peces (Díaz-

Rosales y col., 2008). Este estudio, realizado en lenguados (*Solea senegalensis*) alimentados con la microalga *Porphyridium cruentum* y vacunados con bacterina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, puso de manifiesto la capacidad de esta microalga para estimular la explosión respiratoria en esta especie. Sin embargo, son datos insuficientes para establecer el efecto general de las microalgas sobre el sistema inmunitario de peces. Además, la composición bioquímica de las microalgas incluye diferentes polisacáridos algunos de los cuales podrían ser prebióticos potenciales, aunque no se han realizado todavía investigaciones en este sentido.

Tabla 9. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre administración de algas (micro y macroalgas) en peces.

Alga	Especie	Resultados	Referencia
Extractos de algas marinas: <i>Ulva rigida</i> , <i>Enteromorpha</i> sp., <i>Codium tomentosum</i> <i>Fucus vesiculosus</i> <i>Pelvetia canaliculata</i> <i>Dictyota dichotoma</i> <i>Chondrus crispus</i> <i>Porphyra umbilicalis</i>	Fagocitos de <i>Psetta maxima</i> (<i>in vitro</i>)	↑ explosión respiratoria (determinados tiempos y extractos)	Castro y col., 2004
Extractos del alga marina <i>Hydropuntia cornea</i>	Fagocitos de <i>Solea senegalensis</i> (<i>in vitro</i>)	↑ explosión respiratoria (determinados tiempos y extractos)	Díaz-Rosales y col., 2007
<i>Porphyridium cruentum</i>	<i>Solea senegalensis</i>	↑ explosión respiratoria	Díaz-Rosales y col., 2008
<i>Chlorella minutissima</i> <i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Solea senegalensis</i>	↑ supervivencia ↓ recuento de viables totales → recuento de <i>Vibrio</i> → expresión de genes relacionados con el inmunitario	Makridis y col., 2009
<i>Ulva rigida</i> en harina	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	En ayunas post-tratamiento: ↓ pérdida de peso → proteína corporal → composición lipídica hígado → pérdida de ácidos grasos	Güroy y col., 2011

Los símbolos representan un incremento (↑), un descenso (↓) o no efecto (→) sobre la respuesta especificada.

2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos de tres microalgas (*Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricornutum*), sobre determinados parámetros del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.), así como sobre la expresión de genes directamente relacionados con dicho sistema. Las microalgas seleccionadas se utilizan habitualmente como alimento para larvas y como enriquecimiento de

artemia y rotífero, pero no se han evaluado sus posibilidades como inmunoestimulante para peces. Además, dichas microalgas, por su alto contenido en proteínas, podrían constituir una alternativa al uso de proteínas de origen animal (harinas de pescado) en los piensos de peces, lo que tampoco se ha estudiado hasta el momento.

Este es el primer estudio que existe sobre el efecto que poseen las microalgas empleadas en la dieta de peces juveniles que están siendo sometidos a engorde, sobre su sistema inmunitario (tanto a nivel funcional como a nivel de sus genes).

3. Hipótesis de trabajo

Las algas seleccionadas para este estudio, al ser suministradas en dieta a ejemplares de dorada, aumentan los parámetros del sistema inmunitario, es decir, pueden ser consideradas inmunoestimulantes. Su efecto puede ser sobre el parámetro inmunitario directamente y/o sobre la expresión de algún gen relevante para este sistema.

4. Diseño experimental

Ciento sesenta y ocho animales procedentes de un mismo lote (100 g de peso medio) fueron distribuidos al azar en catorce grupos de doce peces cada uno y dispuestos en catorce acuarios (dos réplicas por tratamiento) (Figura 4). Cada grupo de tratamiento fue alimentado con uno de los siguientes piensos:

- » C: pienso control, no suplementado.
- » N50: pienso suplementado con *N. gaditana* a 50 g/kg.
- » N100: pienso suplementado con *N. gaditana* a 100 g/kg.
- » T50: pienso suplementado con *T. chuii* a 50 g/kg.
- » T100: pienso suplementado con *T. chuii* a 100 g/kg.
- » P50: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 50 g/kg.
- » P100: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 100 g/kg.

Seis ejemplares de cada grupo fueron muestreados transcurridas dos y cuatro semanas de iniciado el tratamiento. Los muestreos consistieron en la extracción de sangre y de riñón

cefálico para el análisis de los parámetros del sistema inmunitario y de riñón cefálico e intestino para estudio de la expresión de genes.

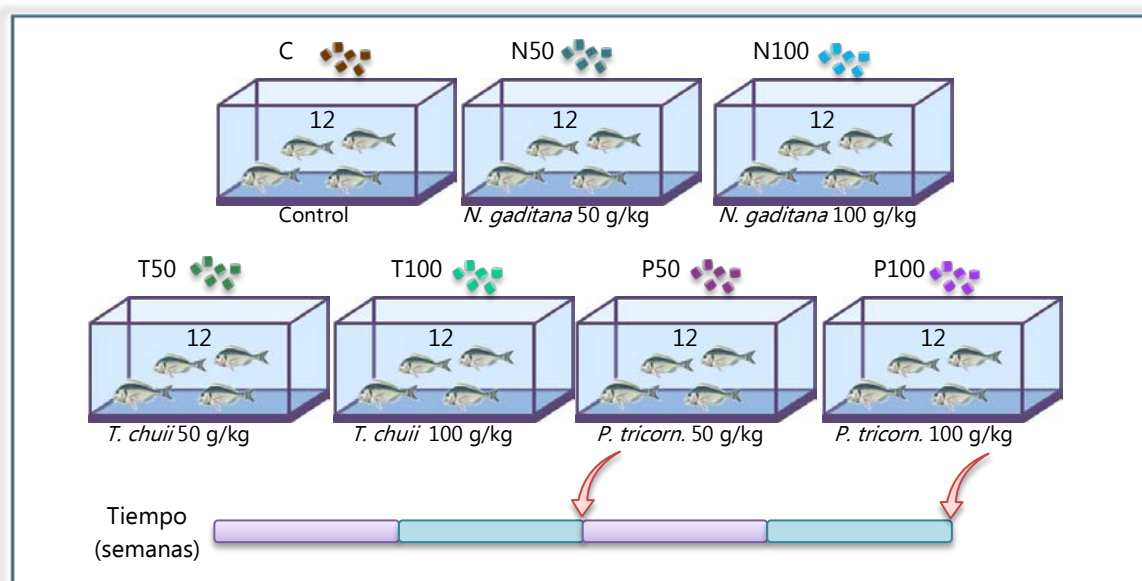


Figura 5. Esquema del diseño experimental planificado para el presente capítulo. Las flechas indican los tiempos de muestreo.

5. Resultados

5.1. Parámetros del sistema inmunitario

La actividad hemolítica del complemento fue uno de los parámetros más afectados de todas las repuestas inmunitarias estudiadas (Figura 6A). Los leucocitos de riñón cefálico de los ejemplares de dorada alimentados con las dietas N50, N100, T50 y T100 durante dos semanas mostraron una actividad hemolítica del complemento similar a la obtenida para los peces control. Sin embargo, las diferencias aparecieron en la cuarta semana, cuando tres de estas dietas (N50, N100 y T100) produjeron un incremento estadísticamente significativo en esta actividad. Por otra parte, las dietas P50 y P100 provocaron un aumento estadísticamente significativo en esta actividad en los dos tiempos muestreados, aunque este aumento fue mayor a dos semanas que a cuatro.

La actividad peroxidasa en el suero resultó afectada negativamente por la administración de las dietas N100, T50, T100 y P100 durante cuatro semanas (Figura 6B),

mientras que en los leucocitos se registró también un descenso significativo con la dieta P100 tras dos semanas (Figura 6F). Los niveles de IgM en suero no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 6C).

Los leucocitos de dorada alimentada con las dietas N50, N100, T50 o T100 durante dos o cuatro semanas presentaron una habilidad fagocítica similar a la observada en el grupo control. Sin embargo, la suplementación de la dieta con P50 o P100 durante los dos tiempos ensayados resultó en una estimulación significativa dosis-dependiente de esta actividad, que fue mayor durante las dos primeras semanas de tratamiento (Figura 6D). A las dos semanas, la capacidad fagocítica de los peces alimentados con las dietas N100, P50 y P100 fue significativamente mayor que en los peces alimentados con la dieta control. Los incrementos observados con las dietas P50 y P100 se mantuvieron en la semana cuatro, aunque solo fueron significativos en el caso de la dieta P100. Por otra parte, la administración de la dieta N50 durante dos semanas no afectó a la capacidad fagocítica, mientras que tras cuatro semanas se observó un aumento significativo con respecto al control. La dieta N100 produjo el efecto inverso: un aumento significativo a las dos semanas, que volvió a los niveles del control a las cuatro semanas. Las dietas T50 y T100 produjeron un aumento significativo de esta actividad tras cuatro semanas de administración (Figura 6E). Por su parte, la explosión respiratoria solo se vio afectada de manera significativa por las dietas P50 y P100, que produjeron un aumento en esta actividad tras dos semanas de administración (Figura 6G).

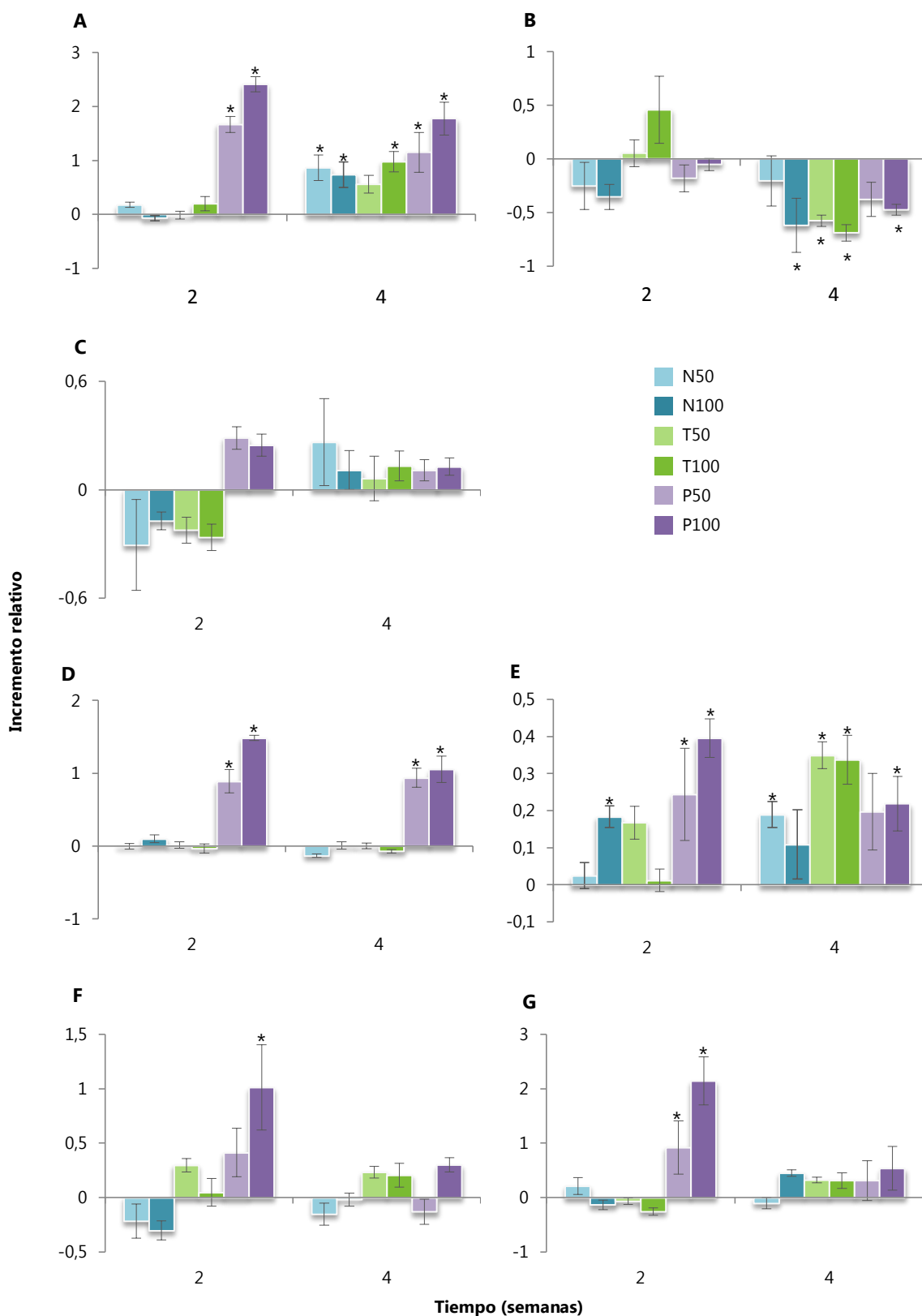


Figura 6. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas (*N. gaditana*, *T. chuii*, *P. tricornutum* a 50 y 100 g/kg). A) Actividad hemolítica del complemento, B) peroxidasa sérica, C) niveles de IgM en suero, D) habilidad fagocítica, E) capacidad fagocítica, F) peroxidasa intraleucocitaria, G) explosión respiratoria. Las barras representan la media ± error estándar (n=12). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

5.2. *Expresión de genes*

La expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en el riñón cefálico de doradas alimentadas con las dietas experimentales no mostró variaciones significativas con respecto al control a ninguno de los dos tiempos ensayados (Figura 7), excepto en el caso del gen de la β -defensina, que fue significativamente mayor tras cuatro semanas de alimentación con la dieta N100 (Figura 7B). El resto de los genes estudiados mostraron solo ligeros aumentos con respecto al control que no resultaron estadísticamente significativos, aunque los aumentos observados fueron más acusados tras cuatro semanas de tratamiento.

En el intestino, la expresión de los genes MHCII α y CSF-1R se vio aumentada significativamente en el grupo alimentado con la dieta T50 durante 2 semanas (Figura 8A). Al igual que se observó en riñón cefálico, el resto de los genes estudiados mostraron un ligero aumento que no fue significativo con ninguna de las dietas ensayadas.

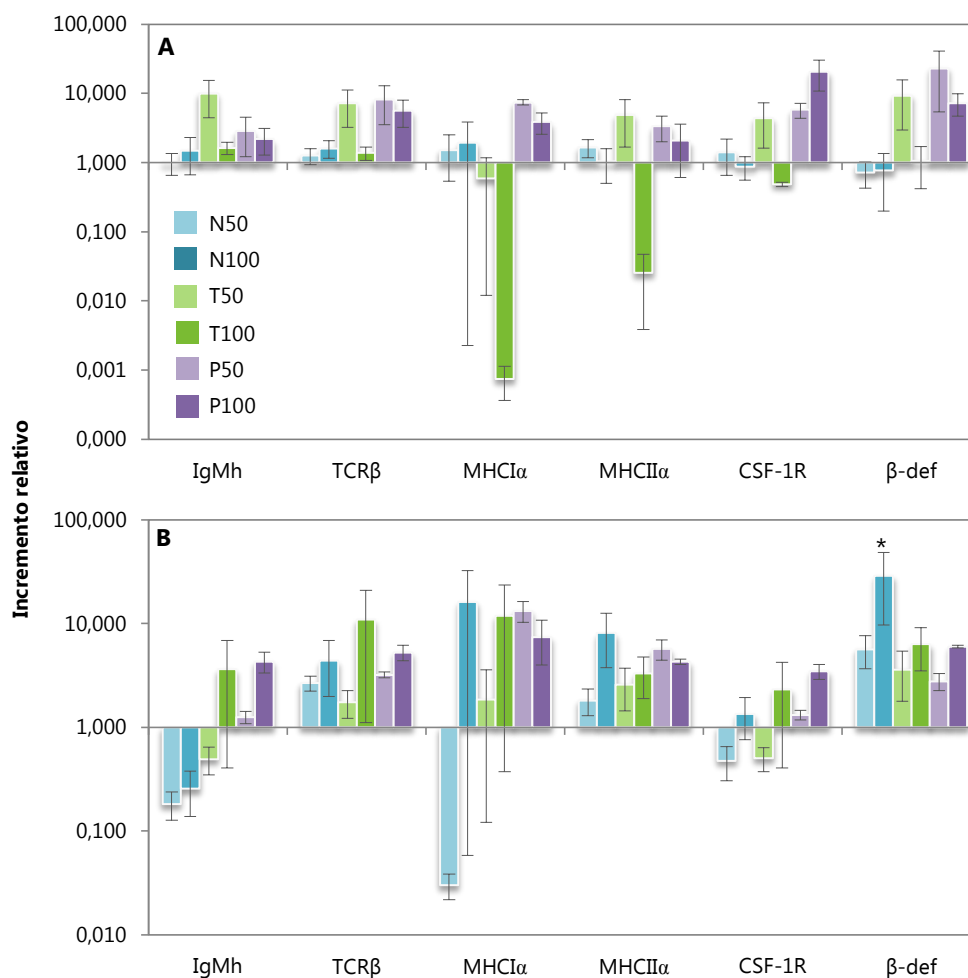


Figura 7. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media \pm error estándar ($n=12$). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

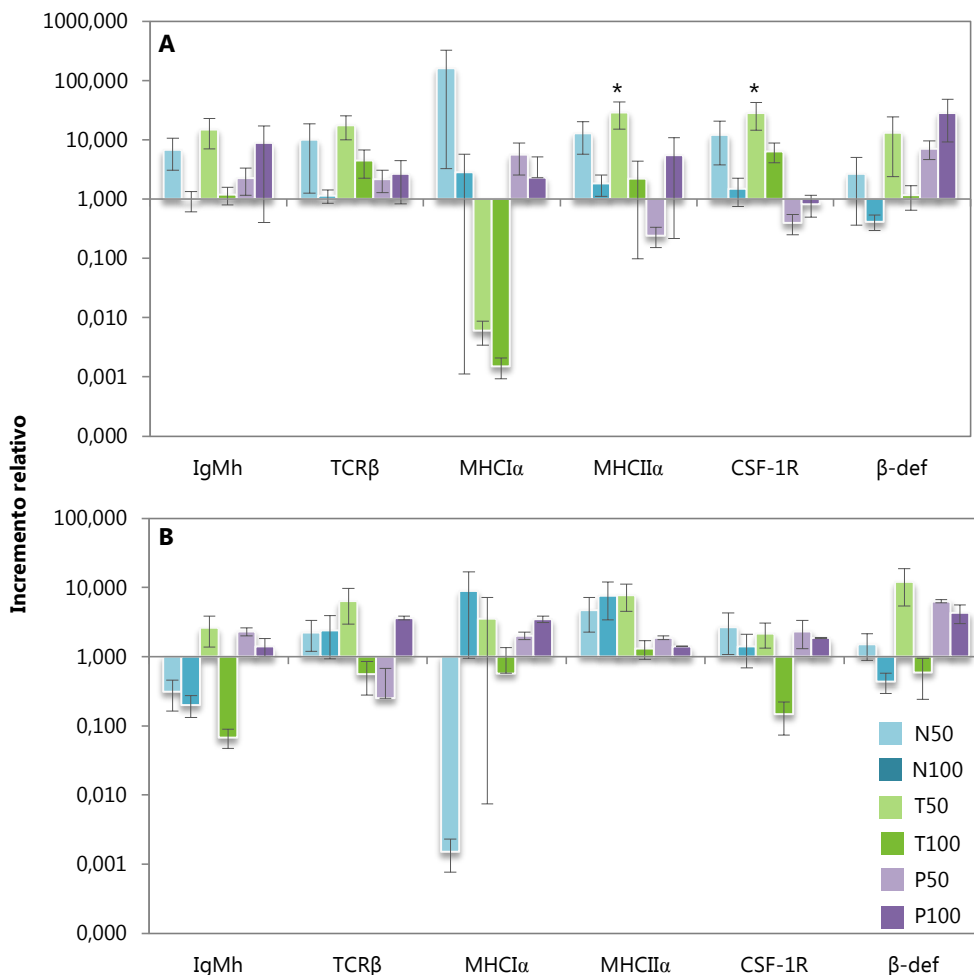


Figura 8. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con pienso suplementado con microalgas (*N. gaditana*, *T. chuii*, *P. tricornutum* a 50 y 100 g/kg) durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media±error estándar (n=12). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

6. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente capítulo mostraron que los peces alimentados con cualquiera de las dietas ensayadas aumentaron significativamente el nivel de al menos tres de las seis actividades analizadas. En general, la respuesta de los peces a estas microalgas fue mayor en los ejemplares alimentados con ellas durante el tiempo de administración más largo: a las dos semanas, solo dos dietas tuvieron un efecto positivo, mientras que a las cuatro semanas se observó una respuesta positiva con todas las dietas ensayadas. Una de las actividades más afectadas fue la actividad hemolítica el complemento, cuya importancia como componente de

los mecanismos de defensa no específicos es mayor en peces que en mamíferos. Estos resultados concuerdan con los observados en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en respuesta a la ingesta de carotenoides procedentes de las microalgas *Dunalliella* y *Phaffia* (Amar y col., 2004), en atún (*Thunnus maccoyii*) tras la administración de vitaminas E y C (Kirchhoff y col., 2011) y en mero (*Epinephelus brneus*) con alginato de sodio (Harikrishnan y col., 2011).

La actividad fagocítica también mostró aumentos significativos con las dietas ensayadas, principalmente en la capacidad fagocítica en peces alimentados con las dietas suplementadas durante cuatro semanas. Estos resultados muestran que las dietas empleadas favorecen la activación de fagocitos más que el aumento del número total de células fagocíticas presentes en el riñón cefálico, excepto en el caso de las dietas P50 y P100, con las que aumentaron ambos parámetros. Amar y col. (2004) demostraron también que la ingesta de carotenoides de microalgas incrementa la actividad fagocítica en trucha arcoíris, al igual que ocurre en *Labeo rohita* con la administración de vitamina C (Tewary y Patra, 2008).

Del presente estudio se deduce que *P. tricornutum* tiene un mayor efecto inmunoestimulante sobre los parámetros de la dorada estudiados que *N. gaditana* o *T. chunii*. Posiblemente, el efecto de esta microalga pueda ser atribuido a la presencia en la pared celular de un glucoromanano sulfatado y un β -1,3-glucano (Ford y Percival, 1965a). El primero ha sido caracterizado como un β -1,3-glucoromanano con ramificaciones en los C-6 de algunas subunidades y un nivel de ésteres sulfatos del 7.5% (Ford y Percival, 1965b; Campa-Córdova y col., 2002; Assreuy y col., 2008). Según la bibliografía consultada, solo dos estudios previos han investigado las propiedades inmunoestimulantes de extractos de *P. tricornutum*, ambos en ratón (Guzmán y col., 2001, 2003). En estos estudios, extractos hidrosolubles de esta microalga mostraron propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antioxidantes, mientras que los extractos de polisacáridos en crudo mostraron efectos antiinflamatorios e inmunoestimulantes. Una de las actividades estudiadas fue la fagocitosis, cuyo índice fue significativamente mayor en el grupo tratado que en el control. Además, *P. tricornutum* ha mostrado propiedades funcionales comparables a las de la harina de soja (Guil-Guerrero y col., 2004).

Por otra parte, Campa-Córdova y col. (2002) examinaron el efecto de soluciones de β -glucano y polisacárido sulfatado procedentes de *P. tricornutum* en la generación de anión superóxido y actividad superóxido dismutasa en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), demostrando que la administración de ambos ingredientes por separado incrementaba la explosión respiratoria de los hemocitos de esta especie. En lenguado, se ha demostrado que la administración de *Porphyridium cruentum* incrementa la explosión respiratoria de ejemplares vacunados con la bacterina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Díaz-Rosales y col.,

2008). De acuerdo con estos estudios previos, nuestros resultados indican un aumento en la explosión respiratoria de leucocitos de ejemplares alimentados con *P. tricornutum*.

El efecto de las dietas experimentales sobre la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario fue evaluado en riñón cefálico, que es el principal órgano hematopoyético, y en intestino, donde cabía esperar una respuesta local. Sin embargo, estos efectos fueron sorprendentemente bajos. Solo dos de las dietas mostraron propiedades inmunoestimuladoras, principalmente sobre los genes de la β -defensina (en riñón cefálico), y MHCII α y CSF-1R (en intestino). La β -defensina es un péptido antimicrobiano recientemente descrito que ha mostrado una fuerte actividad antimicrobiana frente a *Vibrio anguillarum* (Cuesta y col., 2011). El incremento en la expresión de este péptido antimicrobiano podría llevar a una defensa más eficaz frente a determinadas bacterias, aunque son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

El gen CSF-1R codifica el receptor para el factor estimulante de colonias 1, una citoquina que controla la producción, diferenciación y función de los macrófagos. El aumento de CSF-1R y MHCII α en respuesta a *T. chuii* sugiere que esta microalga puede ayudar a desarrollar una respuesta inmunitaria innata contra los patógenos. Por otra parte, la ausencia de diferencias en los marcadores de linfocitos T y B (genes TCR β IgM respectivamente) indica que estos tipos celulares no se activan o proliferan en respuesta a las dietas ensayadas.

CAPÍTULO 3: Administración de inulina y *Bacillus subtilis* en dieta

1. Introducción

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva aerobia que se encuentra habitualmente en el aire, el suelo y la materia en descomposición. Este género tiene la capacidad de formar esporas, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientales adversas, ya sea temperaturas extremas, sustancias químicas o incluso algunos tipos de radiación. Además, este género se caracteriza también por la producción de enzimas hidrolíticas, tales como las proteasas, amilasas y glicosidasas (Sippola y Mäntsälä, 1981), que descomponen las moléculas complejas ingeridas con el alimento y las transforman en moléculas más simples y fácilmente asimilables. Esta bacteria ha mostrado propiedades inmunoestimulantes y probióticas en animales a través de la estimulación del crecimiento y la supervivencia de las bacterias acidolácticas presentes en el intestino (Casula y Cutting, 2002; Gaggia y col., 2010).

En peces, diversos estudios han demostrado que *B. subtilis* estimula las respuestas inmunitarias e incrementa la resistencia a las infecciones (Salinas y col., 2005; Newaj-Fyzul y col., 2007; Kumar y col., 2008; Aly y col., 2008b). Estas propiedades han sido estudiadas en varias especies entre las que se encuentra la dorada (*Sparus aurata*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), el labeo (*Labeo rohita*) y la corvina amarilla (*Larimichthys crocea*) (ver Tabla 10).

Tabla 10. Estudios (ordenados cronológicamente) sobre la administración de *B. subtilis* en peces.

Dosis y tiempo de administración	Especie	Resultados	Referencia
10 ⁷ ufc/g 3 semanas	<i>Sparus aurata</i>	↓ peroxidasa de leucocitos → explosión respiratoria ↑ fagocitosis → citotoxicidad	Salinas y col., 2005
0.5x10 ⁷ , 1x10 ⁷ , 1.5x10 ⁷ ufc/g 2 semanas	<i>Labeo rohita</i>	↑ ganancia de peso ↑ recuento de leucocitos ↑ proteína sérica ↑ globulina ↑ hemoglobina ↑ resistencia frente a <i>Aeromonas hydrophila</i>	Kumar y col., 2006
10 ⁸ ufc/g 8 semanas	<i>Labeo rohita</i>	↑ proteína sérica ↑ globulina → explosión respiratoria ↑ nivel de anticuerpos ↑ resistencia frente a <i>Edwardsiella tarda</i>	Nayak y col., 2007
10 ⁷ ufc/g 2 semanas	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑ explosión respiratoria ↑ lisozima sérica e intestinal ↑ peroxidasa ↑ fagocitosis ↑ resistencia frente a <i>Aeromonas</i> sp.	Newaj-Fyzul y col., 2007
10 ⁷ ufc/g 4-8 semanas	<i>Oreochromis niloticus</i>	↑ ganancia de peso ↑ explosión respiratoria ↑ actividad lisozima ↑ adherencia de neutrófilos ↑ actividad bactericida del suero ↑ protección frente a <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Streptococcus iniae</i>	Aly y col., 2008b
0.5x10 ⁷ , 1x10 ⁷ , 1.5x10 ⁷ ufc/g 2 semanas	<i>Labeo rohita</i>	↑ explosión respiratoria ↑ actividad bactericida ↑ granulocitos	Kumar y col., 2008
0.42 x10 ⁷ , 1.35 x10 ⁷ ufc/g	<i>Larimichthys crocea</i>	→ tasa de crecimiento → supervivencia → explosión respiratoria → complemento → lisozima → superóxido dismutasa	Ai y col., 2011

Los símbolos representan un incremento (↑), un descenso (↓) o no efecto (→) sobre la respuesta especificada.

Las investigaciones llevadas a cabo para evaluar los efectos de la administración de *B. subtilis* en peces se han centrado en la evaluación de ciertos parámetros inmunitarios, así como el crecimiento y la resistencia a enfermedades. Sin embargo, a pesar de la importancia del intestino como primera barrera de defensa frente a agresiones externas, la posible influencia de esta bacteria sobre la microflora y la morfología del intestino todavía no ha sido estudiada en peces.

2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos del prebiótico inulina, el probiótico *B. subtilis* y su combinación como simbiótico sobre determinados parámetros del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.), la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino y riñón cefálico, y la morfología y microbiota intestinal. Por último, se determinó la supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento frente a la infección experimental por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

3. Hipótesis de trabajo

B. subtilis tiene capacidad de crecer en presencia de inulina como única fuente de carbono y energía.

La inulina y *B. subtilis*, al ser administrados conjuntamente en la dieta de peces, tienen un efecto inmunoestimulante sinérgico sobre los parámetros del sistema inmunitario, generándose una respuesta mayor que cuando son administrados por separado. Además, ambos tienen un efecto beneficioso sobre la morfología del intestino y la microflora intestinal. Con todo ello, se espera que los animales alimentados con pienso suplementado con inulina y/o *B. subtilis* sobrevivan mejor a una infección experimental que los peces alimentados con pienso sin suplementar.

4. Diseño experimental

En primer lugar se determinó la capacidad de crecimiento de *B. subtilis* en presencia de inulina como única fuente de carbono y energía.

A continuación, se llevaron a cabo dos experimentos exactamente iguales, en los que solo varió el peso medio de los ejemplares. Noventa y seis animales procedentes de un mismo lote (100 g de peso medio en el primer experimento, 50 g en el segundo) fueron distribuidos al azar en ocho acuarios con 12 peces cada uno (dos acuarios por tratamiento) (Figura 9). Cada grupo fue alimentado con uno de los siguientes piensos:

- » C: pienso control, no suplementado.
- » I: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg.
- » B: pienso suplementado con *B. subtilis* a 10^7 ufc/g.

- » BI: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g.

En el primero de los experimentos se estudiaron los efectos causados por estas dietas sobre el sistema inmunitario, la expresión de genes, la morfología intestinal y la microflora intestinal. Transcurridas 2 y 4 semanas de iniciado el tratamiento se muestrearon doce ejemplares de cada grupo y se recogieron las siguientes muestras:

- » Sangre y riñón cefálico: para analizar los parámetros del sistema inmunitario.
- » Riñón cefálico e intestino: para estudiar la expresión de genes.
- » Intestino: para realizar el estudio de microscopía óptica y electrónica (solo a 4 semanas).
- » Intestino: para estudiar la microbiota intestinal (solo a 4 semanas).

En el segundo experimento, los peces, tras ser alimentados con las diferentes dietas suplementadas, fueron sometidos a una infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscida*, y se observó la mortalidad de los ejemplares durante siete días.

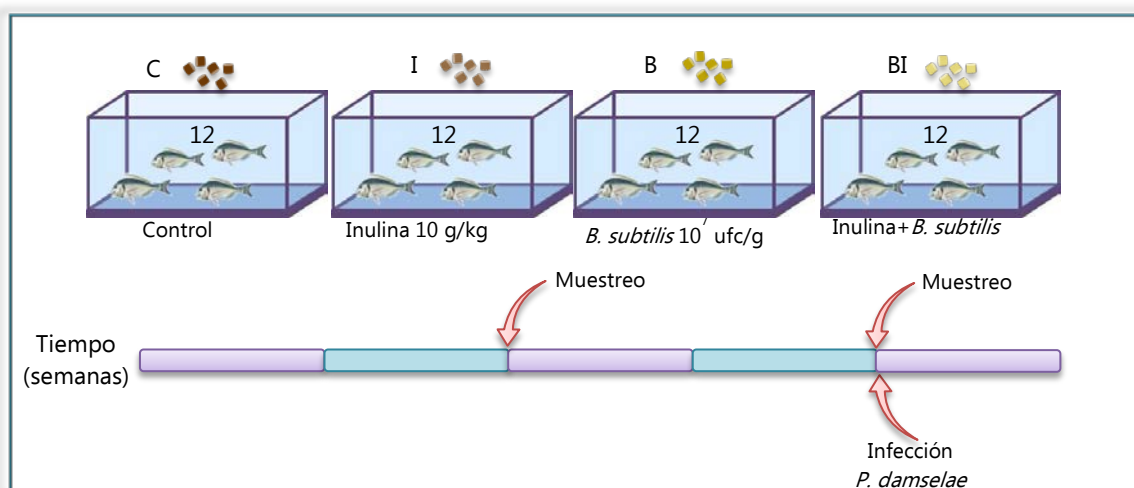


Figura 9. Diseño experimental planteado para los dos experimentos del presente capítulo. En el primer experimento, se realizaron dos muestreos, indicados por las flechas rojas. En el segundo experimento, se llevó a cabo una infección experimental al finalizar el tiempo de tratamiento y se observó la mortalidad durante una semana.

5. Resultados

5.1. Crecimiento de *B. subtilis* en presencia de inulina

La curva de crecimiento de *B. subtilis* en presencia de inulina como única fuente de carbono demostró que este probiótico es capaz de utilizar la inulina. De hecho, el crecimiento de *B. subtilis* en presencia de inulina fue extraordinariamente similar al obtenido al emplear glucosa como fuente de carbono y energía (Figura 10).

