

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE DE EXTRACTOS DE MICROALGAS Y MACROALGAS SOBRE MACRÓFAGOS DE TRUCHA ARCO IRIS

Resumen

La mejora del estado inmunológico de los peces de acuicultura a través de la dieta es un tema de gran interés en el desarrollo de estrategias de prevención y control de enfermedades infecciosas en acuicultura. En este trabajo se utilizaron técnicas *in vitro* como primer paso para evaluar la actividad antioxidante e inmunomoduladora de cuatro especies de microalgas y macroalgas, candidatas a ser incorporadas a piensos de acuicultura. Los extractos metanólicos de *Rhodomonas lens*, *Porphyridium purpureum* y *Mastocarpus stellatus* presentaron una elevada actividad antioxidante, que fue más baja en el caso de *Osmundea pinnatifida*. Todos estos extractos provocaron un aumento en la actividad metabólica de cultivos celulares de macrófagos de trucha arco iris, indicando ausencia de citotoxicidad. Los resultados sugieren que estas especies presentan propiedades inmunomoduladoras y que podrían emplearse como aditivos en piensos de acuicultura para mejorar el estado inmunológico de los peces cultivados.

Introducción

El control de las enfermedades infecciosas es uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la acuicultura. La red FISHEALTH (<https://redfishhealth.es>) pretende contribuir al desarrollo de una estrategia de prevención y control de las patologías infecciosas generando nuevos conocimientos, capacidades y productos que se pondrán a disposición de los acuicultores. Una de las líneas de trabajo se centra en la investigación en ingredientes y aditivos con acción inmunomoduladora de origen marino, vegetal y microbiano, para incorporar a los piensos de acuicultura. Para ello se está avanzando en la estandarización de protocolos *in vitro* e *in vivo*, que puedan ser aplicados de forma sistemática a diversos compuestos o sustancias candidatas.

Se evaluó la actividad antioxidante de dos especies de microalgas: *Rhodomonas lens* y *Porphyridium purpureum*, y de dos macroalgas rojas: *Osmundea pinnatifida* y *Mastocarpus stellatus*. *R. lens*, *P. purpureum* y *M. stellatus* presentan altos contenidos de ficoeritrina, que en los últimos años ha sido profusamente investigada por sus propiedades antioxidantes protectoras contra el estrés oxidativo en células y tejidos, tanto *in vitro* (Jung et al., 2016) como *in vivo* (Soni et al., 2009). Por su parte, *O. pinnatifida* presenta también una notable actividad antioxidante (Silva et al., 2019).

Materiales y métodos

Microalgas y macroalgas

Las microalgas se cultivaron en un fotobiorreactor de columnas y se cosecharon al inicio de la fase estacionaria, *R. lens* mediante filtración en membrana y *P. purpureum* mediante centrifugación. Una vez obtenida la biomasa concentrada, se congeló y liofilizó. *Mastocarpus stellatus* y *Osmundea pinnatifida* fueron proporcionadas por la empresa Porto-Muiños S.L. recolectadas del medio natural y deshidratadas.

Preparación de extractos

Se prepararon extractos concentrados de compuestos fenólicos mediante extracción sólido-líquido (100 mg/ml) con una solución metanólica al 50% y acidificada al 0,1% de ácido fórmico. Estos extractos se evaporaron para eliminar los solventes, se resuspendieron en un mismo volumen de agua MilliQ y se filtraron con filtro de jeringa con poro 0,22 µm para esterilizarlos.

Ensayo de actividad antioxidante

Se realizó un ensayo de determinación de

capacidad antioxidante según el método de screening TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Ensayos de citotoxicidad y actividad inmunomoduladora

Se utilizaron cultivos adherentes de la línea celular (RTS-11; Ganassin y Bols, 1998) de macrófagos derivados de bazo de trucha arco iris. Los extractos -a excepción de los extractos de *R. lens* - se añadieron al medio de cultivo celular en una disolución 1:10 (equivalentes a 10

mg de biomasa/ml de volumen final). El efecto citotóxico se evaluó mediante el indicador de viabilidad celular alamarBlue, utilizando etanol como control positivo para provocar mortalidad de las células, y un control negativo con agua MilliQ. La actividad inmunomoduladora se evaluó con el método CyQuant, para determinar si el aumento de la señal proporcionada por el alamarBlue se debía a una mayor actividad metabólica de los macrófagos o a la proliferación celular.

Resultados y discusión

Actividad antioxidante

Los valores de actividad antioxidante variaron en función del ensayo empleado. *R. lens* dio lugar a los valores máximos en dos de los ensayos, seguida de *P. purpureum*. La mayor actividad antioxidante no parece estar relacionada con el contenido de compuestos fenólicos, notablemente más elevado en las dos macroalgas (Tabla 1).

Citotoxicidad y actividad inmunomoduladora

Ninguno de los extractos mostró actividad citotóxica respecto a los cultivos utilizados como controles negativos, a los que se dio el valor de referencia del 100 % de viabilidad celular. Los valores del ensayo CyQuant indican que el aumento de señal observado en el ensayo de viabilidad se debió a un incremento de la actividad metabólica, ya que no se observa una mayor proliferación celular. Los extractos de *O. pinnatifida* fueron los más activos, dando lugar a una mayor respuesta en el ensayo alamarBlue con una menor proliferación celular (Figura 1).

