

## Efecto inmunomodulador de subproductos porcinos en dietas con alto nivel de sustitución de harina de pescado en dorada

Joana P. Firmino (1,2,3); Eva Vallejos-Vidal (2); Karl B. Andree (1); María Ángeles Esteban (4); Felipe E. Reyes-López (2); Ricardo Salomón (1,2); Carmen Rodríguez (5); Javier Polo (5); Lluís Tort (2); Enric Gisbert (1). 1) IRTA-SCR 2) UAB 3) TECNOVIT-FARMFAES 4) UM 5) APC Europe SA

### Abstract

Although still unexploited, it is worldwide recognized that terrestrial animals' byproducts represent a safe source of animal protein and lipid available for the aquafeed industry (Hernández *et al.*, 2010). In addition to its use as a protein source, blood byproducts have also been recommended in animal diets as an immune support due to their high levels of immunoglobulins (Campbell *et al.*, 2016). In this study, the inclusion of porcine spray-dried plasma and porcine hydrolyzed protein (APPETEIN® and PEPTEIVA®, APC Europe, SA) was used in low FM diets (7%) to substitute 5% fishmeal (FM) for on-growing gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. A significant increase in growth was observed in fish fed both additives. The additive did not affect the non-specific immune parameters in serum. However, by means of an *ex vivo* challenge with LPS using spleen cells, the results demonstrated a significant over-expression in genes associated with the innate humoral response (*immunoglobulin M*), pro-inflammatory (*il-1 $\beta$* ) and anti-inflammatory cytokines (*il-10*, *tgfb1*), cell surface marker *cd4* and the antioxidant enzyme superoxide dismutase of manganese (*mn-sod*), at different times of incubation with LPS. These results indicate that the substitution of 5% of FM of the diet with either APPETEIN® or PEPTEIVA® improves the growth performance and the immune response in the presence of LPS.

### Resumen

Aunque poco explotado, es reconocido mundialmente que los subproductos de animales terrestres representan una fuente segura de proteínas y lípidos animales disponibles para la industria de alimentos acuícolas (Hernández *et al.*, 2010). Además de su uso como fuente proteica, los subproductos de la sangre también han sido recomendados en dietas para animales como un apoyo inmunológico debido a sus altos niveles de inmunoglobulinas (Campbell *et al.*, 2016). En este estudio, la inclusión de plasma porcino y proteína hidrolizada de porcino (APPETEIN® y PEPTEIVA®, APC Europe, SA) se utilizó para sustituir el 5 % de harina de pescado (HP) en dietas bajas en HP (7 %), en dorada (*Sparus aurata*) en fase de engorde. Se observó un aumento significativo del crecimiento en peces alimentados con ambos aditivos. Los parámetros inmunes no específicos en suero no se vieron afectados por el aditivo. Sin embargo, mediante un desafío *ex vivo* con LPS con un tejido con función linfóide secundaria, como el bazo, los resultados demuestran una marcada sobre-expresión en genes asociados a la respuesta innata humoral (*inmunoglobulina M*), de las citoquinas pro-inflamatoria (*il-1 $\beta$* ) y antiinflamatorias (*il-10*, *tgfb1*), del marcador de superficie celular *cd4*, y de la enzima antioxidante superóxido dismutasa de manganeso (*mn-sod*) a los distintos tiempos de incubación con LPS. Estos resultados indican que la sustitución del 5 % de HP en la dieta tanto con APPETEIN® como con PEPTEIVA® mejora el rendimiento del crecimiento y la respuesta inmune en presencia de LPS.

### Justificación

Con el presente estudio se pretende evaluar el efecto de la sustitución del 5 % de HP con plasma de cerdo (APPETEIN®) y proteína hidrolizada de porcino (PEPTEIVA®) en una dieta con bajo contenido de HP sobre el rendimiento del crecimiento de los peces y su estado inmunológico.