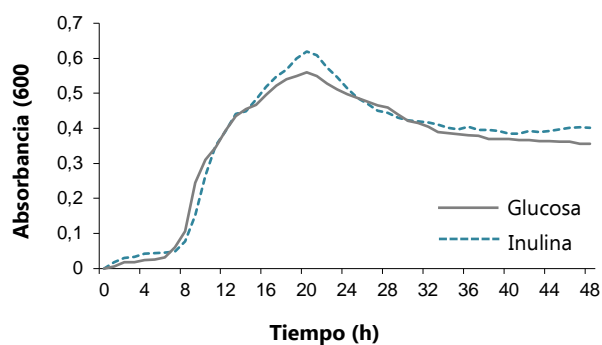


Figura 10. Curva de crecimiento de *B. subtilis* en PBS estéril suplementado con glucosa o inulina. Los valores son medias de medidas duplicadas.

5.2. Parámetros del sistema inmunitario

Como ya se había observado en el capítulo 1, la dieta suplementada con inulina resultó causar un incremento estadísticamente significativo de la actividad hemolítica del complemento tras dos y cuatro semanas de administración, así como de la capacidad fagocítica de los leucocitos tras las cuatro semanas de administración. Sin embargo, los niveles de IgM en suero, la habilidad fagocítica y la explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico solo aumentaron significativamente tras dos semanas (Figura 11).

Por el contrario, los peces que recibieron la dieta suplementada con *B. subtilis* mostraron un incremento significativo de los niveles de IgM, así como de la habilidad fagocítica de sus leucocitos con respecto al control, pero no de su explosión respiratoria. No se detectaron diferencias significativas al comparar el mismo parámetro en ejemplares sometidos a estos dos tratamientos.

Cuando probiótico y prebiótico se administraron conjuntamente (dieta BI), solamente se observó un incremento significativo en dos parámetros humorales del sistema inmunitario, que fueron los niveles de IgM séricos (a las dos semanas) y la actividad hemolítica del complemento (a las cuatro semanas). En el caso de los niveles de IgM, el incremento fue mayor en peces alimentados con la dieta BI, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dietas I, B y BI. En relación a la actividad del complemento, el incremento observado con la dieta BI fue menor que el obtenido en los peces alimentados con las dietas I y B. Ninguna de las dietas afectó significativamente a la capacidad fagocítica de los leucocitos ni a la actividad peroxidasa (tanto en suero como en leucocitos).

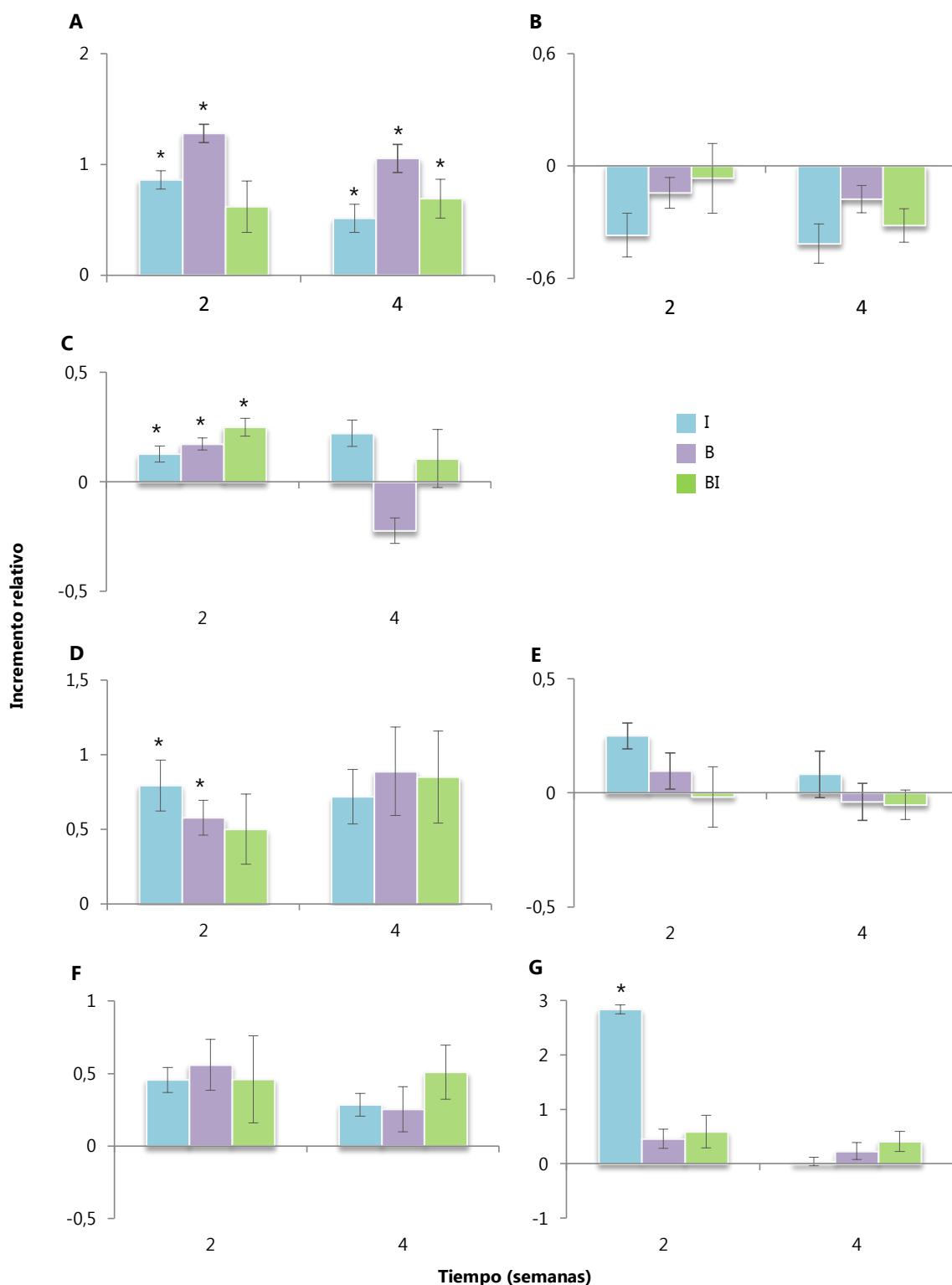


Figura 11. Incremento relativo observado en los parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas con pienso suplementado con inulina (10 g/kg) y/o *B. subtilis* (10^7 ufc/g). A) Actividad hemolítica del complemento, B) peroxidasa sérica, C) IgM en suero, D) habilidad fagocítica, E) capacidad fagocítica, F) peroxidasa intraleucocitaria, G) explosión respiratoria. Las barras representan la media±error estándar (n=12). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

5.3. Estudio microscópico

Los efectos provocados en el intestino anterior tras cuatro semanas de alimentación con las dietas experimentales fueron analizados mediante microscopía óptica (LM) y electrónica de transmisión (TEM). Las observaciones de LM revelaron que los peces alimentados con la dieta C presentaban una morfología normal de la pared intestinal, mientras que en las muestras de ejemplares alimentados con las dietas I, B y BI se observaron diversos signos de daño o alteración.

Histológicamente, la pared intestinal de la dorada está constituida por cuatro capas que desde el lumen hacia el interior son: mucosa, submucosa, muscular (muscular interna y externa) y serosa (Figuras 12A y 12B). Los intestinos de peces procedentes del grupo control mostraron un epitelio constituido por una capa simple de células epiteliales columnares con abundantes células caliciformes intercaladas y unidas por complejos de unión aparentemente intactos (Figura 12A). No se observaron restos celulares en la luz intestinal, ni signos de daño, edema o inflamación. Una observación más detallada evidenció la presencia de una capa mucosa continua en la parte apical de las células, así como la presencia de algunos leucocitos infiltrados (Figura 12C).

Los peces alimentados con las dietas experimentales (I, B, BI) mostraron, curiosamente, las mismas alteraciones morfológicas cuando fueron estudiados mediante LM, observándose diferentes signos de daño intestinal. Todas las alteraciones observadas se presentaron en la mucosa, mientras que las otras capas del intestino (submucosa, muscular y serosa) mostraron la misma morfología que la observada en el intestino de peces control. La alteración más significativa fue la presencia de áreas intestinales con enterocitos altamente vacuolados, alteración que fue más evidente en la parte apical de las vellosidades intestinales; así como una aparente reducción en el número de células caliciformes, principalmente en la base de las vellosidades (Figura 12B). Las áreas dañadas mostraron también un desplazamiento de los núcleos de los enterocitos hacia una posición más apical. Los enterocitos siempre aparecen unidos por complejos de unión aparentemente intactos y con una capa mucosa más gruesa que la observada en el intestino de los peces control. Al igual que en los peces control, no se observaron restos celulares en la luz intestinal y en el epitelio se detectaron algunos leucocitos infiltrados (Figura 12D).

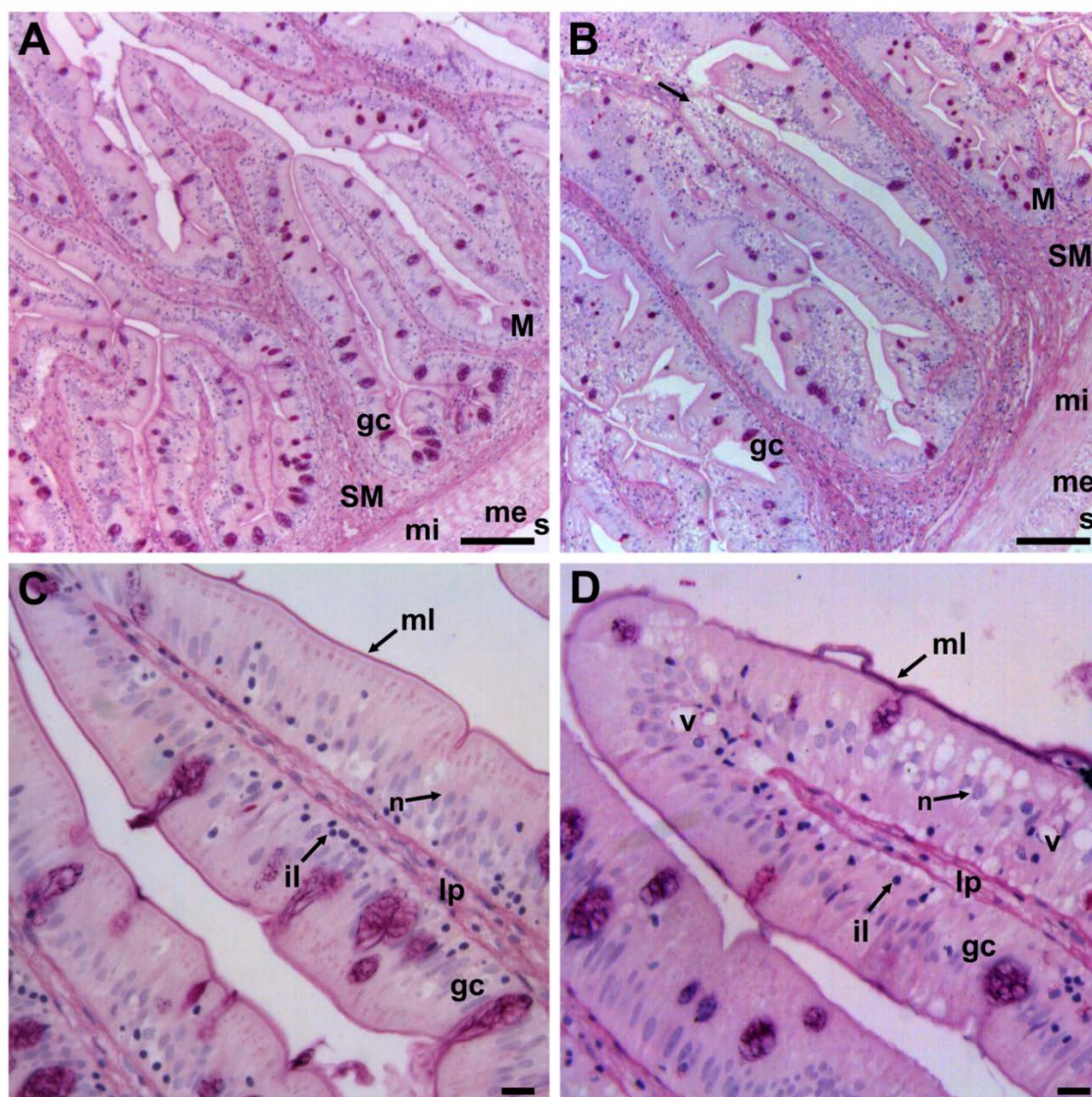


Figura 12. Histología comparativa (tinción PAS) del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas experimentales C (control) (A, C) y B (10^7 ufc/g *B. subtilis*) (B, D). La flecha en la micrografía B muestra las áreas dañadas en el epitelio. M: mucosa; SM: submucosa; mi: muscular interna; me: muscular externa; s: serosa; gc: célula caliciforme, ml: capa de moco; il: leucocitos infiltrados; v: vacuolas, n: núcleo, lp: lamina propia. Barras: A, B 100 μ m; C, D 10 μ m.

Las observaciones de TEM confirmaron que los tres grupos de peces alimentados con las dietas experimentales I, B y BI mostraban una mucosa intestinal dañada comparada con la de los peces alimentados con la dieta C. Los peces del grupo control presentaron un intestino con un epitelio columnar simple integrado por células altas (Figura 13A) con un borde en cepillo bien definido y organizado (Figura 13A, recuadro). Las células aparecieron unidas por complejos de unión intactos y no se detectaron espacios intercelulares entre los enterocitos. Los núcleos basales eucromatínicos con el nucléolo fueron también evidentes en dichos enterocitos y las células presentaron un citoplasma con escasas vacuolas claras (Figura 13A).

Los peces alimentados con las dietas experimentales presentaron un epitelio continuo integrado por células altas (Figura 13B) con microvellosidades más cortas, menos numerosas y más desorganizadas, en comparación con las observadas en los enterocitos de los peces control (Figura 13B, recuadro). La alteración más destacable fue la presencia de amplios espacios intercelulares entre los enterocitos, no detectado mediante LM. Estos espacios intercelulares fueron más amplios en la zona basal del epitelio. Las secciones transversales mostraron de una manera mucho más evidente la presencia de estos espacios, así como la de las vacuolas en el citoplasma de los enterocitos (Figura 13C, 13D). También se observaron leucocitos intraepiteliales (Figura 13D).

Las medidas morfométricas obtenidas mediante el análisis de imágenes de LM y TEM se encuentran resumidas en la Tabla 11. El área correspondiente a las vellosidades, la luz, y la pared intestinal, determinadas mediante microscopía electrónica en el intestino anterior, fue similar en todos los grupos, sin diferencias significativas entre los ejemplares alimentados con las dietas experimentales y el grupo control. En todos los grupos se observó un incremento en la medida de la altura de las vellosidades (V_h) y el diámetro del intestino (I_d) con respecto al grupo control, aunque el ratio $I_d:V_h$ no resultó afectado de manera significativa.

Las células caliciformes totales (PAS+AB+ y PAS+) se vieron significativamente reducidas en número en los peces alimentados con las dietas I, B y BI en comparación con las de los peces presentes en el grupo control, siendo las dietas que contenían *B. subtilis* (B, BI) las que provocaron una mayor reducción. Además, las dietas experimentales afectaron al tipo de células caliciformes observado. En los peces alimentados con las dietas I y B, el número de células caliciformes PAS+AB+ descendió significativamente, mientras que las células PAS+ no se vieron afectadas de manera significativa. En los peces alimentados con la dieta BI, el número de ambos tipos celulares (PAS+AB+ y PAS+) descendió respecto al control. El número de leucocitos intraepiteliales (IELs) solo resultó afectado en los peces alimentados con la dieta I, en los que presentó un número significativamente mayor con respecto al control, mientras que los leucocitos de la lámina propia no presentaron diferencias significativas.

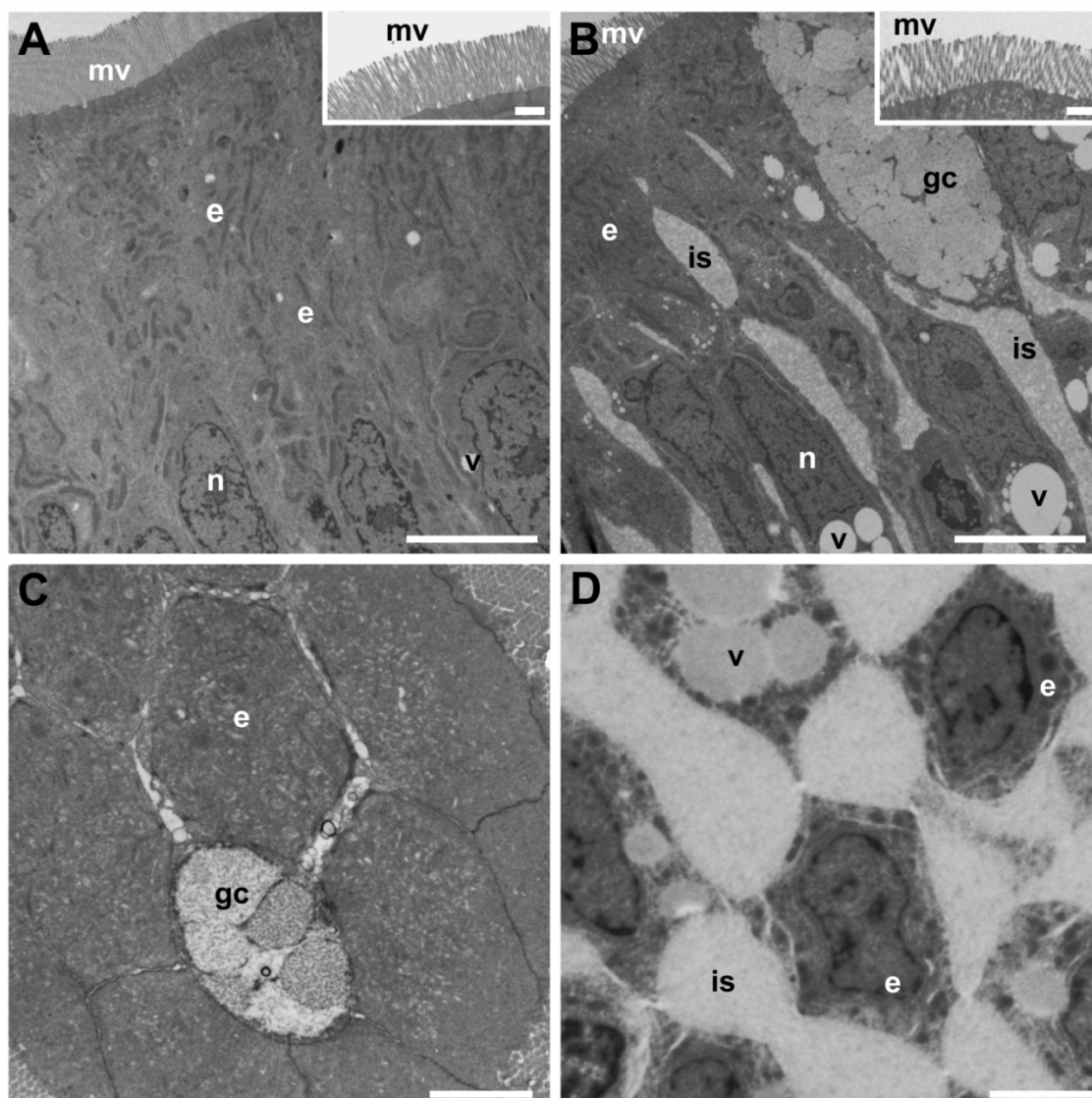


Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas C (control) (A, C, recuadro A), BI (B), I (D) o B (10^7 ufc/g *B. subtilis*) (recuadro B). A) Sección del epitelio mostrando la morfología normal. B) Sección del epitelio mostrando la vacuolización de los enterocitos y los espacios intercelulares. Recuadro A) borde en cepillo regular y bien definido. Recuadro B) Las microvellosidades son claramente más cortas y están más desorganizadas que en el grupo control. C) Sección transversal del epitelio con morfología normal. D) Sección transversal mostrando grandes vacuolas y espacios intercelulares. mv: microvellosidades, e: enterocito; gc: célula caliciforme; is: espacio intercelular; v: vacuola, n: núcleo. Barras: A, B 5 μ m; Recuadros A, B 1 μ m; C, D 2 μ m.

Para determinar la longitud de las microvellosidades, se realizaron medidas morfométricas en imágenes de TEM. Estas medidas confirmaron que los peces alimentados con las dietas I, B y BI presentaron microvellosidades más cortas que las de los peces control (Tabla 11).

Tabla 11. Medidas intestinales de ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales (C, control; I, inulina; B, *B. subtilis*; BI, *B. subtilis*+inulina) durante cuatro semanas. Los datos representan las medias± el error estándar (n=6). Valores en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Parámetro	Dieta			
	C	I	B	BI
Va	5.58±1.08	7.96±0.18	7.59±0.62	6.93±0.29
Wa	1.45±0.34	1.52±0.16	1.62±0.24	1.30±0.13
La	0.84±0.18	1.29±0.23	0.74±0.24	0.81±0.29
Vh	1032±55 ^a	1426±38 ^b	1342±50 ^{bc}	1260±39 ^c
Id	2885±171 ^a	3743±41 ^b	3665±108 ^{bc}	3427±69 ^c
Id:Vh	2.80±0.10	2.65±0.06	2.72±0.07	2.75±0.09
GC	62±4 ^a	50±3 ^b	39±3 ^c	34±3 ^c
GC PAS+AB+	57±3 ^a	42±3 ^b	34±3 ^{bc}	31±3 ^c
GC PAS+	6±1 ^{ab}	8±1 ^b	5±1 ^{ac}	3±1 ^c
IELs	254±4 ^a	307±15 ^b	242±16 ^a	243±19 ^a
LPLs	275±16	288±15	304±27	281±10
MVh	1.90±0.09 ^a	1.23±0.05 ^b	1.64±0.05 ^c	1.51±0.05 ^c

Va: área vellosidades (mm²); Wa: área pared (mm²); La: área luz (mm²); Vh: altura vellosidades (µm); Id: diámetro intestinal (µm); Id:Vh : ratio altura vellosidades : diámetro intestinal; Gc: células caliciformes (por 100.000 µm²); GC PAS+AB+: goblet cells PAS+ and AB+ (por 100.000 µm²); GC PAS+: células caliciformes PAS+ (por 100.000 µm²); IELs: leucocitos intraepiteliales (por 100.000 µm²); LPLs: leucocitos de la lámina propia (por 100.000 µm²); MVh: altura microvellosidades (µm).

La puntuación obtenida en cada una de las alteraciones observadas en el intestino demostró un daño significativo en los peces alimentados con las dietas I, B y BI (Tabla 12). Estas tres dietas provocaron un incremento en los espacios intercelulares entre los enterocitos y un aumento de la vacuolización en el citoplasma, mientras que la desorganización de las microvellosidades fue significativa solo en los peces alimentados con la dieta I. La puntuación total mostró que las muestras procedentes de los tres grupos experimentales (I, B y BI) presentaron cambios ultraestructurales patológicos severos, siendo las dietas que contenían *B. subtilis* (B y BI) las que presentaron el mayor grado de alteraciones patológicas.

Tabla 12. Resultados histológicos para el intestino anterior de peces alimentados con las diferentes dietas experimentales (C, control; I, inulina; B, *B. subtilis*; BI, *B. subtilis*+inulina) durante cuatro semanas. Los datos representan las medias \pm el error estándar (n=6). Valores en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Alteración	Dieta			
	C	I	B	BI
Espacio intercelular	0.00 \pm 0 ^a	1.13 \pm 0.17 ^c	2.10 \pm 0.19 ^b	1.5 \pm 0.21 ^{bc}
Vacuolización de enterocitos	0.43 \pm 0.09 ^a	1.43 \pm 0.15 ^b	2.17 \pm 0.13 ^c	1.57 \pm 0.18 ^b
Daño/desorganización microvellosidades	0.00 \pm 0.06 ^a	0.81 \pm 0.18 ^b	0.50 \pm 0.16 ^{ab}	0.40 \pm 0.23 ^a
Daño total	0.43 \pm 0.11 ^a	3.37 \pm 0.28 ^b	4.77 \pm 0.23 ^c	3.47 \pm 0.34 ^b

5.4. Microflora intestinal

El análisis de la microflora intestinal se realizó en ocho ejemplares de cada tratamiento tras cuatro semanas de tratamiento con las dietas experimentales y los resultados de los parámetros calculados aparecen resumidos en la tabla 13. El número de bandas de la DGGE (riqueza específica, R) observadas en los peces alimentados con las dietas I, B y BI fue significativamente menor que el número detectado en los peces alimentados con la dieta control.

Los peces alimentados con dietas suplementadas con *B. subtilis* (B y BI) mostraron valores significativamente menores del índice de Shannon (H' , 1.72 y 1.76 respectivamente) que los peces alimentados con las dietas C e I (2.78 y 2.37 respectivamente). De acuerdo a criterios previamente establecidos, los valores de R_r calculados indican que los peces control mostraron una elevada habitabilidad (55.08), mientras que esta habitabilidad fue media en el intestino de los peces alimentados con las dietas I y B (24.21 y 27.67 respectivamente). Por el contrario, cuando los peces se alimentaron con la dieta BI, la habitabilidad de su intestino mostró una drástica reducción, con valores correspondientes a ambientes con una muy baja capacidad para soportar diferentes especies. El análisis de los dendrogramas mostró que el porcentaje de similitud de los patrones de DGGE fue del 75% en los peces control, mientras que en el caso de los demás peces estudiados varió significativamente (Figura 14). La similitud aumentó significativamente en los peces que se alimentaron con las dietas I y BI (87% y 62% respectivamente) y se redujo en el caso de los especímenes alimentados con la dieta suplementada solo con el probiótico (B) (sobre el 40%).

Tabla 13. Valores de riqueza específica (R), índice de Shannon (H') y habitabilidad (Rr) obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de intestinos de doradas alimentadas con las dietas experimentales (C, control; I, inulina; B, *B. subtilis*; BI, *B. subtilis*+inulina) durante cuatro semanas. Los datos representan la media \pm el error estándar (n=8). Valores en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Índice	Dieta			
	C	I	B	BI
R	17.33 \pm 0.94 ^a	12.75 \pm 0.43 ^b	11.00 \pm 1.41 ^b	6.00 \pm 0.001 ^c
H'	2.78 \pm 0.12 ^a	2.37 \pm 0.09 ^a	1.72 \pm 0.38 ^b	1.66 \pm 0.03 ^b
Rr	55.08 \pm 3.24 ^a	27.67 \pm 1.84 ^b	24.21 \pm 6.21 ^b	1.8 \pm 0.001 ^c

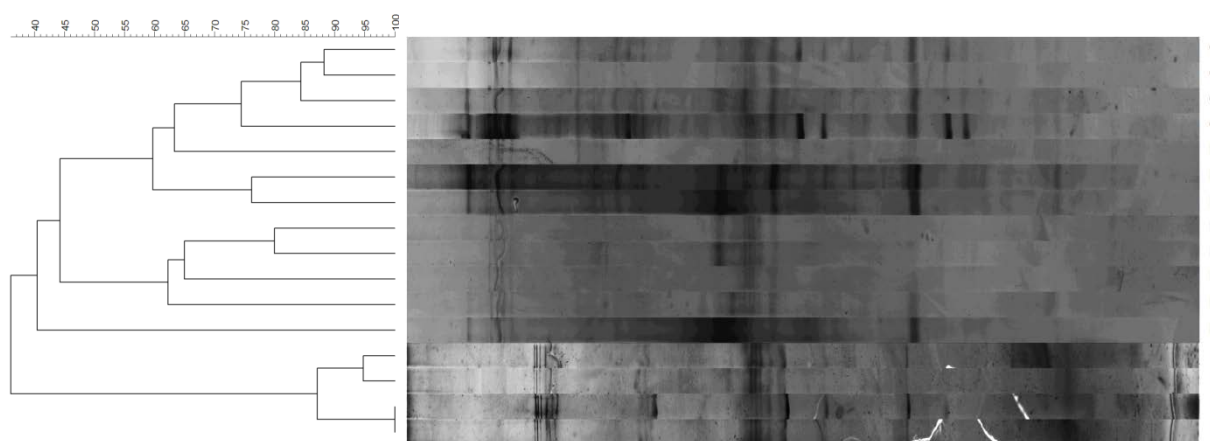


Figura 14. Análisis de agrupamientos basados en el índice de similitud de los patrones de PCR-DGGE derivados del análisis de los intestinos de ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) alimentados durante 4 semanas con las dietas C, I, B y BI (C, control; I, inulina; B, *B. subtilis*; BI, *B. subtilis*+inulina).

5.5. Expresión de genes

El análisis de la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en el riñón cefálico y en el intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales durante dos o cuatro semanas no mostró variaciones significativas. En el riñón cefálico, se observó un aumento notable en la expresión de todos los genes tras dos semanas de tratamiento, siendo los más afectados el TCR β , MHCII α , CSF1R y β -defensina. A las cuatro semanas, este incremento no significativo descendió de nuevo a niveles similares a los obtenidos en ejemplares pertenecientes al grupo control (Figura 15).

En el caso del intestino, la respuesta fue menor, ya que todos los genes mostraron valores muy cercanos al control, excepto la β -defensina, que presentó valores más altos que los encontrados en el intestino de peces pertenecientes al grupo control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 16).

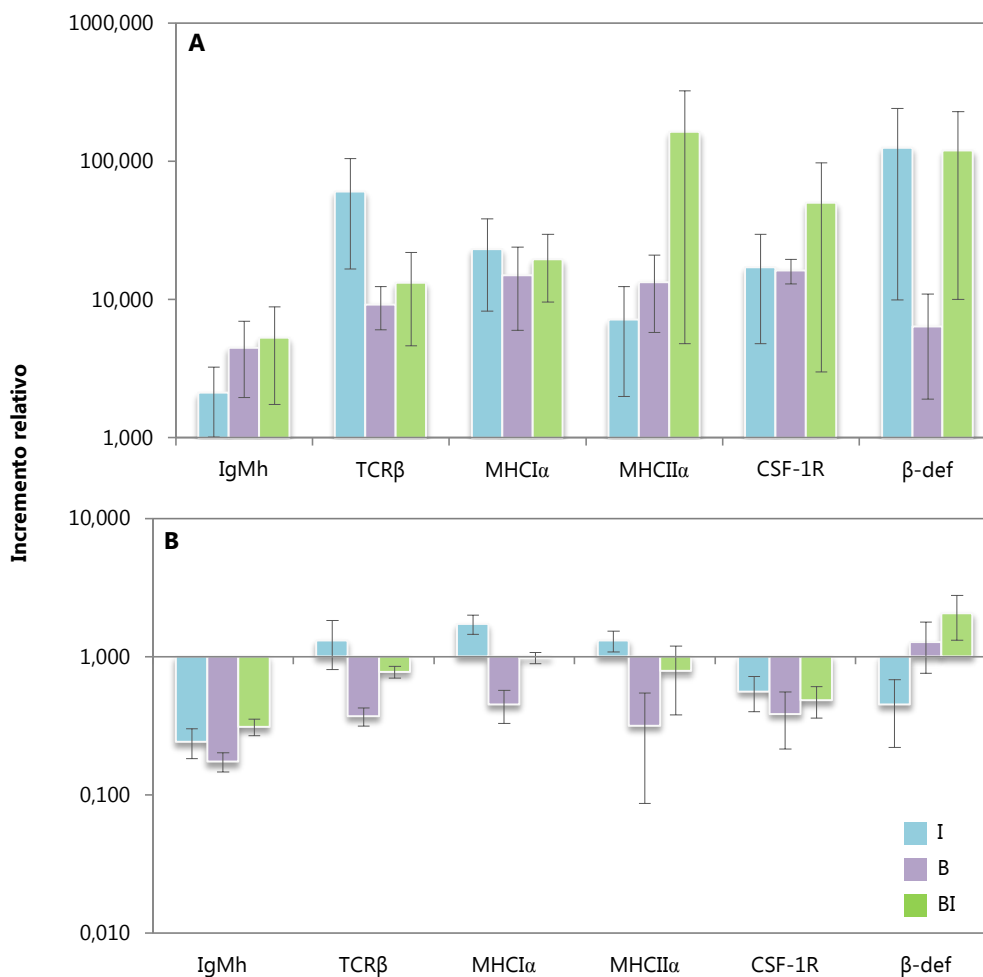


Figura 15. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con las dietas experimentales I (inulina a 10 g/kg), B (*B. subtilis* a 10^7 ufc/g) y BI (inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g) durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media \pm error estándar (n=12). IgMh, IgM; TCR β , receptor β de células T; MHC I α , complejo mayor de histocompatibilidad I α ; MHC II α , complejo mayor de histocompatibilidad II α ; CSF-1R, receptor 1 del factor estimulante de colonias; β -def, β -defensina.

