

Egoitza Nagusia / Sede Central
Txatxarramendi Ugarteza z/g
E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)
Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55



Parque Tecnológico de Bizkaia
Astondo bidea - Edificio 609
E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)
Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaiet - Portu aldea z/g
E-20110 Pasai - Gipuzkoa (Spain)
Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

www.azti.es
info@azti.es

VIVAQUA-Identificación de moléculas que mejoran la supervivencia de peces de Acuicultura

Convenio AZTI/DAPA

Informe Final 2014

para:

Dirección de Innovación y Desarrollo Tecnológico, Viceconsejería de Política e Industria Alimentaria, Dpto. Agricultura, Pesca y Alimentación , Eusko Jaurlaritza - Gobierno Vasco

Derio, 28 Noviembre 2014

Tipo documento Informe Final
Título documento Informe Final 2014
Fecha 28 de Noviembre 2014
Proyecto VIVAQUA-Identificación de moléculas que mejoran la supervivencia de peces de Acuicultura
Código IA12VIVAQ
Cliente Eusko Jaurlaritza - Gobierno Vasco, Dpto. de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, Viceconsejería de Pesca e Industrias Alimentarias
Equipo de proyecto Sandra Rainieri, Miguel Angel Pardo, Monica Martinez, Nagore Egurrola, Nadia Conledo

Responsable proyecto Sandra Rainieri

Revisado por Felix Amarita
Fecha

Aprobado por Felix Amarita
Fecha



ÍNDICE

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	4
2. METODOLOGÍA	6
3. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS	11
4. DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN	17
5. BIBLIOGRAFIA	19
6. CONCLUSIONES	18

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Este informe recoge todas las actividades y resultados realizados dentro del proyecto IA12VIVAQUA desde su inicio en enero 2014 hasta noviembre 2014 y que lleva por título: VIVAQUA-Identificación de moléculas que mejoran la supervivencia de peces de acuicultura. Este proyecto, enmarcado dentro del convenio marco entre AZTI y el DAPA, pretende definir métodos específicos para disminuir el nivel de estrés y de mortalidad en peces de acuicultura e incrementar su reproductividad y su bienestar.

La acuicultura en su sentido más amplio es la actividad que maneja e interviene en los ecosistemas acuáticos para mejorar la producción de las especies acuáticas de interés para el hombre. La acuicultura está alcanzando mundialmente un desarrollo espectacular, constituyendo el sector de más rápido crecimiento dentro de la agricultura, debido en parte a la necesidad de buscar soluciones a la sobre-explotación de los stocks de especies en el medio natural. Este aumento en el consumo de pescado unido a la incapacidad del sector extractivo para cubrirlo, han dado mayor relevancia al sector de la acuicultura a nivel mundial. Sin embargo, el desarrollo del sector de la acuicultura para poder satisfacer las necesidades existentes, lleva consigo, en la mayoría de los casos, la aparición de problemas inherentes al sistema de cría en cautividad de peces. Uno de los mayores problemas es el de las enfermedades ya que son una fuente importante de pérdidas económicas en acuicultura. Dentro de estas enfermedades se encuentran las de origen parasitario, bacteriológico, viral y fúngico. De entre estas patologías las de origen bacteriano juegan un papel importante ya que aunque bien es cierto que en el medio acuático existen relativamente pocas bacterias que puedan ser estrictamente patógenos obligados, sí que hay una gran cantidad de bacterias oportunistas. Estas bacterias oportunistas, en determinadas ocasiones y cuando el pez está sometido a estrés generan grandes

perjuicios a la salud del animal en condiciones de cautividad. Actualmente la forma de controlar la expansión de enfermedades de tipo bacteriano se ha centrado en la vacunación, en el control sanitario mediante antibiogramas periódicos y en un correcto manejo de dicho control con vacíos sanitarios y con el uso de antibióticos. Sin embargo, la política regulatoria de la UE está siendo enfocada a una mayor restricción en el uso de tratamientos terapéuticos con antibióticos, tendiendo a evitar el uso masivo de estos compuestos mediante medidas de prevención. De hecho, la tendencia actual es la de minimizar este estrés generado por el hacinamiento, la alta concentración de contaminantes químicos, la presencia de patógenos oportunistas y las condiciones ambientales [1], mediante dietas funcionales con capacidad inmunoestimuladora [2, 3], antioxidante, etc; mejorando su bienestar animal y por lo tanto su resistencia a enfermedades oportunistas y que al final repercute disminuyendo las pérdidas de alevines y adultos en el sector.

