

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugarte 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 Kaia - Portu aldea z/g

E-20110 Pasaia - 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 2013

para:

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

Derio, 21 de Febrero 2014

Tipo documento Informe Final
Título documento Informe Final 2013
Fecha 21 de Febrero 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, MariJose Sierra

Responsable proyecto Sandra Rainieri

Revisado por Kepa Escuredo

Fecha

Aprobado por Kepa Escuredo

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 2013 hasta diciembre 2013 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 rodaballos, 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, antiinflamatorio e inmunomodulador en peces.

- 4) Definición de métodos para evaluar el nivel de bienestar de los peces.

Los objetivos específicos para el año 2013 han sido los siguientes:

- 1) Desarrollo de una metodología para identificar efectos antioxidantes y anti-inflamatorios de moléculas funcionales en peces utilizando el modelo animal pez cebra
- 2) Screening de moléculas funcionales con efectos anti-inflamatorios y estimulantes del sistema inmune para utilizar como suplemento en la dieta de peces de acuicultura.
- 3) Desarrollo de sistemas alternativos para la evaluación del nivel de bienestar de los peces.

METODOLOGÍA

A lo largo de esta anualidad se han realizado 3 tipos de actividades:

2.1. Puesta a punto metodología para identificar efectos antioxidantes y anti-inflamatorios.

2.1.1. Con el objetivo de evaluar los **efectos de estrés oxidativo** en larvas de pez cebra expuestas a moléculas pro-oxidantes de referencia y otras moléculas inductoras de estrés oxidativo, se han testado sondas fluorescentes y se ha procedido a la evaluar los resultados obtenidos. Para ello se han utilizado dos pro-oxidantes de referencia; el hidropéroxido de tert-butilo (**t-BHP**) y el peróxido de hidrógeno (**H₂O₂**), y ha incluido otro inductor potencial de estrés oxidativo como es el Benzo (k) Fluoranteno (**BkF**). Para la detección y medición de los efectos oxidantes se han empleado dos enfoques:

- a) **Comparación de sondas fluorescentes en la detección cualitativa de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en larvas de pez cebra.** En la puesta a punto de este método de detección cualitativa de ROS se han testado dos sondas, el CMF-DA (Diacetato de 5-clorometilfluoresceína) y el MitoSOX (catión de dihidroetidio (HE) trifenilfosfonio), en larvas de pez cebra de 5 días. CMF-DA permite detectar ROS. El MitoSOX por el contrario

presenta especificidad por una ROS concreta como es el anión Superóxido. Continuando con la puesta a punto del método se han empleado *t*-BHP y H_2O_2 .

- b) **Evaluación del nivel de expresión de otros genes biomarcadores que codifican por enzimas relacionados con el estrés oxidativo.** También en este caso se han testado los efectos de la exposición en larvas de 5 días evaluando distintas concentraciones y tiempos de exposición a *t*-BHP y **B (k)Fluoranteno**. Se han expuesto lotes de 25 larvas por triplicado a diferentes concentraciones de los compuestos anteriormente citados. Tras la exposición se ha extraído el RNA de cada pool de larvas utilizando el método del Trizol. Se ha detectado el nivel de expresión diferencial de dos genes seleccionados por qRT-PCR utilizando la β -actina como gen constitutivo. Los genes testados seleccionados en esta fase han sido los siguientes: *Hmox-1* y *Nrf2*.

2.1.2. Con el objetivo de poder evaluar la **efectividad de sustancias potencialmente anti-inflamatorias** se ha puesto a punto un modelo de enterocolitis química en larvas de pez cebra. Este modelo consiste básicamente en la adición de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfónico) o DSS (sulfato de dextrano sódico) que genera: (i) secreción de mucus ácido en el tracto intestinal y (ii) reclutamiento de macrófagos (utilizando el transgénico mpo-GFP) hacia la región donde se ha producido la inflamación.

La puesta a punto del modelo enterocolítico se ha completado con la optimización de las condiciones de exposición a los productos químicos y un protocolo de tinción de mucus ácido mediante la tinción con azul Alcian según el método de Chen et al., 2009) [6].

2.2. Screening de moléculas funcionales (efectos inmunomodulador; antioxidante y anti-inflamatorio) en larvas de pez cebra *in vivo*.

Durante el 2013 se ha evaluado la capacidad inmunomoduladora del polisacárido comercial Zymosan y de varias muestras de Agar, con diferentes usos comerciales: bacteriológico, biológico, alimentario y farmacológico. Para ello se ha utilizado un protocolo de exposición a larvas de pez cebra durante 5 días y el posterior análisis de expresión génica de una batería de genes relacionados con el sistema inmune innato, tal y como se describe en Oyarbide et al. (2012) [7].

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

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 tipos de sensores no son invasivos y tienen la potencialidad de identificar posibles situaciones de estrés de manera directa. Para llegar al diseño óptimo de dicho sensores se han estudiado las características de diferentes metales tanto a nivel eléctrico como toxicológico.