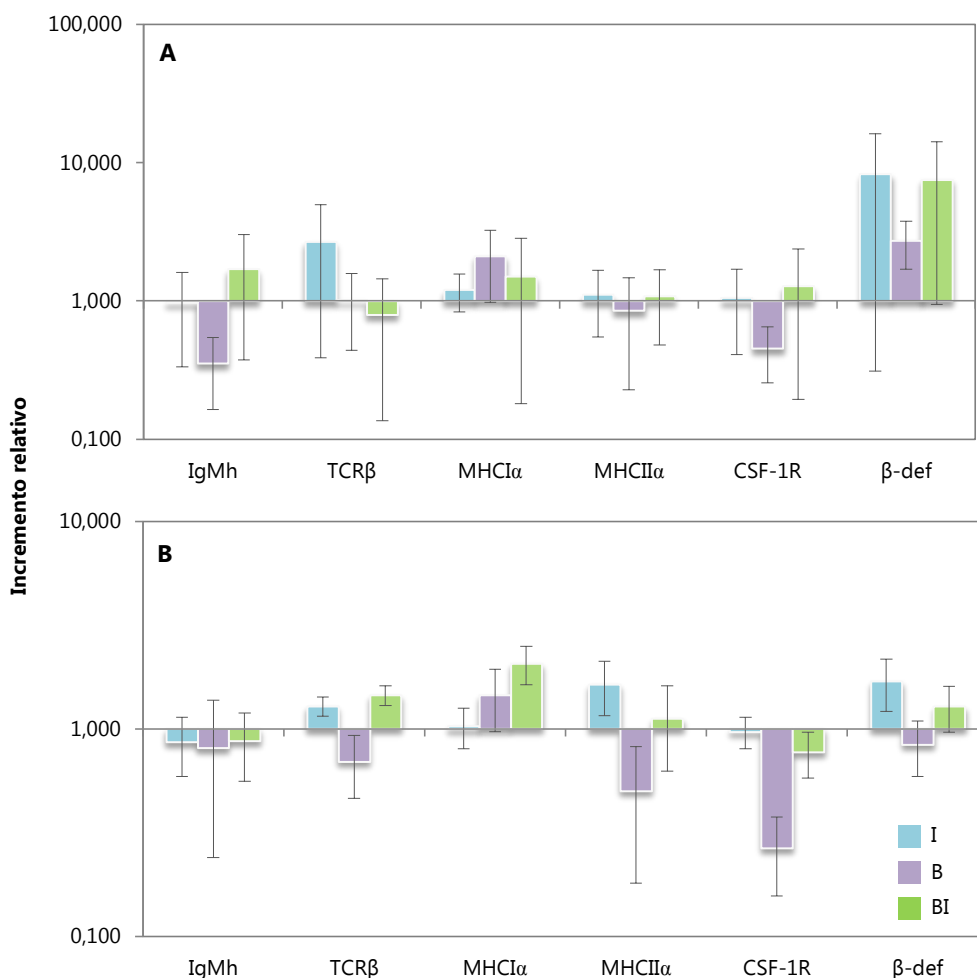


Figura 16. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales I (inulina a 10 g/kg), B (*B. subtilis* a 10⁷ ufc/g) y BI (inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10⁷ ufc/g) durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media ± error estándar (n=12). IgMh, IgM; TCRβ, receptor β de células T; MHCIIα, complejo mayor de histocompatibilidad Iα; MHCIIα, complejo mayor de histocompatibilidad IIα; CSF-1R, receptor 1 del factor estimulante de colonias; β-def, β-defensina.

5.6. Infección experimental

La mortalidad en los peces del grupo control infectados experimentalmente ocurrió durante los dos primeros días post-inyección (Figura 17). La mortalidad acumulada de los peces alimentados con las dietas experimentales fue de 33.3% (I), 50% (C y B) y 100% (BI) (Figura 18). El análisis estadístico de la mortalidad acumulada al finalizar la infección en los peces alimentados con la dieta BI fue significativamente mayor que la observada en los peces alimentados con la dieta control. Los análisis bacteriológicos revelaron la presencia de *P.*

damselae subsp *piscicida* en hígado y bazo de todos los peces que murieron durante la infección.

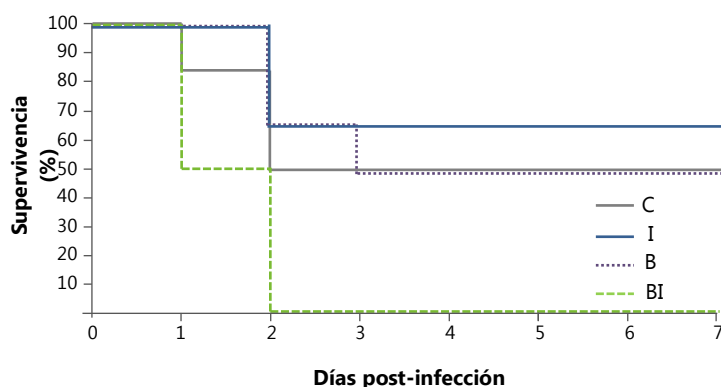


Figura 17. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las doradas alimentadas con cada una de las dietas experimentales (C: control; I: inulina a 10 g/kg; B: *B. subtilis* a 10^7 ufc/g; y BI: inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g) durante la infección experimental con *P. damsela* subsp *piscicida*.

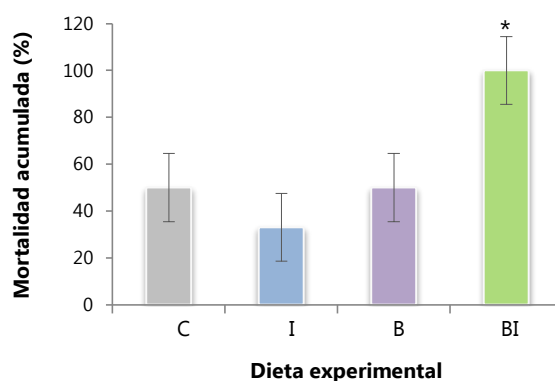


Figura 18. Mortalidad acumulada (%) en cada grupo experimental (C: control; I: inulina a 10 g/kg; B: *B. subtilis* a 10^7 ufc/g; y BI: inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g) a los siete días de la infección experimental con *P. damsela* subsp *piscicida*. La mortalidad entre grupos se comparó empleando el método de Kaplan-Meier. Las barras representan la media \pm error típico ($n=12$). El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($P \leq 0.05$).

6. Discusión

El resultado obtenido en el ensayo *in vitro*, en el que se constató el crecimiento de *B. subtilis* en presencia de inulina como fuente de carbono y energía, apoya la hipótesis de una capacidad prebiótica de la inulina para *B. subtilis*. En este trabajo, el aumento significativo de la actividad hemolítica del complemento observado como consecuencia de la administración de *B. subtilis* concuerda con los resultados obtenidos previamente en trucha arcoíris (*Oncorhynchus*

mykiss) (Panigrahi y col., 2007), pero es contrario, sin embargo, a las observaciones obtenidas en corvina (*Larimichthys crocea*) (Ai y col., 2011). Los resultados disponibles sobre *B. subtilis* en combinación con un prebiótico también son contradictorios. Ai y col. (Ai y col., 2011) demostraron que la administración de este probiótico en combinación con FOS no tiene efecto sobre la actividad hemolítica del complemento. Sin embargo, en otro estudio en el que se administró *B. subtilis* y quitosán a ejemplares de cobia (*Rachycentron canadum*), la actividad del complemento resultó incrementada (Geng y col., 2011). Nuestros resultados mostraron un incremento significativo de esta actividad con la administración del simbiótico, pero no se observó un efecto sinérgico entre ambos componentes.

A pesar de la importancia de la IgM como un parámetro inmunitario, hay pocos estudios que hayan investigado los niveles de este anticuerpo tras la administración de probióticos o prebióticos. En uno de ellos, se observó un aumento de los anticuerpos específicos contra *Edwardsiella tarda* en *Labeo rohita* tras la administración en dieta de *B. subtilis* (Nayak y col., 2007). Estudios previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que los niveles de IgM en dorada son susceptibles a la acción de inmunomoduladores como vitamina A, levamisol, quitosán y levaduras, o factores de estrés como la hipoxia, el hacinamiento o los anestésicos (Cuesta y col., 2004). De acuerdo con estos resultados, en nuestro estudio tanto la inulina como *B. subtilis* tuvieron un efecto positivo sobre el nivel sérico de IgM, que fue significativamente mayor tras dos semanas de tratamiento con las dietas I, B, y BI. Este incremento fue mayor en los peces alimentados con la dieta BI que en los alimentados con las dietas I y B. Se ha sugerido que los probióticos y prebióticos pueden estimular activamente la secreción de IgM por parte de los linfocitos B, efecto que se vería incrementado cuando se administra una combinación de ambos tipos de ingredientes (Ng y col., 2009; Ringø y col., 2010).

En cuanto a la fagocitosis, solo mostró incrementos estadísticamente significativos en peces alimentados durante dos semanas con las dietas I y B. El incremento observado como consecuencia de la administración de *B. subtilis* coincide con las observaciones hechas en trucha arcoíris (Brunt y col., 2007; Newaj-Fyzul y col., 2007), aunque los resultados en esta especie son contradictorios, ya que otros estudios han mostrado el no efecto de este probiótico en la fagocitosis (Panigrahi y col., 2007). En combinación con quitosán, *B. subtilis* ejerce un efecto estimulante sobre la fagocitosis de cobia mayor que el observado con quitosán solo, sin embargo, en este estudio no se evaluó el efecto de la administración de *B. subtilis* solo (Geng y col., 2011). Nuestros resultados no solo no mostraron una potenciación del efecto individual de la inulina y *B. subtilis* sobre la fagocitosis, sino que incluso sugieren que la administración

combinada anula el efecto observado con la administración individual. En nuestros resultados se observó que los niveles de las respuestas inmunitarias decrecieron con el tiempo, sugiriendo una respuesta rápida a la dieta, fenómeno que concuerda con otras investigaciones previas (Sharifuzzaman y Austin, 2010).

En el presente trabajo, tanto la inulina como *B. subtilis* tuvieron un impacto negativo sobre la morfología intestinal de la dorada, como se evidencia por los distintos signos de inflamación y edema. La presencia de vacuolas en el interior de los enterocitos es normal durante los procesos de digestión, absorción y transporte de lípidos, pero una acumulación excesiva de estas vacuolas puede resultar en alteraciones funcionales de estas células (Olsen y col., 2000). Por otra parte, la dilatación del espacio intercelular entre los enterocitos se ha relacionado con situaciones patológicas en humanos como el reflujo gastroesofágico (Tadiparthi y col., 2011). Nuestros resultados concuerdan con lo observado en trucha alpina, en la que se ha demostrado que una elevada ingesta de inulina ejerce un efecto dañino sobre los enterocitos (Olsen y col., 2001) mientras que en salmón atlántico no se ha observado daño intestinal provocado por la administración de inulina (Bakke-McKellep y col., 2007). Cabe destacar que daños tisulares similares a los observados en el presente trabajo se han relacionado con el uso de ciertas plantas como fuentes de proteínas, como harina de soja y aceites vegetales, y han sido revertidos por la administración de probióticos (Caballero, 2003; Sáenz de Rodríguez y col., 2009). En nuestro estudio, sin embargo, los ejemplares control no presentaron alteraciones en la morfología intestinal, por lo que las alteraciones observadas en los grupos de tratamiento son atribuibles solamente a la adición de inulina y *B. subtilis*.

El estudio morfométrico intestinal reveló que tanto la inulina como *B. subtilis* no afectaron al área de absorción del intestino. En tilapia se ha demostrado que la administración en dieta del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* produce un aumento significativo en la altura de las vellosidades. Se ha propuesto que el aumento en la altura de las vellosidades implica un aumento de la superficie que mejora la absorción de los nutrientes disponibles (Caspary, 1992). Sin embargo, la medida de la altura de las vellosidades por sí sola no tiene en cuenta las variaciones que pueden ocurrir debido a diferencias en el diámetro del intestino entre unos ejemplares y otros. Para evitar este sesgo, en el presente estudio se introdujeron dos medidas: el ratio Id:Vh y el área de las vellosidades. Aunque el análisis estadístico reveló incrementos estadísticamente significativos en la altura de las vellosidades en peces alimentados con las dietas I, B y BI, los datos del ratio Id:Vh y el área de las vellosidades mostraron que estas diferencias se debieron a aumentos en el diámetro del intestino. Estos hallazgos concuerdan con lo observado en un estudio previo en el que se alimentó a doradas con MOS (Dimitroglou y

col., 2010). Además, generalmente se asume que la altura de las microvellosidades está directamente relacionada con la superficie de absorción del intestino. Hasta la fecha, según la bibliografía consultada, solo un estudio ha demostrado en vivo que los probióticos (*Pediococcus acidilactici*) pueden aumentar la altura de las microvellosidades en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Merrifield y col., 2010). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que tanto la inulina como *B. subtilis* disminuyen la altura de las microvellosidades en la dorada. De hecho, estas dietas experimentales provocaron un desequilibrio que desembocó en efectos similares a los producidos por la sustitución de harina de pescado por harina de soja en la dieta de peces (Rombout y col., 2011).

El epitelio gastrointestinal está cubierto por una capa mucosa sintetizada y secretada por las células caliciformes (Forstner y col., 1995; Deplancke y Gaskins, 2001). Se ha comprobado que un amplio rango de factores (incluyendo alteraciones en la microbiota normal, como se discutirá más adelante) pueden provocar cambios en las funciones de las células caliciformes y la composición del moco (Deplancke y Gaskins, 2001; Kleessen y col., 2003). En un trabajo reciente, intestinos procedentes de ejemplares de salmón atlántico alimentados con un prebiótico comercial (EWOS prebiosal®) fueron expuestos *ex vivo* al probiótico *Carnobacterium divergens*, no observándose diferencias en las células caliciformes, aunque no se realizó un estudio cuantitativo (Kristiansen y col., 2011). En otras especies, se ha descrito un aumento de estas células tras la administración de probióticos (Ringø y col., 2007; Pirarat y col., 2011), lo que contrasta con los resultados del presente trabajo. El número de células caliciformes fue claramente inferior en los peces alimentados con las dietas experimentales, siendo el grupo BI el más afectado, con una reducción de casi el 50%. Curiosamente, se detectó también un aparente aumento en el grosor de la capa mucosa que recubre los enterocitos en los peces alimentados con las dietas I, B y BI. La inulina y *B. subtilis* parecen provocar un incremento en la liberación de mucinas, aunque se desconocen los mecanismos responsables de esta secreción.

La mayoría de las células caliciformes en dorada presentan un contenido mixto (mucopolisacáridos ácidos y neutros) (Elbal y Agulleiro, 1986). Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que las dietas I, B y BI descendieron el número de células caliciformes PAS+AB+, mientras que las células AB+ solamente descendieron en la dieta BI. Hasta la fecha, la relevancia fisiológica de los distintos subtipos de mucinas no se conoce con exactitud, aunque se ha sugerido que las mucinas ácidas pueden proteger frente a la traslocación bacteriana (Robertson y Wright, 1997; Deplancke y Gaskins, 2001) mientras que las neutras estarían relacionadas con procesos de digestión (Clarke y Witcomb, 1980; Grau y col.,

1992). Son necesarios más estudios para comprender la importancia de la alteración en los tipos de mucinas en peces.

El GALT de peces está constituido por leucocitos intraepiteliales dispersos por toda la mucosa que destruyen células infectadas y atraen a otras células inmunitarias (Isolauri y col., 2001). Los IELs son principalmente linfocitos T, y juegan un papel crucial en el mantenimiento de la tolerancia oral y la protección frente a patógenos (Watzl y col., 2007). El aumento en la población de IELs se ha relacionado con procesos de inflamación intestinal (Urán y col., 2008), aunque recientemente se ha demostrado también que probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* pueden incrementar esta población (Pirarat y col., 2011). En el presente trabajo, la dieta I aumentó el número de IELs en el intestino de la dorada, quizá como consecuencia de un proceso inflamatorio, aunque son necesarios más estudios para comprender cómo probióticos y prebióticos pueden afectar a la infiltración de leucocitos en el intestino.

Estas importantes alteraciones histológicas coinciden con modificaciones en la microflora intestinal. El análisis de los patrones de DGGE mostró que la administración en dieta de inulina o *B. subtilis* tiene un importante efecto en la diversidad de la microflora intestinal de la dorada. La adición de *B. subtilis* a la dieta redujo significativamente la riqueza específica y el índice H', así como la similitud en comparación con los patrones obtenidos en los peces control. Esta capacidad de *B. subtilis* de modular la microflora intestinal ha sido demostrada también en pollo (Molnár y col., 2011). La inclusión de inulina también produjo un descenso en la riqueza específica, aunque el índice H' no se vio afectado. Los dendrogramas de los patrones DGGE demostraron que la inulina incrementó la similitud con respecto al control. La capacidad de la inulina para alterar la microflora intestinal ha sido puesta de manifiesto en trucha alpina (Ringø y col., 2006), aunque en rodaballo (*Psetta maxima*) no se observó un efecto claro de la inulina sobre la microflora (Mahious y col., 2006). La reducción de la riqueza específica producida por la inulina en el presente estudio concuerda con datos similares aportados por otros estudios, en los que se ha observado que la inulina produce una reducción de la diversidad de la microflora de salmón atlántico (*Salmo salar*) (Bakke-McKellep y col., 2007) y una menor complejidad de los patrones de DGGE de la microbiota de lubina rayada híbrida (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Burr y col., 2010). Por el contrario, se ha demostrado que otros prebióticos como MOS incrementan la riqueza específica y la diversidad de la microflora intestinal de dorada (Dimitroglou y col., 2010), aunque no se encontraron diferencias histológicas significativas. En trucha se ha observado que la administración de MOS reduce la riqueza específica y aumenta la similitud de las poblaciones bacterianas intestinales, y mejora la morfología intestinal y el borde en cepillo del epitelio (Dimitroglou y col., 2009). La dieta BI redujo los valores de R y H' en

comparación con los valores obtenidos para las dietas C, I y B, y también se observó una reducción de la similitud de los patrones de DGGE. La drástica reducción de la diversidad producida en los peces alimentados con la dieta BI contrasta con los resultados obtenidos en pollos de corral (Li y col., 2008), donde se observó que la administración de *B.subtilis* en combinación con FOS tuvieron una mejoría en los microecosistemas fecales mucho mayor que cuando se administraba la bacteria o el prebiótico por separado.

Basándose en el criterio propuesto por Marzorati y col. (Marzorati y col., 2008), los valores de Rr obtenidos para los peces control y aquellos alimentados con las dietas I y B corresponden con ambientes con una alta habitabilidad, aunque el valor de Rr fue significativamente menor en los peces que recibieron las dietas I y B comparado con el control. Sin embargo, cuando probiótico y prebiótico se administraron juntos (dieta BI) el valor de Rr obtenido correspondió a un ambiente con una muy baja capacidad para soportar diferentes especies microbianas. La diversidad bacteriana tiene un importante papel en la función de los ecosistemas (Bell y col., 2005), y su estabilidad está influenciada por la riqueza de especies y grupos funcionales (Griffiths y col., 2001). La biodiversidad protege los ecosistemas frente a la disminución de su funcionalidad, y permite la adaptación a condiciones cambiantes, ya que la coexistencia de muchas especies proporciona una mayor garantía de que alguna asumirá una función dada cuando otra especie falle (Yachi y Loreau, 1999; Wittebolle y col., 2008). En este contexto, los importantes cambios en la diversidad estructural de la microflora intestinal provocados por la administración en dieta de inulina y *B. subtilis*, por separado o en combinación, pueden ser considerados como negativos, ya que la microflora de estos peces estaría menos cualificada para soportar las condiciones ambientales frecuentemente cambiantes que se dan en la acuicultura, especialmente los peces alimentados con la dieta BI.

La expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario ha sido evaluada en diversos estudios como indicador de las propiedades inmunoestimulantes de diversos factores. En el presente estudio, el único gen que aumentó su expresión en respuesta a las dietas experimentales fue la β -defensina en riñón cefálico, concretamente tras la administración de la dieta BP. Se ha demostrado que los probióticos (Pirarat y col., 2011; Pérez-Sánchez y col., 2011), polisacáridos de plantas (Yuan y col., 2008) o incluso polisacáridos sulfatados de algas marinas (Leiro y col., 2007) son capaces de inducir la expresión de genes inmunitarios en diferentes especies. Cabe destacar que el incremento observado en los niveles de IgM en suero no se correlacionó con un aumento en la expresión del gen correspondiente, lo que sugiere una estimulación de la secreción pero no en la síntesis de IgM.

Una infección experimental proporciona una oportunidad de determinar el efecto de los tratamientos ensayados sobre la resistencia de los peces. *P. damselae* subsp. *piscicida* es un importante patógeno para la dorada y otras especies marinas que causa importantes pérdidas en la acuicultura (Romalde, 2002). En el presente estudio, solo la dieta I produjo un aumento en la resistencia de la dorada a la infección por *P. damselae*, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Estudios previos han demostrado efectos beneficiosos de los FOS en términos de resistencia a enfermedades en el carpín (*Carassius auratus*) (Wang y col., 2008), mientras que en corvina no se observó este efecto (Ai y col., 2011). Según la bibliografía consultada, solo dos estudios previos han evaluado la resistencia de los peces tras la administración de inulina. En estos estudios, las dietas suplementadas no tuvieron efecto en la resistencia de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) y la tilapia (*Tilapia aureus*) frente a *Aeromonas hydrophyla* y *Edwardsiella tarda*, respectivamente (Wang y Wang, 1997). Por otra parte, la administración de la dieta B no tuvo tampoco efecto significativo sobre la resistencia a la infección en la dorada, lo que contrasta con estudios previos en corvina (Ai y col., 2011) y *Labeo rohita* (Kumar y col., 2008), en los que la administración de este probiótico incrementó la resistencia frente a *V. harveyi* y *A. hydrophyla*. Sin embargo, en el presente estudio el resultado más llamativo fue el incremento en la mortalidad tras la administración de la dieta BI. De acuerdo a la literatura consultada, no hay trabajos previos que proporcionen evidencias de un efecto negativo de probióticos o prebióticos sobre la resistencia a las enfermedades en los peces; es más, dos estudios previos han demostrado un incremento de la resistencia cuando se administran probióticos y prebióticos combinados (Ai y col., 2011; Geng y col., 2011). Nuestros resultados sugieren que la combinación de inulina y *B. subtilis* ejerce un efecto negativo sobre la dorada que favorece la infección causada por *P. damselae* subsp. *piscicida*.

CAPÍTULO 4: Administración de microalgas y *Bacillus subtilis* en dieta

1. Introducción

Como se ha expuesto en capítulos anteriores, las microalgas contienen carbohidratos susceptibles de actuar como prebióticos, además de otras sustancias inmunoestimulantes, mientras que *B. subtilis* es un probiótico ampliamente estudiado en peces. Sin embargo, las posibilidades de las microalgas como prebióticos no han sido estudiadas previamente. Además, los estudios que evalúan los efectos de la administración combinada de dos inmunoestimulantes son escasos. Por otra parte, a pesar de la importancia del intestino como un órgano digestivo y defensivo, pocos estudios previos han investigado el efecto de probióticos o inmunoestimulantes en la morfología y la microflora intestinal de peces, y muchos de ellos han sido experimentos *in vitro* o *ex vivo*.

2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos de dos de las microalgas empleadas en el capítulo 2 (*T. chuii* y *P. tricornutum*), el probiótico *B. subtilis* y su combinación sobre determinados parámetros del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.), la expresión de genes del sistema inmunitario, la morfología intestinal y la microbiota. También se determinó la supervivencia frente a una infección experimental llevada a cabo con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

3. Hipótesis de trabajo

Las microalgas y *B. subtilis* tienen un efecto sinérgico sobre los parámetros del sistema inmunitario, generándose una respuesta mayor que con la administración por separado. *B. subtilis* tiene capacidad de crecer en presencia de microalgas, empleándolas como única fuente de carbono y energía, ya que las microalgas contienen carbohidratos que podrían tener efecto prebiótico. Además, ambos tienen un efecto beneficioso sobre la morfología del intestino y la microflora intestinal. Con todo ello, se espera que los animales alimentados con pienso suplementado con microalgas y/o *B. subtilis* sobrevivan mejor a una infección experimental que los peces alimentados con pienso sin suplementar.

4. Diseño experimental

En primer lugar, se determinó la capacidad de crecimiento de *B. subtilis* en presencia de productos de la digestión de microalgas como única fuente de carbono y energía.

A continuación, se llevaron a cabo dos experimentos exactamente iguales, en los que solo varió el peso medio de los ejemplares. 144 animales procedentes de un mismo lote (de 100 g de peso medio en el primer experimento y de 50 g en el segundo) fueron distribuidos al azar en seis grupos (de veinticuatro peces cada uno) y dispuestos en doce acuarios diferentes (Figura 20). Cada grupo fue alimentado con uno de los siguientes piensos:

- » C: pienso control, no suplementado.
- » T: pienso suplementado con *T. chuii* a 100 g/kg.
- » P: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 100 g/kg.
- » B: pienso suplementado con *B. subtilis* a 10^7 ufc/g.
- » BT: pienso suplementado con *T. chuii* a 100 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g.
- » BP: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 100 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g.

El primero de los experimentos se destinó al estudio de los efectos sobre el sistema inmunitario, la expresión de genes, la morfología intestinal y la microflora. Transcurridas 2 y 4 semanas de iniciado el tratamiento se muestrearon doce ejemplares de cada grupo, y se recogieron las siguientes muestras:

- » Sangre y riñón cefálico: análisis de los parámetros del sistema inmunitario.
- » Riñón cefálico e intestino: análisis de la expresión de genes.
- » Intestino: microscopía óptica y electrónica (solo a 4 semanas).
- » Intestino: microflora intestinal (solo a 4 semanas).

En el segundo experimento, los peces fueron sometidos a una infección experimental con *P. damselae* subsp. *piscida* al finalizar el tratamiento con las dietas suplementadas.

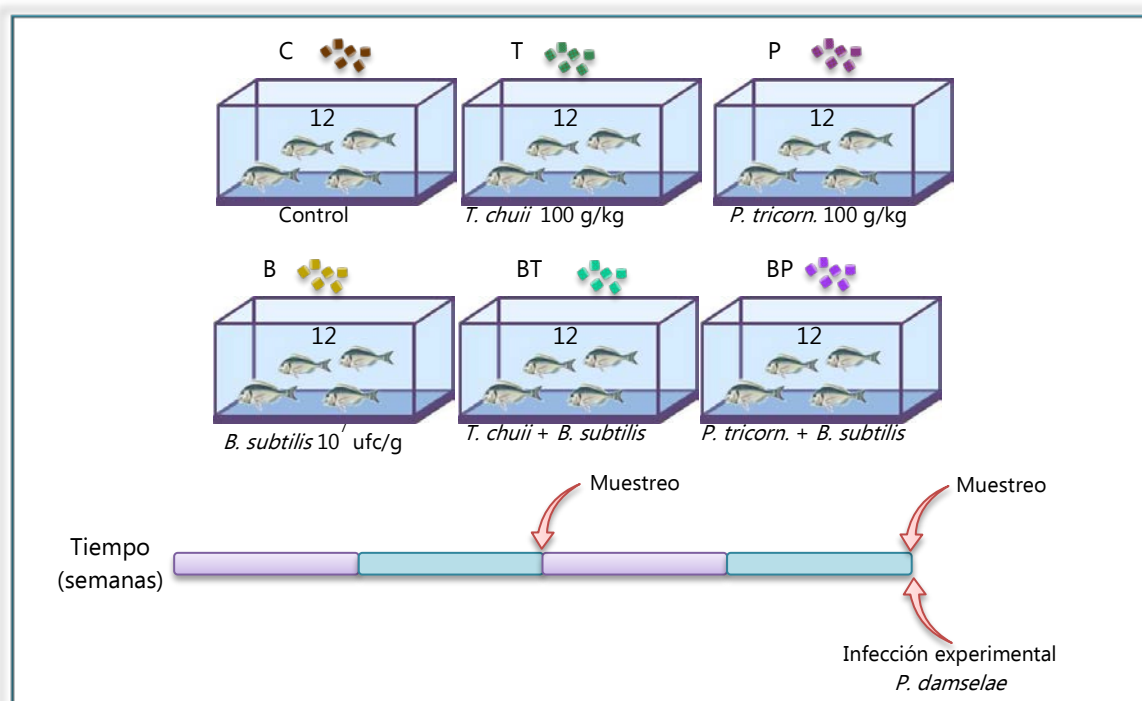


Figura 19. Diseño experimental planteado para los dos experimentos del presente capítulo. En el primer experimento, se realizaron dos muestreos, indicados por las flechas rojas. En el segundo experimento, se llevó a cabo una infección experimental al finalizar el tiempo de tratamiento.

5. Resultados

5.1. Crecimiento de *B. subtilis* en presencia de microalgas

El crecimiento de *B. subtilis* en PBS suplementado con distintas fuentes de carbohidratos está representado en la figura 21. Los resultados mostraron diferencias en la utilización de las microalgas por parte de la bacteria. Aunque creció en presencia de ambas especies, con el producto de la digestión de *P. tricorutum* se logró un mejor crecimiento que con la glucosa o el producto de la digestión de *T. chuii*.

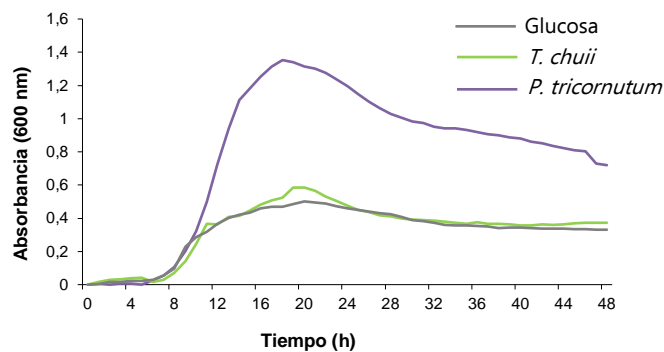


Figura 20. Curvas de crecimiento de *B. subtilis* en PBS estéril suplementado con glucosa o los productos de digestión de *T. chuii* o *P. tricorutum*. Los valores son medias de medidas duplicadas.

5.2. Parámetros del sistema inmunitario

Los parámetros inmunitarios humorales y celulares de las doradas alimentadas con las diferentes dietas fueron evaluados tras dos y cuatro semanas de tratamiento. Entre las respuestas humorales, la actividad del complemento fue la más afectada por las dietas experimentales, mostrando un incremento significativo, con respecto al control, tras dos semanas de alimentación con las dietas T, P, B y BP (Figura 23A). Estos aumentos se mantuvieron con las dietas T, P y BP, aunque ligeramente inferiores, cuando el tratamiento se extendió hasta cuatro semanas, mientras que en con las dietas B y BT no hubo diferencias respecto al control. En ambos tiempos, la dieta P fue la que provocó un mayor incremento de esta actividad, en comparación con el resto de dietas experimentales.

En los niveles de IgM se observó un incremento significativo en los peces alimentados con las cinco dietas (T, P, B, BT y BP), con respecto al control a las dos semanas de tratamiento (Figura 23C). Sin embargo, tras cuatro semanas de tratamiento, los niveles de IgM se redujeron y, aunque en el caso de las dietas T, P y B fueron ligeramente superiores a los niveles de la dieta control, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el caso de los peces alimentados con las dietas B y BT se observó un descenso de IgM comparado con el grupo control, que fue significativo con la dieta B.

Entre las actividades celulares, la más afectada fue la fagocitosis. La habilidad fagocítica aumentó significativamente con respecto al control en todos los grupos tras dos semanas y en los grupos T, P, B y BT a las cuatro semanas (Figura 23D). La capacidad fagocítica, sin embargo, no tuvo una respuesta tan acusada (Figura 23E). En los peces alimentados con las dietas T y P

durante dos semanas esta actividad aumentó con respecto al control y a los peces alimentados con las dietas B, BT y BP, mientras que la dieta P resultó en un incremento significativo de la actividad también a las cuatro semanas, aunque algo menor que el observado a las dos semanas. Por otra parte, la administración de la dieta BP durante cuatro semanas provocó un descenso estadísticamente significativo con respecto al control. La explosión respiratoria se vio incrementada significativamente en los peces alimentados con las dietas T y P durante dos semanas, mientras que en el resto de dietas y tiempos no hubo variaciones con respecto al control (Figura 23G). La actividad peroxidasa, tanto en suero como en leucocitos, no se vio afectada significativamente por ninguna de las dietas ensayadas, aunque hubo ciertos aumentos llamativos que a pesar de ello no fueron significativos, posiblemente debido a la alta variabilidad entre las diferentes las muestras (Figura 23B y 23F).

5.3. Estudio microscópico

Los cambios histológicos producidos en el intestino anterior de las doradas tras ser alimentadas con las dietas experimentales se analizaron mediante microscopía óptica (LM) y electrónica de transmisión (TEM). Histológicamente, la pared intestinal de la dorada está compuesta por cuatro capas, que desde la luz hacia el exterior son: mucosa, submucosa, muscular (interna y externa) y serosa. Los peces alimentados con la dieta C presentaron una barrera epitelial intacta, con los enterocitos organizados, sin restos celulares en la luz y sin signos de inflamación o edema. La mucosa intestinal, constituida por un epitelio simple con abundantes células caliciformes y una lámina propia, mostró algunos leucocitos infiltrados y una capa mucosa continua se evidenciaba en la parte apical de las células (Figura 21A).

En las muestras procedentes de peces alimentados con las dietas T, P, B, BT y BP se observaron distintos signos de daño tisular. Cabe destacar que las diferentes dietas experimentales provocaron las mismas alteraciones morfológicas en el intestino anterior de dorada, aunque con diferentes grados de severidad. Las observaciones mediante LM revelaron la presencia de áreas con una alta vacuolización de los enterocitos, que fue más evidente en la parte apical de las vellosidades (Figura 21B) y una aparente reducción en el número de células caliciformes (Figura 21D). Además, la capa mucosa que cubre el epitelio fue aparentemente más gruesa comparada con la observada en los peces alimentados con la dieta C (Figuras 21A y 21B). Tanto en la lámina propia como en el epitelio se observaron leucocitos infiltrados (Figuras 21C y 21E).