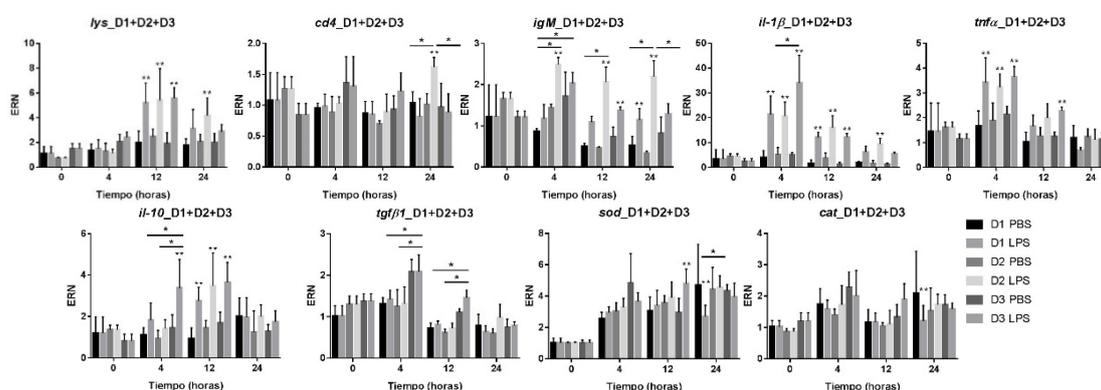
### Material y métodos

Juveniles de dorada se mantuvieron en tanques de 450 L conectados a un sistema de recirculación (IRTAMar™) a una densidad inicial de 2 kg/m<sup>3</sup> en condiciones ambientales de fotoperiodo y temperatura del agua (22–27 °C). Se establecieron tres dietas experimentales: D1, dieta control (sin aditivos; 7 % HP); D2, dieta con 5 % de plasma de cerdo (APPETEIN®, APC Europe, SA; 2 % HP); y D3, dieta con 5 % de proteína hidrolizada de porcino (PEPTEIVA®, APC Europe, SA; 2 % HP). El ensayo nutricional tuvo duración de 92 días. Al final del ensayo se pesaron los peces, se colectaron muestras de sangre y de tejidos. Se evaluaron los parámetros inmunes serológicos standard en peces, tales como los niveles totales de inmunoglobulina M (IgM), la actividad del complemento hemolítico natural y la actividad bactericida contra un patógeno marino oportunista, *Vibrio anguillarum*. Cultivos celulares primarios de esplenocitos de dorada tratados con PBS y LPS se analizaron mediante qRT-PCR para evaluar la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario. La selección de genes incluyó el análisis de respuesta innata humoral (*lisozima [lys]*, *inmunoglobulina M [igm]*), citoquinas pro- (*il-1 $\beta$* , *tnfa*) y anti-inflamatorias (*il-10*, *tgfb1*), el marcador de células de superficie *cd4*, y enzimas antioxidantes (*superóxido dismutasa de manganeso [mn-sod]* y *catalasa [cat]*). La  $\beta$ -actina se incluyó como gen de referencia para el análisis de expresión. Todas las reacciones se realizaron por duplicado utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384 Touch (Bio-Rad Laboratories). La cuantificación se realizó de acuerdo con el método de Pfaffl corregido para la eficiencia de cada conjunto de cebadores obtenido. Los resultados se expresaron

como valores medios  $\pm$  desviación estándar de expresión obtenidos a las 0, 4, 12 y 24 horas de incubación con PBS o LPS ( $n=6$  peces por dieta, condición experimental y tiempo evaluado).

### Resultados y discusión

Los peces alimentados con APPETEIN® y PEPTEIVA® aumentaron su rendimiento en un 4 % y 5 % respectivamente, con respecto a su crecimiento en peso (173,8 g vs. 180,0 g vs. 182,2 g; D1 vs. D2 vs. D3) en comparación con la dieta control. Al final de la prueba de alimentación, el estado inmunitario a nivel plasmático no mostró diferencias entre grupos experimentales. Sin embargo, en cuanto la respuesta inmunitaria específica del bazo respondió a la exposición *ex vivo* a LPS, se registró una mayor expresión de *igM* (gene asociado a la respuesta innata humoral), de las citoquinas proinflamatoria (*il-1 $\beta$* ) y antiinflamatorias (*il-10*, *tgf $\beta$ 1*) y del marcador de células de superficie *cd4*. La expresión relativa de las enzimas antioxidantes *mn-sod* y *cat* demuestra que 24h post-tratamiento las células de bazo de peces alimentados con los aditivos tienen más capacidad de mantener el estado *redox* en la presencia de LPS, cuando comparadas con el control (Figura 1).



**Figura 1.** Expresión relativa normalizada (ERN) de los genes *lys*, *cd4*, *igM*, *il-1 $\beta$* , *tnfa*, *il-10*, *tgf $\beta$ 1*, *sod* y *cat* en cultivo *ex vivo* de bazo de doradas alimentadas con las dietas control (D1), APPETEIN® (D2) y PEPTEIVA® (D3) a tiempos 0h, 12 y 24h post-inducción con LPS. El tiempo 0h corresponde al estado basal previo al tratamiento. \* representa diferencia significativa entre dietas; \*\* representa diferencias significativas entre células tratadas con PBS y LPS dentro de una misma dieta ( $P<0.05$ ).

El presente estudio apoya que una dieta con solo 2 % de harina de pescado se puede usar con éxito cuando el contenido de proteína restante se sustituye por subproductos funcionales de porcinos como el APPETEIN® and PEPTEIVA®, no solo mejorando el crecimiento de la dorada, sino también incrementando varios marcadores inmunológicos.

### Bibliografía

- Campbell, J. M., J. Polo y JCrenshaw, J. 2016. Orally fed spray dried plasma modulated the immune response during respiratory challenges: A review. *Journal of Animal Science*. 94(3): 145-47
- Hernández, C., M.A. Olvera-Novoa, R.W. Hardy, A. Hermosillo, C. Reyes y B. González. 2010. Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition*. 16: 44-53

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado por el proyecto "Estrategias nutricionales para la mejora del rendimiento productivo: uso de alimentos funcionales y dietas salud en acuicultura (DIETAplus)", financiado por los fondos JACUMAR (Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de España, MAPAMA) y FEMP (UE), y por el proyecto MedAID, financiado por el programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020. Joana P. Firmino ha sido subvencionada por el programa de Doctorats Industrials (Generalitat de Catalunya; TECNOVIT-FARMFAES).