

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE TESIS

# 

**“DESARROLLO DE PROTEÍNAS NANOESTRUCTURADAS COMO INMUNOESTIMULANTES DE USO ORAL PARA *Salmo salar* CONTRA *Piscirickettsia Salmonis*”**

**Alumno:** Daniela López

**Profesor Patrocinante:** José Gallardo Matus

Valparaíso, Fecha

## RESUMEN:

Debe indicar claramente los principales puntos que se abordarán en su investigación y que incluya: breve introducción, hipótesis, objetivos específicos, metodología y resultados que se espera obtener. Su extensión no debe exceder esta página, con tipo y tamaño de letra semejante al aquí utilizado (Verdana 12).

## 1. FORMULACIÓN DE LA PROPUESTA, MARCO TEÓRICO Y DISCUSIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Esta sección debe contener la exposición general de la propuesta, precisar los aspectos nuevos a desarrollar, señalando los enfoques actualmente en uso en el tema de investigación, así como los fundamentos teóricos y análisis de la información bibliográfica actual que lo avalan. La extensión máxima de esta sección es de 6 páginas con tipo y tamaño de letra semejante al aquí utilizado (Verdana 12). En hojas adicionales incluya el listado de referencias bibliográficas citadas.

La acuicultura, denota todas las formas de cultivo de animales y plantas acuáticas en ambientes frescos, salobres y marinos. Se ha desarrollado como actividad de subsistencia, que permite producir alimentos, con mayor velocidad y cantidad que la ganadería (Pillay & Kutty, 2005). El desarrollo tecnológico ha permitido el mejor aprovechamiento de los recursos acuáticos, y, durante las últimas tres décadas, la producción acuícola ha aumentado aproximadamente un 11%. Actualmente, son cultivadas alrededor de 600 especies diferentes de animales marinos y de agua dulce, de diferentes niveles tróficos, y cada vez, incrementan las especies cultivadas (Troell et al., 2017)(Metian et al., 2020)

La piscicultura está dominada por Asia, que ha producido el 89% del total mundial en términos de volumen en los últimos 20 años. Fuera de China, Chile figura entre los países productores más importantes. Chile cuenta con una superficie marítima de 3,15 millones de km2 destinadas a la producción acuícola, y los ecosistemas favorecen la productividad. Esto le otorgan ventajas como productor de recursos acuícolas altamente valorados y demandados en los mercados mundiales (Gobierno de Chile CONICYT & Unión Europea, 2007).

A fines de la década de 1980, Chile entró oficialmente en el grupo de países productores de salmón (*Salmo Salar*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*), convirtiéndose en el segundo país del mundo con mayor producción en estas especies (Ibieta et al., 2011). Las empresas de cultivo de salmón aumentaron y la producción creció enormemente. Actualmente, produce alrededor de 924.000 toneladas de salmón, y aproximadamente 3,6 millones de toneladas de productos del mar en 2018, lo que representa el 2,2% del total mundial (Cárcamo et al., 2021).

La sostenibilidad de la acuicultura, ha sido debatida desde el año 2000 (Naylor et al., 2021). Al ser la acuicultura un importante motor económico, aumenta rápidamente, más aún, con el crecimiento de la población y la adquisición de cada vez más, nuevos hábitos de alimentación saludable (Rodríguez-Luna et al., 2021). Sin embargo, la acuicultura implica un efecto potencial negativo sobre el medio ambiente, ya que varios productos químicos de cultivo, así como enfermedades y parásitos pueden ser liberados directamente en las aguas subyacentes (Dabi, 2015). Por tanto, aprovechar el potencial de la acuicultura para contribuir positivamente a la transformación del sistema alimentario requerirá mejores sistemas de producción, que faciliten la acuicultura sostenible (Henriksson et al., 2021).