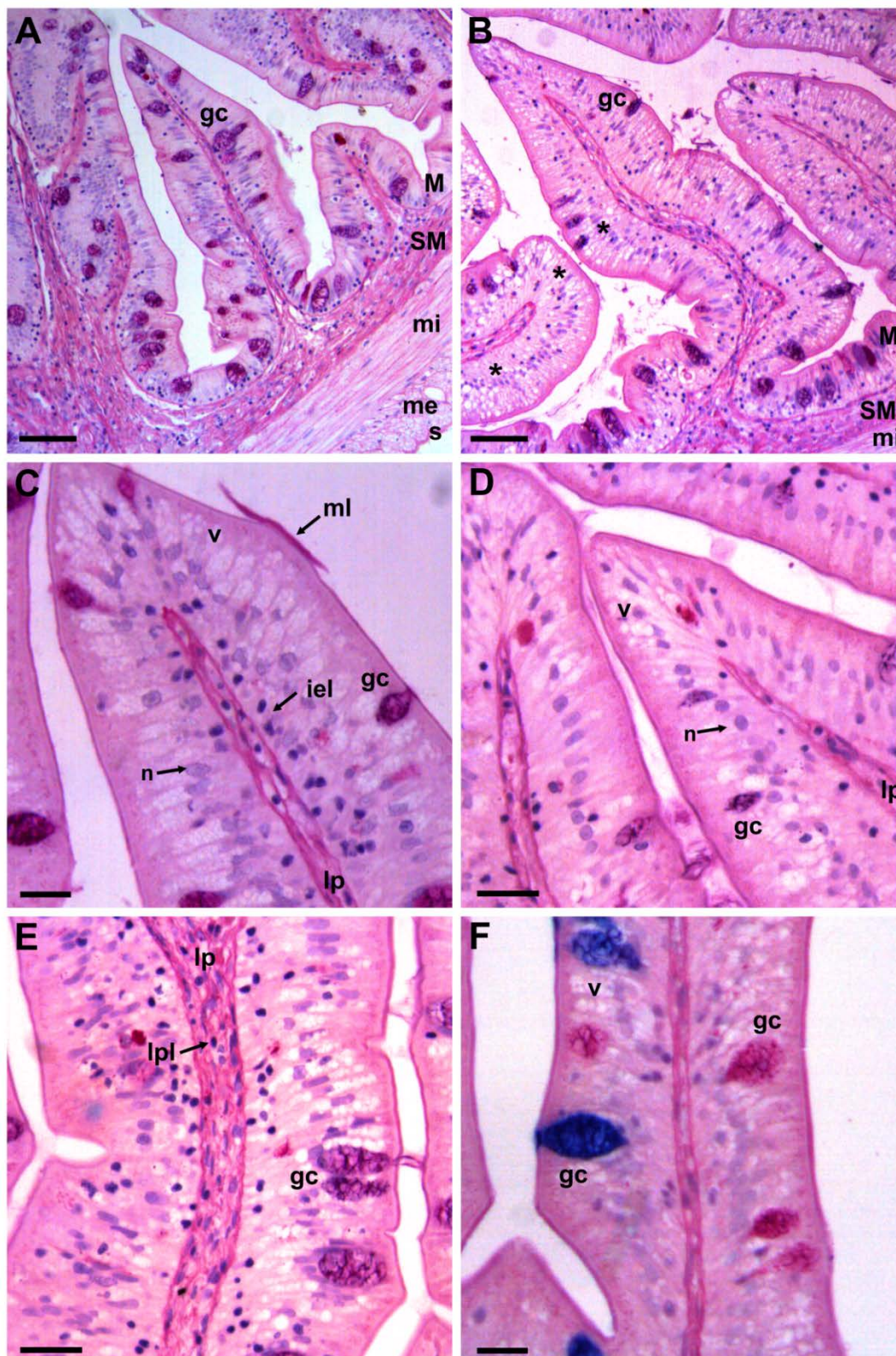


Figura 21. Histología del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas C (control) (A), B (*B. subtilis* 10^7 ufc/g) (B), T (*T. chuii* 100 g/kg) (C), P (*P. tricoratum* 100 g/kg) (D), BT (*B. subtilis* 10^7 ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg) (E) o BP (*B. subtilis* 10^7 ufc/g + *P. tricoratum* 100 g/kg) (F). Los asteriscos en la micrografía B indican las áreas dañadas en el epitelio. La infiltración de leucocitos, marcada con flechas (LPLs e IELs), es claramente visible en las micrografías C y E. En F se pueden observar los dos tipos de células caliciformes (PAS+ en magenta y PAS+AB+ en azul) presentes en el intestino de dorada. Tinción PAS en A-E y PAS-AB en F. M: mucosa; SM: submucosa; mi: muscular interna; me: muscular externa; s: serosa; gc: célula caliciforme; ml: capa mucosa; il: leucocitos infiltrados; v: vacuolas; n: núcleo. Barras: A, B 50 μ m; C-F 10 μ m.

Las observaciones mediante TEM confirmaron que los grupos alimentados con las dietas experimentales (T, P, B, BT y BP) presentaron una mucosa intestinal dañada en comparación con la que presentaban los peces alimentados con la dieta control (C) (Figura 22). Las muestras control presentaron un epitelio simple de células columnares unidas por complejos de unión aparentemente intactos y con un borde en cepillo organizado y bien definido (Figura 22A). No se observaron vacuolas en el citoplasma ni espacios intercelulares entre los enterocitos. En los peces alimentados con las dietas experimentales, los enterocitos presentaron numerosas y amplias vacuolas claras, mientras que las microvellosidades, aparentemente menos numerosas y más cortas, mostraron una apariencia más desorganizada, comparadas con lo observado en los peces control. Además, estas micrografías revelaron que los enterocitos se encontraban separados por amplios espacios intercelulares, principalmente en la zona basal del epitelio, detalle que no se detectó mediante LM (Figuras 22B-22F).

Los datos morfológicos del intestino anterior de dorada, medidos en varias secciones o imágenes tanto de LM como de TEM, se presentan en la Tabla 14. Las medidas de área (vellosidades, luz y pared intestinal) determinadas mediante LM, mostraron valores similares en todos los grupos, sin diferencias entre los ejemplares alimentados con la dieta C y las dietas experimentales T, P, B, BT y BP. La alimentación con las dietas T, P y B resultó en un aumento significativo de la altura de las vellosidades (V_h) y el diámetro intestinal (I_d) en comparación con los peces control. Si embargo, el ratio $I_d:V_h$ no mostró diferencias significativas respecto al grupo control.

El número de células caliciformes descendió significativamente en los ejemplares alimentados con las dietas T, P, B y BT (Tabla 14). En estos grupos, el tipo de células caliciformes afectadas fueron las PAS+AB+, mientras que las PAS+ no mostraron variaciones respecto al control. La histoquímica de mucinas, empleando como tinción AB y/o PAS, demostró que la dieta BP tuvo una influencia en la composición de las mucinas de las células caliciformes. En este grupo, el número total de células caliciformes no se vio afectado por la dieta, mientras que hubo un aumento significativo del número de células caliciformes PAS+ (Figura 21F).

La población de leucocitos intraepiteliales (IELs) fue significativamente menor en los peces alimentados con las dietas T, BT y BP que en los alimentados con la dieta C (Tabla 14). Tanto en el grupo BT como en el BP el número de leucocitos en la lámina propia aumentó significativamente respecto al recuento realizado en el grupo control.

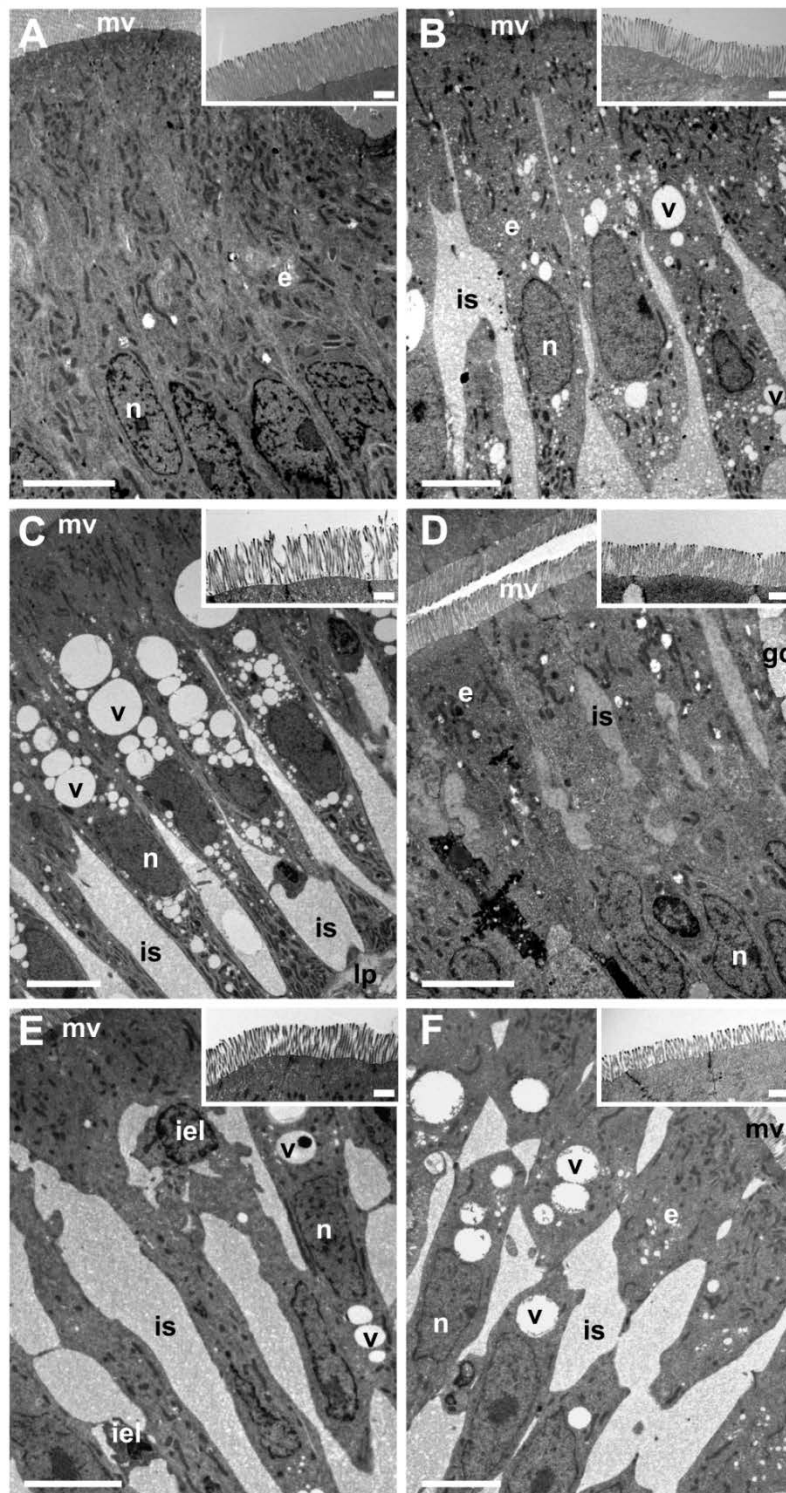


Figura 22. Micrografías electrónicas de transmisión del intestino anterior de doradas alimentadas con las dietas C (control) (A), B (*B. subtilis* 10^7 ufc/g) (B), T (*T. chuii* 100 g/kg) (C), P (*P. tricorutum* 100 g/kg) (D), BT (*B. subtilis* 10^7 ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg) (E) y BP (*B. subtilis* 10^7 ufc/g + *P. tricorutum* 100 g/kg) (F). A-F: secciones del epitelio. Detalles: microvellosidades. A, detalle A) La sección de epitelio muestra una morfología normal, con un borde en cepillo regular y bien definido. B-F, detalles B-F) las secciones muestran claramente la vacuolización de los enterocitos y los espacios intercelulares, y las microvellosidades más cortas y desorganizadas con respecto al control. mv: microvellosidades, e: enterocitos; gc: célula caliciforme; is: espacio intercelular; v: vacuola; n: núcleo, iel: leucocito intraepitelial. Barras: A-F 5 μ m; recuadros 1 μ m.

La longitud de las microvellosidades fue determinada mediante medidas morfométricas en imágenes TEM. Cabe destacar que este parámetro solo se vio afectado en peces alimentados con dietas suplementadas con *B. subtilis* (B, BT y BP), en los que la longitud de las microvellosidades fue significativamente menor que en los peces alimentados con la dieta C o con dietas suplementadas solo con microalgas (T y P) (Tabla 14).

Tabla 14. Medidas intestinales de ejemplares de dorada alimentados con las dietas experimentales durante cuatro semanas (C: control; T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricornutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g; BT: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *P. tricornutum* 100 g/kg). Los datos representan las medias ± el error estándar (n=6). Los valores que aparecen en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Parámetro	Dieta					
	C	T	P	B	BT	BP
Va	5.58±1.08	10.01±0.70	8.42±0.94	7.59±0.62	6.00±0.67	5.86±1.28
Wa	1.45±0.34	1.74±0.12	1.53±0.09	1.62±0.24	1.38±0.33	1.28±0.12
La	0.84±0.18	1.10±0.29	1.16±0.20	0.74±0.24	1.01±0.38	0.68±0.21
Vh	1032±55 ^a	1335±37 ^b	1295±30 ^b	1342±50 ^{bc}	1180±41 ^{ab}	1047±99.36 ^a
Id	2885±171 ^a	3878±108 ^b	3670±104 ^b	3665±108 ^{bc}	3225±146.66 ^a	3115±73 ^a
Id:Vh	2.80±0.10	2.96±0.06	2.84±0.07	2.72±0.07	2.71±0.05	3.11±0.1
GC	62±4 ^a	49±4 ^b	44±2 ^b	39±3 ^c	49±3 ^b	64±5 ^a
GC PAS+AB+	57±3 ^a	43±3 ^{bc}	37±2 ^b	34±3 ^{bc}	41±3 ^b	52±5 ^{ac}
GC PAS+	6±1 ^{ab}	6±1 ^{ab}	8±2 ^{ab}	5±1 ^{ac}	9±1 ^{ac}	12±1 ^c
IELs	254±4 ^a	206±9 ^{bc}	222±13 ^{ab}	242±16 ^a	175±7 ^c	176±12 ^c
LPLs	275±16 ^a	267±12 ^a	320±33 ^{ab}	304±27 ^a	389±31 ^b	332±32 ^b
MVh	1.90±0.09 ^a	1.78±0.14 ^{ab}	1.96±0.08 ^a	1.64±0.05 ^c	1.35±0.05 ^c	1.22±0.06 ^c

Va: área vellosidades (mm²); Wa: área pared (mm²); La: área luz (mm²); Vh: altura vellosidades (µm); Id: diámetro intestinal (µm); Id:Vh : ratio altura vellosidades : diámetro intestinal; GC: células caliciformes (por 100.000 µm²); GC PAS+AB+: goblet cells PAS+ and AB+ (por 100.000 µm²); GC PAS+: células caliciformes PAS+ (por 100.000 µm²); IELs: leucocitos intraepiteliales (por 100.000 µm²); LPLs: leucocitos de la lámina propia (por 100.000 µm²); MVh: altura microvellosidades (µm).

La valoración semicuantitativa de las alteraciones del intestino anterior permitió una rápida y simple valoración de las lesiones observadas, proporcionando información adicional a la histología convencional (Tabla 15). Los resultados demostraron que todas las dietas experimentales (T, P, B, BT y BP) provocaron un incremento significativo del espacio intercelular entre los enterocitos, así como una mayor vacuolización de estas células en todas ellas excepto en la dieta P. Las microvellosidades, aparte del hecho de sufrir el acortamiento comentado anteriormente, no se vieron demasiado afectadas en cuanto a pérdida de organización y/o apariencia dañada. Solamente en los peces alimentados con las dietas que contenían *T. chuii* (T y BT) se observó un ligero daño significativo en las microvellosidades. Además, la suma de las

valoraciones realizadas sobre cada alteración demostró que los peces alimentados con las dietas T, B, BT y BP presentaron cambios ultraestructurales de moderados a severos, con rangos totales comprendidos entre 2.9 (BT) y 4.77 (B).

Tabla 15. Resultados histológicos para el intestino anterior de peces alimentados durante cuatro semanas con las diferentes dietas experimentales (C: control; T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricornutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g; BT: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *P. tricornutum* 100 g/kg). Los datos representan las medias ± el error estándar (n=6). Valores en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Alteración	Dieta					
	C	T	P	B	BT	BP
Espacio intercellular	0.00±0 ^a	1.50±0.18 ^b	0.53±0.13 ^c	2.10±0.19 ^b	1.7±0.17 ^{bd}	1.50±0.18 ^b
Vacuolización de enterocitos	0.43±0.09 ^a	1.23±0.16 ^{bd}	0.50±0.12 ^{bd}	2.17±0.13 ^c	1.40±0.18 ^b	0.9±0.15 ^d
Daño/desorganización microvell.	0.00±0.06 ^a	0.73±0.19 ^{bc}	0.27±0.10 ^a	0.50±0.16 ^{ab}	1.03±0.21 ^c	0.50±0.16 ^{ab}
Daño total	0.43±0.11 ^a	3.47±0.40 ^{bd}	1.30±0.24 ^a	4.77±0.23 ^c	4.13±0.36 ^{bc}	2.90±0.28 ^d

5.4. Microflora intestinal

Los valores obtenidos para los diferentes parámetros tras el análisis de los patrones de DGGE de los intestinos de doradas alimentadas con cada una de las dietas aparecen resumidos en la Tabla 16. El valor más alto de riqueza específica correspondió a las muestras procedentes de peces alimentados con la dieta control (17.33) mientras que en los peces alimentados con las dietas experimentales la riqueza específica descendió notablemente, especialmente en los peces alimentados con las dietas BT y BP (6 y 7.5 respectivamente).

La inclusión de las microalgas y el probiótico, solos o combinados, en la dieta de la dorada produjo una significativa reducción en el índice de Shannon (H') en comparación con los valores obtenidos para los peces alimentados con la dieta C (Tabla 16). Esta reducción fue especialmente significativa en los peces alimentados con la dieta BP.

Los valores de habitabilidad (Rr) registrados oscilaron entre 0.21 (dieta BP) y 55.08 (dieta control). Los valores más bajos correspondieron a los peces alimentados con las dietas BT y BP, mientras que los alimentados con las dietas T, P y B mostraron valores similares de Rr (23.5, 22.53 y 24.21 respectivamente). Todos estos valores fueron significativamente menores que en el caso del grupo control. Los valores de Rr provocados por las dietas BT y BP corresponden a ambientes con una baja habitabilidad. De nuevo, cabe suponer que el ambiente intestinal de estos peces no sería capaz de soportar una alta variedad de especies filogenéticamente

diferentes. Sin embargo, los grupos T, P y B presentaron valores de Rr correspondientes a una habitabilidad media. El valor de Rr del grupo C correspondió a ambientes con una alta habitabilidad.

Tabla 16. Valores de riqueza específica (R), índice de Shannon (H') y habitabilidad (Rr) obtenidos tras los análisis de los patrones de bandas de la DGGE de intestinos de doradas alimentadas con las dietas experimentales durante cuatro semanas (C: control; T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricorutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g; BT: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *P. tricorutum* 100 g/kg). Los datos representan la media ± el error estándar (n=8). Valores en la misma fila con diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Índice	Dieta					
	C	T	P	B	BT	BP
R	17.33±0.94 ^a	11.75±0.43 ^b	10.33±0.47 ^b	11.00±1.41 ^b	7.50±0.50 ^c	6.00±0.00 ^c
H'	2.78±0.12 ^a	2.26±0.03 ^b	2.17±0.03 ^b	1.72±0.38 ^b	1.96±0.06 ^b	0.83±0.20 ^c
Rr	55.08±3.24 ^a	23.50±1.69 ^b	22.53±1.96 ^b	24.21±6.21 ^b	5.53±0.84 ^c	0.21±0.01 ^d

El análisis de los dendrogramas mostró que el porcentaje de similitud de los patrones de DGGE descendió respecto al control (74%) con la dieta B (48%) y aumentó con las dietas T y P (86 y 81 respectivamente) (Figura 26). Sin embargo, los altos valores de similitud obtenidos con las dietas T y P se vieron significativamente reducidos cuando las dietas fueron suplementadas con *B. subtilis* además de con microalgas (dietas BT y BP), en los que alcanzaron valores de 31% y 35% respectivamente.

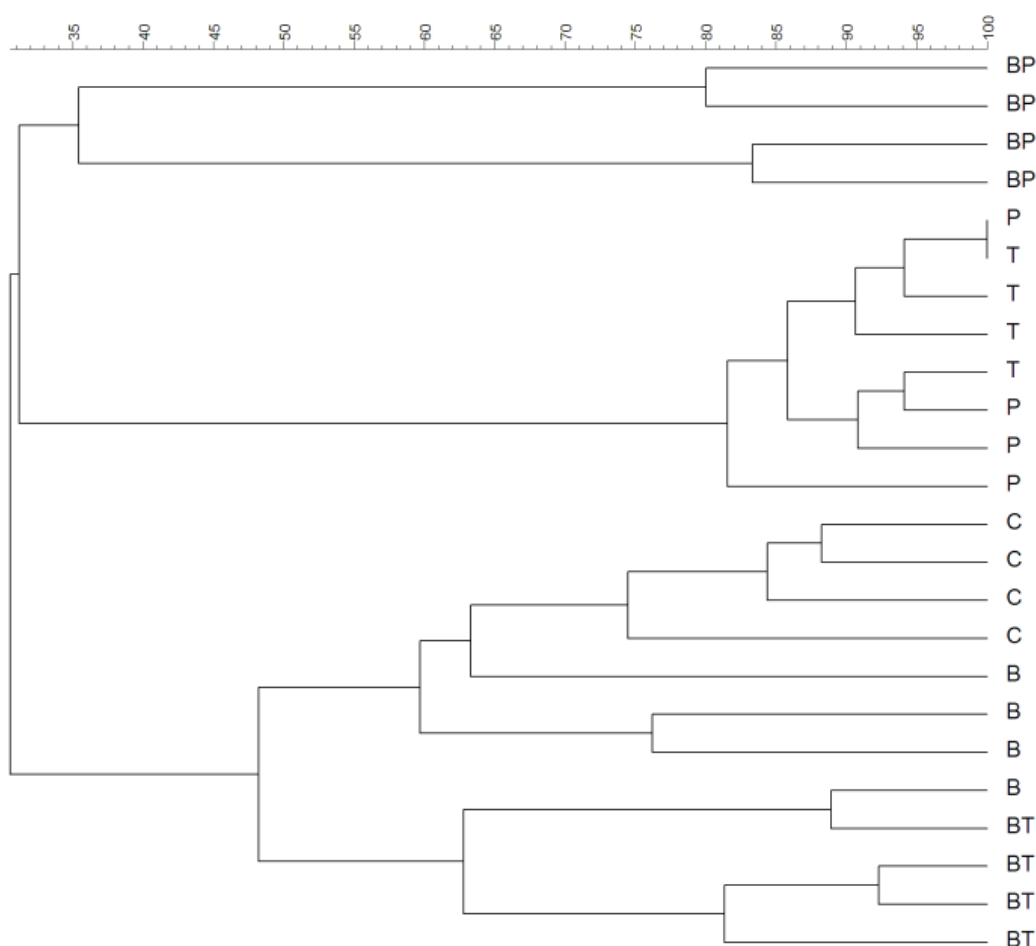


Figura 23. Análisis de agrupaciones basados en el índice de similitud de los patrones de PCR-DGGE derivados del análisis de los intestinos de ejemplares de dorada alimentados durante 4 semanas con las dietas experimentales (C: control; T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricorutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10^7 ufc/g; BT: *B. subtilis* 10^7 ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10^7 ufc/g + *P. tricorutum* 100 g/kg).

5.5. Expresión de genes

La expresión de todos los genes del sistema inmunitario estudiados en el riñón cefálico fue regulada al alza con todas las dietas, tanto a dos semanas como a cuatro (Figura 24), aunque el único aumento estadísticamente significativo se observó en el gen de la β -defensina de los peces alimentados con la dieta BP durante dos semanas (Figura 24A). Cuando se administraron las dietas T y P, la respuesta en la expresión de estos genes fue similar en todos los casos: la dieta T provocó un aumento no significativo en casi todos los genes superior al registrado con la dieta P. Por su parte, el incremento no significativo provocado por la dieta B fue menor que el

producido por las dietas T y P. Cuando se administraron las dietas BT y BP no se observó un efecto potenciador respecto a la respuesta producida por los ingredientes por separado.

En el intestino, la respuesta en la expresión de estos genes fue menos acusada y uniforme que en el riñón cefálico, observándose oscilaciones tanto por encima como por debajo de los niveles obtenidos en el grupo control, diferencias que en ningún caso fueron estadísticamente significativas (Figura 25).

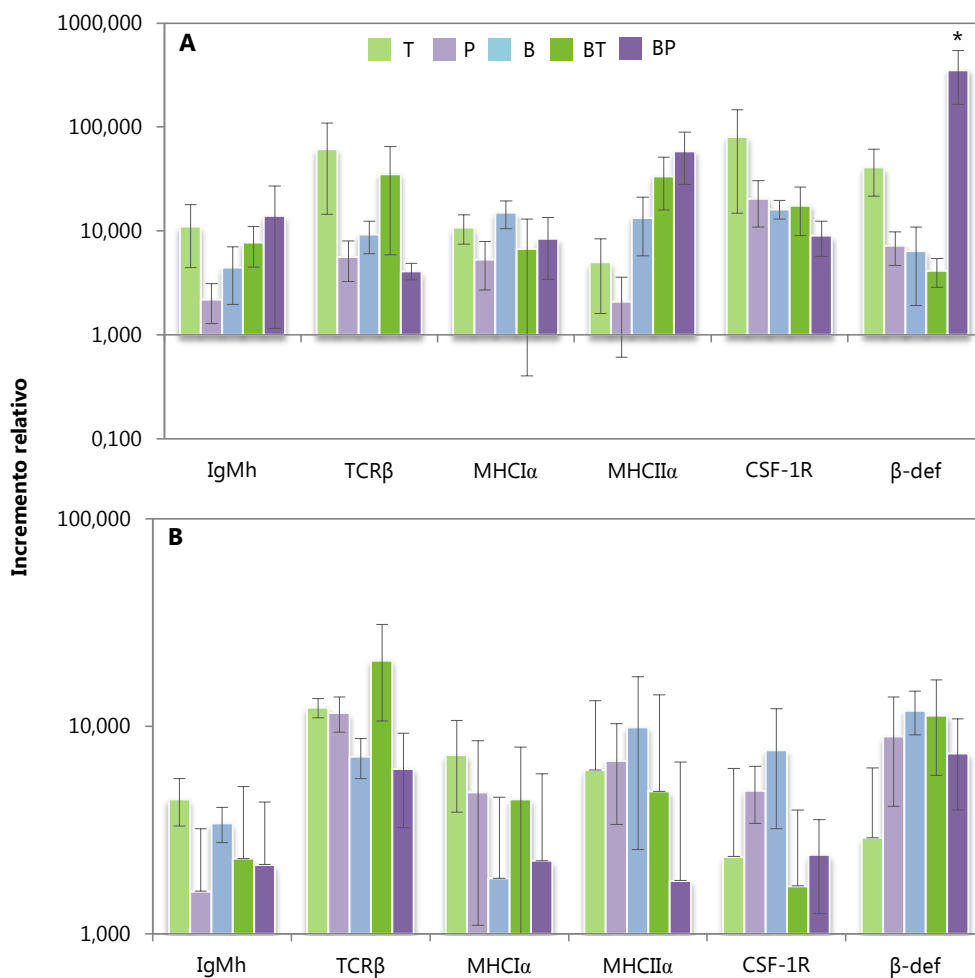


Figura 24. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico de doradas alimentadas con las dietas experimentales (T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricornutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10^7 ufc/g; BT: *B. subtilis* 10^7 ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10^7 ufc/g + *P. tricornutum* 100 g/kg) durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media \pm error estándar (n=12).

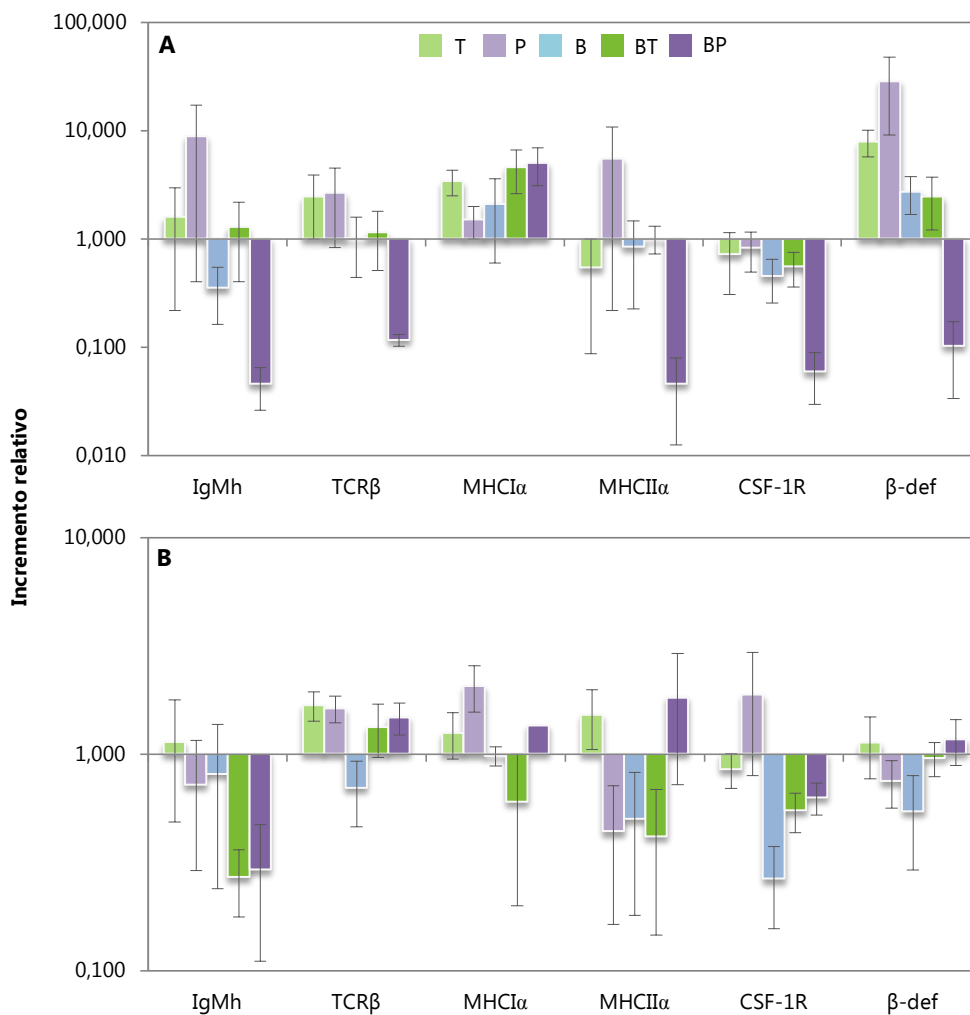


Figura 25. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en intestino de doradas alimentadas con las dietas experimentales (T: *T. chuii* 100 g/kg; P: *P. tricorutum* 100 g/kg; B: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g; BT: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *T. chuii* 100 g/kg; BP: *B. subtilis* 10⁷ ufc/g + *P. tricorutum* 100 g/kg) durante dos (A) y cuatro semanas (B). Las barras representan la media ± error estándar (n=12).

5.6. Infección experimental

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que las mortalidades en el grupo control tras la infección experimental con *P. damselae* ocurrieron durante los dos primeros días post-infección (Figura 26). En este grupo, la mortalidad acumulada alcanzó su máximo en el segundo día (50%) y permaneció constante hasta el final del periodo de observación (Figura 27). En los peces alimentados con las dietas T y B, las mortalidades comenzaron en el segundo día y continuaron hasta el tercero y cuarto respectivamente, observándose un retraso en el desarrollo de la enfermedad, aunque la mortalidad acumulada

final fue la misma que la registrada en el grupo control. En los peces alimentados con la dieta BT, todas las mortalidades sucedieron en el primer día post-infección, alcanzándose una mortalidad acumulada del 67%. En los peces alimentados con la dieta P, se observaron mortalidades durante los tres días siguientes a la infección, alcanzándose una mortalidad acumulada del 83% al tercer día. Sin embargo, ninguna de las diferencias observadas fue estadísticamente significativa.

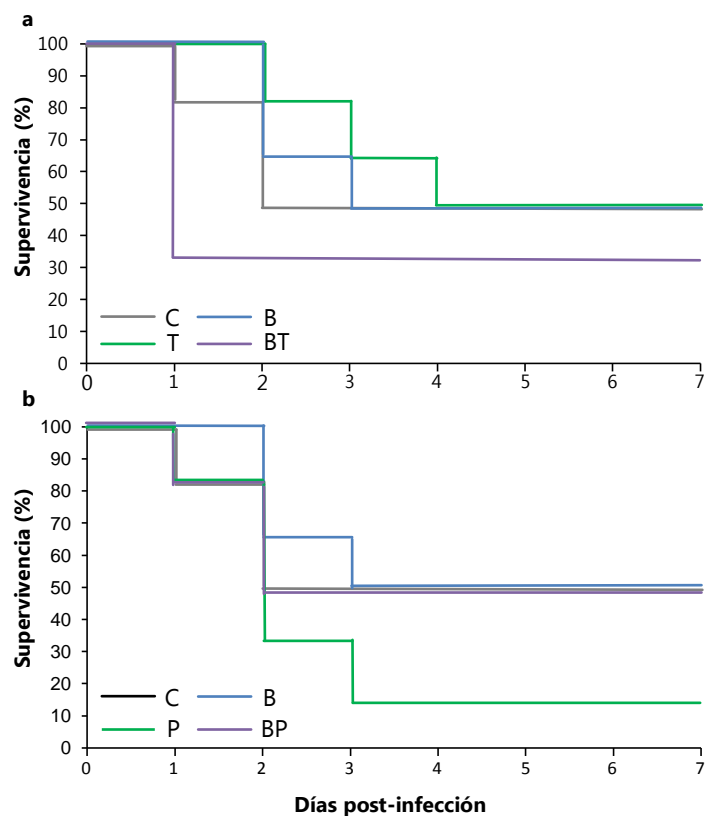


Figura 26. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de las doradas alimentadas con cada una de las dietas durante la infección experimental con *P. damselae* subsp *piscicida*. A) dietas C, T, B, BT. B) dietas C, P, B, BP.

