

# Aplicación de sustancias naturales (vitaminas y quitina) para modular la capacidad de respuesta a infecciones víricas o protozoarias y frente a tumores de doradas *Sparus auratus* L., 1758 cultivadas

A. Cuesta, J. Ortuño, A. Rodríguez, M. A. Esteban y J. Meseguer

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus Universitario de Espinardo. E-30100 Murcia (Murcia), España. Correo electrónico: meseguer@um.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

Aunque el efecto inmunomodulador de diversas sustancias sobre algunas respuestas del sistema inmunitario de peces teleósteos ha sido ampliamente estudiado, la respuesta citotóxica natural casi no se ha evaluado. En el presente trabajo el estudio se centró en el posible efecto inmunomodulador del suplemento dietético de vitaminas C y E y de quitina, todas sustancias naturales, sobre la respuesta citotóxica natural de doradas *Sparus auratus* L., 1758. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de estas sustancias produce una estimulación de dicha respuesta citotóxica, lo que supone la mejora de su capacidad de reacción frente a una posible infección viral o protozoaria y frente a tumores, siempre que su administración sea en dosis apropiadas y durante periodos óptimos.

**Palabras clave:** Citotoxicidad, inmunoestimulación, vitaminas, quitina, teleósteos.

## ABSTRACT

*Use of natural substances (vitamins and chitin) to modulate response to viral or protozoan infections and tumors in farmed gilthead seabream Sparus auratus L., 1758*

*The immunomodulatory effect of several substances on teleost fishes' immune systems has been widely studied. However, those studies have rarely assessed natural cytotoxic response. Thus, the aim of the present work was to examine the possible immunomodulatory impact on the natural cytotoxic response of the gilthead seabream Sparus auratus L., 1758 of using vitamins C and E and chitin as dietary supplements. Our results show that the correct administration of these naturally occurring substances enhances cytotoxic activity, leading to a better response to viral and protozoan infections and tumors; however, this method is only effective when the supplements are administered at proper dosages and during optimal periods of time.*

**Keywords:** Cytotoxicity, immunostimulation, vitamins, chitin, teleosts.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades víricas y protozoarias, así como los tumores, pueden llegar a tener gran incidencia en acuicultura y, a pesar de ello, no se han realizado muchos estudios al respecto. El principal

mecanismo responsable de llevar a cabo la defensa en estos casos es la respuesta citotóxica natural (Evans *et al.*, 1988). En las dos últimas décadas, numerosos estudios se han centrado en la utilidad que tiene en acuicultura la administración de suplementos dietéticos, y más concretamente de in-

munomoduladores (Anderson, 1992; Blazer, 1992; Sakai, 1999), que pueden mitigar la incidencia de enfermedades y reducir la mortalidad de los peces afectados. Sin embargo, no hay estudios que relacionen la administración de inmunomoduladores y la actividad citotóxica natural.

Entre las sustancias con propiedades inmunoestimulantes, las vitaminas han sido las más estudiadas, concretamente las vitaminas C y E, capaces de estimular la respuesta humoral y celular de varias especies de peces teleósteos. La vitamina C aumenta la actividad del complemento y de la lisozima, eleva los niveles de anticuerpos séricos y estimula las respuestas propias de linfocitos y macrófagos en especies tan variadas como pez gato *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818), salmón atlántico *Salmo salar* L., 1758, trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) y dorada *Sparus auratus* L., 1758 (Hardie, Fletcher y Secombes, 1991; Waagbo *et al.*, 1993; Mulero, Esteban y Meseguer, 1998; Verlhac *et al.*, 1998; Ortuño, Esteban y Meseguer, 1999). El papel de la vitamina E ha sido menos estudiado. El suplemento en dieta de vitamina E aumenta la actividad fagocítica, pero no la actividad de explosión respiratoria ni las respuestas humorales en el salmón atlántico (Hardie, Fletcher y Secombes, 1990). En dorada, la vitamina E produce un aumento en la actividad de los fagocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mulero, Esteban y Meseguer, 1998; Ortuño, Esteban y Meseguer, 2000). Se ha comprobado que ambas vitaminas son importantes en diversas rutas metabólicas, pero se piensa que su papel sobre el sistema inmunitario se debe, principalmente, a sus conocidas propiedades antioxidantes.

