

K. Patología y Sanidad

Efectos del suero de dorada (*Sparus aurata*) en la composición de ácidos grasos y la respuesta inmune *in vitro* de macrófagos

Yazmina Real¹, Luis Monzón-Atienza¹, Félix Acosta¹

¹Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Crta. Taliarte s/n, 35214 Telde, Las Palmas, Islas Canarias, España

Resumen

El estudio de los componentes inmunológicos resulta de gran relevancia dada la necesidad de cultivar animales capaces de defenderse de agentes infecciosos que amenacen su salud, siendo de especial interés en especies de alto valor nutricional y comercial como la dorada (*Sparus aurata*). Dentro de la inmunidad celular no específica se encuentran los macrófagos, un tipo de leucocito y principal célula fagocítica productora de citoquinas. Clásicamente, la respuesta inmune *in vitro* en peces se ha estudiado utilizando suero fetal bovino (SFB) en vez de suero de la especie para el cultivo celular. En este estudio, se analizan y comparan los siguientes parámetros en macrófagos cultivados con SFB o SD: perfil de ácidos grasos (AG), índice fagocítico (IF) tras incubación con *Vibrio anguillarum*, viabilidad celular y estallido respiratorio, basal y tras estimulación con PMA, y la expresión génica de citoquinas tras una incubación con LPS de *Vibrio alginolyticus* y POLY I:C. Los resultados obtenidos hasta la fecha muestran que, respecto al perfil de AG entre ambos sueros solo hubo diferencias en 16:0 (Ácido palmítico); 16:1n-7 (Ácido palmitoleico) y 18:0 (Ácido esteárico). El índice fagocítico no mostró diferencias entre ambos sueros. En cuanto a la viabilidad celular y el estallido respiratorio, el SD parece ejercer un efecto protector en los macrófagos y estimular la producción de mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere la posibilidad de uso del SD en experiencias futuras similares.

Introducción

La intensificación de la acuicultura conlleva un aumento de brotes de enfermedades infecciosas, siendo el sistema inmunitario la herramienta básica para defenderse de los patógenos, dividiéndose en innato y adquirido, con los macrófagos como uno de sus principales componentes. Poseen actividad fagocítica y capacidad de producción de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Geissmann y Mass, 2015) pudiendo evaluarse diferentes parámetros como el perfil de AG de su membrana o el IF. Tras someter a los macrófagos a un estimulante inmunológico (PMA) se produce el estallido respiratorio donde se generan ROS (Castro *et al.*, 1999) que se cuantifican con espectrofotometría (Reynaud *et al.*, 2001). La expresión génica de citoquinas mediante q-PCR, tras enfrentar a los macrófagos a LPS bacteriano y POLY I:C vírico, sería otro parámetro para analizar la respuesta proinflamatoria, antiinflamatoria, antiviral y actividad apoptótica.

Material y Métodos

- Obtención y descomplementación del SD y extracción de macrófagos de riñón anterior de dorada.
- Extracción de lípidos totales y AG de macrófagos de dorada incubados con SFB, SD o sin suero.
- Actividad fagocítica de macrófagos de dorada incubados con SFB o SD: Preparación de la bacteria (*Vibrio anguillarum*) e IF.
- Viabilidad celular y estallido respiratorio de macrófagos de dorada incubados con SFB o SD.
- Expresión génica de citoquinas en macrófagos de dorada incubados con SFB o SD: Extracción de ARN, RT-PCR y q-PCR.

