

## RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

### **Plantas aromáticas como aditivos de la dieta de peces de acuicultura: efectos sobre el sistema inmunitario, el estrés y el metabolismo**

**José María García Beltrán**

Directores:

Dra. María de los Ángeles Esteban Abad

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

Defendida el 27 de noviembre de 2019 en la Universidad de Murcia (UM)

Realizada en la Facultad de Biología, Departamento de Biología Celular e Histología (UM)

Mención internacional y *cum laude*

### **Resumen**

La acuicultura es el sector de producción animal para alimentación con mayor crecimiento a nivel mundial, el cual ha incrementado durante las últimas décadas y está previsto que siga aumentando, aportando casi dos tercios de pescado para alimentación a nivel mundial en el año 2030, compensando así el estancamiento sufrido por la actividad pesquera desde la década de 1980. Sin embargo, esta gran actividad que tiene lugar en las piscifactorías también conlleva algunos problemas, entre los que se encuentran una gran cantidad de peces por jaula, el empeoramiento de la calidad del agua, el continuo manejo de los peces y la aparición de heridas, lo que implica la aparición de estrés y efectos negativos sobre el sistema inmunitario, provocando inmunosupresión y la aparición de infecciones que pueden provocar la muerte de los peces y, por lo tanto, causar grandes pérdidas económicas. Por ello, los peces son vacunados y los antibióticos han sido usados hasta hace unos años con el objetivo de mejorar su sistema inmunológico para tratar o prevenir enfermedades o infecciones y disminuir su mortalidad, aunque ambos tratamientos pueden tener efectos negativos. En este sentido, la vacunación, aunque es el método más efectivo, no tiene éxito frente a patógenos intracelulares, es patógeno-específica, muy cara, estresante para los peces debido a que tienen que ser manipulados manualmente uno a uno y hay muy pocas vacunas comerciales disponibles. Por su parte, los antibióticos, que han sido usados como profilácticos, promotores del crecimiento y terapéuticamente, han sido añadidos al pienso de los peces, administrados disueltos en el agua o por inyección. Sin embargo, el uso de antibióticos también presenta un gran número de efectos negativos para los peces, para los humanos que los consuman y para el medio ambiente. En primer lugar, los antibióticos se acumulan en los tejidos de los peces y pueden ser transmitidos a los humanos a través de la cadena alimentaria. En segundo lugar, las heces de los peces contienen trazas de antibióticos, por lo que las bacterias marinas están mucho tiempo en contacto con concentraciones no letales de antibióticos, lo que favorece el desarrollo

de bacterias multi-resistentes que acaban causando daño en los animales y en los humanos. Por lo tanto, debido a los problemas derivados del uso de los antibióticos, uno de los pilares fundamentales de la FAO es el desarrollo sostenible económico, social y ambiental de la acuicultura, para lo que se buscan posibles sustitutos de los antibióticos, como, por ejemplo, compuestos inmunoestimulantes naturales que puedan ser usados como medidas profilácticas para fortalecer el sistema inmunitario de los peces.

En este sentido, la fitoterapia o uso de plantas medicinales para la prevención o tratamiento de una gran variedad de enfermedades e infecciones, y para mantener el buen estado de salud, se ha convertido en una muy buena e interesante alternativa al uso de antibióticos, ya que debido a la gran variedad de compuestos biológicos activos presentes en las plantas (fitoquímicos), pueden reemplazarlos como agentes inmunoprolácticos para estimular el sistema inmunitario y además no tienen impacto negativo ni sobre los animales ni sobre los humanos o el medioambiente y son de bajo costo. Estas plantas medicinales se han utilizado durante miles de años en la medicina tradicional de todo el mundo para tratar muchas enfermedades e infecciones, e incluso a día de hoy, casi el 80% de la población mundial, especialmente la de países en vías de desarrollo o subdesarrollados, sigue usando plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades. Además, debido al contenido de hidratos de carbono, proteínas, ácidos grasos, amino-ácidos, minerales, vitaminas y fibras que poseen las plantas medicinales, éstas tienen también un importantísimo valor nutricional, pudiendo tener efectos positivos tales como la estimulación del crecimiento o la maduración temprana. Por último, estas plantas medicinales pueden ser administradas oralmente a través de su adicción al pienso de los peces, lo que permite tratar a un elevado número de peces en muy poco tiempo sin provocarles estrés.