6. Discusión

En el presente capítulo, el primer objetivo parcial fue determinar la capacidad de *B. subtilis* de crecer empleando los polisacáridos de las dos especies de microalgas ensayadas (*P. tricornutum* y *T. chuii*) como fuente de carbono y energía. Estas microalgas fueron seleccionadas a partir de los experimentos realizados en el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral. Para ello,

se diseñó un experimento *in vitro*, que demostró que los productos de digestión de las dos microalgas, pero especialmente de *P. tricornutum*, soportan el crecimiento de la bacteria. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la administración combinada de *B. subtilis* y microalgas puede favorecer el establecimiento y supervivencia de la bacteria en el intestino. Además, proporcionan información preliminar sobre la preferencia de sustratos de esta cepa particular, que puede servir como guía para futuros estudios.

Tanto las microalgas como la bacteria, adicionadas en la dieta de la dorada, incrementaron significativamente los parámetros inmunitarios evaluados con respecto a la dieta control. Esta estimulación fue mayor a las dos semanas de tratamiento. Son escasos los estudios que han evaluado la capacidad inmunoestimulante de los probióticos en combinación con otros inmunoestimulantes (Nayak y col., 2007) y la mayoría de ellos han empleado combinaciones de probióticos y prebióticos (Ye y col., 2011). En *Labeo rohita*, por ejemplo, la suplementación de la dieta con *B. subtilis* y vitamina C no mejoró los parámetros inmunitarios en comparación con la suplementación con ambos ingredientes por separado (Nayak y col., 2007). Nuestros resultados, de acuerdo con este estudio, demostraron una capacidad inmunoestimulante de las microalgas y *B. subtilis*, solos o en combinación, aunque no hubo diferencias significativas entre las dietas combinadas y los tratamientos individuales.

El sistema del complemento es una cascada enzimática compleja constituida por diversas glicoproteínas que desempeñan un importante papel en las respuestas inmunitarias humorales. Varios estudios han demostrado que factores externos como nutrientes, vitaminas y probióticos pueden modular la actividad de este sistema en peces (Cuesta y col., 2006). En este estudio, la actividad del complemento fue uno de los parámetros inmunitarios más afectados, mostrando un aumento significativo tras el tratamiento con todas las dietas excepto la BT. En contraste con estos resultados, un estudio previo en corvina demostró que la actividad del complemento no se vio afectada por un preparado comercial de esporas de *B. subtilis* (Ai y col., 2011). Esta discrepancia de resultados puede ser atribuida a diferentes variables como la dosis de probiótico, la duración del tratamiento y la especie de pez. Nuestros resultados, sin embargo, coinciden con las observaciones realizadas con otros probióticos como *L. casei* (Harikrishnan y col., 2011) y *Enterococcus faecium* (Wang y col., 2008), que provocan incrementos significativos en la actividad del complemento en *Oplegnathus fasciatus* y *Oreochromis niloticus* respectivamente. Según la bibliografía consultada, no hay estudios previos que hayan evaluado la capacidad inmunoestimulante de las microalgas empleadas en el presente trabajo. Si embargo, el estudio llevado a cabo por Amar y col., (Amar y col., 2004) reveló un incremento significativo de esta actividad en trucha arcoíris tras la ingesta de carotenoides procedentes de

la microalga *Dunaliella salina*. Cabe destacar que la administración de la dieta BP provocó un aumento en esta actividad menor del producido por la dieta P, lo que concuerda con las observaciones realizadas por Harikrishnan y col. (2011). En este estudio, la administración combinada de hierbas y *L. casei* provocó una estimulación del complemento similar a la provocada por *L. casei*.

La IgM es la respuesta adaptativa humoral principal, y comúnmente la única clase de inmunoglobulina descrita en peces. La IgM de peces puede estar presente en el suero en concentraciones relativamente altas, donde actúan como anticuerpos naturales, reflejando el estado del sistema inmunitario sin exponer al animal a un antígeno específico, y proporcionando protección instantánea contra patógenos de una amplia especificidad (Cuesta y col., 2004; Magnadóttir, 2010). Nuestros resultados confirman la observación realizada en estudios previos de que los niveles de IgM son susceptibles a la inmunomodulación por un amplio rango de productos (Nikoskelainen, 2003; Cuesta y col., 2004; Panigrahi y col., 2004), siendo estimulados también por la administración de las dietas del presente estudio. Los resultados observados en el presente trabajo sugieren una respuesta rápida y una posterior adaptación al estímulo, que se refleja en la recuperación de la actividad a los niveles normales o incluso en el descenso. Esta observación puede deberse a la extenuación de las células tras una exposición continua y relativamente prolongada, aunque serían necesarios más estudios para constatar esta hipótesis.

La explosión respiratoria se considera un importante indicador de los mecanismos de defensa en peces, y ha sido ampliamente utilizada para evaluar la capacidad defensiva frente a patógenos (Secombes y Fletcher, 1992; Miyazaki, 1998). El aumento observado en esta actividad tras la administración de microalgas coincide con las observaciones realizadas en un estudio previo en lenguado, en el que la explosión respiratoria aumentó tras cuatro semanas de alimentación con la microalga *Porphyridium cruentum* (Díaz-Rosales y col., 2008). En el presente trabajo, sin embargo, se logró una estimulación de la actividad con tiempos más cortos de administración. Por otra parte, la suplementación con *B. subtilis*, solo o en combinación con las microalgas, no tuvo efectos sobre la explosión respiratoria, coincidiendo con los resultados obtenidos para corvina alimentada con FOS y *B. subtilis* (Ai y col., 2011), y *Labeo rohita* alimentada con *L. casei* y vitamina C (Nayak y col., 2007).

La actividad fagocítica es un aspecto clave de la inmunidad innata, y forma parte de la primera línea de defensa celular. Diversos inmunoestimulantes han mostrado ser capaces de incrementar esta actividad en peces (Dügenci, 2003; Amar y col., 2004). En el presente estudio, solamente el porcentaje de células fagocíticas, representado por la habilidad fagocítica, resultó

estimulado por la administración de microalgas y probiótico, mientras que la capacidad fagocítica no se vio afectada. Los datos obtenidos tras la administración de microalgas coinciden con las observaciones realizadas en un estudio llevado a cabo en ratas, en el que se demostró que extractos de polisacáridos de *P. tricornutum* tenían un efecto estimulante en la capacidad fagocítica. Nuestros resultados también concuerdan con diversos estudios previos que han demostrado un efecto estimulante sobre esta actividad de *B. subtilis* en diferentes especies de peces (Salinas y col., 2005; Kumar y col., 2008; Aly y col., 2008b; Geng y col., 2011).

Cabe destacar que en las dietas que combinaron microalgas y probiótico los parámetros inmunitarios estudiados no fueron significativamente diferentes de los registrados en las dietas individuales. Las microalgas mostraron un mayor efecto inmunoestimulante que *B. subtilis*, siendo *P. tricornutum* la más efectiva de las dos. Sin embargo, a pesar de la importante estimulación del crecimiento de *B. subtilis* observada *in vitro* tras la incubación con los productos de la digestión de *P. tricornutum*, no se observaron interacciones positivas significativas entre ambos ingredientes cuando se administraron conjuntamente. Es más, los resultados sugieren que la presencia del probiótico anula de algún modo el efecto positivo observado con ambas microalgas por separado. Cabe suponer que el efecto en los parámetros inmunitarios observado con *P. tricornutum* puede deberse, en parte, a la estimulación del crecimiento de bacterias ya presentes en el intestino.

Los resultados del presente estudio mostraron claramente que las dietas suplementadas con microalgas y/o *B. subtilis* tuvieron una influencia significativa en la morfología del intestino anterior de la dorada. A pesar de la importancia del intestino como un órgano digestivo y defensivo, pocos estudios previos han investigado el efecto de probióticos o inmunoestimulantes en la morfología intestinal de peces, y muchos de ellos han sido experimentos *in vitro* o *ex vivo* (Salinas y col., 2008; Kristiansen y col., 2011; Merrifield y col., 2011; Zhu y col., 2012). En el presente trabajo, tanto *T. chuii* como *B. subtilis* tuvieron un impacto negativo sobre la morfología intestinal de la dorada, como evidenciaron los diferentes signos de edema e inflamación observados en los peces alimentados con las dietas T, B, BT y BP, mientras que el efecto de *P. tricornutum* fue menos evidente. En un estudio anterior con postlarvas de dorada, la sustitución de aceite de pescado con *P. tricornutum* resultó en tasas de supervivencia más bajas, lo que se relacionó con una degeneración epitelial observada en el intestino anterior (Atalah y col., 2007). La acumulación excesiva de vacuolas en los enterocitos y el dilatado espacio intercelular entre ellos han sido relacionados con situaciones patológicas como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la anemia nutricional megaloblástica y la enfermedad del reflujo gastroesofágico en mamíferos (Joshi y col., 1991; Patterson y col., 1993; Tadiparthi y

col., 2011). En peces, se ha descrito un aumento en el espacio intercelular de los enterocitos cuando los animales se encuentran sometidos a un ambiente hiperosmótico (Nonnotte y col., 1986). Además, se han descrito daños similares a los observados en el presente trabajo cuando se administran diferentes fuentes proteicas vegetales como soja o aceites vegetales (Caballero, 2003; Sáenz de Rodrigáñez y col., 2009).

Los resultados del presente trabajo mostraron que las dietas empleadas no aumentaron la altura de las vellosidades ni la superficie de absorción. En los animales acuáticos, la altura de las vellosidades intestinales se considera un signo de la capacidad de absorción del intestino. Estudios recientes han demostrado que ingredientes como MOS (Dimitroglou y col., 2010), *Lactobacillus rhamnosus* (Pirarat y col., 2011) y polisacáridos de levaduras (Zhu y col., 2012) son capaces de incrementar la altura de las vellosidades en diferentes especies. Sin embargo, según la bibliografía consultada, no se dispone de estudios previos que hayan tenido en cuenta las posibles variaciones en este parámetro como consecuencia de diferencias en el tamaño intestinal. Por esta razón, en este trabajo la altura de las vellosidades se relacionó con el diámetro del intestino. De acuerdo con nuestros resultados, que no mostraron diferencias en la superficie de absorción, un estudio previo en dorada demostró que la administración de MOS incrementó la altura de las vellosidades y la densidad, aunque no se detectó un efecto final en la superficie de absorción (Dimitroglou y col., 2010). Por otra parte, se considera que la altura de las microvellosidades está directamente relacionada con la superficie de absorción del intestino. Contrariamente a lo observado en trucha arcoíris, cuyas microvellosidades aumentaron de longitud en respuesta a un probiótico (*Pediococcus acidilactici*), nuestros resultados demostraron una disminución de la altura de las microvellosidades en peces alimentados con dietas suplementadas con *B. subtilis*. Cabe destacar que la sustitución de harina de pescado por harina de soja en las dietas de peces ha provocado una importante reducción en la altura de las microvellosidades (Rombout y col., 2011). Esta observación sugiere que *B. subtilis* tiene un impacto negativo en las microvellosidades similar al observado en peces alimentados con dietas vegetales.

Las células caliciformes, presentes a lo largo de todo el intestino, son las responsables de la síntesis y secreción de la capa protectora de moco que recubre la superficie del epitelio. Esta capa mucosa actúa como un medio de protección, lubricación y transporte entre el contenido de la luz y el revestimiento epitelial, y es un componente integral y estructural del intestino (Forstner y col., 1995; Deplancke y Gaskins, 2001). Diferentes trabajos previos han sugerido que un amplio rango de factores, incluyendo alteraciones en la microbiota normal, pueden provocar cambios en la función de las células caliciformes y en la composición química

del moco (Deplancke y Gaskins, 2001). En el presente trabajo, se observó un descenso en el número de células caliciformes que contrasta con estudios previos que demostraron un incremento en esta población tras la administración de polisacáridos de levaduras (Zhu y col., 2012), efecto que ha sido observado también en peces alimentados con harina de soja (Urán y col., 2008). En nuestro estudio, la pérdida de células caliciformes podría deberse a la alteración observada en el epitelio. Hay muy poca información disponible sobre el efecto de probióticos inmunoestimulantes sobre el número de células caliciformes, aunque se podría suponer que un descenso en el número de células caliciformes iría en detrimento de la defensa intestinal.

Las mucinas secretadas por las células caliciformes se clasifican en neutras y ácidas. Utilizando la tinción de PAS-AB, las mucinas ácidas se tiñen de azul (AB+) y las neutras de magenta (PAS+) mientras que la presencia de ambos tipos de mucinas en la misma célula resulta en un color intermedio (PAS+AB+). En el intestino de dorada, la mayoría de las células caliciformes son de contenido mixto, compuestas por ambos tipos de mucinas (Elbal y Agulleiro, 1986). Nuestros resultados demostraron que las dietas T, P, B y BT redujeron significativamente el número de células mixtas, mientras que las células que contenían solo mucinas neutras no se vieron afectadas. Por el contrario, la dieta BP, las caliciformes PAS+ incrementaron su número hasta duplicar el nivel en los peces control. Aunque la relevancia fisiológica de los distintos tipos de mucinas no se conoce con exactitud, se ha sugerido que las mucinas ácidas protegen contra la translocación bacteriana (Robertson y Wright, 1997; Deplancke y Gaskins, 2001), mientras que las neutras estarían relacionadas con procesos de digestión y absorción (Clarke y Witcomb, 1980; Grau y col., 1992). Además, varias enfermedades intestinales están acompañadas por cambios en la composición de mucinas (Kleessen y col., 2003). Es necesario profundizar en la investigación en este campo para evaluar las consecuencias fisiológicas de la alteración en los tipos de mucinas del moco intestinal de peces.

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) está constituido por los linfocitos intraepiteliales (IELs) y los linfocitos de la lámina propia (LPLs). La población de IELs está formada principalmente por linfocitos T, mientras que los LPLs son mayoritariamente linfocitos B. Estos leucocitos interactúan con las células epiteliales y protegen la mucosa destruyendo células infectadas y atrayendo otras células inmunitarias a combatir la infección (Isolauri y col., 2001). En el presente trabajo se detectaron descensos en las poblaciones de IELs (dietas T, BT y BP) y aumentos en la de LPLs (dietas BT y BP). Aunque hay muy poca información disponible sobre los efectos de los inmunoestimulantes sobre el GALT, se han observado aumentos localizados de leucocitos en peces inyectados con Ergosan (Peddie y col., 2002) y alimentados con probióticos (Picchiatti y col., 2009; Pirarat y col., 2011).

En el presente estudio, la inclusión en dieta de *B. subtilis* y las microalgas tuvo una importante influencia en la microbiota intestinal de la dorada, observándose una disminución en el número de bandas de DGGE, H' y Rr en los peces alimentados con las dietas experimentales en comparación con la dieta control. Esta reducción fue especialmente significativa cuando se administraron microalgas y bacterias en combinación, produciendo una mayor reducción de estos parámetros que la observada cuando se suministraron ambos ingredientes por separado. Según el criterio propuesto por Marzorati y col., (Marzorati y col., 2008) el valor de Rr obtenido en las muestras de peces alimentados con la dieta C corresponden a ambientes con una alta capacidad para soportar diferentes poblaciones microbianas ($Rr > 30$), el de los peces alimentados con las dietas B, T y P corresponden a ambientes con una capacidad media ($Rr 10-30$), y los de las dietas BT y BP a ambientes con una baja capacidad ($Rr < 10$).

Los resultados obtenidos en la microflora intestinal se pueden relacionar con la actividad antimicrobiana descrita por diferentes autores para (Balcázar y Rojas-Luna, 2007; Mahdhi y col., 2011), *T. chuii* (Makridis y col., 2006, 2009), y *P. tricornutum* (Desbois y col., 2008, 2009). La función y estabilidad del ecosistema está influenciada por la riqueza de especies y de grupos funcionales (Bell y col., 2005). La biodiversidad protege el ecosistema frente a descensos en su funcionalidad y permite una mejor adaptación a condiciones cambiantes, por la coexistencia de muchas especies que garantiza que, si una falla en su función, otra ocupará su lugar (Yachi y Loreau, 1999; Wittebolle y col., 2008). En resumen, la drástica reducción de las bandas de DGGE observada en este estudio podría sugerir que la microbiota intestinal de los peces alimentados con estas dietas estarían menos cualificados para soportar las condiciones ambientales frecuentemente cambiantes que se producen en acuicultura, especialmente en las dietas que combinan microalgas y *B. subtilis*. Sin embargo, son necesarios más experimentos para determinar el efecto sobre la microflora intestinal de factores como dosis de microorganismo y tiempo de administración. Además, debido a la ausencia de estudios previos de este tipo, no se han podido correlacionar estos cambios en la microflora intestinal con las alteraciones observadas en la estructura y ultraestructura del epitelio.

En el presente estudio, ninguno de los genes relacionados con el sistema inmunitario evaluados mostró variaciones significativas con respecto al control tras la administración de las dietas experimentales. Diversos estudios han demostrado que los probióticos (Pirarat y col., 2011; Pérez-Sánchez y col., 2011), polisacáridos de plantas (Yuan y col., 2008) o incluso polisacáridos sulfatados de algas marinas (Leiro y col., 2007) son capaces de inducir la expresión de genes inmunitarios en diferentes especies de peces, aunque nuestros resultados no ponen de manifiesto esta capacidad. Cabe destacar que el incremento observado en los niveles de IgM

en suero no se correlacionó con un aumento en la expresión del gen correspondiente, lo que sugiere una estimulación de la secreción pero no en la síntesis de IgM. La β -defensina es un péptido antimicrobiano de reciente descripción que ha demostrado una actividad antimicrobiana importante frente a *Vibrio anguillarum* y *B. subtilis* (Cuesta y col., 2011). El incremento en la expresión de este péptido antimicrobiano en los peces alimentados con la dieta BP durante dos semanas podría favorecer el aumento de la resistencia frente a patógenos.

Una infección experimental permite evaluar la efectividad de las diferentes dietas en términos de protección frente a un patógeno. *P. damselae* subsp. *piscicida* es un importante patógeno para dorada y otras especies marinas que causa importantes pérdidas en la acuicultura mundial (Romalde, 2002). Nuestros resultados mostraron que las dietas experimentales T, P, B, BT y BP no influyeron significativamente en la mortalidad acumulada. La suplementación de la dieta con *B. subtilis* ha demostrado incrementar la supervivencia a infecciones en varias especies (Newaj-Fyzul y col., 2007; Aly y col., 2008b; Ai y col., 2011; Geng y col., 2011), pero en el presente trabajo no se observó este efecto en doradas alimentadas con este probiótico. A pesar de los resultados obtenidos en la expresión de genes y los parámetros del sistema inmunitario, que sugerían un posible aumento de la resistencia frente a una infección experimental, las dietas empleadas no mejoraron la supervivencia de la dorada frente al patógeno empleado. Una investigación reciente ha demostrado que las hierbas chinas pueden incrementar la protección frente a *A. hydrophyla* en carpa (Yin y col., 2009). Según la bibliografía consultada, este es el primer estudio que investiga el efecto de las microalgas sobre la supervivencia de peces frente a patógenos.

CAPÍTULO 5: Efectos de la inulina, *P. tricornutum*, *T. chuii* y *B. subtilis* sobre la expresión de genes en el intestino de dorada.

1. Introducción

Los efectos observados sobre la morfología y microflora del intestino, como consecuencia de la administración de las distintas dietas experimentales en los capítulos 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral, nos llevaron a plantearnos analizar la expresión de otros genes que hubieran podido verse afectados en este órgano. Estos genes se seleccionaron dentro de tres categorías: genes del sistema inmunitario implicados en la inflamación (genes que codifican proteínas proinflamatorias, con el fin de poner de manifiesto inflamación en los enterocitos); genes que codifican proteínas presentes en las uniones entre los enterocitos y genes del citoesqueleto (con el fin de ver si estaban afectados); y, por último, genes que codifican enzimas digestivas y proteínas transportadoras (con el fin de poner de manifiesto si se ve afectada la función digestiva de los enterocitos).

2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue determinar los efectos de las dietas experimentales sobre la expresión de estos genes en el intestino de dorada (*Sparus aurata* L.), con la intención de establecer una relación entre las alteraciones observadas, tanto a nivel morfológico como microbiológico, y una posible alteración de la función o integridad celular, al menos en cuanto a la expresión de los genes estudiados.

3. Hipótesis de trabajo

La administración de inulina, microalgas y *B. subtilis* provoca una alteración en la función y/o integridad celular de las células intestinales de la dorada, lo que se traduce en una alteración de la expresión de genes en el intestino.

4. Diseño experimental

A partir de las muestras de intestino obtenidas en los experimentos presentados en los capítulos 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral, se procedió a analizar la expresión de los siguientes genes:

- » proteínas proinflamatorias: interleucinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6, IL-8), caspasa 1 (CASP-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2).
- » proteínas del citoesqueleto: β -actina (β -actin), tubulina (Tub), y vimentina (Vim).
- » proteínas de unión: ocludina (Ocl), tricelulina (Tricel) y zonula-occludens 1 (ZO-1).
- » enzimas digestivas: amilasa (Am), tripsina (Trip) y fosfatasa alcalina (ALP).
- » proteínas de transporte: transportador de péptidos 1 (PepT-1) y transferrina (Tf).

5. Resultados

La expresión de genes en el intestino de dorada tras la administración de las dietas experimentales ya comentadas en el capítulo 3 (I: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg, B: pienso suplementado con *B. subtilis* a 10^7 ufc/g, BI: pienso suplementado con inulina a 10 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g) mostró incrementos significativos en distintos genes con respecto a los niveles obtenidos en el grupo control (C: pienso no suplementado). En el caso de los genes de proteínas proinflamatorias, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la expresión de IL-8 en el intestino de peces alimentados con las dietas I y B, mientras que la administración de la dieta BI no tuvo efectos significativos en ninguno de los genes de esta categoría (Figura 27). En los peces alimentados con la dieta B también se detectó un aumento significativo de la expresión de caspasa-1 y de la ciclooxigenasa-2. El resto de genes implicados en el sistema inmunitario no se vieron afectados de manera significativa.

En el caso de los genes implicados en la codificación de proteínas del citoesqueleto, solamente se vio afectado de forma estadísticamente significativa la β -actina. La expresión de esta proteína aumentó significativamente en los peces alimentados con las dietas I y B con respecto a la expresión registrada en los peces alimentados con la dieta control. Por otra parte, la ocludina fue el único gen de proteínas de unión que mostró un aumento significativo con respecto al control, en este caso en los tres grupos de tratamiento (dietas I, B y BI).

Entre los genes de enzimas digestivas se observó un ligero aumento en la expresión de amilasa y tripsina tras la administración de las dietas B y BI, aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por último, de las dos proteínas transportadoras analizadas, la transferrina mostró un aumento significativo de su expresión con respecto al control en todos los grupos experimentales (dietas I, B y BI).

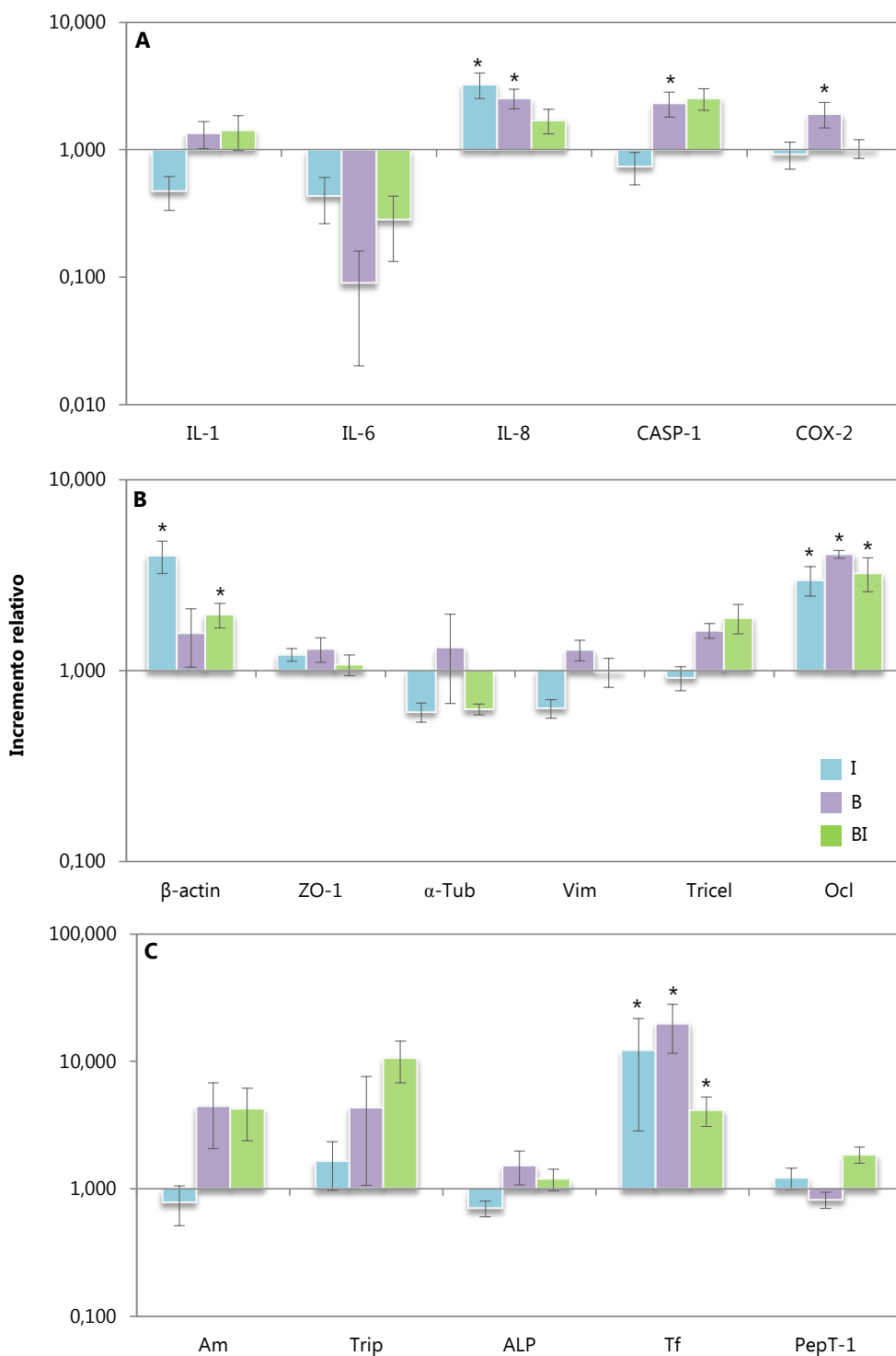


Figura 27. Expresión de genes en intestino de doradas alimentadas con pienso suplementado con inulina (I), *B. subtilis* (B) o *B. subtilis*+inulina (BI) durante cuatro semanas. A) Genes del sistema inmunitario (IL-1, interleucina 1; IL-6, interleucina 6; IL-8, interleucina 8; CASP-1, caspasa 1; COX-2, ciclooxigenasa 2), B) genes del citoesqueleto y uniones celulares (β -actin, β -actina; ZO-1, zona ocludens 1; α -Tub, α -tubulina; Vim, vimentina; Tricel, trichelulina; Ocl, ocludina), C) genes de enzimas digestivas y transportadores (Am, amilasa; Trip, tripsina; ALP, fosfatasa alcalina; Tf, transferrina, PepT-1, transportador de péptidos 1). Las barras representan la media \pm error estándar (n=12).

La expresión de genes en el intestino de dorada tras la administración de las dietas experimentales comentadas en el capítulo 4 (T: pienso suplementado con *T. chuii* a 100 g/kg, P: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 100 g/kg, B: pienso suplementado con *B. subtilis* a 10^7 ufc/g, BT: pienso suplementado con *T. chuii* a 100 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g. BP: pienso suplementado con *P. tricornutum* a 100 g/kg + *B. subtilis* a 10^7 ufc/g) mostró incrementos significativos en distintos genes con respecto a los niveles obtenidos en el grupo control (C: pienso no suplementado). Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la expresión de Il-8 en el intestino de peces alimentados con las dietas T, P, B, BT y BP (Figura 28). En el caso de la dieta B también aumentó significativamente la expresión de caspasa-1 y de la ciclooxigenasa-2. El resto de genes relacionados con la respuesta inmunitaria no se vieron afectados de manera significativa.

Ninguna de las dietas experimentales administradas afectó significativamente a la expresión de los genes implicados en la codificación de proteínas del citoesqueleto. En el caso de las proteínas de unión se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de ocludina con respecto al control en los peces alimentados con las dietas T, B, BT y BP.

La expresión de genes de enzimas digestivas no mostró variaciones significativas con respecto al control en ninguno de los grupos, aunque tanto la amilasa como la tripsina aumentaron ligeramente con las dietas suplementadas con *B. subtilis* (B, BT y BP). En el último grupo de genes, el de las proteínas transportadoras, la expresión de transferrina mostró un aumento significativo con respecto al control en los peces que recibieron dietas suplementadas con *B. subtilis* (B, BT y BP). Las dietas que contenían solo microalgas (T y P) no tuvieron ningún efecto significativo sobre la expresión de estos dos grupos de genes.

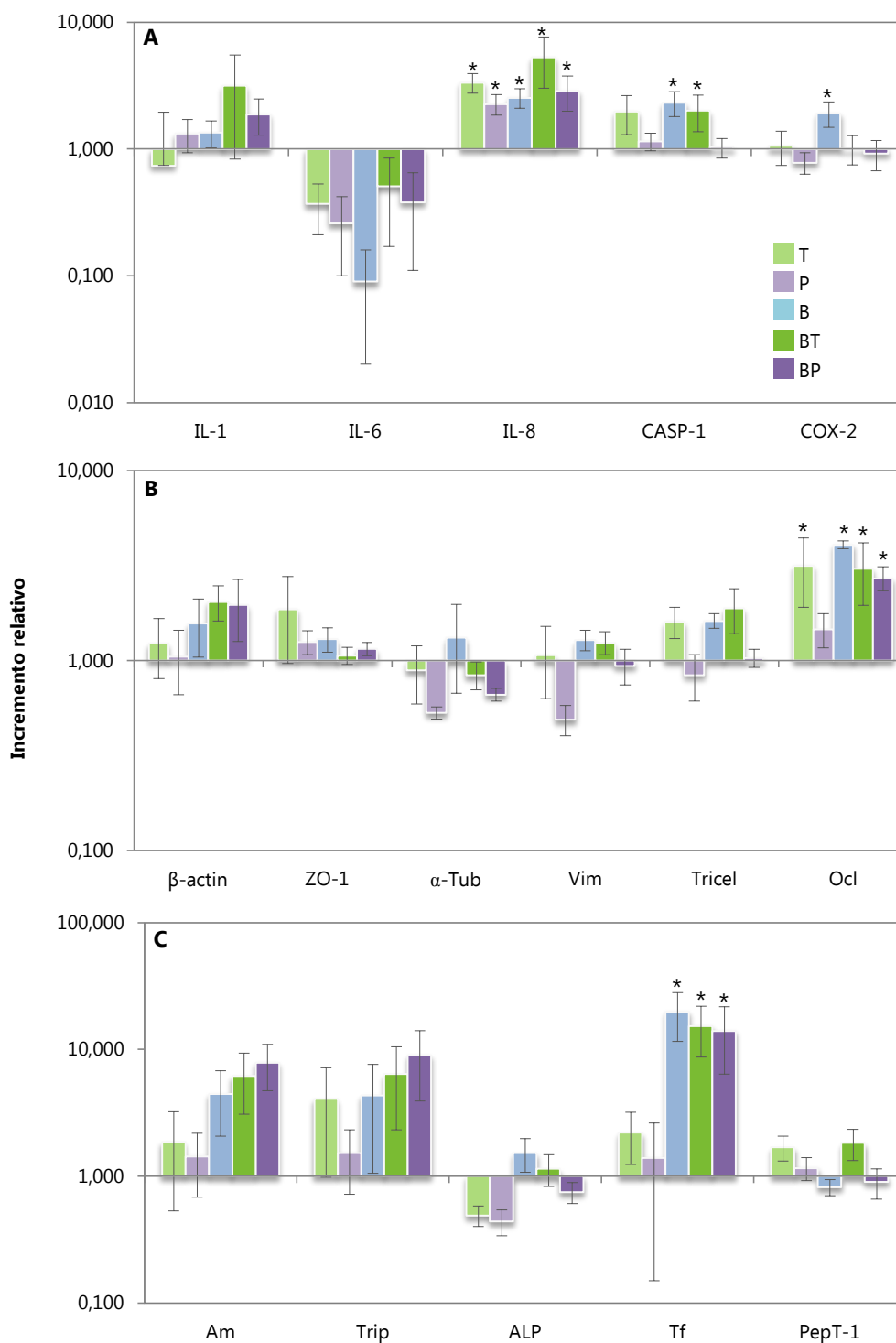


Figura 28. Expresión de genes en intestino de doradas alimentadas con pienso suplementado con *T. chuii* (T), *P. tricornutum* (P), *B. subtilis* (B), *B. subtilis*+*T. chuii* (BT) y *B. subtilis*+*P. tricornutum* (BP) durante cuatro semanas. A) Genes del sistema inmunitario (IL-1, interleucina 1; IL-6, interleucina 6; IL-8, interleucina 8; CASP-1, caspasa 1; COX-2, ciclooxigenasa 2), B) genes del citoesqueleto y uniones celulares (β -actin, β -actina; ZO-1, zona ocludens 1; α -Tub, α -tubulina; Vim, vimentina; Tricel, tricolulina; Ocl, ocludina), C) genes de enzimas digestivas y transportadores (Am, amilasa; Trip, tripsina; ALP, fosfatasa alcalina; Tf, transferrina, PepT-1, transportador de péptidos 1). Las barras representan la media \pm error estándar (n=12).