Tradicionalmente, la experimentación para testar nuevas dietas funcionales y mejorar del bienestar animal en acuicultura se han llevado a cabo directamente sobre las especies de peces objeto de la explotación intensiva, como rodaballo, truchas, etc. Sin embargo, durante los últimos años, el uso del pez cebra (*Danio rerio*) como un modelo de experimentación en acuicultura ha cobrado gran relevancia [4]. Entre otras ventajas, el uso de este modelo animal nos permite trabajar en unas instalaciones reducidas lo que facilita enormemente su manejo y el número de animales que se pueden utilizar en cada experimento. Además, durante los primeros días 5-6 días de desarrollo es considerado como modelo *in vivo* y alternativo a la experimentación animal lo que es una gran ventaja [5]. Finalmente, su enorme potencial y desarrollo en investigación humana ha proporcionado una enorme cantidad de herramientas moleculares que pueden ser implementadas fácilmente al ámbito de la investigación en acuicultura.

En este proyecto se ha utilizado el pez cebra como modelo animal para el desarrollo de métodos para disminuir el nivel de estrés y de mortalidad en peces de acuicultura e incrementar su reproductividad y su bienestar.

Los objetivos generales de este proyecto son los siguientes:

- 1) Reducción del nivel de estrés y de mortalidad en peces de acuicultura

- 2) Incremento del bienestar y la reproductividad de los peces de acuicultura
- 3) Identificación de moléculas y extractos naturales con efecto antioxidante, antinflamatorio e inmunomodulador en peces
- 4) Definición de métodos para evaluar el nivel de bienestar de los peces

Los objetivos específicos para el 2014 han sido los siguientes:

- 1) Definición de un test para la evaluación del daño generado por exposición a las ROS y su posible aplicación para testar el efecto antioxidante de moléculas funcionales en larvas de pez cebra.
- 2) Optimización y estandarización de métodos y condiciones para testar efectos anti-inflamatorio.
- 3) Evaluación del efecto antioxidante, inmunomodulador y antinflamatorio de extractos naturales.
- 4) Evaluación del efecto protector de microrganismos seleccionados frente a infecciones por patógenos.
- 5) Protección industrial del sistema para la evaluación del nivel de estrés en peces.

METODOLOGÍA

A lo largo de esta anualidad se han realizado las siguientes actividades:

1) Puesta a punto de una metodología para identificar efectos antioxidantes

- 1.1** Evaluación del daño oxidativo. Se ha llevado a cabo la evaluación del daño oxidativo generado por el estrés oxidativo a través de la determinación de la muerte celular programada o Apoptosis y la Peroxidación Lipídica.

1.2.1. Apoptosis. Con este ensayo se pretender evaluar el papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la muerte celular programada. El método seleccionado para determinar la cantidad de muerte celular debida a la apoptosis es el Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). El ensayo TUNEL utiliza un dUTP marcado con fluoresceina (FL-dUTP), que se une y marca los extremos rotos de la doble hélice de DNA mostrando así las células que han sufrido una muerte celular programada.

1.2.2. Peroxidación lipídica. Con éste ensayo se pretende evaluar la integridad de la membrana mitocondrial y celular tras la exposición al pro-oxidante *t*-BHP (*tert*-butil hidroperóxido) y poder así evaluar de una forma más precisa el daño oxidativo.

Para llevar a cabo este ensayo se han utilizado el método TBARS, en el que tiene lugar una reacción ácida a una temperatura de 100°C donde se generan Especies Reactivas del ácido tiobarbitúrico que serán medidas mediante técnicas espectrofotométricas. El resultado final será expresado como concentración de Malondialdehído [MDA] por cantidad de proteína.