Por otro lado, la quitina, segundo polímero más abundante en la naturaleza, se ha presentado en los últimos años como una sustancia natural, biocompatible y biodegradable que podría ser usada como inmunoestimulante en acuicultura. Sin embargo, los trabajos existentes sólo describen su acción tras ser suministrada mediante inyección, aumentando las respuestas celulares inespecíficas (Sakai *et al.*, 1992; Kawakami, Shinohara y Sakai, 1998; Esteban *et al.*, 2000), y solamente existe un estudio en el que esta sustancia haya sido suministrada de forma oral (Esteban *et al.*, 2001).

Por todo lo expuesto, la intención del presente trabajo fue estudiar el efecto que tiene el suplemento dietético con diferentes sustancias natura-

les sobre la respuesta citotóxica natural de doradas en cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Ejemplares de dorada *Sparus auratus* con un peso medio de 150 g y procedentes de la empresa Culmarex S. A. (con sede en Águilas, Murcia), fueron mantenidos en acuarios de laboratorio con un flujo de 1 500 l/h, a 22 °C, con una salinidad de 21, fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad y alimentados con pienso comercial enriquecido (de ProAqua®, Palencia) en una cantidad equivalente al 1 % de su biomasa.

### Elaboración de dietas enriquecidas

La vitamina C (ascorbato sódico, comercializado por Sigma), vitamina hidrosoluble, fue directamente incorporada al pienso y sellada con aceite de pescado (25 ml/kg de pienso) hasta conseguir un suplemento de 3 g de vitamina C/kg de pienso. Se utilizó como control pienso comercial (conteniendo en vitamina C: 100 mg/kg de pienso) con aceite de pescado (25 ml/kg de pienso).

La vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol, de Sigma), vitamina liposoluble, fue disuelta en aceite de pescado a razón de 24, 48 o 72 mg/ml; estas suspensiones se incorporaron al pienso comercial, suplementando la dieta con 0,6, 1,2 y 1,8 g de acetato de  $\alpha$ -tocoferol/kg de pienso. Como control se utilizó pienso comercial con contenido en vitamina E de 0,1 g/kg de pienso y con aceite de pescado agregado en las mismas proporciones detalladas.

La quitina, procedente de exoesqueleto de cangrejo ( $\beta$ (1-4)-N-acetil-D-glucosamina, de Sigma), polímero insoluble, fue usada como suplemento. El pienso comercial granulado fue triturado, mezclado con la quitina y vuelto a granular. Las concentraciones de quitina añadida fueron de 0 (control), 25, 50 y 100 g/kg de pienso.

### Muestreos

Cinco ejemplares de cada grupo fueron muestreados tras 2, 4 y 6 semanas de experimentación.

Los ejemplares fueron anestesiados, desangrados y diseccionados para obtener el riñón cefálico.

### Aislamiento de leucocitos de riñón cefálico

El riñón cefálico de los ejemplares muestreados fue fraccionado y tamizado, empleando para ello medio de cultivo sRRPMI-1640 (RPMI-1640 suplementado con 0,35 % NaCl, 2 % suero bovino fetal (SBF), 100 UI/ml penicilina (de Flow®), 100 µg/ml estreptomicina (Flow) y 10 UI/ml heparina (Sigma)) (Esteban *et al.*, 1998). Los leucocitos fueron aislados utilizando un gradiente de Percoll al 48 %, lavados con sRPMI-1640 y ajustados a  $10^7$  células/ml. La viabilidad fue mayor del 95 % según el test de exclusión del azul tripano.

### Células tumorales

Células tumorales de ratón de la línea L1210 (ATCC CCL-219) fueron utilizadas en los ensayos de citotoxicidad como células diana. Éstas fueron mantenidas en fase exponencial de crecimiento (37 °C, 85 % humedad relativa y 5 % CO<sub>2</sub>) en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % SBF, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM glutamina (de Gibco®).

Previamente al ensayo de citotoxicidad, las células tumorales fueron incubadas en oscuridad con el colorante fluorescente perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina (DiO) (10 µg/ml, 3 h, 37 °C). Las células fueron entonces recogidas, lavadas y ajustadas a  $10^6$  células/ml en el medio de cultivo. El porcentaje de células marcadas (fluorescencia verde) y la homogeneidad de la marca (intensidad) fueron estudiados mediante citometría de flujo.

### Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron según Cuesta, Esteban y Meseguer (1999). Para ello, 250 µl de leucocitos (efectores), aislados de los ejemplares de dorada que habían recibido la dieta correspondiente, fueron incubados con 50 µl de células tumorales (dianas) marcadas con DiO, consiguiendo una relación efector:diana de 50:1. Las muestras fueron incubadas a 25 °C durante 2 h. De forma inmediata se colocaron en hielo y se incorporaron 30 µl de io-

duro de propidio (IP), colorante vital que emite fluorescencia roja, para su análisis mediante citometría de flujo. Como control del ensayo se utilizaron muestras incubadas durante 0 h.