6. Discusión

Los resultados obtenidos en los capítulos presentados anteriormente, nos llevaron a plantearnos el estudio de la expresión de distintos genes relacionados con aspectos como la inflamación y la funcionalidad e integridad celular, con el fin de profundizar a nivel celular en los efectos ocasionados por el suministro en dieta de prebióticos y simbióticos. Estos genes fueron seleccionados en base a diferentes criterios. Los genes de proteínas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-8 se seleccionaron debido a su importancia como marcadores de la inflamación, mientras que la CASP-1 se analizó, además de por su relación con la inflamación, por ser una proteína poco estudiada en dorada. Las proteínas del citoesqueleto escogidas son todas ellas de expresión constitutiva y representan subunidades esenciales de los filamentos (β -actina), microtúbulos (tubulina) y filamentos intermedios (vimentina), mientras que las proteínas de unión representan a las uniones estrechas (occludina y ZO-1) y a las uniones tricelulares (trichelulina).

La amilasa y la tripsina son enzimas digestivas que hidrolizan carbohidratos y proteínas respectivamente, mientras que la fosfatasa alcalina es responsable de la hidrólisis de grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo el lipopolisacárido de las bacterias que constituyen la microflora intestinal. Por ello, la fosfatasa alcalina interviene en la defensa de la mucosa intestinal y en el mantenimiento de su integridad, ya que previene la inflamación que podría derivarse del establecimiento de la microflora intestinal (Chen y col., 2011).

Los genes cuya expresión se vio incrementada de manera significativa a consecuencia de la administración de las dietas empleadas fueron IL-8, CASP-1, COX-2, occludina y transferrina en intestino, resultados que demuestran que las dietas ensayadas son capaces de generar una respuesta local en la expresión de los citados genes.

La IL-8 es una citoquina proinflamatoria que, junto a la IL-1 y el $TNF\alpha$, contribuye a los mecanismos de defensa del hospedador en respuesta a la invasión o colonización bacteriana (Kim y Austin, 2006). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral concuerdan con estudios previos que han mostrado que la suplementación de la dieta con probióticos aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias en trucha arcoíris, incluyendo la IL-8 (Pérez-Sánchez y col., 2011). Curiosamente, cuando la inulina se administró en combinación con *B. subtilis*, la expresión de IL-8 no varió significativamente respecto al control, lo que contrasta con los resultados obtenidos tras la administración combinada de *B. subtilis* con *T. chuii* y *P. tricornutum*. Estudios previos han demostrado también que la expresión de IL-8, al igual que otras citoquinas proinflamatorias, aumenta en el intestino proximal de la trucha arcoíris cuando está infectada por *A. salmonicida* (Mulder y col., 2007). Puede que la modificación de la

microflora intestinal se la responsable de dicho aumento de IL-8 aunque serán necesarios nuevos ensayos para comprobar dicha hipótesis.

Cabe destacar que, al contrario de lo observado en estos estudios previos, la expresión de los otros dos genes de citoquinas proinflamatorias evaluados en el presente trabajo (IL-1 e IL-6) no se vio afectada por las dietas experimentales. Sí aumentó, en el caso de las dietas B y BT, la expresión de CASP-1. Las caspasas, enzimas pertenecientes al grupo de las cisteín proteasas, son moléculas proinflamatorias ya que intervienen en la escisión proteolítica de otras proteínas proinflamatorias, como la IL-1 y la IL-8. Hasta ahora, en peces se ha demostrado que la CASP-1 está implicada en la activación de la IL-1 (Angosto y col., 2012), mientras que en humanos se ha relacionado también con la activación de IL-6, IL-8 y otras citoquinas proinflamatorias (Koenen y col., 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen poner de manifiesto, por primera vez en peces que, al menos en la dorada, sí parece existir una relación entre la IL-8 y las CASP-1. Además, en peces alimentados con la dieta B también aumentó la expresión de COX-2. Esta ciclooxigenasa es una enzima que interviene en los procesos de inflamación y su expresión es rápidamente inducida en respuesta a diferentes mediadores inflamatorios, tales como factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias (Ramsay y col., 2003; Martín Sanz y col., 2006), por lo que está sobreexpresada durante la inflamación. Por tanto, en el intestino de ejemplares de dorada alimentados con la dieta B se produjo un aumento significativo de la expresión de tres genes que codifican tres moléculas proinflamatorias, lo que concuerda con las observaciones realizadas en la morfología intestinal. Estos resultados, de manera conjunta, sugieren una posible respuesta inflamatoria del intestino como consecuencia de la administración de la cepa de *Bacillus subtilis* (CECT 35) empleada en la presente Tesis Doctoral.

Algunas cepas de *B. subtilis*, al igual que otras especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas (*B. licheniformis*, *B. pumulis*, y *B. megaterium*) tienen la capacidad de producir lecitinasa, una fosfolipasa A2 que actúa sobre la lecitina y se considera un factor de virulencia potencial (Obi, 1980; Hong y col., 2008). La fosfolipasa A2, tanto en su forma secretada como en su forma asociada a lipoproteínas ha mostrado propiedades proinflamatorias (Dennis y col., 2011; Silva y col., 2011). La forma secretada de la fosfolipasa A2 interviene en los procesos de inflamación a través de su actividad enzimática, que provoca la liberación de ácidos grasos libres, incluyendo el ácido araquidónico. De esta forma, se inicia la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), mediadores de la inflamación tanto en invertebrados como en vertebrados. Además, los productos de la hidrólisis de fosfolípidos (lisofosfolípidos) son también mediadores lipídicos proinflamatorios (Dennis y col., 2011). En

mamíferos, se ha demostrado que el proceso de la inflamación está regulado por el eje fosfolipasa A2/ciclooxigenasa-2/prostaglandina E sintasa/prostaglandina E2 (PCPP), núcleo de un circuito regulador que controla el inicio, magnitud, duración y resolución de la respuesta inflamatoria. Durante la fase inflamatoria, el eje PCPP regula la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y metaloproteasas a través de la modulación de las vías de señalización que controlan la expresión de genes proinflamatorios a nivel transcripcional, post-transcripcional y de traducción (Mancini y Di Battista, 2011). Esta relación entre la fosfolipasa 2 y la ciclooxigenasa 2 podría explicar, al menos en parte, el efecto causado por la cepa de *B. subtilis* empleada en el presente estudio sobre el intestino de la dorada, si se comprobara que la cepa es capaz de producir lecitinasas, lo que no ha sido estudiado hasta la fecha. Se deben pues realizar más análisis microbiológicos para llevar a cabo la perfecta caracterización de los productos segregados por dicha cepa, así como su función en el intestino de vertebrados.

Los resultados del presente estudio mostraron que algunas de las dietas experimentales también provocaron un aumento en la expresión de β -actina (dietas I y BI) y ocludina (dietas I, B, BI, T, BT y BP), mientras que los genes vimentina, tubulina, tricelulina y ZO-1 no se vieron afectados de manera significativa por las dietas administradas. La β -actina es una proteína que forma parte del citoesqueleto y participa en numerosos procesos celulares, incluyendo la contracción del músculo, la división celular, el movimiento de vesículas y organelas y el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares (Hennessey y col., 1993). En el presente estudio, la β -actina aumentó su expresión con las dietas I, y BI, mientras que la ocludina lo hizo con todas las dietas excepto la dieta P. Este aumento de la β -actina podría mejorar los procesos de movimiento de vesículas y organelas dentro de los enterocitos, funciones muy importantes en estas células. La ocludina, por su parte, es un componente transmembrana de las uniones estrechas (Kimura y col., 1997). En mamíferos, se ha demostrado que la expresión de la ocludina aumenta en respuesta a probióticos y prebióticos, y ha sido sugerida, junto a la ZO-1, como un marcador de la integridad de las uniones estrechas (Cani y col., 2009; Mennigen y col., 2009). Estos resultados sugieren que las dietas empleadas, excepto la dieta P, mejoran la integridad de las uniones celulares entre los enterocitos.

Por otra parte, el incremento en la expresión de estas proteínas (β -actina y ocludina) podría estar relacionado con la regulación del proceso inflamatorio. Las propiedades de la barrera epitelial intestinal están reguladas por las uniones apicales de los enterocitos, que se componen de proteínas adhesivas y estructurales que se encuentran ancladas en diferentes estructuras del citoesqueleto tales como filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. En mamíferos, algunos estudios previos han puesto de manifiesto la

reorganización de la arquitectura del citoesqueleto tras una situación patológica, y la implicación de la actina en este proceso (Huber y col., 2001; Greenberg y col., 2002). El incremento en la expresión de β -actina, junto a su estrecha relación con la ocludina, sugiere una reorganización del citoesqueleto para mantener la integridad de las uniones estrechas en la barrera epitelial intestinal. De cualquier forma, son necesarios más estudios para esclarecer las funciones de estas proteínas y, sobre todo, conocer su regulación por factores externos e internos.

Por último, las transferrinas constituyen una superfamilia de proteínas de unión a hierro ampliamente distribuidas en vertebrados. A través de la unión y el transporte de hierro, las transferrinas intervienen en una amplia variedad de procesos metabólicos que incluyen procesos tan variados como la regulación inmunitaria, actividades antimicrobianas y antioxidantes, síntesis de DNA, crioprotección y transporte de electrones (Stafford y Belosevic, 2003; Ong y col., 2006). Esta aparente estrecha relación entre la transferrina y los mecanismos inmunitarios de defensa ha llevado a considerar recientemente a esta proteína como un gen candidato para estudiar la resistencia frente a enfermedades (García-Fernández y col., 2011), de ahí que fuera seleccionada en el presente estudio. En cuanto a los resultados obtenidos, las dietas suplementadas con *B. subtilis* (B, BI, BT y BP) y la dieta suplementada con inulina (dieta I) incrementaron significativamente la expresión de esta proteína, mientras que las dietas que contenían solo una microalga no provocaron efectos significativos. En el caso de las dietas I, B y BI, este aumento fue mayor cuando probiótico y prebiótico se administraron por separado. En mamíferos, se ha demostrado que los prebióticos son capaces de aumentar la absorción de minerales como el magnesio, el hierro y el zinc (Wang y col., 2010). Concretamente, en un estudio llevado a cabo en cerdos, se ha comprobado que la inulina afecta a la expresión de transportadores de hierro en el intestino (Tako y col., 2008), al igual que ocurre en el presente estudio. El incremento en la expresión de esta proteína puede estar relacionado con una estimulación de la absorción de minerales o con una estimulación del sistema inmunitario, ya que, en peces, se ha demostrado que la transferrina aumenta en tejidos importantes para el sistema inmunitario, tales como la piel, la sangre y el bazo, cuando los animales son sometidos a una infección con LPS (Liu y col., 2012). Los resultados de la presente Tesis parecen apoyar esta segunda opción, aunque sin embargo, este aumento en la expresión de transferrina sabemos que no se tradujo en un aumento de la resistencia frente a la infección experimental con *P. damselae*, tal y como se demostró al realizar las infecciones experimentales. No obstante, son necesarios más estudios para relacionar este aumento de la transferrina con la protección frente

a infecciones, ya que podría proteger frente a otras infecciones diferentes a la realizada en la presente Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos en la expresión de genes de enzimas digestivas sugieren que las dietas experimentales no tienen un efecto sobre la funcionalidad digestiva de los enterocitos, a pesar de las observaciones realizadas en el estudio microscópico. Esto podría deberse al hecho de que solo se haya estudiado el intestino anterior y que las alteraciones aparezcan por áreas, tal y como se ha descrito en los resultados estructurales y ultraestructurales. Al no haber estudiado la totalidad del intestino, no tenemos datos de si se ven también afectadas otras zonas ni con qué intensidad. Es posible que las alteraciones observadas no se extiendan a todo el intestino y que por ello los procesos globales no sufran grandes alteraciones como consecuencia de la administración de las dietas experimentales ensayadas.

VII. RESULTADOS GLOBALES

A continuación, se exponen de manera esquematizada y agrupados en tablas, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Las flechas indican un aumento (↑) o disminución (↓) significativa del parámetro estudiado respecto al control. Las celdas vacías indican que no hubo variación del parámetro estudiado con respecto al control, mientras que las actividades no determinadas aparecen como "nd". Las dietas experimentales administradas consistieron en pienso comercial (Skretting, Burgos) suplementado con inulina, microalgas y/o *B. subtilis* (Tabla 17).

Tabla 17. Suplementos adicionados al pienso comercial (Skretting, Burgos) para obtener las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Suplementos	Dosis
I10	Inulina	10 g/kg
I15	Inulina	15 g/kg
I30	Inulina	30 g/kg
N50	<i>N. gaditana</i>	50 g/kg
N100	<i>N. gaditana</i>	100 g/kg
T50	<i>T. chuii</i>	50 g/kg
T100	<i>T. chuii</i>	100 g/kg
P50	<i>P. tricornutum</i>	50 g/kg
P100	<i>P. tricornutum</i>	100 g/kg
I	Inulina	10 g/kg
B	<i>B. subtilis</i>	10 ⁷ ufc/g
BI	<i>B. subtilis</i> Inulina	10 ⁷ ufc/g 10 g/kg
T	<i>T. chuii</i>	100 g/kg
P	<i>P. tricornutum</i>	100 g/kg
BT	<i>B. subtilis</i> <i>T. chuii</i>	10 ⁷ ufc/g 100 g/kg
BP	<i>B. subtilis</i> <i>P. tricornutum</i>	10 ⁷ ufc/g 100 g/kg

Tabla 18. Parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas durante dos semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Parámetro						
	ACH	PER-S	IgM	HF	CF	PER-L	ER
I10	↑		nd	↑	↑		nd
I15			nd				nd
I30			nd		↑		nd
N50							
N100					↑		
T50							
T100							
P50	↑			↑	↑		↑
P100	↑			↑	↑	↑	↑
I	↑		↑	↑			↑
B	↑		↑	↑			
BI			↑				
T	↑		↑	↑	↑		↑
P	↑		↑	↑	↑		↑
BT			↑	↑			
BP	↑		↑	↑			

Parámetro: ACH: actividad hemolítica del complemento; PER-S: peroxidasa sérica; IgM: inmunoglobulina M; HF: habilidad fagocítica; CF: capacidad fagocítica; PER-L: peroxidasa intraleucocitaria; ER: explosión respiratoria.

Tabla 19. Parámetros del sistema inmunitario de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Parámetro						
	ACH	PER-S	IgM	HF	CF	PER-L	ER
I10	↑			↑			
I15						↓	
I30					↓		
N50	↑				↑		
N100	↑	↓					
T50		↓			↑		
T100	↑	↓			↑		
P50	↑			↑			
P100	↑	↓		↑	↑		
I	↑						
B	↑						
BI	↑						
T	↑			↑			
P	↑			↑	↑		
BT	↑			↑			
BP	↑					↓	

Parámetro: ACH: actividad hemolítica del coplemento; PER-S: peroxidasa sérica; IgM: inmunoglobulina M; HF: habilidad fagocítica; CF: capacidad fagocítica; PER-L: peroxidasa intraeucitaria; ER: explosión respiratoria.

Tabla 20. Parámetros intestinales de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Parámetro											
	Va	Wa	La	Vh	Id	Id:Vh	GC T	GC M	GC N	IELs	LPLs	Mvh
I				↑	↑		↓	↓		↑		↓
B				↑	↑		↓	↓				↓
BI				↑	↑		↓	↓	↓			↓
T				↑	↑		↓	↓		↓		
P				↑	↑		↓	↓				
BT							↓	↓		↓	↑	↓
BP									↓	↓	↑	↓

Parámetro: Va: área vellosidades (mm^2); Wa: área pared (mm^2); La: área luz (mm^2); Vh: altura vellosidades (μm); Id: diámetro intestinal (μm); Id:Vh : ratio altura vellosidades : diámetro intestinal; GC T: células caliciformes totales (por 100.000 μm^2); GC M: células caliciformes mixtas (PAS+AB+) (por 100.000 μm^2); GC N: células caliciformes neutras (PAS+) (por 100.000 μm^2); IELs: leucocitos intraepiteliales (por 100.000 μm^2); LPLs: leucocitos de la lámina propia (por 100.000 μm^2); MVh: altura microvellosidades (μm).

Tabla 21. Resultados histológicos (en intestino anterior) e índices de la microflora intestinal de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral .

Dieta	Parámetro					
	EI	VE	DMv	R	H'	Rr
I	↑	↑	↑	↓		↓
B	↑	↑		↓	↓	↓
BI	↑	↑		↓	↓	↓
T	↑	↑	↑	↓	↓	↓
P	↑			↓	↓	↓
BT	↑	↑	↑	↓	↓	↓
BP	↑	↑		↓	↓	↓

Parámetro: EI: espacio intercelular; VE: vacuolización enterocitos; DMv: daño/desorganización microvellosidades; R: riqueza específica; H': índice de Shannon; Rr: habitabilidad.

Tabla 22. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino de doradas alimentadas durante dos semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral .

Dieta	Riñón cefálico						Intestino					
	IgMh	TCRβ	MHCIα	MHCIα	CSF-1R	β-def	IgMh	TCRβ	MHCIα	MHCIα	CSF-1R	β-def
N50						↑						
N100												
T50										↑	↑	
T100												
P50												
P100												
I												
B												
BI												
T												
P												
BT												
BP						↑						

Gen: IgMh: IgM; TCRβ: receptor β de células T; MHCIIα: complejo mayor de histocompatibilidad Iα; MHCIIα: complejo mayor de histocompatibilidad IIα; CSF-1R: receptor 1 del factor estimulante de colonias; β-def: β-defensina;

Tabla 23. Expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en riñón cefálico e intestino de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Riñón cefálico						Intestino					
	IgMh	TCR β	MHCI α	MHCII α	CSF-1R	β -def	IgMh	TCR β	MHCI α	MHCII α	CSF-1R	β -def
N50												
N100						↑						
T50												
T100												
P50												
P100												
I												
B												
BI												
T												
P												
BT												
BP												

Gen: IgMh: IgM; TCR β : receptor β de células T; MHCII α : complejo mayor de histocompatibilidad I α ; MHCII α : complejo mayor de histocompatibilidad II α ; CSF-1R: receptor 1 del factor estimulante de colonias; β -def: β -defensina.

Tabla 24. Expresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias en intestino de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral .

Dieta	Gen				
	IL-1	IL-6	IL-8	CASP-1	COX-2
I			↑		
B			↑	↑	↑
BI					
T			↑		
P			↑		
BT			↑	↑	
BP			↑		

Gen: IgMh: IgM; TCR β : receptor β de células T; MHCII α : complejo mayor de histocompatibilidad I α ; MHCII α : complejo mayor de histocompatibilidad II α ; CSF-1R: receptor 1 del factor estimulante de colonias; β -def: β -defensina; IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; CASP-1: caspasa 1; COX-2: ciclooxigenasa 2.

Tabla 25. Expresión de genes que codifican proteínas del citoesqueleto, de unión, enzimas digestivas y proteínas de transporte en intestino de doradas alimentadas durante cuatro semanas con las distintas dietas experimentales administradas en la presente Tesis Doctoral.

Dieta	Gen										
	β -actin	ZO-1	α -Tub	Vim	Tricel	Ocl	Am	Trip	ALP	Tf	PepT-1
I	↑					↑				↑	
B						↑				↑	
BI	↑					↑				↑	
T						↑					
P											
BT						↑				↑	
BP						↑				↑	

Gen: β -actin: β -actina; ZO-1: zona ocludens 1; α -Tub: α -tubulina; Vim: vimentina; Tricel: tricelulina; Ocl: ocludina; Am: amilasa; Trip: tripsina; ALP: fosfatasa alcalina; Tf: transferrina; PepT-1: transportador de péptidos 1.

VIII. CONCLUSIONES

1. Tras dos semanas de tratamiento, las dietas experimentales que tuvieron un mayor efecto estimulante sobre las actividades inmunitarias de la dorada fueron las suplementadas con *Tetraselmis chuii* (100 g/kg) o *Phaeodactylum tricornutum* (100 g/kg).
2. A las cuatro semanas, la mayoría de las dietas produjeron un incremento significativo en la actividad hemolítica del complemento y, en menor medida, en la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico. El resto de parámetros permanecieron constantes o disminuyeron su actividad.
3. En cuanto a los parámetros intestinales, la altura de las vellosidades y el diámetro intestinal aumentaron significativamente tras cuatro semanas de tratamiento con todas las dietas excepto las dietas suplementadas con bacteria+microalga, aunque la relación altura vellosidades : diámetro intestinal permaneció constante. El número de células caliciformes y la altura de las microvellosidades descendió con casi todas las dietas, excepto en aquellas suplementadas con *B. subtilis*+*P. tricornutum* y las microalgas individuales respectivamente.
4. La vacuolización y el espacio intercelular de los enterocitos aumentaron significativamente en los peces alimentados con las dietas experimentales, mientras que los índices de diversidad de la microflora intestinal disminuyeron.
5. Las dietas suplementadas con inulina, microalgas, *B. subtilis*, o las combinaciones con *B. subtilis* (*B. subtilis*+inulina, *B. subtilis*+*T. chuii*, *B. subtilis*+*P. tricornutum*) no mejoraron la resistencia de los peces a la infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*; es más, la administración combinada de inulina y *B. subtilis* resultó en una mortalidad mayor que la observada en los peces control. Los aumentos en los parámetros inmunitarios observados tras administrar las dietas experimentales en la dorada no se correlacionaron con un aumento en la resistencia frente a *P. damselae*.
6. La expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en el riñón cefálico de dorada no se vio prácticamente afectada por las dietas experimentales.
7. La expresión del gen de la proteína proinflamatoria IL-8 aumentó en el intestino de dorados alimentados con casi todas las dietas, mientras que la expresión de CASP-1 y COX-2 solamente aumentó con la dieta de *B. subtilis*. El resto de genes de proteínas proinflamatorias no se vieron afectados por las dietas experimentales.
8. La expresión de genes de proteínas del citoesqueleto, uniones estrechas y transportadores también aumentó: β -actina (dietas con inulina), ocludina (todas las dietas excepto la suplementada con *P. tricornutum* solo) y transferrina (todas las dietas excepto las suplementadas con microalgas solas).

IX. ABSTRACT

Aquaculture is the fastest growing food-production sector in the world and, over the last 30 years, much effort in research has focused on increasing fish growth efficiency by the manipulation of dietary formulation (Kiron, 2012; Oliva-Teles, 2012). At present, diet optimization and disease control are two primary objectives to guarantee the continued expansion of aquaculture. The newest area of high interest to improve fish growth efficiency and to prevent and/or control fish diseases is through the application of probiotics, prebiotics, and immunostimulant feed additives as significant alternatives to the use of antibiotics (Magnadóttir, 2010; Dimitroglou et al., 2011). Optimization diets includes the use of vegetable protein sources, such as soybean and other plants (Kumar et al., 2011; Lech and Reigh, 2012). To our knowledge, the replacement of fishmeal by microalgae meal in fish diets has not been investigated.

Information about the influence of inulin (a prebiotic) on fish immune systems is still scarce (Ringø et al., 2010), but available results demonstrate an alteration of intestinal microbiota (Mahious et al., 2006; Ringø et al., 2006). Among probiotics, *Bacillus subtilis* has been reported to have various beneficial properties when used as a supplement in fish diets (Salinas et al., 2005, 2008; Nayak et al., 2007; Newaj-Fyzul et al., 2007; Aly et al., 2008a; Kumar et al., 2008). On the other hand, microalgae have emerged as a very interesting natural source of new compounds with biological activity that may be used as functional ingredients in the fish diet (Plaza et al., 2009, 2010; Christaki et al., 2011; Guedes et al., 2011).

Therefore, the aim of the current study was to evaluate the potential *in vivo* effects of the dietary administration of inulin, microalgae and *B. subtilis*, singly or combined, on different immune parameters of the gilthead seabream (*Sparus aurata*), immuno-related gene expression in the head kidney and intestine, and protection against an experimental challenge with *P. damselae* subsp. *piscicida*. Concomitantly, the effects on gut morphology, microflora, intestinal proinflammatory expression, cytoskeleton, tight junctions, and digestive and transport proteins genes were also evaluated.

The different experiments conducted to carry out this objective have been organized into five chapters in the present doctoral thesis. In the first chapter, different concentrations of inulin—zero (control), 5, 10, 15, and 30 g/kg—were orally administered to determine the optimal concentration and time for stimulating the seabream's immune system. At the end of the feeding trial (one, two, or four weeks) the fish were sampled and various immune parameters were measured. Inulin produced significant inhibition in phagocytosis and respiratory burst in leukocytes from specimens fed diets containing 5 or 10 g/kg of inulin for one week. However, in fish fed the 10 g/kg inulin-supplemented diet for two and four weeks, a significant increase in

complement and phagocytic activities were observed. On the other hand, the diet containing 30 g/kg inulin only significantly increased phagocytic capacity, whereas administration of the 15 g/kg inulin-supplemented diet had no effect on the assayed activities.

In the second chapter, the effects of three orally administered microalgae (*Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*) on different immune parameters and immune-related gene expression of the gilthead seabream were evaluated. The fish were fed a control or one of the six experimental diets (*N. gaditana*, *T. chuii*, and *P. tricornutum* at two concentrations—50 and 100 g/kg—each), and they were sampled after two and four weeks of treatment. At the end of each trial, different systemic and local immune activities were measured (natural haemolytic complement activity, IgM levels, phagocytosis, and respiratory burst). The expression levels of different immune-associated genes (EF-1 α , IgM_H, TCR- β , MHCII α , MHCII β , CSF-1R, and β -defensin) were analyzed in the head kidney and gut. Administration of *N. gaditana* resulted in a significant increase in haemolytic complement activity, phagocytic capacity and expression level of β -defensin, whereas *T. chuii* increased haemolytic complement activity, phagocytic capacity and expression levels of MHCII α , and CSF-1R. The *P. tricornutum*-supplemented diet provoked immunostimulation, and very little effect on gene expression was observed. These results suggest that dietary microalgae enhance seabream defence activity, which could be very important in considering such microalgae as a possible additive in fish diets.

In the third chapter, the effects of inulin and *B. subtilis*, singly or combined, on immune parameters, immune-related gene expression, protection against *P. damselae* subsp. *piscicida*, and the intestinal morphology and microbiota of the gilthead seabream were tested. To test the capacity of *B. subtilis* to grow, employing inulin as an energy and carbon source, an *in vitro* assay was defined, and it demonstrated that this carbohydrate supported the growth of *B. subtilis* in a similar manner as glucose. For the *in vivo* study, the fish were distributed into four equal treatment groups: control (non-supplemented diet), inulin (10 g/kg), *B. subtilis* (10^7 cfu/g), and inulin + *B. subtilis* (10 g/kg and 10^7 cfu/g, respectively). Dietary administration of inulin or *B. subtilis* for two weeks stimulated the serum complement activity and the IgM level, as well as leukocyte phagocytic activity. When inulin and *B. subtilis* were administered together (as a synbiotic), only the serum complement activity and the IgM level increased in a statistically significant manner. Furthermore, the complement activity showed a significant increase in fish fed the three experimental diets for four weeks. The expression of immuno-related genes in the gilthead seabream head kidney was not significantly affected by the assayed diets. However, in the intestine, the expression of certain genes was significantly up-regulated. The challenge

experiment showed that the fish fed inulin or the synbiotic diet had non-significantly lower or significantly higher cumulative mortality, respectively, compared with the control group (non-supplemented diet). Curiously, fish fed the experimental diets (inulin, *B. subtilis*, or *B. subtilis* + inulin) showed the same morphological alterations when studied by light and electron microscopy, while significant differences in the signs of intestinal damage were detected by the morphometric study. All of the observed alterations were present only in the gut mucosa, and intestinal morphometric study revealed no effect of inulin or *B. subtilis* on the intestinal absorptive area. Furthermore, the experimental diets caused important alterations in the intestinal microbiota by significantly decreasing bacterial diversity, as demonstrated by the specific richness, Shannon, and range-weighted richness indices. The observed alterations demonstrate that the fish fed the experimental diets had different signs of gut oedema and inflammation that could compromise their body homeostasis, which is mainly maintained by the epithelial lining of the gastrointestinal tract. These results suggest that inulin and *B. subtilis* modulate the immune response in the gilthead seabream, although the combined administration increases susceptibility to infection by *P. damselae* subsp. *piscicida*, related to the observed damage in the intestine. To our knowledge, this is the first *in vivo* study regarding the implications of the use of synbiotics (conjunction of probiotics and prebiotics) on fish gut morphology and microbiota.

The fourth chapter was designed to investigate the combined or individual effects of two microalgae (*P. tricornutum* and *T. chuii*) and *B. subtilis* on immune response, gene expression, survival to challenge from *P. damselae* subsp. *piscicida*, intestinal morphology, and microbiota. To test the capacity of *B. subtilis* to grow, employing the microalgae polysaccharides as energy and carbon source, an *in vitro* assay was defined, and it demonstrated that the digestion product of microalgae, mainly *P. tricornutum*, supported the growth of *B. subtilis* much better than glucose. For the *in vivo* study, fish were distributed into six equal groups and received one of the following experimental diets: control, non-supplemented diet; *T. chuii* 100 g/kg; *P. tricornutum* 100 g/kg; *B. subtilis* 10⁷ cfu/g; *B. subtilis* 10⁷ cfu/g + *T. chuii* 100 g/kg; or *B. subtilis* 10⁷ cfu/g + *P. tricornutum* 100 g/kg. Complement activity, serum IgM level, respiratory burst, phagocytic activity, and expression of selected immune-related genes and non-immune-related genes in the head kidney and intestine were evaluated following two and four weeks of treatment. At the end of the feeding trial, the fish were challenged by intraperitoneal injection of LD₅₀ concentration of *P. damselae* subsp. *piscicida*, and mortality was recorded. This is the first study to test the immunomodulatory capacity of the microalgae used in the present work. The dietary applications of *B. subtilis*, *T. chuii*, and *P. tricornutum*, singly or in combination, may

exhibit up-regulating effects on the immune parameters of the gilthead seabream. Following two weeks of the feeding trial, significant increases were observed in complement activity, serum IgM level, respiratory burst, and phagocytosis. At four weeks, the observed immunostimulant effect only remained in complement activity and phagocytosis. Under the assayed conditions, no additive effect was observed among microalgae and the probiotic, because there were no significant differences between combination feeding and feeding the ingredients separately. Regarding gene expression, the β -defensin gene was significantly up-regulated, in the head kidney only, by the *B. subtilis* + *P. tricornutum* diet administered for two weeks. *P. tricornutum* demonstrated the highest immunostimulant activity on the assayed parameters. However, no significant effects of the assayed diets were observed in mortality after challenge compared to the control group. Fish fed the experimental diets showed similar morphological alterations when studied by light and electron microscopy, and significant signs of intestinal damage were detected. No effect of microalgae or *B. subtilis* on the intestinal absorptive area was observed, whereas the number of goblet cells and IELs were significant lower in fish fed the *T. chuii*, *P. tricornutum*, *B. subtilis*, and *B. subtilis* + *T. chuii* diets and *T. chuii*, *P. tricornutum* + *B. subtilis*, and *B. subtilis* + *T. chuii* diets, respectively. Interestingly, only the diets containing *B. subtilis* resulted in a significant reduction of microvilli height. Alterations such as wide intercellular spaces and large vacuoles in enterocytes were observed in fish fed the *T. chuii*, *B. subtilis*, and *B. subtilis* + *T. chuii* diets, and, to a lesser degree, *P. tricornutum*. These observations demonstrate that the fish fed the experimental diets presented different signs of oedema and inflammation that could compromise their body homeostasis. Moreover, the experimental diets caused important alterations in the intestinal microbiota by significantly decreasing bacterial diversity, as demonstrated by the fall in specific richness, Shannon, and range-weighted richness indices. Our results demonstrated the potential of microalgae as immunostimulants for fish, although further studies regarding the implications and effects of a stimulated immune system against pathogens, especially the protective capacity against specific diseases, are necessary. To our knowledge, this is the first *in vivo* study regarding the implications of the use of probiotics in combination with immunostimulants on fish intestinal morphology and microbiota.

Lastly, chapter five was carried out to determine the effect of the assayed diets in chapters three and four on expression of different genes in the intestine of the gilthead seabream following four weeks of the feeding trial. These genes were grouped into five categories: immuno-related genes involved in inflammation (genes encoding proinflammatory

proteins); genes related to the cytoskeleton; proteins of junction complexes; genes implicated in digestion processes; and genes related to transport proteins.

Regarding proinflammatory genes, IL-8 expression showed a significant increase in the fish fed all assayed diets, except the *B. subtilis* + inulin diet, whereas the expression of caspase-1 was also increased by the *B. subtilis* and *B. subtilis* + *T. chuii* diets. Cyclooxygenase-2 gene expression only increased in fish fed the *B. subtilis* diet.

Among cytoskeletal and junctional genes, only β -actin and occludin were significantly affected by the assayed diets. β -actin expression was up-regulated by the inulin-containing diets (inulin and *B. subtilis* + inulin diets), whereas occludin expression increased in the fish fed all of the assayed diets, except the *P. tricornutum* diet. Finally, the expression of transport protein genes demonstrated that the inulin diet and all the experimental diets containing *B. subtilis* significantly increased transferrin expression, whereas digestive enzymes were not affected by the experimental diets.

To conclude, our results demonstrated that inulin, *B. subtilis*, and microalgae can improve certain immune responses in gilthead seabream, although this observation did not imply a higher resistance to a *P. damselae* challenge in the present conditions. However, these dietary supplements also caused important alterations in the intestinal morphology, microbiota, and gene expression, which could be considered as negative for the health of the fish in the case of intestinal morphology and microbiota, although more morphofunctional studies are needed in order to correlate the nutritional and immune aspects of the fish gut and understand the physiological implications of up-regulated gene expression in the gut.

