

Estrategias nutricionales para el control de ectoparásitos (*Sparicotyle chrysophrii*) en dorada

Joana P. Firmino (1,2,3); Eva Vallejos-Vidal (2); Carmen Sarasquete (4); Felipe E. Reyes-López (2); Juan B. Ortiz-Delgado (4); Laura Fernández-Alacid (5); Ricardo Salomón (1,2); Antoni Ibarz (5); Lluís Tort (2); Alicia Estévez (1) Enric Gisbert (1). 1) IRTA-SCR 2) UAB 3) TECNOVIT-FARMFAES 4) ICMAN-CSIC 5) UB

Abstract

A commercial additive containing a mixture of garlic, thymol and carvacrol essential oils, AROTEC-G®, was tested in the formulation of a diet for gilthead seabream (*Sparus aurata*) in a nutritional trial as a strategy to prevent infections of the ectoparasite *Sparicotyle chrysophrii*. A standard diet was used as control (46 % crude protein). There were no significant difference in growth between fish fed the diet supplemented with AROTEC-G® and the control diet. The transcriptomic profile of skin obtained by microarrays shown that the differentially expressed genes related to RNA processing, vesicular transport and biogenesis were in its majority up-regulated in fish fed with AROTEC-G® compared with the fish fed with the control diet. In the skin mucus, a significant reduction of the classical biomarkers associated with stress response levels was observed in animals fed the AROTEC-G® diet. In gills, the histopathological study indicates an improvement in the condition of the gills in fish fed with AROTEC-G®. These alterations agreed with the over-expression of differentially expressed genes related to the immune system, status redox, and metabolic response in fish fed with the additive. Subsequently, a cohabitation challenge with *S. chrysophrii* was performed, which resulted in a significant decrease in the total *S. chrysophrii* prevalence in fish fed AROTEC-G®. Taken together, the results suggest that AROTEC-G® is an effective natural compound for the formulation of functional diets designed to protect the gilthead seabream against infection by ectoparasites such as *S. chrysophrii*.

Resumen

Un aditivo comercial compuesto por aceites esenciales de ajo, timol y carvacrol, AROTEC-G®, se usó en la formulación de una dieta para dorada (*Sparus aurata*) en un ensayo nutricional como estrategia de protección contra el ectoparásito *Sparicotyle chrysophrii*. Como dieta control se utilizó una dieta standard (46 % de proteína). No se observaron diferencias significativas en el índice de crecimiento entre los peces alimentados con la dieta AROTEC-G® y la dieta control. El perfil transcriptómico de piel obtenido por *microarrays* demuestra que los genes diferencialmente expresados relacionados con el procesamiento de RNA, transporte vesicular y biogénesis están en su mayoría sobre-expresados en los peces alimentados con AROTEC-G® comparado con los peces alimentados con la dieta control. En el moco de la piel los resultados revelan una reducción significativa de los biomarcadores clásicos asociados a respuesta de estrés. En las branquias, el estudio histopatológico indica una mejora en la condición de las branquias en peces alimentados con AROTEC-G®. Estas alteraciones coinciden con el aumento de la sobre-expresión de genes diferencialmente expresados relacionados con el sistema inmune, status redox, y respuesta metabólica en peces alimentados con el aditivo. Posteriormente, se realizó un desafío por cohabitación con *S. chrysophrii*, donde se observó una disminución significativa de la prevalencia de parásitos en los peces alimentados con AROTEC-G®. En conjunto, los resultados sugieren que AROTEC-G® es un compuesto natural interesante para la formulación de dietas funcionales destinadas a proteger el estado de salud de la dorada frente a la infección por ectoparásitos como *S. chrysophrii*.

Justificación

Con el presente estudio se pretende mejorar la competitividad del sector acuícola español mediante el desarrollo de dietas que mejoren la condición general del animal, su resistencia frente a episodios de estrés y potenciales agentes infecciosos, más allá de sus efectos promotores sobre el crecimiento.