Teniendo en cuenta todos estos conocimientos, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue determinar la posibilidad del uso de plantas, o algunos compuestos presentes en ellas, para la aplicación directa en la acuicultura de peces, y en particular de dorada (*Sparus aurata* L.), debido a que es una especie cultivada en toda el área mediterránea y se trata de la quincuagésimo novena especie más cultivada a nivel mundial y la tercera en la UE, donde España es el cuarto principal productor y la región de Murcia la segunda comunidad autónoma con mayor producción. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

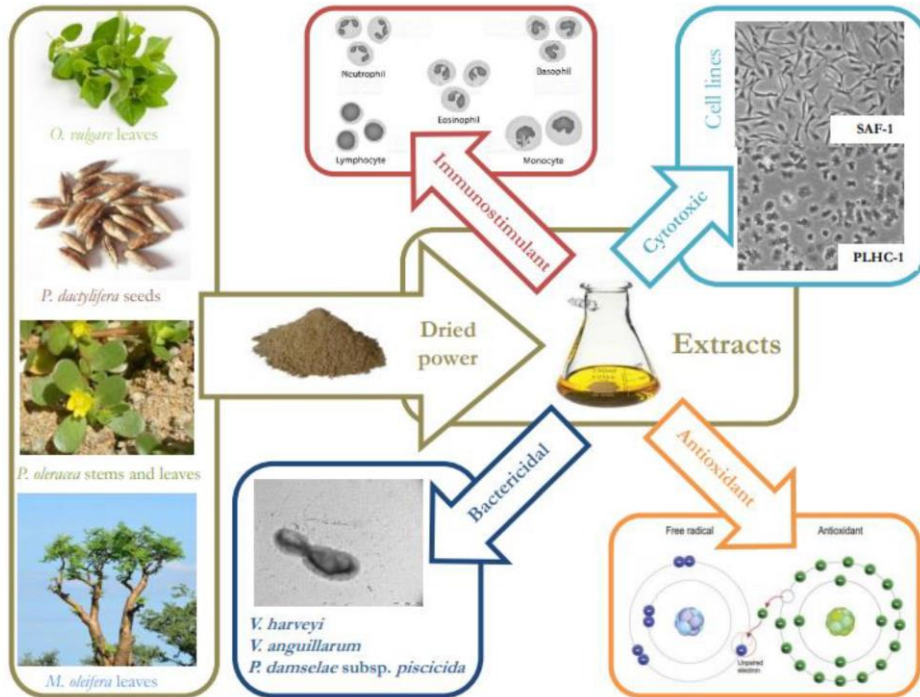
1. Evaluar los efectos *in vitro* de diferentes extractos de plantas en las actividades de los leucocitos de riñón cefálico de dorada y evaluar su actividad citotóxica, bactericida y antioxidante.
2. Evaluar los efectos *in vivo* de distintas plantas como aditivos alimentarios para dorada.
3. Evaluar la actividad bactericida y el efecto *in vitro* sobre la actividad inmunitaria de leucocitos de riñón cefálico de dorada de compuestos idénticos a los naturales (NICs), y su efecto *in vivo* como aditivos alimentarios para dorada.

Para lograr nuestro objetivo dividimos esta Tesis Doctoral en tres partes o capítulos:

En la primera parte (Capítulo 1) estudiamos el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones (0,001 - 1 mg/mL) de extractos acuosos y etanólicos de cuatro plantas diferentes (orégano, semillas de palmera datilera, verdolaga y moringa) en varios tipos de células de peces y contra bacterias, así como su actividad antioxidante. Se evaluó la toxicidad y la capacidad inmunoestimulante de los extractos de plantas en leucocitos de riñón cefálico y una línea celular de fibroblastos (SAF-1), ambas de dorada, mostrando que concentraciones adecuadas demostraron capacidad inmunoestimulante y promovieron la división celular. Posteriormente, demostramos que los extractos de plantas pueden inhibir el crecimiento de células tumorales, como lo indica el efecto

citotóxico contra una línea celular de hepato-carcinoma de pescado (PLHC-1), así como su fuerte actividad antibacteriana contra tres bacterias patógenas de peces (*Vibrio harveyi*, *V. anguillarum* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). Finalmente, también se estudió la actividad antioxidante de los extractos de plantas, que fue muy alta en algunas de las muestras estudiadas.