El crecimiento de la acuicultura ha ido acompañado del surgimiento, o re-emergencia, de varias enfermedades infecciosas. Esto debido a que la producción a gran escala implica alta densidad poblacional, proporcionando las condiciones para la propagación de las infecciones (Pérez-Sánchez et al., 2018). Las enfermedades infecciosas prevalecen en las poblaciones porque los peces de cría, a menudo no coevolucionan con agentes infecciosos locales, pero el extenso uso de antibióticos (en Chile de 900 g/ton de biomasa cosechada, <http://oceana.org/>) genera una presión selectiva sobre el patógeno haciendo que sea cada vez más resistente y persistente (Lafferty et al., 2015).

Las enfermedades infecciosas son uno de los principales factores limitantes en la acuicultura (Pérez-Sánchez et al., 2018). Estas, representan grandes pérdidas económicas, ya que, se estima que hasta el 10% de todos los animales acuáticos cultivados se pierden debido a enfermedades infecciosas, lo que equivale a más de 10 mil millones de dólares en pérdidas anuales a escala mundial (Adams, 2019).

En Chile, segundo país de mayor producción de Salmón en el mundo, una de las principales enfermedades infecciosas que amenaza la industria salmonera, es la Salmonid Rickettsial Septicaemia (SRS), cuyo agente etiológico es la *Piscirickettsia salmonis*, y es responsable del 50,5 al 97,2% de la mortalidad total de las enfermedades en salmón (Mardones et al., 2018). Este patógeno intracelular, genera pérdidas anuales que superan los 700 millones de dólares en Chile (Pontigo et al., 2021). Debido no solo a la mortalidad, sino también a los costos asociados al uso de antibióticos, vacunas y otras medidas para su prevención y control (Maisey et al., 2017).

Desde el punto de vista sanitario, el control del SRS ha sido difícil en Chile principalmente debido a la amplia difusión y alto grado de endemicidad del patógeno en las regiones salmoneras. La probabilidad de reportar mortalidades por SRS en cualquier ciclo de producción se ha estimado en 82,5%, lo que sugiere que ni el uso actual de vacunas o antibióticos contra *P. salmonis* han sido estrategias efectivas para eliminar la infección (Mardones et al., 2018).

La vacunación representa una estrategia de control importante, para enfermedades infecciosas; sin embargo, su eficacia suele ser limitada o ineficaz cuando se aplica a peces que no son completamente inmunocompetentes (Pérez-Sánchez et al., 2018). Actualmente, hay 32 vacunas comercialmente disponibles contra la piscirickettsiosis, desde vacunas monovalentes vivas atenuadas, hasta vacunas pentavalentes inactivadas, incluida la bacterina 17 de *P. salmonis* (Figueroa et al., 2020). A pesar de ello, aproximadamente el 87% de las poblaciones de peces vacunados aún pueden verse afectadas por la enfermedad clínica, demostrando la ineficacia de la mayoría de las vacunas (Mardones et al., 2018; Love et al., 2020) .

Aún, hoy en día, la mayoría de las vacunas autorizadas para teleósteos todavía usan patógenos inactivados completos. Varios factores como la diversidad de especies, serotipos del patógeno, y la diversidad de especies de peces de cultivo suponen una limitación para la eficacia de las vacunas basadas en patógenos completos (Chukwu et al., 2022). Además, se ha sugerido que los niveles circulantes de anticuerpos para *P. salmonis* disminuyen solo unos meses después de la vacunación, por lo que los peces podrían ser más susceptibles, esto, junto a que la variación genética del huésped, son factores intrínsecos, o propios del pez, que hacen ineficiente la vacunación (Figueroa et al., 2020)