2) Evaluación de la capacidad antioxidante de la N-Acetilcisteína (NAC) y anti-inflamatoria de la Vitamina C y E (Trolox)

- 2.1. **Capacidad antioxidante.** Para la evaluación de la capacidad antioxidante se empleó la metodología descrita en el punto 1. Se realizó un ensayo donde se empleó el *t*-BHP como oxidante de referencia y otro que fue posteriormente tratado con NAC.
- 2.2. **Capacidad anti-inflamatoria.** Para la evaluación del efecto anti-inflamatorio, larvas de 3 dpf fueron sometidas a una inflamación enterocolítica química en presencia de DSS (sulfato de dextrano sódico) al 0.8% (p/v) y la sustancia a evaluar a una concentración de 50 µg/mL. La mortalidad acumulada se cuantificó durante 3 dpt (días post tratamiento). Todas las soluciones fueron renovadas diariamente.

3) Efecto protector de microrganismos frente a infecciones.

En este caso primero se obtuvieron larvas gnotobióticas y con esa se llevó a cabo el ensayo para evaluar la protección frente a infecciones.

3.1. Obtención de las larvas de pez cebra gnotobióticas Embriones del pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822) se obtuvieron en las instalaciones del Animalario de AZTI (Número de registro REGA ES489010006105) siguiendo las condiciones de mantenimiento estándar a 27 °C en tanques de 60 litros con aireación y manteniendo los ciclos de luz/oscuridad de 12 horas [6]. Los peces fueron alimentados diariamente con un pienso especialmente formulado para mantener el bienestar de los animales (Gemma Micro 300, Skretting). Los embriones fueron esterilizados con diferentes lavados en presencia de un cóctel de antibióticos y lejía, siguiendo las instrucciones descritas en Pham et al [7] y en combinación con un tratamiento final de pulsos de luz. Las condiciones de axenicidad fueron testadas mediante PCR y conteo en placa.

3.2. Efecto protector de *Lactobacillus sakei* frente a una infección con *Vibrio anguillarum*. Veinte larvas de 4 dpf (días post fecundación) y por triplicado fueron infectadas por inmersión durante 18 horas la cepa de *L. sakei* (10^7 UFC; unidades formadoras de colonias) marcada fluorescentemente con el plásmido pPCR12 (RedCherry). La cepa de *L. sakei* fue crecida en medio MRS suplementado con cloranfenicol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 30 °C en presencia de 2% de glucosa (no producción de dextrano) o de 2% de sacarosa (producción de dextrano). Transcurrido el tiempo de infección al probiótico, y como terapia preventiva, las larvas se lavaron con PBS y se infectaron durante toda la noche al patógeno *V. anguillarum* a una concentración de 10^7 UFC. La mortalidad acumulada se evaluó tras 72 h. En paralelo, se cuantificó el número de colonias que han colonizado el tracto digestivo a las 6, 24 y 48 horas en 5 larvas por condición (*L. sakei* crecidas en glucosa o en sacarosa) fueron anestesiadas en tricaina (Sigma Aldrich, St Louis, MO) a 200 mg mL $^{-1}$ y lavadas tres veces en PBS suplementado con Tween20 al 0.1 % (v/v) para eliminar cualquier rastro de bacteria adherido en la piel. Cada larva fue homogeneizada y crecida en placa para evaluar las UFCs adheridas en su sistema digestivo.

4) Desarrollo de un método alternativo para la evaluación del nivel de bienestar de los peces.

Anteriormente en este proyecto se ha desarrollado un sistema para la evaluación del nivel de bienestar de los peces. Este sistema está basado en un grupo de sensores capaces de detectar el movimiento de los peces. Estos sensores no son invasivos y tienen la potencialidad de identificar posibles situaciones de estrés de manera directa. Durante el 2014 el trabajo se ha centrado en seguir adelante con la solicitud de una patente para proteger el sistema y en la colaboración con una empresa que está interesada en comercializar el producto.

PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS

A continuación se detallan los principales avances realizados a lo largo del 2014.

2(B).

1. Evaluación del daño oxidativo por apoptosis y peroxidación lipídica.

Apoptosis. Los resultados obtenidos en los grupos de larvas control y grupos de larvas expuestas a t-BHP (*tert*-butil hidroperóxido) han mostrado un notable incremento de la apoptosis en los grupos expuestos analizados y por tanto una clara relación directa entre el estrés oxidativo y la muerte celular programada.

Peroxidación lipídica. Los resultados obtenidos con el método TBARS para evaluar la peroxidación de lípidos de los diferentes grupos de larvas control y expuestas confirman los resultados obtenidos en los otros ensayos llevados a cabo para evaluar el estrés oxidativo aportando información adicional de interés a la hora de evaluar el daño generado por las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS). En los resultados obtenidos, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos al oxidante frente a los grupos control no expuestos. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo es capaz de incrementar la oxidación de macromoléculas como los lípidos provocando daños a nivel celular.

2. Evaluación de la capacidad antioxidant de la N-Acetilcisteína (NAC) y anti-inflamatoria de la vitamina C y vitamina E (Trolox)

Efecto antioxidant del NAC. Se ha llevado a cabo un ensayo preliminar para testar el efecto protector del NAC frente al estrés oxidativo. La detección de la producción de ROS con sondas fluorescentes no ha dado buenos resultados y se repetirá en un futuro. En cambio, se ha podido detectar la peroxidación lipídica. El efecto de esta molécula supuestamente antioxidant se evaluará más en profundidad en un futuro.

Evaluación de la capacidad anti-inflamatoria de la vitamina C y vitamina E (Trolox)

Tras realizar el ensayo se detectó una significativa capacidad anti-inflamatoria de la Vitamina C (Figura 1).

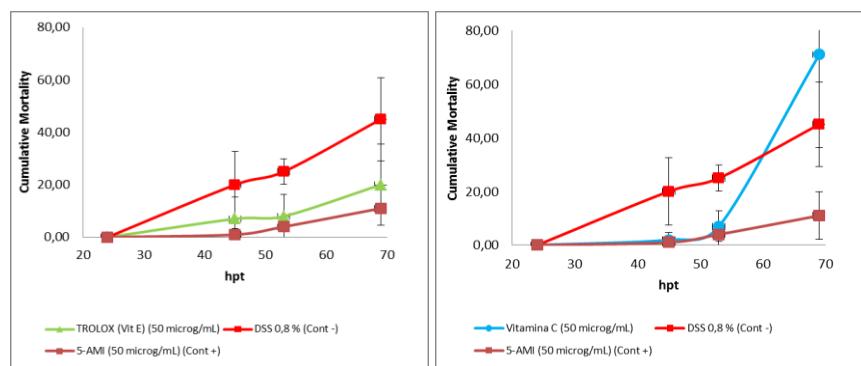


Figura 1. Ensayo para evaluar la capacidad anti-inflamatoria de la Vitamina C y E mediante la cuantificación de la mortalidad acumulada frente a una inflamación química producida por el DSS.

3) Efecto protector de microrganismos frente a infecciones.

Vibrio anguillarum es uno de los patógenos que genera más pérdidas en especies comerciales de acuicultura. De hecho, al tratarse de un patógeno oportunista está demostrado que su incidencia es mayor en aquellos peces inmunodeprimidos debido a diferentes tipos de estrés ambiental. Nuestros resultados previos indican que se trata de un patógeno intracelular que invade las células epiteliales del tracto digestivo utilizando la estrategia denominada “stealth mechanism”. Una forma de minimizar el efecto oportunista de este patógeno es estimular el sistema inmune de los peces mediante dietas suplementadas con prebióticos, probióticos, polisacáridos etc... *Lactobacillus sakei* es un microorganismo con potencial capacidad probiótica y que hemos utilizado para ver su capacidad protectora frente a la infección. Los primeros resultados llevados a cabo en un modelo de larvas de pez cebra gnotobióticas indican una estadísticamente significativa protección frente a la infección con *V. anguillarum* tal y como se detalla en la Figura 2.