### Capítulo 1

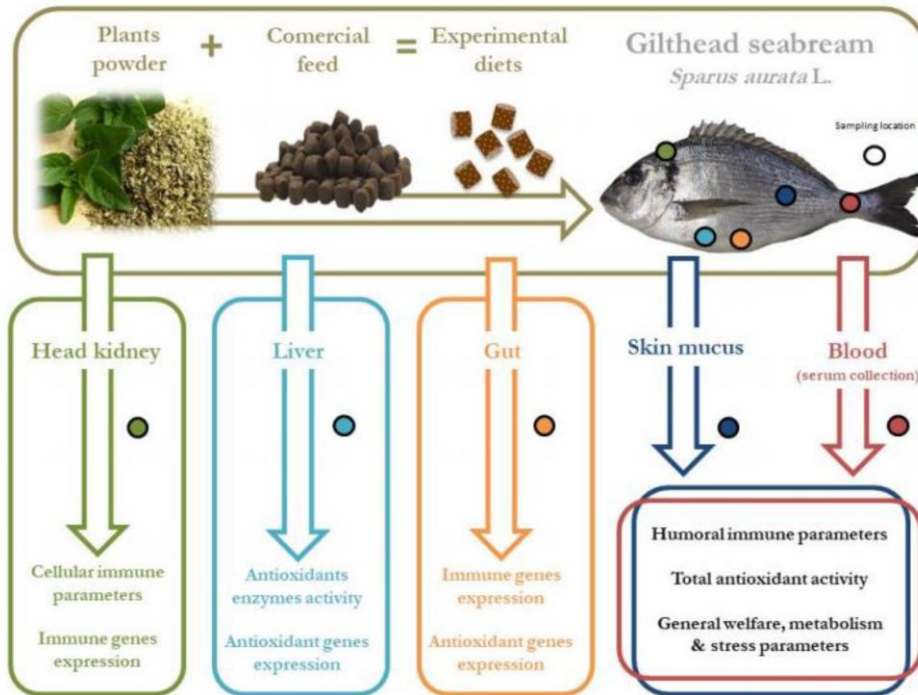


En la segunda parte (Capítulo 2) estudiamos el efecto *in vivo* de algunas plantas (orégano, semillas de palmera datilera y cáscara de limón) incluidas como aditivos en la dieta de dorada. Primero evaluamos el efecto sobre el crecimiento, y ninguna de las dietas suplementadas con plantas logró promover la mejora del crecimiento de la dorada, e incluso la dieta con cascara de limón lo disminuyó. Después evaluamos el efecto de la adición de plantas a la dieta sobre el sistema inmunitario innato y adaptativo de la dorada, incluyendo parámetros humorales (inmunoglobulina M [IgM] y actividad hemolítica natural del complemento, lisozima, bactericida, proteasa, antiproteasa y peroxidasa en suero y moco de la piel) y celulares (actividad fagocítica, explosión respiratoria y peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico). A su vez, también se estudió el efecto de las plantas sobre la actividad de enzimas antioxidantes del hígado (glutación reductasa, superóxido dismutasa y catalasa) y la actividad antioxidante total presente en el suero y el moco de la piel. Finalmente, también se estudió la expresión de numerosos genes relacionados con la inmunidad en riñón cefálico y genes antioxidantes en hígado. En general, se obtuvieron resultados positivos tanto en la respuesta inmune humoral y celular como en la expresión génica, así como una tendencia a mejorar el estado antioxidante de los peces. Finalmente, también se consideró el efecto de la piel de limón sobre el metabolismo de los peces y se observó que su adición tenía algún efecto negativo o perjudicial en el metabolismo.