Dada la necesidad de

Algunas de estas vacunas han protegido con éxito a los peces contra una variedad de enfermedades como furunculosis, vibriosis, úlcera de invierno, piscirickettsiosis y enfermedad de la boca roja entérica causada por A. salmonicida, V. anguillarum, M. viscosa, P. salmonis y Y. ruckeri, respectivamente. [35]. Sin embargo, varios factores como la diversidad de especies y serotipos de patógenos [36], las coinfecciones [37] y la diversidad de especies de peces de cultivo suponen una limitación para la eficacia de las vacunas basadas en patógenos completos [36]. Específicamente, las vacunas de microbios inactivados completos provocan una protección más corta y una respuesta inmune débil porque se ha informado que las bacterias inactivadas inducen una inmunidad celular modesta en los peces [38,39]. Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas polivalentes que proporcionen una protección inmunitaria duradera frente a varios patógenos para los peces huéspedes. Cuando las vacunas solo protegen a los huéspedes de los síntomas de la enfermedad, pero permiten cierto nivel de infección por patógenos y transmisión posterior, pueden conducir a la selección de cepas más virulentas [40,41,42]. Las vacunas de subunidades recombinantes, que se basan en antígenos dirigidos específicamente, son más eficaces para inducir respuestas inmunológicas humorales y mediadas por células, y se reducen los riesgos asociados con la evolución de la virulencia [43].

Las vacunas multivalentes utilizadas en la acuicultura del salmón del Atlántico (Salmo salar) todavía emplean la misma formulación de vacuna convencional basada en microbios inactivados completos [36]. Por ejemplo, la microvacuna Forte producida por Elanco contiene cultivos inactivados con formalina de A. salmonicida, V. anguillarum serotipos I y II, V. ordalii y V. salmonicida serotipos I y II en emulsión líquida con un adyuvante a base de aceite [44] . Alpha Ject micro 4 producido por Pharmaq contiene cultivos inactivados con formalina de A. salmonicida subsp. salmonicida, Listonella (Vibrio) anguillarum serotipos O1 y O2 y V. salmonicida [45]. La eficacia de estas vacunas polivalentes basadas en microbios completos inactivados puede verse limitada por la presencia de epítopos inmunosupresores [36,40] y la competencia o interferencia de antígenos [46,47]. Es importante seleccionar cuidadosamente el número y las propiedades de los antígenos bacterianos en las vacunas polivalentes para evitar los efectos inhibitorios de los antígenos sobre la respuesta específica de los peces [48].

Sistema Inmune

Los peces tienen un fuerte sistema inmunológico innato que puede hacer frente a una gran variedad de agentes infecciosos. Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado mecanismos de evasión para resistir las defensas inmunitarias innatas y, en tales casos, el sistema inmunitario adaptativo, que evolucionó por primera vez en los primeros vertebrados, debe entrar en juego para combatir estos patógenos (8). Los sistemas inmunitarios innato y adaptativo están entrelazados, y la magnitud y la especificidad de las señales percibidas por las células inmunitarias innatas después de la infección o la vacunación dan forma a las respuestas inmunitarias adaptativas posteriores (9). (Wangkahart *et al*., 2018).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra agentes patógenos, y su principal función es el reconocimiento temprano de patógenos y la activación de una respuesta proinflamatoria adecuada (Medzhitov, 2007). La IL-12 promueve la transformación de las células T helper (Th1) y estimula la secreción de IFN-γ e IL-2, que a su vez regulan la proliferación de células T, la maduración de las células T CD8+ y la activación de la respuesta inmune celular dirigida a controlar los patógenos intracelulares (Yamane y Paul, 2012). La infección in vitro de macrófagos de trucha arcoíris (Álvarez et al., 2016) y la infección in vivo de salmón del Atlántico post-smolt (Rozas-Serri et al., 2017b) con P. salmonis inducen la sobreexpresión de IL-10 y regulan a la baja la IL-12 expresión, contribuyendo así a la inactivación de la respuesta antibacteriana y la promoción de la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria (Rozas et al., 2018).