2. PRINCIPALES AVANCES REALIZADOS-BENEFICIOS GENERADOS

3.1. Puesta a punto metodología para identificar efectos antioxidantes y anti-inflamatorios.

3.1.1. Detección cualitativa de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en larvas de pez cebra. Con el fin de optimizar el método para poder realizar una rápida y correcta evaluación de la presencia y/o ausencia de estrés oxidativo, hemos testado sondas fluorescentes (o fluoróforos). Los experimentos se han llevado a cabo en larvas de pez cebra de 5 dpf. Los resultados obtenidos reflejan un incremento en el % de ROS detectados.

Evaluación del nivel de expresión de otros genes biomarcadores que codifican por enzimas relacionados con el estrés oxidativo.

Para continuar con la puesta a punto de la expresión diferencial de genes biomarcadores, se han seleccionado dos genes (Hmox-1 y Nrf2). El Hmox-1 participa en mecanismos de defensa celular, mientras que el Nrf2 es un importante factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes de enzimas antioxidantes y detoxificantes, por tanto, son considerados genes con “actividad antioxidante”. Los resultados obtenidos tras la exposición de las larvas a *t*-BHP 2mM y Benzo (k) Fluoranteno 1ppb durante 1 hora y 24 horas respectivamente muestran una

activación de dichos genes y por tanto, su capacidad para responder frente a una situación de stress oxidativo.

3.1.2. Método para la evaluación de la efectividad de sustancias potencialmente anti-inflamatorias.

Tras exponer a larvas de 4 dpf a diferentes concentraciones de DSS y TNBS durante 3 días se ha llegado a la conclusión de que al menos un 0.6 % de DSS o un 0.6 µg/mL de TNBS genera la suficiente mortalidad acumulada para poder estudiar el posible efecto beneficioso de sustancias potencialmente anti-inflamatorias (Figura 1).

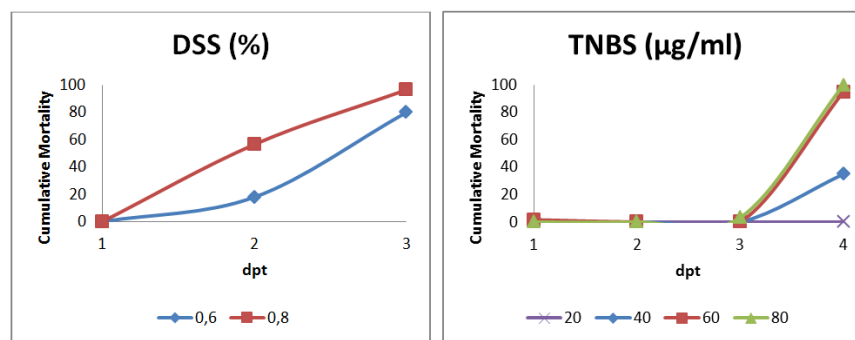


Figura 1. Efecto de la exposición de DSS y TNBS (durante 3 días) en la mortalidad de larvas de pez cebra de 4 dpf.

La puesta a punto del modelo enterocolítico se completa con la optimización de las condiciones de exposición a los productos químicos y un protocolo de tinción de mucus ácido mediante la tinción con azul Alcían. En la Figura 2 se muestra la presencia de mucus en el tracto digestivo del pez cebra mediante tinción con azul Alcían.

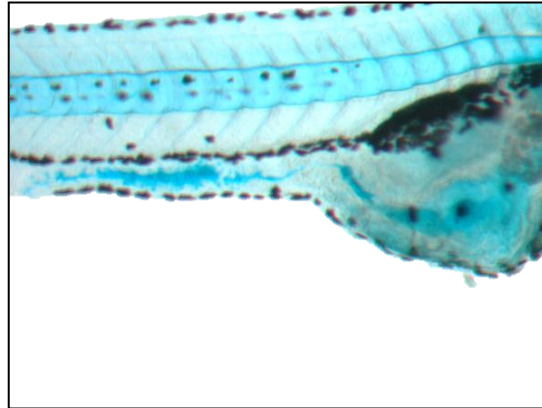


Figura 2. Monitorización de mucus ácido en el tracto digestivo del pez cebra mediante la tinción con azul Alcían

3.2 Screening de moléculas funcionales (efectos inmunomodulador; antioxidante y anti-inflamatorio)

Durante el desarrollo del proyecto se han testado varias moléculas con potencial capacidad inmunoestimulante:

EL Zymosan es un polisacárido comercial en formato liofilizado con supuesta capacidad inmunomoduladora. Tras exponer las larvas de pez cebra a este polisacárido, siguiendo el protocolo establecido durante el 2012, no hemos encontrado diferencias significativas en el panel de genes relacionados con el sistema inmune. Este resultado corrobora resultados anteriores en donde extractos comerciales de Spirulina y Laminaria no mostraron ningún efecto inmunomodulador. De este modo podemos concluir que los polisacáridos comerciales no son tan activos como cabría esperar, por lo que es necesario incorporar polisacáridos de otra manera, preferiblemente en fresco o incluso añadiendo directamente el alga o microalga al medio, lo que se denomina técnicamente “Greenwater effect”.