Los datos procedentes del citómetro de flujo se representaron en diagramas de puntos de tamaño (FSC) frente a la complejidad estructural (SSC) y fluorescencia verde (FL1) (DiO) frente a fluorescencia roja (FL2) (IP), así como en histogramas de FL1 y FL2. De esta forma se pudo discriminar tres poblaciones celulares: leucocitos o células efectoras (DiO<sup>-</sup>), células diana vivas (DiO<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>) y células diana muertas (DiO<sup>+</sup>IP<sup>+</sup>). El análisis se centró en las células con fluorescencia verde (DiO<sup>+</sup>, células diana o tumorales), analizándose 3 000 células por muestra. La actividad citotóxica natural se determinó como el porcentaje de células diana muertas tras ser incubadas con los leucocitos mediante la fórmula

$$\text{Actividad citotóxica (\%)} = \frac{100 (\%_{\text{ensayo}} - \%_{\text{control}})}{(100 - \%_{\text{control}})}$$

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar. Las diferencias entre grupos fueron estudiadas mediante el test de análisis de varianza simple Anova, considerándose las diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ , y los tests de comparación de medias de Bonferroni y Tukey.

## RESULTADOS

### Vitamina C

El suplemento en la dieta de 3 g de vitamina C/kg pienso durante 6 semanas produjo un aumento de la actividad citotóxica natural de los leucocitos de riñón cefálico de dorada que llegó a cuadruplicar a la encontrada en los leucocitos de ejemplares del grupo de control. Tiempos más cortos de administración no produjeron ningún efecto sobre tal actividad.

### Vitamina E

El suplemento en la dieta de 1,8 o, incluso, de 0,6 g de vitamina E/kg de pienso produjo un au-

mento de la citotoxicidad natural de 2,5 a 3 veces superior al correspondiente al grupo de control tras 2 y 4 semanas de tratamiento, respectivamente. La concentración de 1,2 g/kg pienso aumentó la actividad citotóxica a las 4 semanas, pero este aumento no fue estadísticamente significativo. El tratamiento durante 6 semanas no produjo ningún efecto sobre dicha actividad.

### Quitina

La administración de quitina en la dieta produjo un aumento de la citotoxicidad natural de los leucocitos, que llegó a duplicar la actividad correspondiente a los leucocitos de ejemplares del grupo de control, de forma dosis dependiente, tras dos semanas de aplicación. Tratamientos más prolongados no produjeron efecto alguno.

### DISCUSIÓN

El suministro de diferentes sustancias en las piscifactorías ha sido muy estudiado con el fin de conocer si con estas prácticas se pueden solucionar, o al menos paliar, ciertos problemas de infecciones en los ejemplares. De entre todas las sustancias que han sido probadas, los antibióticos y las vacunas han sido tradicionalmente las estrategias más usadas. En los últimos 15-20 años se ha comenzado su sustitución o complementación mediante el empleo de sustancias con carácter inmunomodulador, que poseen cualidades de índole fisiológica, ecológica y de eficacia que les ha llevado a ser casi totalmente sustitutorias de las anteriores. Su principal ventaja es que suelen conferir a los animales tratados, y en concreto a su sistema inmunitario, un estado fisiológico mucho más idóneo para afrontar cualquier situación adversa, como enfermedades y situaciones de estrés. Además, estas sustancias tienen coste bajo y su uso mediante vía oral como suplemento dietético es el más aceptado en acuicultura, y, aunque se ha comprobado que el suministro mediante inyección suele ser más efectivo, resulta mucho más costoso y prácticamente inviable en una piscifactoría.

En peces, las sustancias más estudiadas con capacidad inmunomoduladora han sido las vitaminas C y E, algo menos la vitamina A, y los glucanos. También han recibido especial atención la quitina,

las levaduras, las bacterias y sus derivados, los extractos de animales y plantas, ciertos micronutrientes, las hormonas y otros (Sakai, 1999). Estas sustancias son mayoritariamente inmunoestimulantes de las respuestas inespecíficas o naturales.