X. CONCLUSIONS

1. Following two weeks of the feeding trial, the experimental diets supplemented with *Tetraselmis chuii* (100 g/kg) or *Phaeodactylum tricornutum* (100 g/kg) had a greater stimulating effect on the immune activities of the gilthead seabream.
2. Following four weeks of the feeding trial, most of the diets produced a significant increase in serum complement activity and, to a lesser degree, in phagocytic activity of head kidney leukocytes. Others parameters remained unaffected or decreased in activity.
3. Regarding intestinal parameters, villus height and intestinal diameter significantly increased following four weeks of the feeding trial with all the diets except the microalgae + bacteria diets, although the ratio villus height:intestinal diameter remained constant. The number of goblet cells and microvillus height decreased following almost all the assayed diets, except the diets supplemented with *B. subtilis* + *P. tricornutum* and microalgae solely, respectively.
4. The intercellular space in the intestinal epithelium and enterocyte cytoplasmatic vacuolization significantly increased at the end of the feeding trial, whereas intestinal microbiota diversity indexes decreased in the fish fed the experimental diets.
5. The diets supplemented with inulin, microalgae, *B. subtilis*, or the *B. subtilis* combinations (*B. subtilis* + inulin, *B. subtilis* + *T. chuii*, *B. subtilis* + *P. tricornutum*) did not improve the resistance of the fish to the challenge with *P. damsela* subsp. *piscicida*; moreover, the combined administration of inulin and *B. subtilis* resulted in a higher mortality rate than that observed in the control fish. The observed increases in immune parameters by administering the experimental diets to the gilthead seabream did not correlate with disease resistance to *P. damsela*.
6. Expression of immune-related genes in the gilthead seabream head kidney and intestine were practically not affected by the experimental diets.
7. Expression of proinflammatory protein gene IL-8 was up-regulated in the gilthead seabream intestine following administration of almost all diets, whereas CASP-1 and COX-2 expression only increased following the *B. subtilis* diet administration. Other proinflammatory protein genes were not affected by the experimental diets.
8. Expression of cytoskeleton, tight junction protein, and transport proteins genes were also up-regulated: β -actin (diets containing inulin), occludin (all diets except *P. tricornutum* single diet), and transferrin (all diets except diets supplemented with microalgae solely).

XI. ANEXOS

Anexo 1. Curvas de crecimiento *Bacillus subtilis* y *Photobacterium damsela*

1. Introducción

El crecimiento de las bacterias en cultivo puede determinarse midiendo experimentalmente el incremento de la materia celular o el incremento del número de células. La medida de la materia celular puede realizarse por métodos directos, como el peso seco o el volumen de masa celular, o por métodos indirectos, como la determinación de ácidos nucleicos o enzimas específicas. El número de células puede medirse directamente por recuento al microscopio, citometría de flujo o dilución y cultivo en placa, o indirectamente mediante medidas de turbidez, traducidas en número de células mediante el uso de una curva de crecimiento previamente establecida.

Las curvas de crecimiento bacteriano son representaciones gráficas del número de células viables por mililitro que existen en un cultivo. Un cultivo bacteriano atraviesa cuatro fases principales, desde que empieza a crecer hasta que “envejece” (Madigan y col., 2009):

- » **Fase lag o de latencia:** en esta fase, las bacterias se adaptan a las condiciones de cultivo, las células individuales están madurando y no tienen aún capacidad de división.
- » **Fase logarítmica o exponencial:** esta fase se caracteriza por la duplicación celular. Las bacterias se dividen activamente, y el número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población. Esta duplicación continúa a un ritmo constante, por tanto el número de células y la tasa de crecimiento de la población se duplica con cada período de tiempo consecutivo. Para este tipo de crecimiento exponencial, si representamos el logaritmo natural del número de células frente al tiempo se obtiene una línea recta. La pendiente de esta línea es la tasa de crecimiento específica del organismo, que es una medida del número de divisiones por célula y por unidad de tiempo. Sin embargo, el crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente, ya que las bacterias agotan pronto los nutrientes del medio de cultivo a la vez que se van acumulando los desechos.
- » **Fase estacionaria:** durante esta fase, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos disponibles, y se caracteriza por un valor constante en el número de células a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de mortalidad.

- » **Fase de declive o muerte:** los nutrientes se han agotado y las bacterias mueren. El número de células va disminuyendo debido a que la tasa de mortalidad es mayor que la tasa de crecimiento.

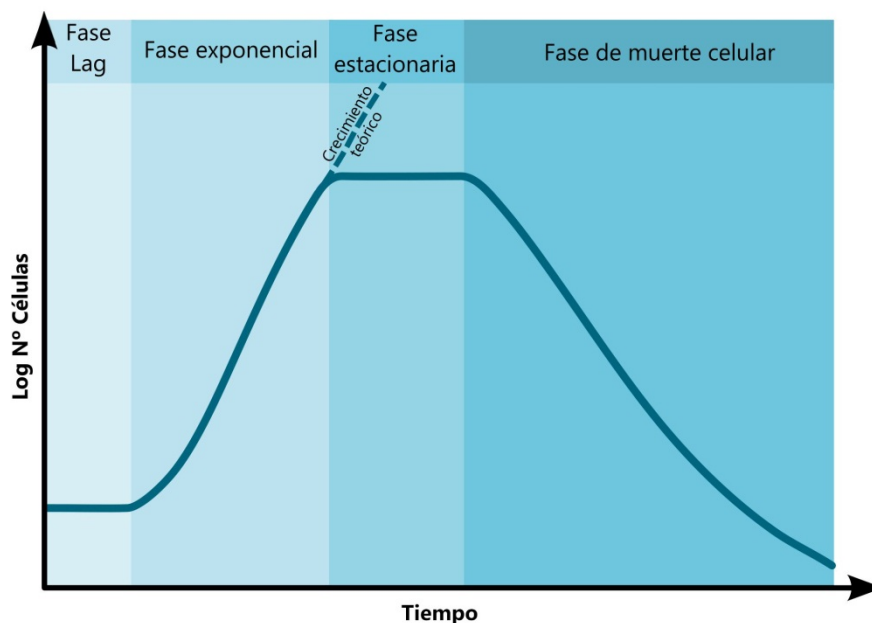


Figura 29. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana en cultivo líquido, con las cuatro fases en que se divide (Modificado de Michal Komorniczak, Medical Illustrations (Polonia)).

2. Procedimiento

En el presente trabajo, se establecieron las curvas de crecimiento de las dos bacterias utilizadas: el probiótico *B. subtilis* y el patógeno *P. damsela* subsp. *piscicida*. Para ello, se sembraron placas a partir de alícuotas congeladas de ambas bacterias, en su correspondiente medio de cultivo (Agar nutritivo y TSAs respectivamente) y se dejaron crecer durante 24 h. A partir de este cultivo se sembraron 5 ml de medio líquido y se crecieron durante 12-16 h. Este cultivo se empleó para inocular 40 ml de medio de cultivo nuevo, hasta alcanzar una absorbancia de 0.01 aproximadamente a una longitud de onda de 600 nm (absorbancia de partida). Una vez obtenido este cultivo, se anotó la absorbancia y se sembraron dos placas con 100 μ l, constituyendo la muestra correspondiente a tiempo 0.

A continuación, el cultivo se incubó en agitación a la temperatura adecuada (30° para *B. subtilis* y 22° para *P. damsela* subsp. *piscicida*). Durante las cuatro primeras horas de

incubación, se recogieron muestras cada hora, y después cada dos horas, hasta las doce horas. A partir de ahí, se dejaron doce horas sin recoger muestra y se recogieron otras dos a las 24 y 26 h.

De cada tiempo y muestra, se midió la absorbancia a 600 nm y se sembraron las diluciones presentadas en la tabla 26.

Tabla 26. Tiempos de incubación y diluciones que se sembraron en cada caso para determinar las curvas de crecimiento de *B. subtilis* y *P. damselae*.

Tiempo (h)	Diluciones <i>B. subtilis</i>	Diluciones <i>P. damselae</i>
T0	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$	$10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
T1	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$	$10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$
T2	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$
T3	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$
T4	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$
T6	$10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$
T8	$10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$
T10	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$
T12	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$
T24	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	$10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$
T26	$10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$	$10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$

De cada una de las diluciones indicadas en la tabla 25, se sembraron dos placas y se incubaron durante 8-16 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias en cada placa y se calculó, para cada tiempo, el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ufc}}{\text{ml}} = \text{n}^{\circ} \text{ colonias} \times \left(\frac{1}{\text{factor de dilución}} \right) \times \left(\frac{1}{\text{Volumen sembrado(ml)}} \right)$$

A partir de los datos obtenidos, se representaron dos tipos de gráficos. En primer lugar, se representó un gráfico lineal con el tiempo de incubación en el eje X y la absorbancia a 600 nm en el eje Y, y por otra parte, se representó el número de células frente al tiempo, también en escala lineal. A partir de estas gráficas se seleccionó el periodo de tiempo correspondiente a la

fase exponencial, y se representó en otra gráfica, obteniéndose la ecuación del ajuste a una línea recta.

3. Resultados

En las figuras 30 y 31 aparecen las distintas curvas de crecimiento obtenidas para las dos especies bacterianas, *B. subtilis* y *P. damselae*.

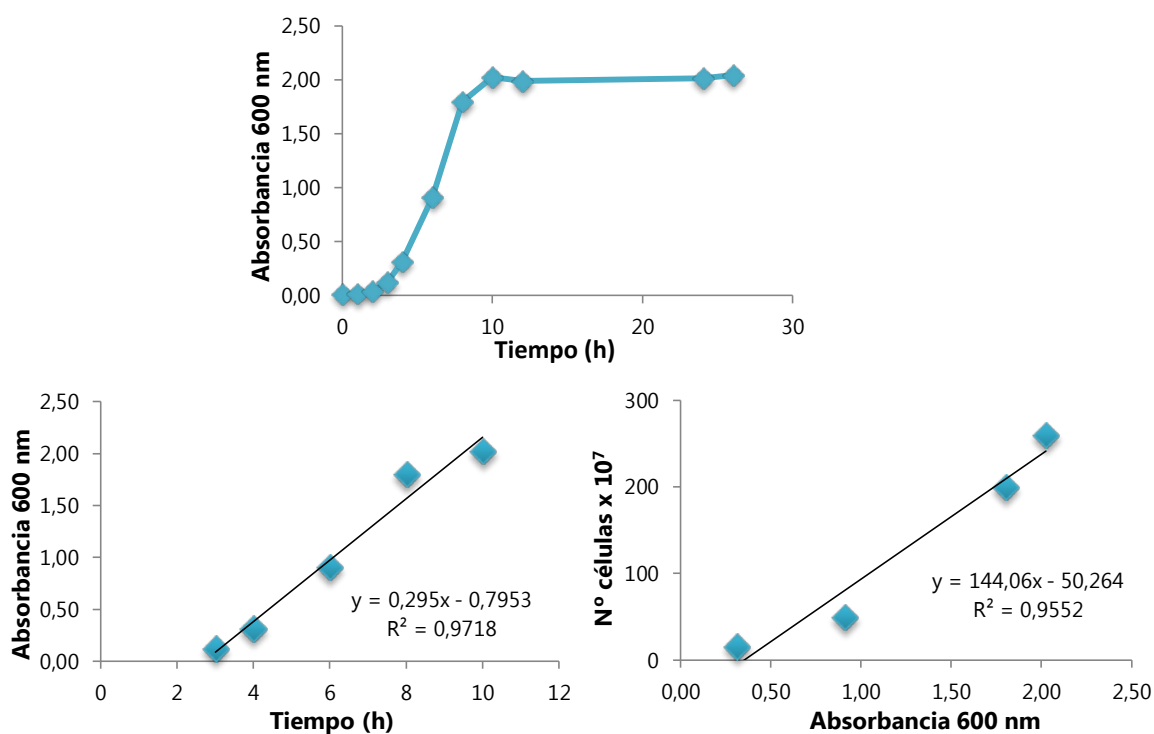


Figura 30. Curvas de crecimiento de *B. subtilis* en agar nutritivo durante el periodo de incubación a 30°C. A) Representación lineal absorbancia-tiempo. B) Representación de la pendiente absorbancia-tiempo, con la ecuación de la regresión lineal. C) Representación de la pendiente número de células-absorbancia, con la ecuación de la regresión lineal.

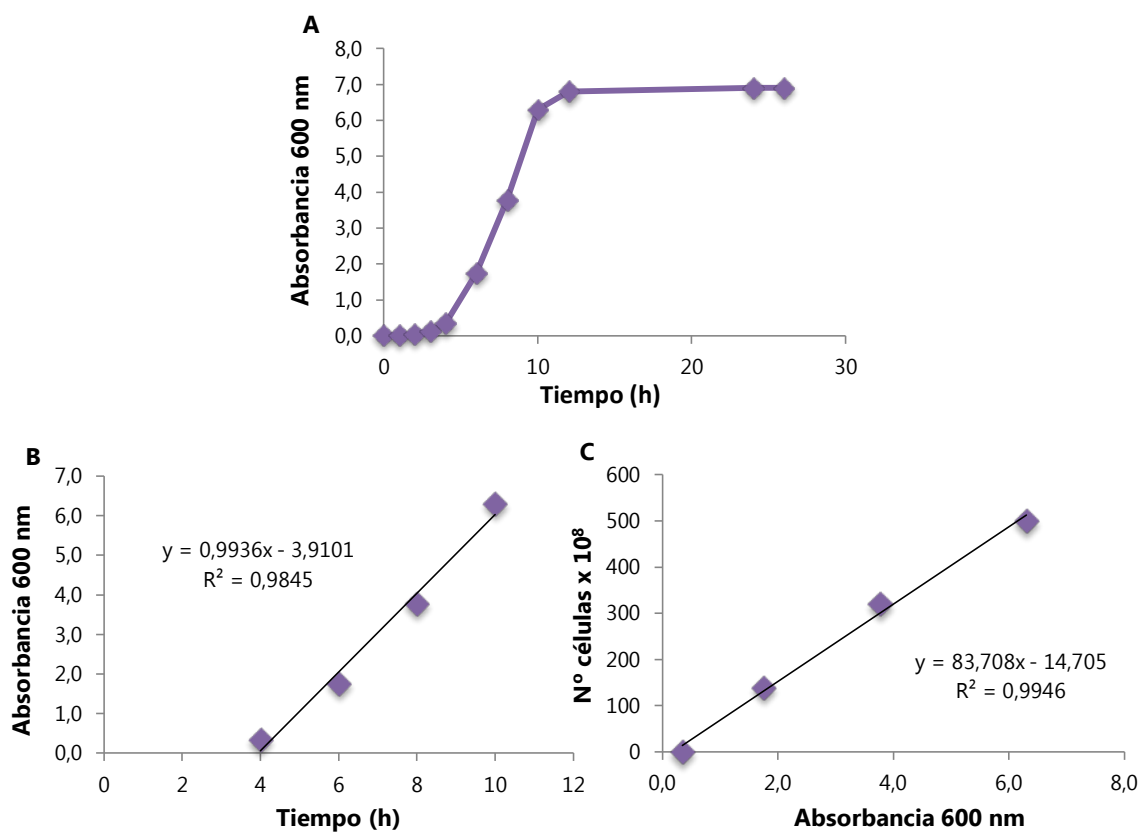


Figura 31. Curvas de crecimiento de *P. damselae* en agar nutritivo durante el periodo de incubación a 30°C. A) Representación lineal absorbancia-tiempo. B) Representación de la pendiente absorbancia-tiempo, con la ecuación de la regresión lineal. C) Representación de la pendiente número de células-absorbancia, con la ecuación de la regresión lineal.

Anexo 2. Determinación DL50 de *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*

1. Introducción

Con el objetivo de determinar la dosis de patógeno a inyectar en las infecciones experimentales, se realizaron varios ensayos previos. La dosis letal 50 corresponde, en nuestro caso, a la dosis mínima de bacterias capaz de causar la muerte del 50% de los ejemplares infectados.

2. Diseño experimental

Fue necesario realizar dos infecciones, partiendo de dosis bajas, hasta alcanzar la DL50. Los peces (50 g de peso medio) fueron distribuidos en tanques aislados e independientes, con 12 peces cada uno, que fueron infectados de la siguiente forma:

- » Infección 1: se inyectaron dosis de 0 (control), 10^4 , 10^5 y 10^6 ufc/ml
- » Infección 2: se inyectaron dosis de 0 (control), 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} ufc/ml

3. Procedimiento y resultados

En primer lugar, se recuperó la cepa congelada mediante el cultivo en placas de TSAs y la incubación posterior a 22°C durante 24 h en agitación. A continuación, a partir de una colonia de esta placa se sembraron 5 ml de TSBs y se incubaron en agitación (24 h, 22°C). Posteriormente, se llevó el cultivo a 100 ml y se incubó hasta la fase de crecimiento exponencial. En este momento, se midió la absorbancia a 600 nm y se estimó el número de células mediante las curvas de crecimiento. Las células fueron lavadas (1.500 rpm 10 min) y ajustadas a las concentraciones requeridas en PBS estéril.

Los peces fueron infectados mediante inyección intraperitoneal con 100 µl de PBS con *P. damselae*. Como control, se emplearon peces a los que se inyectó solamente PBS. Se contabilizó la mortalidad dos veces al día, durante siete días.

En la primera infección, no se observaron mortalidades, por lo que se procedió a diseñar la segunda infección, cuyas mortalidades observadas se resumen en la tabla 27.

Tabla 27. Mortalidades observadas en doradas durante los seis días posteriores a la infección por inyección intraperitoneal con *P. damselae* subsp. *piscicida*. d, días; %, porcentaje.

Dosis (ufc/ml)	Bajas						Total	%
	1d	2d	3d	4d	5d	6d		
C	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁹	-	-	2	-	-	-	2	16.67%
10 ¹⁰	2	4	2	-	-	-	8	66.67%

Como se puede observar en la tabla, la dosis de 10⁹ ufc/ml provocó la muerte de un 17% de los ejemplares, mientras que la dosis inmediatamente superior (10¹⁰ ufc/ml) afectó al 67% de la población. Por tanto, la DL50 estaría comprendida entre estas dos dosis.

Para calcular la DL50 se empleó el método de Reed y Muench (Reed and Muench, 1938). Este método se basa en la suposición de que el número de ejemplares afectados varía proporcionalmente al log₁₀ de la dilución, es decir, que a diluciones menores (mayor concentración de bacteria) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de bacteria). Además, se supone que en la zona cercana al 50% de efecto éste varía linealmente con la dosis. Este método consiste en una serie de cálculos sencillos que se detallan a continuación.

En primer lugar, para calcular los porcentajes de infectividad se construye una tabla en la que los valores de "muertos totales" y "vivos totales" son cumulativos, debido a la suposición de que las concentraciones mayores de bacteria, como la 10¹⁰ ufc/ml, hubieran ejercido su efecto sobre todos los ejemplares inoculados con las diluciones menores; del mismo modo, las concentraciones menores de bacteria (10⁹ ufc/ml) no hubieran hecho efecto sobre los ejemplares inoculados con las concentraciones mayores (Tabla 28).

Tabla 28. Cálculo del porcentaje de infectividad de *P. damselae* para cada una de las dosis administradas en la segunda infección experimental. N^o, número; %, porcentaje.

Dosis	N ^o Animales	Muertos	Vivos	Muertos totales	Vivos totales	Muertos/ total	% infectividad
10 ¹⁰	12	8	4	10	4	10/14	71.4
10 ⁹	12	2	10	2	14	2/14	12.5
10 ⁸	12	0	12	0	26	0/26	0
10 ⁷	12	0	12	0	39	0/36	0

Los porcentajes obtenidos así son ligeramente diferentes de los calculados con el número de ejemplares muertos respecto al total en la tabla anterior. A continuación, calculamos la distancia proporcional entre las dos dosis infectivas aplicando la siguiente ecuación:

$$DP = \frac{(\% \text{ I D } + 50\%) - 50\%}{(\% \text{ I D } + 50\%) - (\% \text{ I D } - 50\%)}$$

DP: distancia proporcional

I D +50%: infectividad producida por la dosis que provoca mortalidad inmediatamente por encima del 50%

I D -50%: infectividad producida por la dosis que provoca mortalidad inmediatamente por debajo del 50%

Esta fórmula nos daría una distancia proporcional de 0.36. A continuación, calculamos la DL 50 mediante esta fórmula:

$$DL50 = -\text{Log} (\text{I D} + 50\%) + DP$$

Con lo cual, obtendríamos que la DL50 de *P. damselae* subsp. *piscicida* para doradas de 50 g de peso medio sería $10^{9.36}$, lo que equivaldría aproximadamente a 2×10^9 ufc/ml.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichman, A., Poher, J., 2002. Propiedades generales de las respuestas inmunitarias., in: Abbas, A., Lichman, A., Poher, J. (Eds.), *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, pp. 1–16.
- Abelli, L., Randelli, E., Carnevali, O., Picchiatti, S., 2009. Stimulation of gut immune system by early administration of probiotic strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 340–342.
- Adams, C.A., 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews* 23, 37–46.
- Ahmdifar, E., Akrami, R., Ghelichi, A., Mohammadi Zarejabad, A., 2011. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology* 20, 447–451.
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H., 2007. Effects of dietary beta-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 394–402.
- Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Zhang, W., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture* 317, 155–161.
- Akira, S., Hemmi, H., 2003. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters* 85, 85–95.
- Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126, 171–198.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A., Bermudez, R., Quiroga, M.I., 2006. Levamisole activates several innate immune factors in *Scophthalmus maximus* (L.) Teleostei. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 19, 727–738.
- Aly, S.M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., Mohamed, M.F., 2008a. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 128–136.
- Aly, S.M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., Mohamed, M.F., 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 128–136.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 527–537.
- Angosto, D., López-Castejón, G., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Arizcun, M., Meseguer, J., Mulero, V., 2012. Evolution of inflammasome functions in vertebrates: Inflammasome and caspase-1 trigger fish macrophage cell death but are dispensable for the processing of IL-1 β . *Innate Immunity*.
- Aranishi, F., Mano, N., 2000. Antibacterial cathepsins in different types of ambicoloured *Japanese flounder* skin. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 87–89.

- Assreuy, A.M.S., Gomes, D.M., da Silva, M.S.J., Torres, V.M., Siqueira, R.C.L., Pires, A. de F., Criddle, D.N., de Alencar, N.M.N., Cavada, B.S., Sampaio, A.H., Farias, W.R.L., 2008. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 691–695.
- Atalah, E., Cruz, C.M.H., Izquierdo, M.S., Rosenlund, G., Caballero, M.J., Valencia, A., Robaina, L., 2007. Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270, 178–185.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish*, 4th ed. Springer-Praxis, Chichester, UK.
- Baeverfjord, G., Krogdahl, Å., 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* 19, 375–387.
- Bagni, M., Romano, N., Finioia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G., 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology* 18, 311–325.
- Bakke-McKellep, A.M., Penn, M., Salas, P., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E., Krogdahl, Å., 2007. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* 97, 699–713.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T., 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology* 55, 409–412.
- Bates, J.M., Mittge, E., Kuhlman, J., Baden, K.N., Cheesman, S.E., Guillemin, K., 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology* 297, 374–386.
- Bayne, C.J., Gerwick, L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 725–743.
- Bayne, C.J., Levy, S., 1991. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. *Journal of Leukocyte Biology* 50, 554–560.
- Becker, E.W., 2007. Microalgae in human and animal nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgae Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Bedirli, A., Kerem, M., Ofluoglu, E., Salman, B., Katircioglu, H., Bedirli, N., Yilmazer, D., Alper, M., Pasaoglu, H., 2009. Administration of *Chlorella* sp. microalgae reduces endotoxemia, intestinal oxidative stress and bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *Clinical Nutrition* 28, 674–678.
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–1160.
- Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmonczyk, S., Quillet, E., Boudinot, P., Benmansour, A., 2006. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal of Immunology* 176, 3942–3949.

- Birkbeck, T., Ringø, E., 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish., in: Holzapfel, W., Naughton, P. (Eds.), *Microbial Ecology in Growing Animals*. Elsevier, Edinburgh, UK., pp. 208–234d.
- Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9, 393–401.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 239–262.
- Bosscher, D., Breyneart, A., Pieters, L., Hermans, N., 2009. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 60 Suppl 6, 5–11.
- Bosscher, D., Van Loo, J., Franck, A., 2006. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *International Dairy Journal* 16, 1092–1097.
- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I.R., Ellis, A.E., 1997. Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish and Shellfish Immunology* 7, 377–385.
- Boyd, C.E., Massaut, L., 1999. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering* 20, 113–132.
- Brattgjerd, S., Evensen, O., Lauve, A., 1994. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology* 83, 288–294.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 457–472.
- Brown, M., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.
- Brown, M., 2011. Modes of action of probiotics: recent developments. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 1895–1900.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145, 79–99.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161, 91–113.
- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenergy, C., 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 11, 247–255.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 30, 573–579.
- Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 36, 425–436.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D., 2010. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the prebiotics GroBiotic-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide on the digestive microbiota and

- performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Microbial Ecology* 59, 187–198.
- Caballero, M., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325–340.
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology* 19, 21–41.
- Campa-Córdova, A., Hernández-Saavedra, N., De Philippis, R., Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 12, 353–366.
- Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D.M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091–1103.
- Carreto, J.I., Catoggio, J.A., 1976. Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth. *Marine Biology* 36, 105–112.
- Carrington, A.C., Secombes, C.J., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, 87–101.
- Caspary, W.F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American journal of clinical nutrition* 55, 299S–308S.
- Castro, R., Zarra, I., Lamas, J., 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture* 229, 67–78.
- Casula, G., Cutting, S.M., 2002. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2344–2352.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 26, 243–248.
- Cerón García, M., García Camacho, F., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J., Chisti, Y., Molina Grima, E., 2006. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 689–694.
- Chen, K.T., Malo, M.S., Beasley-Topliffe, L.K., Poelstra, K., Millan, J.L., Mostafa, G., Alam, S.N., Ramasamy, S., Warren, H.S., Hohmann, E.L., Hodin, R.A., 2011. A role for intestinal alkaline phosphatase in the maintenance of local gut immunity. *Digestive diseases and sciences* 56, 1020–1027.
- Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin, D.M., 2011. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 143–147.
- Chichlowski, M., Croom, J., W McBride, B., B Havenstein, G., D Koci, M., 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science* 6, 694–704.
- Chiu, C.-H., Cheng, C.-H., Gua, W.-R., Guu, Y.-K., Cheng, W., 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 1053–1059.

- Choct, M., 2009. Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science* 50, 9–15.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E., 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62, 794–799.
- Clarke, A.J., Witcomb, D.M., 1980. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Fish Biology* 16, 159–170.
- Cruz-García, L., Sánchez-Gurmaches, J., Bouraoui, L., Saera-Vila, A., Pérez-Sánchez, J., Gutiérrez, J., Navarro, I., 2011. Changes in adipocyte cell size, gene expression of lipid metabolism markers, and lipolytic responses induced by dietary fish oil replacement in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 158, 391–399.
- Cuesta, A., Cerezuela, R., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2008. *In vivo* actions of melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. *Journal of Pineal Research* 45, 70–78.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71, 161–171.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002a. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 97–109.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002b. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89, 169–174.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Ortuño, J., Meseguer, J., 2001. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 11, 293–302.
- Cuesta, A., Laiz-Carrión, R., Arjona, F., Del Río, M.P.M., Meseguer, J., Mancera, J.M., Esteban, M.A., 2006. Effect of PRL, GH and cortisol on the serum complement and IgM levels in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 20, 427–432.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101, 203–210.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.Á., 2011. Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Molecular Immunology* 48, 1432–1438.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2005. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 18, 71–80.
- Cuesta, A., Salinas, I., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2008. Unmethylated CpG motifs mimicking bacterial DNA triggers the local and systemic innate immune parameters and expression of immune-relevant genes in gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 617–624.
- Dalmo, R., Børgwald, J., 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 384–396.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature immunology* 6, 295–302.

- Das, B.K., Debnath, C., Patnaik, P., Swain, D.K., Kumar, K., Mishra, B.K., 2009. Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish and Shellfish Immunology* 27, 678–683.
- Das, B.K., Ellis, A.E., Collet, B., 2009. Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 40–48.
- Das, S., Ward, L.R., Burke, C., 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 419–429.
- Decamp, O., Moriarty, D., 2006. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. *Journal of the World Aquaculture Society* 37, 60–62.
- Delaedt, Y., Diallo, M.D., Rurangwa, E., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Ollevier, F., 2008. Impact of arabinoxylooligosaccharides on microbial community composition and diversity in the gut of Siberian Sturgeon (*Acipenser baeri*), in: *Aquaculture Europe*, September 15–18. pp. 183–184.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* 111, 6130–6185.
- Deplancke, B., Gaskins, H.R., 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 1131S–1141S.
- Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L., Smith, V.J., 2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology* 81, 755–764.
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J., 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology* 11, 45–52.
- Dhanasiri, A.K.S., Brunvold, L., Brinchmann, M.F., Korsnes, K., Bergh, Ø., Kiron, V., 2011. Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microbial Ecology* 61, 20–30.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D., Davies, S.J., 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production – a Mediterranean perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 1–16.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley, G., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal Science* 87, 3226–3234.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182–188.
- Domínguez-González, R., Romarís-Hortas, V., García-Sartal, C., Moreda-Piñeiro, A., Barciela-Alonso, M.D.C., Bermejo-Barrera, P., 2010. Evaluation of an *in vitro* method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. *Talanta* 82, 1668–1673.
- Drakoularakou, A., McCartney, A., Rastall, R., Gibson, G.R., 2004. Established and emerging prebiotics and their effects on the gut microflora. *Agro Food Industry Hi-Tech* 15, 18–20.

- Duerr, E.O., Molnar, A., Sato, V., 1998. Cultured microalgae as aquaculture feeds. *Journal of Marine Biotechnology* 6, 65–70.
- Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Abdala, R.T., Figueroa, F.L., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2008. Effect of dietary administration of *Porphyridium cruentum* on the respiratory burst activity of sole, *Solea senegalensis* (Kaup), phagocytes. *Journal of Fish Diseases* 31, 489–495.
- Díaz-Rosales, P., Felices, C., Abdala, R., Figueroa, F.L., Gómez Pinchetti, J.L., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C., 2007. *In vitro* effect of the red alga *Hydropuntia cornea* (J. Agardh) on the respiratory burst activity of sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) phagocytes. *Aquaculture Research* 38, 1411–1418.
- Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2006. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 482–492.
- Dügener, S., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 99–106.
- Elbal, M., Agulleiro, B., 1986. A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus auratus* (Teleostei). *Journal of Submicroscopic Cytology* 18, 335–347.
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827–839.
- Elmer, G.W., Surawicz, C.M., McFarland, L.V., 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 275, 870–876.
- Enis Yonar, M., Mişe Yonar, S., Silici, S., 2011. Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish and Shellfish Immunology* 31, 318–325.
- Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuño, J., Meseguer, J., 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 303–315.
- Esteban, M.A., Meseguer, J., 1994. Phagocytic defence mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *The Anatomical Record* 240, 589–597.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 293, 133–141.
- Esteban, M.A., Rodríguez, A., Meseguer, J., 2004. Glucan receptor but not mannose receptor is involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus aurata* L.) blood leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 447–451.
- FAO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization, Cordoba, Argentina.
- FAO, 2010. The state of world fisheries and aquaculture 2010. Rome.

- Falco, A., Frost, P., Miest, J., Pionnier, N., Irnazarow, I., Hoole, D., 2012. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish and Shellfish Immunology* 32, 1051–1057.
- Falkow, S., 2006. Is persistent bacterial infection good for your health? *Cell* 124, 699–702.
- Farzanfar, A., 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48, 149–158.
- Fast, M.D., Ross, N.W., Mustafa, A., Sims, D.E., Johnson, S.C., Conboy, G.A., Speare, D.J., Johnson, G., Burka, J.F., 2002. Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Diseases Of Aquatic Organisms* 52, 57–68.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J.L., Davies, S.J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology* 109, 851–862.
- Fernandes, J.M.O., Smith, V.J., 2004. Partial purification of antibacterial proteinaceous factors from erythrocytes of *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 1–9.
- Fernandez-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M.C., Bejar, J., Borrego, J.J., Machado, M., 2008. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish and Shellfish Immunology* 24, 279–285.
- Firmansyah, A., Dwipoerwantoro, P.G., Kadim, M., Alatas, S., Conus, N., Lestarina, L., Bouisset, F., Steenhout, P., 2011. Improved growth of toddlers fed a milk containing synbiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 20, 69–76.
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Köllner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 209–226.
- Fjellheim, A.J., Playfoot, K.J., Skjermo, J., Vadstein, O., 2007. Vibrionaceae dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 269, 98–106.
- Flajnik, M.F., 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nature reviews. Immunology* 2, 688–698.
- Flajnik, M.F., 2005. The last flag unfurled? A new immunoglobulin isotype in fish expressed in early development. *Nature Immunology* 6, 229–230.
- Flajnik, M.F., Du Pasquier, L., 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* 25, 640–644.
- Ford, C.W., Percival, E., 1965a. The carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum*. Part I. Preliminary examination of the organism, and characterisation of low molecular weight material and of a glucan. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 7035–7041.
- Ford, C.W., Percival, E., 1965b. Carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum*. Part II. A sulphated glucuromannan. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 7042–7046.

- Forstner, J., Oliver, M., Sylvester, F., 1995. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins., in: Blaser, M., Smith, P., Ravdin, J., Greenberg, H., Guerrant, R. (Eds.), *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 71–88.
- Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., Dufrêne, Y.F., 2008. Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology* 10, 1344–1356.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Beganović, J., Lebos, A., Susković, J., 2009. Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *The Journal of Dairy Research* 76, 98–104.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–378.
- Furnes, C., Seppola, M., Robertsen, B., 2009. Molecular characterisation and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish and Shellfish Immunology* 26, 285–292.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141S, 15–28.
- Galina, J., Yin, G., Ardó, L., Jeney, Z., 2009. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 669–676.
- Galindo-Villegas, J., Hosokawa, H., 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish, in: Cruz Suárez, L., Ricque Marie, D., Nieto López, M., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. (Eds.), *Memorias Del VII Simposium Internacional De Nutrición Acuícola*. Hermosillo, Sonora, México., pp. 279–319.
- García-Fernández, C., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2011. Characterization of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) transferrin gene: genomic structure, constitutive expression and SNP variation. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 548–556.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Gatesoupe, F.J., 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267, 20–30.
- Geng, X., Dong, X.-H., Tan, B.-P., Yang, Q.-H., Chi, S.-Y., Liu, H.-Y., Liu, X.-Q., 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 400–406.
- Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R., Agh, N., 2008. Biochemical effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. *Research Journal of Biological Sciences* 3, 217–221.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 167, 103–113.
- Gill, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* 17, 755–773.

- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259–270.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 969–973.
- Grau, A., Crespo, S., Sarasquete, M.C., Canales, M.L.G., 1992. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning electron microscope study. *Journal of Fish Biology* 41, 287–303.
- Graves, S.S., Evans, D.L., Cobb, D., Dawe, D.L., 1984. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Developmental and Comparative Immunology* 8, 293–302.
- Greenberg, S.A., Sanoudou, D., Haslett, J.N., Kohane, I.S., Kunkel, L.M., Beggs, A.H., Amato, A.A., 2002. Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology* 59, 1170–1182.
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16, 49–61.
- Grootaert, C., Delcour, J.A., Courtin, C.M., Broekaert, W.F., Verstraete, W., Van de Wiele, T., 2007. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science and Technology* 18, 64–71.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2011. Microalgae as sources of high added-value compounds--a brief review of recent work. *Biotechnology Progress* 27, 597–613.
- Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., Reboloso-Fuentes, M.M., 2004. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering* 65, 511–517.
- Gupta, S.K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Dalvi, R., Kumar, V., Mukherjee, S.C., 2008. Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 31, 649–657.
- Guzmán, S., Gato, A., Calleja, J.M., 2001. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytotherapy Research* 15, 224–230.
- Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M., Calleja, J.M., 2003. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytotherapy Research* 17, 665–670.
- Güroy, D., Güroy, B., Merrifield, D.L., Ergün, S., Tekinay, A.A., Yiğit, M., 2011. Effect of dietary Ulva and Spirulina on weight loss and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during a starvation period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95, 320–327.
- Hanley, F., Brown, H., Carbery, J., 1995. First observations on the effects of mannan oligosaccharide added to hatchery diets for warmwater Hybrid Red Tilapia, in: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries: Proceedings of Alltech's 11 Annual Symposium*. Lexington, KY, USA, pp. May 20–23.
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38, 1–26.

- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6919–6924.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2010a. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 354–361.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2010b. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 1037–1043.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1–15.
- Harikrishnan, R., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2011. Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) against *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 886–893.
- Harikrishnan, R., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Han, Y.-J., Jang, I.-S., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2011. Immunomodulatory effect of sodium alginate enriched diet in kelp grouper *Epinephelus bruneus* against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 543–549.
- Hart, S., Wrathmell, A.B., Harris, J.E., Grayson, T.H., 1988. Gut immunology in fish: A review. *Developmental and Comparative Immunology* 12, 453–480.
- Havenaar, R., Huis int'Veld, J., 1992. Probiotics: a general view., in: Wood, B. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Chapman & Hall, New York, pp. 209–224.
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A.A., Behgar, M., 2012. Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* In press.
- Heine, H., Lien, E., 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International Archives of Allergy and Immunology* 130, 180–192.
- Hennessey, E.S., Drummond, D.R., Sparrow, J.C., 1993. Molecular genetics of actin function. *The Biochemical Journal* 291, 657–671.
- Hernández, P., 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture, in: FAO (Ed.), *FAO Fisheries Technical Paper N° 469*. Rome, pp. 1–97.
- Hong, H.A., Huang, J.-M., Khaneja, R., Hiep, L.V., Urdaci, M.C., Cutting, S.M., 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology* 105, 510–520.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22, 283–307.
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K.F., Rossen, L., Nielsen, T., Gram, L., 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 96, 117–132.

- Huber, J.D., Witt, K.A., Hom, S., Egleton, R.D., Mark, K.S., Davis, T.P., 2001. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 280, H1241–1248.
- Ibrahem, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 29, 241–246.
- Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Peter, S.M.P., Babu, M.M., Palavesam, A., 2009. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 74, 1462–1475.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25, 633–642.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S., 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 444S–450S.
- Jagadeeswaran, P., Sheehan, J.P., Craig, F.E., Troyer, D., 1999. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British Journal of Haematology* 107, 731–738.
- Jault, C., Pichon, L., Chluba, J., 2004. Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular Immunology* 40, 759–771.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D.P., 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1–15.
- Joshi, M., Hyams, J., Treem, W., Ricci, A., 1991. Cytoplasmic vacuolization of enterocytes: an unusual histopathologic finding in juvenile nutritional megaloblastic anemia. *Modern Pathology* 4, 62–65.
- Kaattari, S., Piganelli, J., 1996. The specific immune system: humoral defense., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, pp. 207–254.
- Kageyama, T., Tomoda, T., Nakano, Y., 1984. The effect of Bifidobacterium administration in patients with leukemia. *Bifidobacteria and Microflora* 3, 39–33.
- Kalmar, J.R., Van Dyke, T.E., 1994. Effect of bacterial products on neutrophil chemotaxis. *Methods in Enzymology* 236, 58–87.
- Kamilya, D., Maiti, T.K., Joardar, S.N., Mal, B.C., 2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of Fish Diseases* 29, 331–337.
- Karalazos, V., Bendiksen, E.Å., Dick, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2011. Influence of the dietary protein:lipid ratio and fish oil substitution on fatty acid composition and metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared at high water temperatures. *The British Journal of Nutrition* 105, 1012–1025.
- Kelly, G., 2009. Inulin-type prebiotics: a review (Part 2). *Alternative Medicine Review* 14, 36–55.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M., Gibson, L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1–14.
- Kim, D.-H., Austin, B., 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114, 297–304.

- Kimura, Y., Shiozaki, H., Hirao, M., Maeno, Y., Doki, Y., Inoue, M., Monden, T., Ando-Akatsuka, Y., Furuse, M., Tsukita, S., Monden, M., 1997. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *The American Journal of Pathology* 151, 45–54.
- Kirchhoff, N.T., D'Antignana, T., Leef, M.J., Hayward, C.J., Wilkinson, R.J., Nowak, B.F., 2011. Effects of immunostimulants on ranched southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*: immune response, health and performance. *Journal of Fish Biology* 79, 331–355.
- Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173, 111–133.
- Kleessen, B., Hartmann, L., Blaut, M., 2003. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *The British Journal of Nutrition* 89, 597–606.
- Koenen, T.B., Stienstra, R., van Tits, L.J., Joosten, L.A.B., van Velzen, J.F., Hijmans, A., Pol, J.A., van der Vliet, J.A., Netea, M.G., Tack, C.J., Stalenoef, A.F.H., de Graaf, J., 2011. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology* 152, 3769–3778.
- Kristiansen, M., Merrifield, D.L., Vecino, J.L.G., Myklebust, R., Ringø, E., 2011. Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Aquaculture Research and Development* S1:009.
- Kudrenko, B., Snape, N., Barnes, A.C., 2009. Linear and branched beta(1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: implications for dietary immunostimulation. *Fish and Shellfish Immunology* 26, 443–450.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Prasad, K.P., Pal, A.K., 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research* 37, 1215–1221.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Nayak, S.K., 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish and Shellfish Immunology* 24, 168–172.
- Kumar, V., Akinleye, A.O., Makkar, H.P.S., Angulo-Escalante, M.A., Becker, K., 2011. Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 37-46.
- Landolt, M., 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* 79, 193–206.
- Lange, S., Gudmundsdottir, B.K., Magnadottir, B., 2001. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 11, 523–535.
- Lauzon, H.L., Gudmundsdottir, S., Pedersen, M.H., Budde, B.B., Gudmundsdottir, B.K., 2008. Isolation of putative probiotics from cod rearing environment. *Veterinary microbiology* 132, 328-39.
- Lauzon, H.L., Gudmundsdottir, S., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., Petursdottir, S.K., Reynisson, E., Bjornsdottir, R., Gudmundsdottir, B.K., 2010. Effects of bacterial treatment at early stages of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on larval survival and development. *Journal of Applied Microbiology* 108, 624–632.

- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper. FAO Fisheries Technical Paper, N° 361.
- Lech, G.P., Reigh, R.C., 2012. Plant products affect growth and digestive efficiency of cultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed compounded diets. PLoS one 7, e34981.
- Lefrançois, L., Olson, S., 1997. Reconstitution of the extrathymic intestinal T cell compartment in the absence of irradiation. Journal of Immunology 159, 538–541.
- Leiro, J.M., Castro, R., Arranz, J.A., Lamas, J., 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. International Immunopharmacology 7, 879–888.
- Li, P., Gatliniii, D., 2006. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications. Aquaculture 251, 141–152.
- Li, X., Qiang, L., Xu, C., 2008. Effects of supplementation of fructooligosaccharide and/or *Bacillus subtilis* to diets on performance and on intestinal microflora in broilers. Archives of Animal Breeding 51, 64–70.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science 147, 747–748.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L., 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Fish and Shellfish Immunology 31, 788–794.
- Liu, Y., Yu, S., Chai, Y., Zhu, Q., 2012. Transferrin gene expression in response to LPS challenge and heavy metal exposure in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). Fish and Shellfish Immunology 32, 223–229.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P., 2009. Brock. Biología de los microorganismos., 12th ed. Pearson Addison-Wesley, Madrid.
- Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M., Hirayama, K., 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia 358, 285–290.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology 20, 137–151.
- Magnadóttir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. Marine Biotechnology 12, 361–379.
- Mahdhi, A., Kamoun, F., Bakhrouf, A., 2011. Inhibitory activity and adhesive ability of potential probiotic *Bacillus* species to confer protection for Artemia gnotobiotic culture against pathogenic *Vibrio* spp. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 35, 227–223.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). Aquaculture International 14, 219–229.
- Maier, V.H., Dorn, K.V., Gudmundsdottir, B.K., Gudmundsson, G.H., 2008. Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. Molecular Immunology 45, 3723–3730.
- Makridis, P., Costa, R.A., Dinis, M.T., 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia* metanauplii. Aquaculture 255, 76–81.

- Makridis, P., Moreira, C., Alves Costa, R., Rodrigues, P., Dinis, M.T., 2009. Use of microalgae bioencapsulated in *Artemia* during the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 292, 153-157.
- Male, D., Roitt, I., 2001. Introduction to the immune system, in: Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (Eds.), *Immunology*. Mosby, London, pp. 1-12.
- Mancini, A.D., Di Battista, J.A., 2011. The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammotaxis. *Inflammation Research* 60, 1083-1092.
- Manning, M., 1998. Immune defences systems., in: Black, K., Pickering, A. (Eds.), *Biology of Farmed Fish*. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 180-221.
- Manning, M., Nakanishi, T., 1996. The specific immune system: cellular defences., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Ed.), *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, pp. 159-205.
- Manning, T.S., Gibson, G.R., 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Prebiotics. Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology* 18, 287-298.
- Marel, M. van der, Adamek, M., Gonzalez, S.F., Frost, P., Rombout, J.H.W.M., Wiegertjes, G.F., Savelkoul, H.F.J., Steinhagen, D., 2012. Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish and Shellfish Immunology* 32, 494-501.
- Martín Sanz, P., Hortelano, S., Bosca, L., Casado, M., 2006. Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 11, 2876-2888.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques* 24, 238-239.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W., 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10, 1571-1581.
- Mazmanian, S.K., Round, J.L., Kasper, D.L., 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453, 620-625.
- McLean, E., Meden, A.C., Donaldson, E.M., 1990. Direct and indirect evidence for polypeptide absorption by the teleost gastrointestinal tract. *Journal of Fish Biology* 36, 489-498.
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Jafarpour, A., 2012. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 474-481.
- Mehrim, A., 2009. Effect of dietary supplementation of Biogen® (Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 4, 261-273.
- Meijer, A.H., Gabby Krens, S., Medina Rodriguez, I.A., He, S., Bitter, W., Ewa Snaar-Jagalska, B., Spaik, H.P., 2004. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular Immunology* 40, 773-783.

- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., Bruwer, M., 2009. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 296, G1140–G1149.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bøggwald, J., Castex, M., Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302, 1–18.
- Merrifield, D.L., Harper, G.M., Dimitroglou, A., Ringø, E., Davies, S.J., 2010. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research* 41, 1268–1272.
- Merrifield, D.L., Harper, G.M., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchietti, S., Davies, S.J., 2011. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research* 344, 135–146.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Agulleiro, B., 1991. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology* 54, 299–309.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Mulero, V., 1996. Nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanisms. *The Anatomical Record* 244, 499–505.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Muñoz, J., López-Ruiz, A., 1993. Ultrastructure of the peritoneal exudate cells of seawater teleosts, seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell and Tissue Research* 273, 301–307.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Rodríguez, A., 2002. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy Research and Technique* 57, 491–497.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A., Esteban, M.A., 1994. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry* 102, 37–44.
- Mishra, S., Mohanty, S., Pattnaik, P., Ayyappan, S., 2001. Probiotics: possible application in aquaculture. *Fishing Chimes* 21, 31–37.
- Mitchell, R.N., Cotran, R.S., 1999. Acute and chronic inflammation, in: Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S. (Eds.), *Basic Pathology*. Saunders, W. B., Philadelphia, pp. 36–38.
- Miyazaki, T., 1998. A simple method to evaluate respiratory activity of blood phagocytes from Japanese flounder. *Fish Pathology* 33, 141–142.
- Molnár, A.K., Podmaniczky, B., Kürti, P., Tenk, I., Glávits, R., Virág, G., Szabó, Z., 2011. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *British Poultry Science* 52, 658–665.
- Moriarty, D.J.W., 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151, 333–349.
- Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358.

- Morris, H.J., Carrillo, O., Almarales, A., Bermúdez, R.C., Lebeque, Y., Fontaine, R., Llauradó, G., Beltrán, Y., 2007. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 456–460.
- Morrison, R.N., Nowak, B.F., 2002. The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11, 46–54.
- Mowry, R.W., 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8x and their combinations with the periodic acid-Schiff rea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 106, 402–423.
- Van Muiswinkel, W.B., 2008. A history of fish immunology and vaccination I. The early days. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 397–408.
- Mulder, I.E., Wadsworth, S., Secombes, C.J., 2007. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 747–759.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Naughton, V., McSorley, E., Naughton, P.J., 2011. Changes in calcium status in aged rats fed *Lactobacillus* GG and *Bifidobacterium lactis* and oligofructose-enriched inulin. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 36, 161–165.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 2–14.
- Nayak, S.K., Swain, P., Mukherjee, S.C., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish and Shellfish Immunology* 23, 892–896.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. Bacillus subtilis AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 103, 1699–1706.
- Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 15, 300–310.
- Nikoskelainen, S., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology* 15, 443–452.
- Nonaka, M., Smith, S.L., 2000. Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 215–228.
- Nonnotte, L., Nonnotte, G., Leray, C., 1986. Morphological changes in the middle intestine of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, induced by a hyperosmotic environment. *Cell and Tissue Research* 243, 619–628.
- Nova, E., Viadel, B., Wärnberg, J., Carreres, J.E., Marcos, A., 2011. Beneficial effects of a synbiotic supplement on self-perceived gastrointestinal well-being and immunoinflammatory status of healthy adults. *Journal of medicinal food* 14, 79–85.

- Nya, E.J., Austin, B., 2010. Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 108, 686–694.
- Obi, S.K., 1980. Lecithinase and toxin production in *Bacillus* species. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale. A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* 246, 415–422.
- Oku, T., Tokunaga, T., Hosoya, N., 1984. Nondigestibility of a new sweetener, "Neosugar," in the rat. *The Journal of Nutrition* 114, 1574–1581.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35, 83–108.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M., Ringø, E., 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* 32, 931–934.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringø, E., Mayhew, T., 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 207–216.
- Ong, S.T., Ho, J.Z.S., Ho, B., Ding, J.L., 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 211, 295–314.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2000. High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 10, 293–307.
- Ortuño, J., Esteban, M.Á., Mulero, V., Meseguer, J., 1998. Methods for studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.), in: Barnes, A.C., Davidson, G.A., Hiney, M., McInthos, D. (Eds.), *Methodology in Fish Diseases Research*. Albion Press, Aberdeen, pp. 97–100.
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P.G., Hughes, H., Gardiner, G.E., 2010. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs* 8, 2038–2064.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379–388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., Aoki, T., 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 372–382.
- Parker, R., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health* 29, 4–8.
- Du Pasquier, L., 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 129, 1–15.
- Du Pasquier, L., 2004. Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *Comptes Rendus Biologies* 327, 591–601.
- Passantino, L., Cianciotta, A., Patruno, R., Ribaud, M.R., Jirillo, E., Passantino, G.F., 2005. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 27, 345–356.

- Patterson, B.K., Ehrenpreis, E.D., Yokoo, H., 1993. Focal enterocyte vacuolization. A new microscopic finding in the acquired immune deficiency wasting syndrome. *American Journal of Clinical Pathology* 99, 24–27.
- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J., 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86, 101–113.
- Phillips, H.J., 1973. Dye exclusion test for cell viability., in: Kruse, P., Patterson, M. (Eds.), *Tissue Culture: Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 406–408.
- Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R., Buonocore, F., Scapigliati, G., Abelli, L., 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish and Shellfish Immunology* 26, 368–376.
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N., Maita, M., 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in Veterinary Science* 91, 92–97.
- Planas, M., Pérez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Uglens Fiksdal, I., Bergh, Ø., Pintado, J., 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255, 323–333.
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 7159–7170.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 450–455.
- Pochart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., Rambaud, J., 1992. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 78–80.
- Press, C.M.L., Evensen, Ø., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 309–318.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 25–39.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 196–201.
- Quigley, E.M.M., 2011. Therapies aimed at the gut microbiota and inflammation: antibiotics, prebiotics, probiotics, synbiotics, anti-inflammatory therapies. *Gastroenterology Clinics of North America* 40, 207–222.
- Rairakhwada, D., Pal, A.K., Bhatena, Z.P., Sahu, N.P., Jha, A., Mukherjee, S.C., 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 477–486.

- Rajan, P.R., Lin, J.H.-Y., Ho, M.-S., Yang, H.-L., 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. piscicida by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1375–1380.
- Rajanbabu, V., Chen, J.-Y., 2011. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* 32, 415–420.
- Ramsay, R.G., Ciznadija, D., Vanevski, M., Mantamadiotis, T., 2003. Transcriptional regulation of cyclooxygenase expression: three pillars of control. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 16, 59–67.
- Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Ley, R.E., Gordon, J.I., 2006. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127, 423–433.
- Raz, E., 2010. Mucosal immunity: aliment and ailments. *Mucosal Immunology* 3, 4–7.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27, 493–497.
- Refstie, S., Bakke-McKellep, A.M., Penn, M.H., Sundby, A., Shearer, K.D., Krogdahl, Å., 2006. Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. *Aquaculture* 261, 392–406.
- Reneshwary, C., Rajalakshmi, M., Marimuthu, K., Xavier, R., 2011. Dietary administration of *Bacillus thuringiensis* on the cellular innate immune response of African catfish (*Clarias gariepinus*) against *Aeromonas hydrophila*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15, 53–60.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17, 208–212.
- Reza, A., Abdolmajid, H., Abbas, M., Abdolmohammad, A.K., 2009. Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 771–779.
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J.L., Wadsworth, S., 2011. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: A review. *Journal of Marine Science: Research and Development* 02, 1–22.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T., Olsen, R., 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268, 251–264.
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.Ø., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.-I., Bakke, A.M., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16, 117–136.
- Ringø, E., Salinas, I., Olsen, R.E., Nyhaug, A., Myklebust, R., Mayhew, T.M., 2007. Histological changes in intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell and Tissue Research* 328, 109–116.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Olsen, R.E., 2006. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research* 37, 891–897.
- Roberfroid, M.B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *The British Journal of Nutrition* 93 Suppl 1, S13–25.

- Robertson, A.M., Wright, D.P., 1997. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Canadian Journal of Gastroenterology* 11, 361–366.
- Rocha, J.M.S., García, J.E.C., Henriques, M.H.F., 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* 20, 237–242.
- Rodriguez-Estrada, U., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Sweetman, J., 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Science* 57, 609–617.
- Rodríguez, A., Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96, 183–192.
- Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 272, 415–423.
- Romalde, J.L., 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* 5, 3–9.
- Rombout, J.H.W.M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., Kiron, V., 2011. Teleost intestinal immunology. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 616–626.
- Rombout, J.H.W.M., Bot, H.E., Taverne-Thiele, J.J., 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. II. Characterization of mucosal leucocytes. *Journal of Fish Biology* 35, 167–178.
- Rombout, J.H.W.M., Lamers, C.H., Helfrich, M.H., Dekker, A., Taverne-Thiele, J.J., 1985. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell and Tissue Research* 239, 519–530.
- Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, A.J., Villena, M.I., 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunocytochemical analysis. *Developmental and Comparative Immunology* 17, 55–66.
- Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 51, 422–430.
- Rurangwa, E., Delaedt, Y., Geraylou, Z., Van De Wiele, T., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Ollevier, F., 2008. Dietary effect of arabinoxylan oligosaccharides on zootechnical performance and hindgut microbial fermentation in Siberian Sturgeon and African Catfish., in: *Aquaculture Europe*, September 15–18. Krakow, Poland, pp. 569–570.
- Russell, S., Lumsden, J.S., 2005. Function and heterogeneity of fish lectins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108, 111–120.
- Sahoo, P.K., 2007. Role of immunostimulants in disease resistance of fish. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2, 18.
- Sahu, M.K., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L., 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology* 48, 299–308.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulant. *Aquaculture* 172, 63–92.

- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25, 114–123.
- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 67–77.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrilón, M., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A., 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111, 279–286.
- Salinas, I., Myklebust, R., Esteban, M.A., Olsen, R.E., Meseguer, J., Ringø, E., 2008. *In vitro* studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Veterinary Microbiology* 128, 167–77.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 347–358.
- Salzman, N.H., Ghosh, D., Huttner, K.M., Paterson, Y., Bevins, C.L., 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 422, 522–526.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E., Simpson, A.J., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17, 914–921.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39, 223–239.
- Savan, R., Aman, A., Sato, K., Yamaguchi, R., Sakai, M., 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *European Journal of Immunology* 35, 3320–3331.
- Schultz, U., Kaspers, B., Staeheli, P., 2004. The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 499–508.
- Secombes, C.J., 1996. The innate immune system: cellular defences., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, pp. 63–103.
- Secombes, C.J., Fletcher, T., 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 53–71.
- Seifert, S., Watzl, B., 2007. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition* 137, 2563S–2567S.
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* 27, 440–445.
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 212–216.

- Silva, D.G., Cooper, P.D., Petrovsky, N., 2004. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunology and Cell Biology* 82, 611–616.
- Silva, I.T., Mello, A.P.Q., Damasceno, N.R.T., 2011. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂): a review. *Lipids in Health and Disease* 10, 170.
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426.
- Sippola, M., Mäntsälä, P., 1981. Coproduction of several exoenzymes in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 10, 303–306.
- Smith, V.J., Fernandes, J.M., Jones, S.J., Kemp, G.D., Tatner, M.F., 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 243–260.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Pipper, C.B., Martinussen, T., Slierendrecht, W.J., Gram, L., 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3, 755–765.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96.
- Stafford, J.L., Belosevic, M., 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 539–554.
- Steinum, T., Sjøstad, K., Falk, K., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J., 2009. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture* 293, 172–179.
- Strandskog, G., Skjæveland, I., Ellingsen, T., Jørgensen, J.B., 2008. Double-stranded RNA- and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison and synergies. *Vaccine* 26, 4704–4715.
- Subasinghe, R.P., 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 117–124.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 148, 256–263.
- Subramanian, S., Ross, N.W., MacKinnon, S.L., 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 150, 85–92.
- Sullivan, C., Kim, C.H., 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 341–350.
- Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H., 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 136, 723–730.
- Swain, P., Nayak, S.K., Nanda, P.K., Dash, S., 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 191–201.

- Sáenz de Rodrigáñez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Arijó, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition* 15, 177–185.
- Tadiparthi, R.A., Bansal, A., Wani, S., Mathur, S., Hall, S.B., Rastogi, A., Higbee, A., Gaddam, S., Sharma, P., 2011. Dilated intercellular spaces and lymphocytes on biopsy relate to symptoms in erosive GERD but not NERD. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 33, 1202–1208.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16, 3–9.
- Tako, E., Glahn, R.P., Welch, R.M., Lei, X., Yasuda, K., Miller, D.D., 2008. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *The British Journal of Nutrition* 99, 472–280.
- Talas, Z.S., Gulhan, M.F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1994–1998.
- Tamura, Z., 1983. Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 2, 3–16.
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., de la Banda, I.G., Lobo, C., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology* 60, 310–319.
- Tassakka, A.C.M.A.R., Sakai, M., 2005. Current research on the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides in fish. *Aquaculture* 246, 25–36.
- Taverniti, V., Guglielmetti, S., 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition* 6, 261–274.
- Temkin, R.J., McMillan, D.B., 1986. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Morphology* 190, 9–26.
- Tewary, A., Patra, B.C., 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 251–259.
- Timmerman, H.M., Mulder, L., Everts, H., van Espen, D.C., van der Wal, E., Klaassen, G., Rouwers, S.M.G., Hartemink, R., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science* 88, 2154–2165.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 969–981.
- Tort, L., Balasch, J., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22, 277–286.
- Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Brück, W.M., Gibson, G.R., 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics--assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design* 11, 75–90.
- Urán, P.A., Gonçalves, A.A., Taverne-Thiele, J.J., Schrama, J.W., Verreth, J., Rombout, J.H.W.M., 2008. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 25, 751–760.

- Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 401–417.
- Vallejo, A.N., Miller, N.W., Clem, L.W., 1992. Cellular pathway(s) of antigen processing in fish APC: effect of varying *in vitro* temperatures on antigen catabolism. *Developmental and Comparative Immunology* 16, 367–381.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655–671.
- de Vrese, M., Schrezenmeir, J., 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111, 1–66.
- Vulevic, J., Rastall, R.A., Gibson, G.R., 2004. Developing a quantitative approach for determining the *in vitro* prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters* 236, 153–159.
- Vázquez, M.J., Alonso, J.L., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology* 11, 387–393.
- Wang, W.S., Wang, D.H., 1997. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 20, 261–270.
- Wang, X.H., Leung, K.Y., 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology* 146, 989–998.
- Wang, Y., Tian, Z., Yao, J., Li, W., 2008. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 277, 203–207.
- Wang, Y., Zeng, T., Wang, S.-e, Wang, W., Wang, Q., Yu, H.-X., 2010. Fructo-oligosaccharides enhance the mineral absorption and counteract the adverse effects of phytic acid in mice. *Nutrition* 26, 305–311.
- Watzl, B., Girrbach, S., Roller, M., 2007. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *British Journal of Nutrition* 93, 49–55.
- Whyte, S.K., 2007. The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 1127–1151.
- Williams, B.A., Verstegen, M.W., Tamminga, S., 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews* 14, 207–228.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N., 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 286–293.
- Xu, B., Wang, Y., Li, J., Lin, Q., 2009. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 351–317.
- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1463–1468.
- Yano, T., 1996. The nonspecific immune system: humoral defence., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, pp. 105–157.

- Ye, J.-D., Wang, K., Li, F.-D., Sun, Y.-Z., 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder <i>Aquaculture Nutrition 17, 902–911.</i>
- Yin, G., Ardó, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology 26, 140–145.*
- Yuan, C., Pan, X., Gong, Y., Xia, A., Wu, G., Tang, J., Han, X., 2008. Effects of *Astragalus* polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology 8, 51–58.*
- Yuan, J.-P., Peng, J., Yin, K., Wang, J.-H., 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition and Food Research 55, 150–165.*
- Zapata, A.G., Chiba, A., Varas, A., 1996. Cells and tissues of the immune system of fish., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, pp. 142–147.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology 11, 827–235.*
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Oriol Sunyer, J., 2011. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish and Shellfish Immunology 31, 627–623.*
- Zhang, Z., Swain, T., Bøggwald, J., Dalmo, R.A., Kumari, J., 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish and Shellfish Immunology 26, 677–684.*
- Zhu, H., Liu, H., Yan, J., Wang, R., Liu, L., 2012. Effect of yeast polysaccharide on some hematologic parameter and gut morphology in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Physiology and Biochemistry* In press.

FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los proyectos AGL2005-07454-C02-01/ACU (Plan Nacional I+D+I, Ministerio de Educación y Ciencia), AGL2008-05119-C02-01 (Plan Nacional I+D+I, Ministerio de Ciencia e Innovación) y GERM 04538/06 (Fundación Séneca).

R. Cerezuela, miembro del Grupo de Investigación Sistema Inmunitario Innato de Teleósteos (Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología) y del Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", ha disfrutado una beca FPI del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2006-12201) durante los años 2006-2010, y un contrato con cargo al proyecto "Mejora de parámetros de gestión en el cultivo de la dorada" durante los años 2010-2012.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

1. Palermo, Italia

Responsable: Nicolò Parrinello

Organismo: Universidad de Palermo, Laboratorio de Inmunobiología Marina, Departamento de Biología Animal.

Periodo: 08/01/2008-08/04/2008

Tema de trabajo: Purificación de la lectina que une manosa del suero de dorada, siguiendo la metodología del laboratorio receptor. Estudiar diferentes aspectos funcionales de la fucolectina relacionados con el sistema inmunitario.

2. La Paz, Baja California Sur, México

Responsable: Felipe de Jesús Ascencio Valle

Organismo: CONACYT, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Laboratorio de Acuicultura.

Periodo: 01/06/2009-08/09/2009

Tema de trabajo: Efecto de la inulina, sola o combinada con dos levaduras, sobre el sistema inmunitario de la cabrilla sardinera, especie de importancia económica en el lugar de destino.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- Cerezuela, R.**, Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology* 24, 663–668.
- Cerezuela, R.**, Guardiola, F.A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae affect immune system. *Fish Physiology and Biochemistry*. Doi: 10.1007/s10695-012-9670-9
- Cerezuela, R.**, Guardiola, F.A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish and Shellfish Immunology* 32, 1032–1040.
- Cerezuela, R.**, Guardiola, F.A., González, P., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Effects of dietary *B. subtilis*, *T. chuii*, and *Pha. tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. Doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.004
- Cerezuela, R.**, Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A., 2012. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *The British Journal of Nutrition*. Enviado el 16.04.2012.
- Cerezuela, R.**, Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A., 2012. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*. Enviado el 23.05.2012.
- Cerezuela, R.**, Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Effects of dietary inulin, *B. subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). En preparación.

OTRAS PUBLICACIONES

- Cuesta, A., **Cerezuela, R.**, Esteban, M.A., Meseguer, J., 2008. *In vivo* actions of melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. *Journal of Pineal Research* 45, 70–78. Doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00557.x
- Cerezuela, R.**, Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 26, 243–248. 10.1016/j.fsi.2008.11.004
- Guardiola, F.A., **Cerezuela, R.**, Meseguer, J., Esteban, M.A., 2011. Effects of 2-deoxy-D-glucose on the immune system of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 30, 592–529.

Cerezuela, R., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A review. *Journal of Aquaculture Research and Development* S1: 008. Open Access.

Guardiola, F.A., **Cerezuela, R.**, Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline. *Aquaculture* 334-337, 51–57.

Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Effects of dietary inulin and heat-inactivated *Bacillus subtilis* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Beneficial Microbes* 3, 77–81.

TRANSFERENCIA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido transferidos a la empresa Culmarex, S.A. Águilas.

AGRADECIMIENTOS

"Cuando bebas agua, recuerda la fuente". Proverbio chino.

El camino ha sido largo y muchas han sido las fuentes de las que he bebido en este tiempo, personas que me han dado la oportunidad de llegar hasta aquí, que me han ayudado y guiado, que me han escuchado aunque no entendiera de qué hablaba, que me han animado cuando todo parecía complicarse. A todas ellas, les dedico esta breve nota que espera ser algo más que un mero formalismo.

- » Al profesor José Meseguer, por aceptarme en su Grupo de Investigación y la gran oportunidad de realizar este trabajo.
- » A Marian, por aquella invitación que fue el comienzo de mi etapa investigadora, por el voto de confianza a pesar de las dificultades y por su apoyo incondicional.
- » A Miguel Ángel Moriñigo, por recibirme y acogerme en Málaga, por sus consejos y su inestimable ayuda, y a las compañeras de laboratorio, Bea, Silvana y Milena.
- » A mis compañeros, Alberto, Pilar, y Fran especialmente, por vuestra amistad, por tenderme la mano en todo momento, por las comidas y las risas.
- » A los miembros del Servicio de Microscopía, Cultivo de Tejidos, Análisis de Imagen y Biología Molecular, especialmente a Juana (aquí tienes a tu Becky Thatcher, a tu Rebeca de Winter, gracias por darme ánimos y comprenderme), y a Fara (cartagenera morena, sin ti todo habría sido mucho más difícil y menos entretenido).
- » A las empresas CULMAREX S.A. (Águilas, Murcia) y PREDOMAR S.L. (Carboneras, Almería) por proporcionarnos los ejemplares de estudio.
- » A Javi y a María (sois muy especiales), a Maite (por esas charlas interminables), a mis queridos quincemayistas (Bea, Jacinto, Virginia, Ángel, Loli, Alfredo y muchos más) y a mis amigos por el mundo: Alberto (qué te voy a decir que no sepas ya), Bea (hiciste que Málaga mereciera aún más la pena), Martha, Tania, Ale y Yorsh (cuánto os extraño amigos mexicanos), David, Irene, Adri, Alba y Lidia. A todos, gracias por animarme siempre, aún con distancia, y no dejarme caer.
- » A Jesús, por todo este tiempo de ánimos, apoyo, compañía y tantas cosas. Fue una suerte encontrarte, pero más suerte aún ha sido conservarte. Nos quedan muchos más regalos por abrir.
- » A mis hermanos y hermanas, Ana, Javi, Rocío (al pequeño Alejandro también lo tengo en mente), Victoria, Miguel, Andrea y Gabi, sois lo más grande que tengo, y a mis padres, por enseñarme a ser quien soy.