Los inmunoestimulantes son compuestos químicos que activan los leucocitos y, por lo tanto, pueden hacer que los animales sean más resistentes a las infecciones. La respuesta inmunitaria innata se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como ARN de doble cadena, flagelina, lipopolisacárido (LPS) y β-glucanos (9, 14), por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como Toll receptores tipo C (TLR), receptores de lectina tipo C (CLR), receptores tipo NOD (NLR) y receptores tipo RIG-I (RLR) (15). En presencia de PAMP, el sistema inmunitario responderá como si lo desafiara un microbio patógeno. Por lo tanto, los PAMP, cuando se administran antes de una infección, pueden elevar las defensas y funcionar como inmunoestimulantes. También pueden funcionar como adyuvantes cuando se formulan con vacunas, para elevar la respuesta inmunitaria adaptativa específica (11–13). (Wangkahart *et al*., 2018).

Inmunoestimulantes

Proteinas recombinantes

Cuerpos de inclusión

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En base al punto anteriormente expuesto, sintetice el problema que va a abordar y los aspectos biotecnológicos que sustentan la solución de éste en su propuesta de tesis doctoral. Extensión máxima 1 página.

## 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Explicite la o las hipótesis de trabajo. Extensión máxima de Hipótesis y Objetivos una página.

## 4. OBJETIVOS: (General y específicos).

## 

## 5. METODOLOGÍA:

Para cada uno de los objetivos específicos, describa los métodos que planea utilizar y justifíquelos. Identifique el equipamiento y principales materiales requeridos, describa las técnicas experimentales y justifique el/los diseño(s) experimental(es) propuesto(s). La extensión máxima de esta sección es de 2.000 palabras. En forma adicional incluya esquemas y figuras.

## 6. PLAN DE TRABAJO:

En relación con los objetivos planteados, señale en una carta Gantt, las etapas y actividades contempladas en la investigación. Extensión máxima 1 página.

## 7. TRABAJO ADELANTADO:

Si lo hubiese, resuma los principales resultados de sus trabajos anteriores sobre el tema. Extensión máxima 2 páginas incluidas tablas, figuras o imágenes.

## 8. OTROS ANTECEDENTES:

Señale otros aspectos que Ud. considere relevantes para la evaluación de su propuesta y que no estén especificados en otras secciones, financiamiento, intención de colaboración con otros grupos de investigación nacionales o internacionales, difusión de su tema de tesis o de los avances de su tesis. Extensión máxima 1 página.

## 

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Wangkahart E., Secombes C. & Wang T. (2019). Studies on the Use of Flagellin as an Immunostimulant and Vaccine Adjuvant in Fish Aquaculture. Front. Immunol. Vol. 9. 10.3389/fimmu.2018.03054

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

HLPE (2014). Sustainable fisheries and aquaculture for food security and nutrition. A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security, Rome.

Mugimba K., Byaruga D., Mutoloki S., Evensen O. & Munang H. (2021). Challenges and

Cárcamo, P. F., Henríquez-Antipa, L. A., Galleguillos, F., & Figueroa-Fábrega, L. D. (2021). Marine stocking in Chile: a review of past progress and future opportunities for enhancing marine artisanal fisheries. *Bulletin of Marine Science*, *97*(4), 729–748. https://doi.org/10.5343/bms.2020.0052

Chukwu, J., Cao, T., Vasquez, I., Gnanagobal, H., Hossain, A., Machimbirike, V., & Santander, J. (2022). Comparative Reverse Vaccinology of Piscirickettsia salmonis, Aeromonas salmonicida, Yersinia ruckeri, Vibrio anguillarum and Moritella viscosa, Frequent Pathogens of Atlantic Salmon and Lumpfish Aquaculture. *Vaccines*, *10*(2), 473. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/vaccines10030473

Dabi, M. (2015). The Impact of Aquaculture on the Environment: A Ghanaian Perspective. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE & TECHNOLEDGE*, *3*(7), 106–113. https://www.researchgate.net/profile/Michael-Dabi-3/publication/282114327\_The\_Impact\_of\_Aquaculture\_on\_the\_Environment\_A\_Ghanaian\_Perspective/links/5602def608ae596d2591b97e/The-Impact-of-Aquaculture-on-the-Environment-A-Ghanaian-Perspective.pdf?origin=pub