Según los resultados obtenidos, la actividad citotóxica natural de los leucocitos de doradas alimentadas con dietas enriquecidas en vitamina C, E o quitina, ha sido, generalmente, la respuesta celular que ha aumentado más rápidamente, y en mayor grado, comparada con el resto de actividades celulares estudiadas (fagocitosis y explosión respiratoria) en otros trabajos de nuestro grupo de investigación sobre los mismos ejemplares de experimentación (Cuesta *et al.*, 2001; Cuesta, Esteban y Meseguer, 2002; Esteban *et al.*, 2000; Esteban *et al.*, 2001; Ortuño, Esteban y Meseguer, 1999, 2000). Parece que estas diferencias pudieran ser debidas a que la respuesta citotóxica está desempeñada por una población adicional de células respecto a la fagocitosis y la explosión respiratoria: los linfocitos, que presentan un papel clave en el sistema inmunitario. Excepto en el caso del uso de la vitamina C, el empleo de concentraciones altas y/o tiempos de administración largos no produce ningún efecto sobre la citotoxicidad natural, lo cual también ha sido descrito para otras actividades del sistema inmunitario estudiadas, incluso con otros inmunoestimulantes. Esto obedece a un efecto de adaptación natural del organismo ante una nueva dieta. Por ello, un suministro inadecuado no produce ningún efecto, incluso los efectos encontrados pueden llegar a ser contrarios a los deseados.

Los mecanismos por los cuales las vitaminas C y E actúan no son totalmente conocidos, aunque su eficacia parece deberse a su carácter antioxidante (Ortuño, Esteban y Meseguer, 1999, 2000; Ortuño *et al.*, 2001). La vitamina E posee una acción sobre el sistema inmunitario muy importante, ya que actúa evitando la autooxidación de los ácidos grasos componentes de las membranas biológicas, proporcionando a las células un mejor estado funcional. Todas las actividades celulares mencionadas son muy dependientes del estado de la membrana citoplasmática, ya que es donde se produce el reconocimiento y unión al antígeno, y también la transmisión de señales. Además, se ha visto que las vitaminas C y E interactúan como un par antioxidante, donde la vitamina C regenera a la vitamina E (Mulero, Esteban y Meseguer, 1998; Ortuño *et al.*, 2001).



Por otro lado, no se conoce nada sobre el mecanismo de acción de la quitina. No se han encontrado receptores específicos, aunque se supone que los hay de tipo lectina, al igual que para otros carbohidratos, como los  $\beta$ -glucanos, manosa y manosa-6-fosfato. Son necesarios más estudios en este sentido para conocer los mecanismos implicados en la acción de la quitina sobre los leucocitos y sus actividades.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido subvencionada por los proyectos PETRI 95-0051-OP y de la Fundación Séneca, Centro de Coordinación de la Investigación de la Región de Murcia, PB/9/FS/97. A. Cuesta posee una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte; J. Ortuño una beca de investigación de CajaMurcia; y A. Rodríguez un contrato asociado a un proyecto Feder.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 281-307.
- Blazer, V. S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 309-323.
- Cuesta, A., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71: 161-171.
- Cuesta, A., M. A. Esteban y J. Meseguer. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunology* 13: 97-109.
- Cuesta, A., M. A. Esteban, J. Ortuño y J. Meseguer. 2001. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology* 11: 293-302.
- Esteban, M. A., A. Cuesta, J. Ortuño y J. Meseguer. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunology* 11: 303-315.
- Esteban, M. A., V. Mulero, A. Cuesta, J. Ortuño y J. Meseguer. 2000. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology* 10: 543-554.
- Esteban, M. A., V. Mulero, J. Muñoz y J. Meseguer. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell. Tis. Re.* 293: 133-141.
- Evans, D. L., L. Jaso-Friedman, E. E. Smith, Jr., A. S. John, H. S. Koren y D. T. Harris. 1988. Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 141: 324-332.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher y C. J. Secombes. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 87: 1-13.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher y C. J. Secombes. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 95: 201-214.
- Kawakami, H., N. Shinohara y M. Sakai. 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathol.* 33: 287-292.
- Mulero, V., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1998. Effects of *in vitro* addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66: 185-199.
- Ortuño, J., A. Cuesta, M. A. Esteban y J. Meseguer. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 167-180.
- Ortuño, J., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology* 9: 429-443.
- Ortuño, J., M. A. Esteban y J. Meseguer. 2000. High dietary intake of  $\alpha$ -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology* 10: 293-307.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92.
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta y M. Kobayashi. 1992. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: *Proceedings of the First Symposium in Asian Aquaculture* (26-29 de noviembre, 1990. Bali, Indonesia). *Diseases in Asian Aquaculture* 1: 413-417. Fish Health Section, Asian Fishery Society. Manila, Filipinas.
- Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schüep y R. Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunology* 8: 409-424.
- Waagbø, R., J. Glette, E. R. Nilsen y K. Sandnes. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Physiol. Biochem.* 12: 61-73.