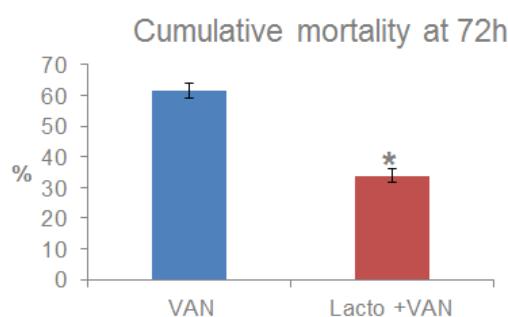


Figura 2. Mortalidad acumulada fe larvas de pez cebra en presencia de *L. sakei* y frente a una infección a *V. anguillarum*

4) Desarrollo de un método alternativo para la evaluación del nivel de bienestar de los peces.

Durante el 2014 se han enviado solicitudes de patente a Europa y Estados Unidos para proteger la invención de un método para la evaluación del bienestar animal. Además, se ha presentado el dispositivo creado a partir de dicha invención en el congreso internacional de Acuicultura *Aquiculture 2014* para averiguar su potencial aplicación en el sector acuicultura. En este foro se ha podido comprobar un grande interés para este dispositivo.

2. DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN

Los resultados del tercer año de proyecto se divulgaron en los siguientes congresos internacionales:

- 1) Rainieri S., García G.A. (2014) *System to detect fish stress and wellbeing with a non-invasive non-video based approach*. Aquaculture Europe 2014, San Sebastian, 14-17 Octubre. Comunicación oral.
- 2) Martinez M., Pardo M.A., Rainieri S. (2014) *Detection of Reactive Oxygen species in vivo using the zebrafish animal model*. Zing Conference on Oxidative Stress, Madrid 3-6 Octubre. Comunicación oral.
- 3) Oyarbide U., Rainieri S., Iturria I., Corey S., Pardo M.A. (2014) *Infection in germ-free zebrafish leads to repression of innate immune response genes*. The 7th Zebrafish Disease Models Conference Madison (USA) 28 Junio - 1 Julio. Comunicación escrita.

Además, se ha publicado el siguiente artículo científico:

Oyarbide, U., Iturria, I., Rainieri, S. and Pardo, M.A. (2015) Use of Gnotobiotic Zebrafish to Study *Vibrio anguillarum* Pathogenicity. Zebrafish: 12(1):71-80.

3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la segunda anualidad del proyecto han permitido obtener:

- Un método para detectar el nivel de daño oxidativo en larvas de pez cebra.

- La aplicación de métodos previamente puesto a punto en este proyecto para la evaluación de los efectos anti-inflamatorio y antioxidante de moléculas funcionales.
- La evaluación del efecto protector de microrganismos con actividad probiótica frente a infecciones en peces.
- La solicitud de una patente europea y de una patente estadounidense que describe un método alternativo para la evaluación del nivel de bienestar de los peces.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Harper, H. and J.C. Wolf, *Morphologic Effects of the Stress Response in Fish*. ILAR, 2009. **50**(4): p. 387-396.
2. Sakai, M., *Current research status of fish immunostimulants*. Aquaculture, 1999. **172**(1-2): p. 63-92.
3. Bricknell, I. and R.A. Dalmo, *The use of immunostimulants in fish larval aquaculture*. 2005. **19**(5): p. 457-472.
4. Dahm, R. and R. Geisler, *Learning from small Fry the zf as a genetic model organism for aquaculture fish species*. Marine Biotechnology, 2006. **8**: p. 329-345.
5. Strahle, U., et al., *Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments-A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations*. Reprod Toxicol, 2011.
6. Nüsslein-Volhard, C. and R. Dahm, *Zebrafish. A practical approach*, ed. 2612002: Oxford University Press. 303.
7. Pham, L.N., et al., *Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish*. Nature Protocols, 2008. **3**(12): p. 1862-1875.