La incorporación de biomasa de microalgas o macroalgas en la dieta de los peces de acuicultura puede tener efectos beneficiosos sobre su salud desde el punto de vista nutricional o funcional; en particular, sobre determinados parámetros inmunológicos (Wan et al., 2018). Estos ensayos constituyen el primer paso a la hora de evaluar sustancias o compuestos con potencial actividad inmunestimulante que puedan ser utilizados como ingredientes o aditivos funcionales en piensos de acuicultura. Estas propiedades deben ser confirmadas posteriormente en estudios con peces alimentados con dietas que incorporen estos productos.

Tabla 1. Actividad antioxidante contenido total de compuestos fenólicos (CFT) de los extractos de microalgas y macroalgas testados.

	µmoles Trolox eq./g muestra			CFT (µg/g)
	TEAC	ORAC	FRAP	
<i>M. stellatus</i>	26,17±0,15	18,37±3,53	6,39±0,62	2.979±207
<i>O. pinnatifida</i>	10,30±2,67	15,95±2,28	7,07±0,13	3.853±109
<i>P. purpureum</i>	32,58±4,29	16,59±0,68	4,58±0,19	632±31
<i>R. lens</i>	42,95±2,94	4,80±1,65	9,82±0,23	470±84

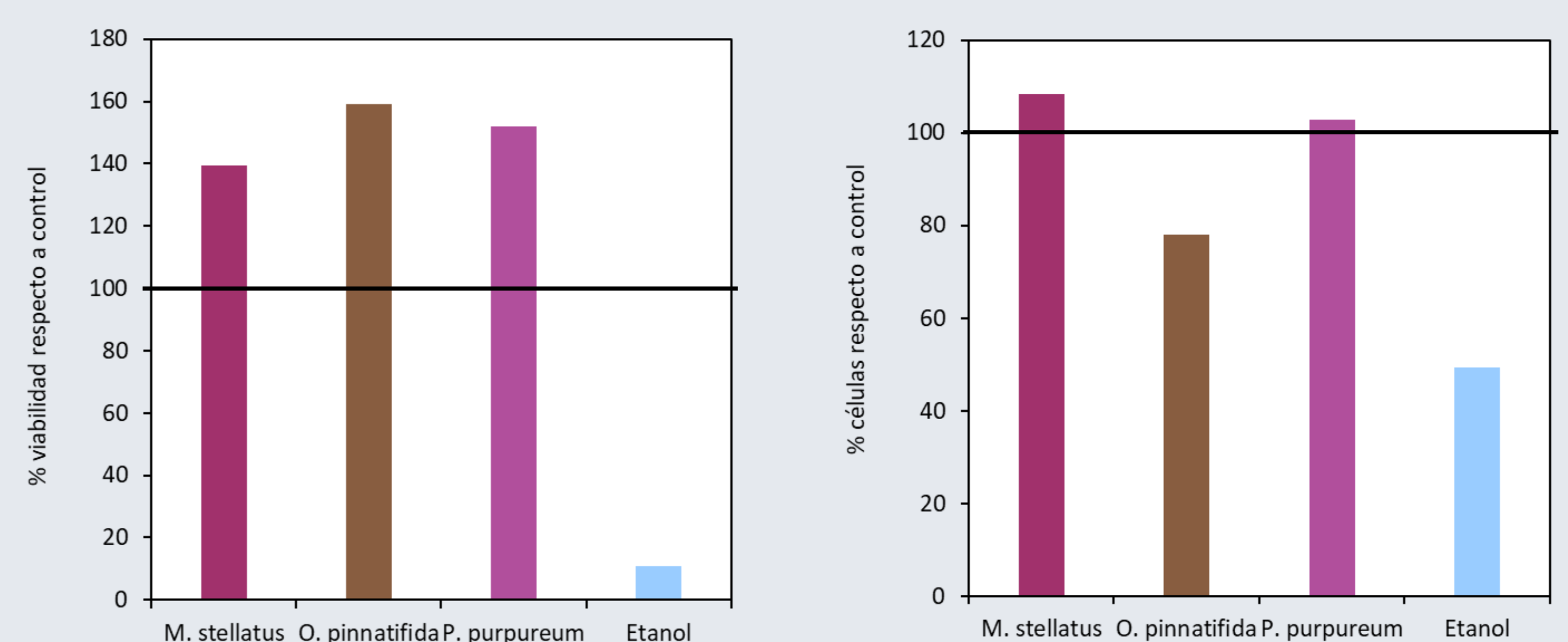


Figura 1. Izquierda, efecto de los extractos sobre la viabilidad celular (ensayo alamarBlue). Derecha, efecto de los extractos sobre la proliferación celular (ensayo CyQuant). Líneas negras: controles negativos de ambos ensayos (valor de referencia del 100 %).

Referencias

- Ganassin, R.C. and Bols, N.C. 1998. Fish Shellfish Immunol. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0153>
 Jung, SM., Park, J.S., Shim, H.J. et al. 2016. Biotechnol Bioproc <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0369-0>
 Badrish Soni, Nishant P. Visavadiya, Datta Madamwar, 2009. Br J Nutr. DOI: 10.1017/S0007114508162973
 Silva, J.P., Alves, C., Pinteus, S. et al. 2019. J. Ocean. Limnol. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-8110-4>
 Wan, A.H.L., Davies, S.J., Soler Vila, A., Fitzgerald, R., Johnson, M.P. 2018. Reviews in Aquaculture. <https://doi.org/10.1111/raq.12241>