

K.Patología y Sanidad

Distribución de linfocitos B IgT mRNA⁺ mediante hibridación in situ en el digestivo de dorada (*Sparus aurata*)

Sirine Abdeljaouad¹, Rafael Ginés Ruiz¹, Paula Sarmiento¹, Daniel Montero¹, Silvia Torrecillas¹, Pedro L. Castro¹

¹GIA-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35001 Telde, Spain

Resumen

La industria de la acuicultura enfrenta desafíos en el manejo de enfermedades y busca alternativas a la harina de pescado en la alimentación de los peces. Este estudio investiga una nueva dieta que combina harina de pescado, harina de subproductos avícolas y harina de insectos, explorando sus efectos en la respuesta inmunológica de la dorada (*Sparus aurata*). Se enfoca en la comprensión de la respuesta inmunológica local en el tracto gastrointestinal, especialmente en los linfocitos B IgT⁺, utilizando técnicas de hibridación in situ. Se recolectaron muestras de tejido digestivo, se realizaron análisis de hibridación in situ y se llevaron a cabo controles experimentales y análisis estadísticos. Los resultados muestran que no se observaron diferencias significativas entre las dos dietas. Sin embargo, hay interacción dentro de cada dieta en función de la región de sistema digestivo. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la distribución de las células IgT mRNA⁺ en el intestino de la dorada es específica de la región y no se ve afectada por las dietas experimentales.

Introducción

La acuicultura enfrenta desafíos en la salud de los peces y la gestión de enfermedades (Ma *et al.*, 2020). Se busca alternativas a la harina de pescado en piensos (Qiu *et al.*, 2022). La dorada es relevante en la inmunología de peces (Mhalhel *et al.*, 2023), pero el conocimiento sobre respuestas inmunológicas en el tracto gastrointestinal es limitado (Bilal *et al.*, 2021). Este estudio evalúa la distribución de IgT mRNA⁺ y cómo la dieta afecta la respuesta inmunológica en el sistema digestivo.

Material y métodos

Condiciones experimentales:

El estudio se llevó a cabo utilizando dos dietas isoproteicas e isoenergéticas en dorada. LA dieta control incluía harina de pescado (15% FM) y aceite de pescado (7% FO), mientras que la dieta alternativa reemplazaba 50% de la FM con harina de subproductos avícolas (PBM) y harina de insecto (IM). El FO con una combinación de aceite de microalgas (AO), aceites de subproductos avícolas (PBO) y aceites de subproductos de salmón (SBO). Se estudiaron 432 doradas.

Hibridación In Situ (ISH):

Se tomaron muestras de tejidos del sistema digestivo de los especímenes sacrificados, incluyendo esófago, estómago, intestino anterior, medio, posterior y recto. Estas muestras fueron preparadas para análisis histológico mediante fijación, deshidratación, inclusión en parafina y corte en secciones de 2 micrómetros. Para investigar la expresión de ARN mensajero de la IgT mRNA⁺, se llevó a cabo la hibridación in situ (ISH) utilizando el ensayo RNAscope® 2.5 HD. El procedimiento de ISH incluyó la preparación de las muestras, hibridación con sondas específicas de IgT mRNA, detección de señales, y análisis de imágenes y recuento de células mRNA⁺ en secciones de tejido.

Para evaluar las áreas de interés, se empleó el software analySIS® para Windows (Image Pro Plus® V. 4.5.0.29). El análisis estadístico se realizó utilizando pruebas adecuadas para evaluar la normalidad y homogeneidad de los datos, con el objetivo de comparar la expresión de IgT mRNA⁺ en tejido del aparato digestivo bajo diferentes condiciones dietéticas (Wang *et al.*, 2012).

Resultados y discusión

El análisis a través de la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA muestra que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$, $n = 432$) en el número total de células IgT positivas entre los grupos de peces alimentados con las dietas control y alternativa. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la distribución de células IgT entre los compartimentos del sistema digestivo en la dieta control ($p < 0,05$; $n = 216$), se observó un aumento significativo de células IgT en el recto, mientras que, en la dieta alternativa, se registró un aumento significativo en el recto y otros compartimentos del sistema digestivo (intestino medio y posterior) en comparación con los compartimentos más proximales (esófago, estómago, intestino anterior). Nuestros resultados destacan variaciones en la presencia de señales de ARNm⁺ de IgT en varios segmentos del intestino de *Sparus aurata*, con una concentración particularmente marcada en el intestino medio, posterior y el recto. Este hallazgo se suma a otros estudios realizados en doradas sobre la expresión genética que han resaltado un aumento significativo en las señales de ARNm⁺ de IgT en el intestino medio alimentado con una dieta enriquecida con omega-3 (Guerreiro *et al.*, 2020). Investigaciones anteriores han señalado que el