Figueroa, C., Veloso, P., Espin, L., Dixon, B., Torrealba, D., Said, I., Alfonso, J., Soto, C., Conejeros, P., & Gallardo, J. (2020). Host genetic variation explains reduced protection of commercial vaccines against Piscirickettsia salmonis in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, *10*(18252). https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-020-70847-9

Gobierno de Chile CONICYT, & Unión Europea. (2007). *The fishery and aquaculture sectors in Chile*. https://www.conicyt.cl/documentos/dri/ue/Pesca\_Acuic\_Fishery\_Aquac\_BD.pdf

Henriksson, P. J. G., Troell, M., Banks, L. K., Belton, B., Beveridge, M. C. M., Klinger, D. H., Pelletier, N., Phillips, M. J., & Tran, N. (2021). Interventions for improving the productivity and environmental performance of global aquaculture for future food security. *One Earth*, *4*(9), 1220–1232. https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.009

Ibieta, P., Tapia, V., Venegas, C., Hausdorf, M., & Takle, H. (2011). Chilean Salmon Farming on the Horizon of Sustainability: Review of the Development of a Highly Intensive Production, the ISA Crisis and Implemented Actions to Reconstruct a More Sustainable Aquaculture Industry. In *Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny*. InTech. https://doi.org/10.5772/30678

Lafferty, K., Harvell, D., Conrad, J., Carolyn, F., Kent, M., Kuris, A., Powell, E., Rondeau, D., & Saksida, S. (2015). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine*, *7*, 471–496. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646

Love, D., Fry, J., Cabello, F., Good, C., & Lunestad, B. (2020). Veterinary drug use in United States net pen Salmon aquaculture: Implications for drug use policy. *Aquaculture*, *518*(734820), 1–12. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734820

Mardones, F., Paredes, F., Medina, M., Tello, A., Valdivia, V., Ibarra, R., Correa, J., & Gelcich, S. (2018). Identification of research gaps for highly infectious diseases in aquaculture: The case of the endemic Piscirickettsia salmonis in the Chilean salmon farming industry. *Aquaculture*, *482*, 211–220. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.048

Metian, M., Troell, M., Christensen, V., Steenbeek, J., & Pouil, S. (2020). Mapping diversity of species in global aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *12*(2), 1090–1100. https://doi.org/10.1111/raq.12374

Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, *591*(7851), 551–563. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6

Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*, *26*(11), 896–903. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002

Pillay, T., & Kutty, M. (2005). *Aquaculture pinciples and practices* (Second Edi). http://www.agrifs.ir/sites/default/files/AQUACULTURE.pdf

Pontigo, J. P., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendaño-Herrera, R., Figueroa, J., Rauch, C., Troncoso, J., Vargas-Chacoff, L., & Yáñez, A. (2021). Protein-Based Vaccine Protect Against Piscirickettsia salmonis in Atlantic Salmon (Salmo salar). *Frontiers in Immunology*, *12*(602689), 1–13. https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602689

Rodríguez-Luna, D., Vela, N., Alcalá, F. J., & Encina-Montoya, F. (2021). The Environmental Impact Assessment in Aquaculture Projects in Chile: A Retrospective and Prospective Review Considering Cultural Aspects. *Sustainability*, *13*(16), 9006. https://doi.org/10.3390/su13169006

Rozas, M., Peña, A., & Maldonado, L. (2018). Transcriptomic profiles of post-smolt Atlantic salmon challenged with Piscirickettsia salmonis reveal a strategy to evade the adaptive immune response and modify cell-autonomous immunity. *Development & Comparative Inmunology*, *81*, 348–362. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.023

Troell, M., Kautsky, N., Beveridge, M., Henriksson, P., Primavera, J., Rönnbäck, P., Folke, C., & Jonell, M. (2017). Aquaculture ☆. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02007-0