Hemos evaluado la capacidad inmunomoduladora de varias muestras de Agar, con diferentes usos comerciales: bacteriológico, biológico, alimentario y farmacológico.

Teniendo en cuenta que el Agar es gelificante, en primer lugar, se evaluó la concentración a la cual comienza a gelificar [a partir de 0.5 % (p/v)] así como las concentraciones a las cuales no se detectó mortalidad en las larvas. Finalmente se ha trabajado con unas concentraciones de 50 y 100 µg/ml. Tras realizar el experimento por triplicado, y realizar la extracción de ARN, se han realizado los ensayos de expresión génica con una batería de genes relacionados con el sistema inmune innato de peces. Los genes seleccionados han sido la interleukina 1β (directamente en la cascada proinflamatoria), dos enzimas con capacidad antimicrobiana (lisozima y transferrina), un receptor de membrana específico de respuesta a lipopolisacáridos (toll like receptor 4) y una proteína mediadora de señal (Myd88) y un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. Tras un primer análisis se ha detectado un efecto inmunosupresor del Agar de uso alimentario y farmacéutico. Este efecto negativo podría explicarse por la presencia de algas de *Cystoseira*, que contiene un componente citotóxico, y/o el de sustancias antimicrobianas que se añaden para evitar la contaminación microbiana.

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

El diseño específico del sistema de sensores que constituyen el método de detección, está descrito en detalle en la patente PCT/EP2012/051317 – System to detect stress/discomfort in aquatic animals.

3. DIVULGACIÓN Y FORMACIÓN

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

- 1) First International Conference of Fish and Shellfish Immunology, Vigo (E) 25 y 28 Junio 2013 en el cual Miguel Angel Pardo presentó el trabajo "*Stealth mechanism as new insights into Vibrio anguillarum pathogenesis*"

Este trabajo se ha publicado se ha publicado en la revista Fish and Shellfish immunology con la siguiente referencia: Oyarbide, U., S. Rainieri, and M.A. Pardo, Stealth mechanism as new insights into Vibrio anguillarum pathogenesis. Fish & Shellfish Immunology, 2013. 34(6): p. 1670

- 2) 7th World Congress on Polyphenols Applications (ISANHP Polyphenols 2013) Bonn (D) 6 y 7 Junio 2013 en el cual Monica Martinez presentó los resultados obtendios mediante un poster titulado "*In vivo method for testing the antioxidant and fat reducing effects of polyphenols using the zebrafish animal model*"

Además, se ha enviado el siguiente articulo científico a la revista Zebrafish para posible publicación. Oyarbide, U., Rainieri, S. and Pardo, M.A. (2014) Use of Gnotobiotic Zebrafish to Study *Vibrio anguillarum* Pathogenicity. (en revisión)

Los resultados del sistema para detectar el nivel de bienestar de los peces se han publicado en la siguiente patente internacional: PCT/EP2012/051317 – System to detect stress/discomfort in aquatic animals.

En el mes de octubre Sandra Rainieri y Miguel Angel Pardo han participado como ponentes al Master en Nutrición y Salud organizado por la UPV-EHU, en el cual han

explicado las ventajas y las aplicaciones del modelo animal pez cebra en nutrición humana y animal así como en toxicología.

4. CONCLUSIONES

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

- Selección de un método rápido para determinar cualitativamente la producción de estrés oxidativo mediante tinción con un fluoroforo y análisis microscópica.
- Puesta a punto un modelo de enterocolitis química en larvas de pez cebra con el objetivo de poder evaluar la capacidad de sustancias con efecto anti-inflamatorio.
- Evaluación de efecto inmunoestimulante de muestras comerciales (polisacáridos, agares, etc.)
- Publicación de una patente que describe un método alternativo para la evaluación del nivel de bienestar de los peces y optimización de un prototipo funcional del sistema.

5. 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 zfish 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. Tietze, F. *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues*. Analytical Biochemistry, 1969. **27**: p. 502-522.
7. Oyarbide, U., S. Rainieri, and M.A. Pardo, *Zebrafish (Danio rerio) Larvae as a System to Test the Efficacy of Polysaccharides as Immunostimulants*. Zebrafish, 2012. **9**(2): p. 74-84.
8. Thisse, C. and B. Thisse, *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. Nature Protocols, 2008. **3**(1): p. 59-69.
9. Chen Y-H, Lu Y-F, Ko T-Y, Tsai M-Y, Lin CY, Lin C-C, et al.: Zebrafish cdx1b Regulates Differentiation of Various Intestinal Cell Lineages. Developmental Dynamics. 2009;238:1021-32.