intestino medio y posterior parecen ser más activos desde el punto de vista inmunológico que otras áreas del tracto gastrointestinal (Martínez-Llorens *et al.*, 2021). Estudios de expresión génica sobre la misma especie también han revelado la presencia de un aumento significativo del nivel de expresión de IgT en el intestino medio y posterior en grupos de peces sometidos a cambios en las dietas (Torrecillas *et al.*, 2022). Observaciones similares se han reportado en otras especies, como el salmón del Atlántico (*salmo salar*), donde se ha señalado que el segundo segmento del intestino medio parece ser más activo desde el punto de vista inmunológico que otras áreas del tracto gastrointestinal (Castro *et al.*, 2023).

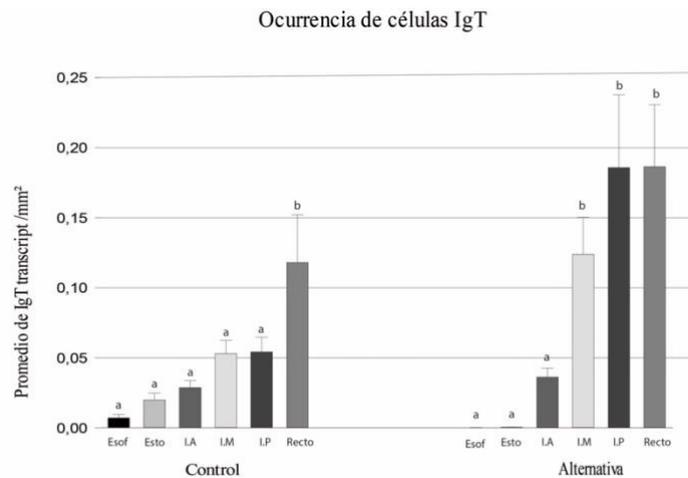


Figura 1. Ocurrencia de células IgT por dieta y por región del tracto digestivo. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras con las mismas letras no son significativamente diferentes mediante análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis ANOVA).

Palabras Clave:

Sparus aurata, Hibridación In Situ, Dieta, Inmunoglobulina T

Bibliografía

- Bilal, S., Etayo, A., Hordvik, I. 2021. Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*. 73. 65–77.
- Guerreiro, I., Conceição, L. E. C., Dias, J., & Afonso, A. 2020. Dietary n-3 HUFA modulate gut and skin immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 106, 446-455.
- Ma, Y., Li, M., Xie, D., Chen, S., Dong, Y., Wang, M., Zhang, G., Zhang, M., Chen, H., Ye, R., Wang, Y., Sun, L., Wang, S., Ning, L., Hasan, A.K.M.M., Li, Y., 2020. Fishmeal can be replaced with a high proportion of terrestrial protein in the diet of the carnivorous marine teleost (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture* 519, 734910.
- Martínez-Llorens, S., Cerdá-Cuéllar, M., Caldach-Giner, J. A., & Pérez-Sánchez, J. 2021. Dietary bioactive peptides and prebiotics modulate the gut microbiota and immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 542, 736791.
- Mhalhel, K.; Levanti, M.; Abbate, F.; Laurà, R.; Guerrero, M.C.; Aragona, M.; Porcino, C.; Briglia, M.; Germanà, A.; Montalbano, G. 2023. Review on Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Aquaculture: Life Cycle, Growth, *Aquaculture Practices and Challenges*. J. Mar. Sci. Eng. 11.
- Qiu, H., Dai, M., Chen, N., & Li, S. 2022. Apparent digestibility of ten protein ingredients for largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Research*, 53, 6846–6854.
- Torrecillas, S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., & Izquierdo, M. 2022. *Dietary microalgae Tetraselmis suec.*
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y. 2012. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.*, 14, 22–29.
- Castro, P.L.; Barac, F.; Hansen, T.J.; Fjellidal, P.G.; Hordvik, I.; Bjørgen, H.; Koppang, E.O. The Distribution of IgT mRNA+ Cells in the Gut of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Animals* 2023, 13, 3191.

Agradecimientos

Gracias al profesor supervisor Pedro Luis Castro y a todo el equipo del laboratorio de histología.

Correo del Autor: Sirine.abdeljaouad101@alu.ulpgc.es /jqsirine8@gmail.com