Material y métodos

Las dietas experimentales se formularon usando un 0,5 % de inclusión del aditivo microencapsulado compuesto por aceite esencial de ajo, carvacrol y timol (AROTEC-G®, TECNOVIT-FAESFARMA, España) en la dieta basal (46 % de proteína, 18 % de grasa, energía: 21,5 MJ/kg) y la ausencia de aditivo para la dieta control. Las dietas se administraron a juveniles de dorada (*Sparus aurata*) de 40 g durante 65 días. El experimento se llevó a cabo en tanques de 450 L por triplicado en las instalaciones del IRTA Sant Carles de La Ràpita, utilizando unidades de recirculación (IRTAmar™). Al final del ensayo, se tomaron muestras de tejidos para análisis. El análisis transcriptómico de piel y branquia se llevó a cabo por hibridación de *microarrays* (4×44k, Agilent) según lo establecido por Reyes-López *et al.* (2015). Los datos brutos extraídos se importaron y analizaron con el software Genespring versión 14.5 GX. El análisis de metabolitos y cortisol en mucus epidérmico se realizó según Fernández-Alacid *et al.* (2018). El estudio y diagnóstico histopatológico en branquia se ejecutó según el protocolo descrito en Sarasquete *et al.* 2001. Después del ensayo nutricional, se realizó un ensayo de cohabitación con peces (1) no parásitados e (2) infectados con *Sparicotyle chrysophrii* en una proporción de 2:1 durante 39 días. El número promedio de parásitos en cada una de las branquias se determinó a partir del recuento de parásitos en cada pez bajo tres categorías de acuerdo a sus características morfológicas: *S. chrysophrii* adultos, juveniles y larvas.

Resultados y discusión

En los peces alimentados con AROTEC-G® no se detectaron diferencias en el crecimiento en peso de los peces comparado con doradas alimentadas con la dieta control (150,8 g – 157,2 g; \pm 14,2 g). El transcriptoma de la piel de doradas alimentadas con AROTEC-G® muestra un total de 534 genes diferencialmente expresados (GDE) (393 GDE sobre-expresados; 141 GDE sub-expresados) comparados con los peces alimentados con dieta control (Figura 1.A). En el moco de la piel, se observó en animales alimentados con la dieta AROTEC-G® una disminución en los niveles cortisol, glucosa y lactato. Además, el estudio histopatológico de la branquia indica una disminución general de epiteliocistis, infiltraciones leucocitarias y de fusiones de laminillas branquiales en peces alimentados con AROTEC-G®. Estas alteraciones coinciden con la modulación de procesos biológicos (respuesta inmune, status redox) obtenidos a partir de los 758 GDE obtenidos a partir del transcriptoma en branquias (556 sobre-expresados; 203 sub-expresados) en peces alimentados con AROTEC-G®. Al cabo de 39 días post-infección con *S. chrysophrii*, los peces alimentados con AROTEC-G® revelaron un número significativamente menor de parásitos totales en comparación con la dieta de control. Globalmente, los resultados sugieren que el aditivo AROTEC-G® promueve la protección a nivel de tejido mucoso en doradas desafiadas con ectoparásitos como *S. chrysophrii*.

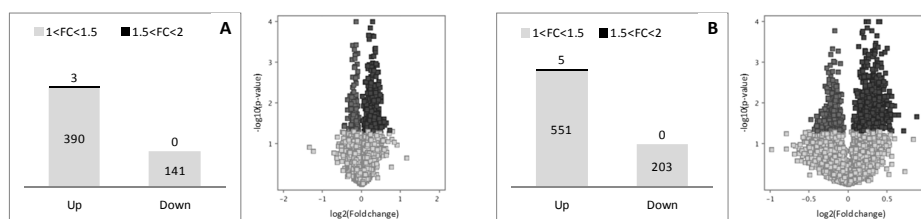


Figura 1. Respuesta transcriptómica del AROTEC-G® en (A) piel y (B) branquia de dorada.

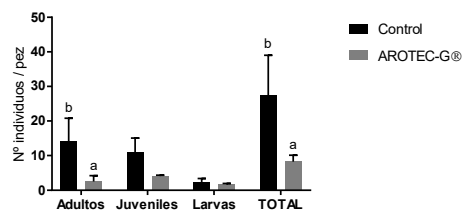


Figura 2. Número de parásitos por pez alimentados con la dieta experimental AROTEC-G® y dieta control (media \pm desviación estándar). Los estadios de adultos, juveniles y larvas están representados. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Bibliografía

- Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuño, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., Ibarz, A. 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of The Total Environment*. 644:1323-1335.
- Reyes-López, F.E., Romeo, J.S., Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Sandino, A.M., Tort, L., Mackenzie, S., Imarai M. 2015. Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Developmental & Comparative Immunology*. 53.
- Sarasquete, C., Gisbert E., Ribeiro, L., Vieira, L., Dinis, M.T. 2001. Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *European Journal Histochemistry*. 45: 267-278.

Agradecimientos

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