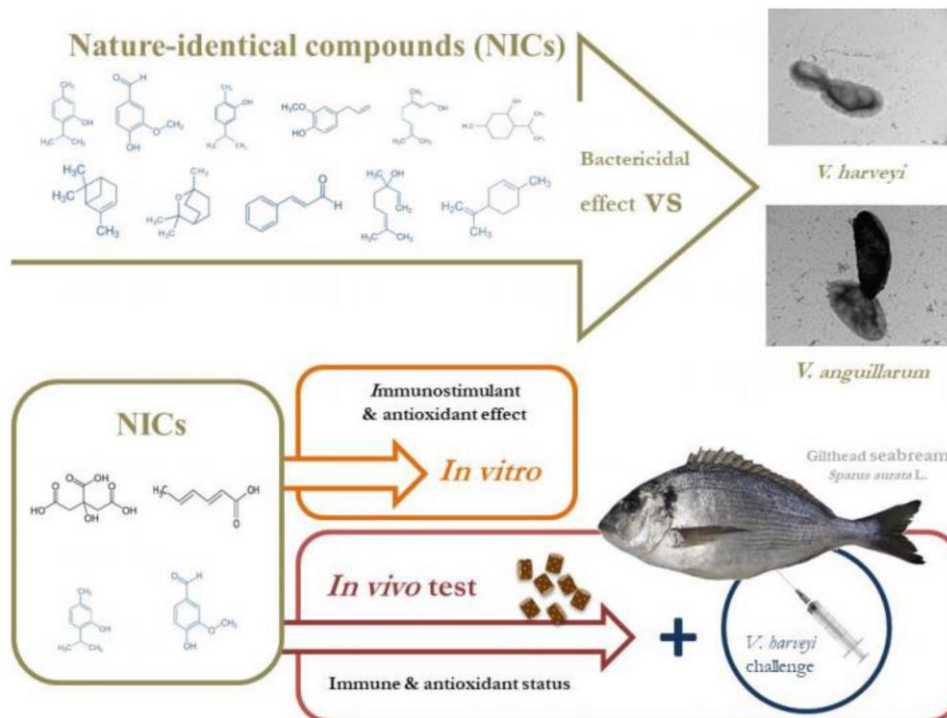
En la tercera parte (Capítulo 3) estudiamos los efectos *in vitro* e *in vivo* de compuestos idénticos a los naturales (NICs) ("fitoquímicos artificiales"). En primer lugar, los fitoquímicos mostraron *in vitro* una actividad antibacteriana muy fuerte contra *V. harveyi* y *V. anguillarum*, pero no mostraron efectos adversos sobre la viabilidad y la respuesta

inmune de los leucocitos de riñón cefálico de dorada. En segundo lugar, probamos los efectos de la adición de diversas concentraciones de una mezcla de NICs a la dieta de dorada sobre el crecimiento y el estado inmunitario y oxidativo de los peces después de desafiarlos con una infección bacteriana o no, mejorando la mezcla de NICs el crecimiento y los parámetros inmunitarios de la dorada.

Capítulo 2



Capítulo 3



*Palabras clave:* acuicultura, plantas aromáticas, aditivos alimentarios.

## Publicaciones de la Tesis

---

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/10201/84801>

- García Beltrán, J. M., González Silvera, D., Espinosa, C., Campo, V., Chupani, L., Faggio, C., Esteban, M. A. (2020). Effects of dietary *Origanum vulgare* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune and antioxidant status. *Fish and Shellfish Immunology*, 99: 452–461. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.02.040
- García Beltrán, J. M., Mansour, A. T., Alsaqufi, A. S., Ali, H. M., Esteban, M. A. (2020). Effects of aqueous and ethanolic leaf extracts from drumstick tree (*Moringa oleifera*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, and their cytotoxic, antitumor, bactericidal and antioxidant activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 106: 44–55. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.06.054
- Cámara-Ruiz, M., García Beltrán, J. M., Guardiola, F. A., Esteban, M. A. (2020). *In vitro* and *in vivo* effects of purslane (*Portulaca oleracea* L.) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *AIMS Agriculture and Food*, 5(4): 799–824. DOI: 10.3934/agrfood.2020.4.799
- García Beltrán, J.M., Mahdhi, A., Abdelkaer, N., Hatem, M., Esteban, M. A. (2020). Effect of the Administration of Date Palm Seeds (*Phoenix dactylifera* L.) in Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Diets. *J. Agric. Sci. Crop. Res.*, 1(1):102.
- García Beltrán, J. M., Espinosa, C., Guardiola, F. A., Manuguerra, S., Santulli, A., Messina, C. M., Esteban, M. A. (2019). Effects of dietary dehydrated lemon peel on some biochemical markers related to general metabolism, welfare and stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 50(11), 3181–3191. DOI: 10.1111/are.14272
- García Beltrán, J. M., Espinosa, C., Guardiola, F. A., Esteban, M. A. (2018). *In vitro* effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish and Shellfish Immunology*, 79: 1–10. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.05.005
- García Beltrán, J. M., Espinosa, C., Guardiola, F. A., Esteban, M. A. (2017). Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 64: 426–436. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.03.042
- García Beltrán, J. M., Esteban, M. A. (2016). Properties and applications of plants of *Origanum* sp. genus. *SM J. Biol.*, 2(1): 1006.