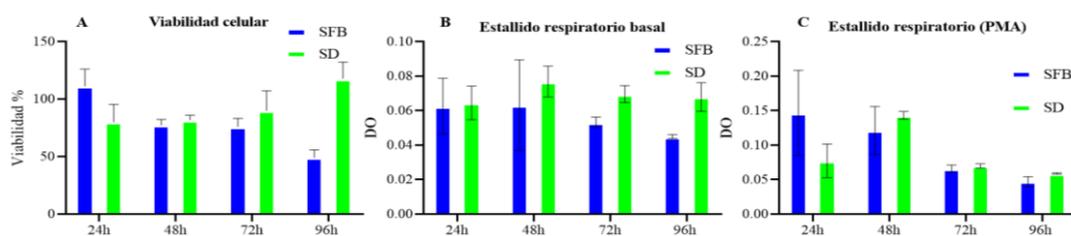
Resultados y discusión

- **Perfil de AG.** Los AG donde hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre ambos sueros fueron: 16:0, 16:1n-7 y 18:0. 16:0 fue el que mayor % presentó sobre el resto de AG siendo la media para SFB $30,45 \pm 0,79$ y $32,35 \pm 0,32$ para SD. En el análisis que realizaron Lee *et al.*, 2023 de SFB también se mostró que 16:0 es el AG predominante, lo que refuerza el hecho de que los AG del suero se reflejan en las células. Para ambos sueros, la cantidad de 20:5n-3 (EPA) fue $<1\%$ y de 22:6n3 (DHA) $<2\%$, siendo para muestras sin suero de $5,75 \pm 0,78$ y $10,25 \pm 0,49$ respectivamente. En células de mamíferos cultivadas con

SFB se ha comprobado que éstas no son capaces de sintetizar AG poliinsaturados (PUFA) y los pocos que incorporan provienen del SFB que de por sí es deficitario en AG poliinsaturados (Else, 2019).

- **Respuesta inmune.** El IF no tuvo diferencias siendo $1,66 \pm 0,26$ para SFB y $1,64 \pm 0,39$ para SD. El IF es difícil de contrastar con otros estudios por falta de coincidencia entre el número de células, la relación célula:bacteria o la especie bacteriana, como estudiaron Qiu., *et al* (2015) en macrófagos de carpa (*Cyprinus carpio*) enfrentados a *Vibrio parahemolyticus* en los que el IF fue de 6,033. En cuanto a la viabilidad celular, como muestra la Figura 1.A, aunque el SFB parte de valores más altos, a lo largo del tiempo es el SD el que mantiene e incluso aumenta la viabilidad del cultivo celular. El estallido respiratorio basal (Fig.1.B) mostró que el SD aporta mayor producción de ROS y más sostenida en el tiempo y tras añadir PMA (Fig.1.C), aunque al inicio el SFB parte de más producción de ROS, en las horas 72 y 96 los valores entre ambos sueros se fueron asemejando. La estimulación de los macrófagos con PMA se traduce en un incremento de la producción de ROS lo que reafirma el hecho de la importancia de estas células en la inmunidad innata como ocurrió tras la estimulación de monocitos de lenguado (*Cynoglossus semilaevis*) (Sha *et al.*, 2017).

Figura 1. Evolución de la viabilidad celular (A), estallido respiratorio basal (B) y estallido respiratorio con PMA (C) SFB vs SD.



Dado que no se encontraron diferencias notables en la composición de AG y que la presencia de SD puede mantener las células viables más tiempo y estimular una mayor producción de ROS, podría pensar en ampliar el uso del SD en futuros experimentos similares.

Palabras clave: Ácidos grasos, dorada (*Sparus aurata*), macrófagos, respuesta inmune.

Bibliografía

- Castro, R., N. Couso, A. Obach y J. Lamas. 1999. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes, *Fish & Shellfish Immunology*. 9: 529-541.
- Else, P.L. 2020. The highly unnatural fatty acid profile of cells in culture. *Progress in Lipid Research*. 11: 101017.
- Geissmann, F y E. Mass. 2015. A stratified myeloid system, the challenge of understanding macrophage diversity. *Seminars in Immunology*. 27: 353-356.
- Lee, D.Y., S.H. Yun, S.Y. Lee, J. Lee, E.J. Mariano, S-T. Joo, I. Choi, J. S. Choi, G-D. Kim, J. Lee, S-H. Choi y S. J. Hur. 2023. Analysis of comercial fetal bovine serum (FBS) and its substitutes in the development of cultured meat. *Food Research International*. 174. 113617.
- Qiu, W., S. Liu, J. Chen, L. Hu, M. Wu y M. Yang. 2016. The primary culture of carp (*Cyprinus carpio*) macrophages and the verification of its phagocytosis activity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 52: 10-19.
- Reynaud, S., C. Duchiron y P. Deschaux. 2001. 3-methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L) macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 175: 1-9.
- Sha, Z., L. Wang, L. Sun, Y. Chen, Y. Zheng, M. Xin, C. Li y S. Chen. 2017. Isolation and characterization of monocyte/macrophage from peripheral blood of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish and Shellfish Immunology*. 65: 256-266.

Correo del autor: yazmina.real101@alu.ulpgc.es (Yazmina Real)