
Resumen

La pérdida del equilibrio Ambiente \leftrightarrow Patógeno \leftrightarrow Hospedero es la causa de la mayoría de las enfermedades presentes en la acuicultura, y es por eso que es estrictamente necesario cimentar las bases de una comprensión íntegra del sistema inmune de peces, para así, poder generar tecnología que pueda sobreponerse a estos paradigmas. Esto tiene suma importancia sobretodo en la industria acuícola, la cual produce anualmente, 158 millones de toneladas de pescado, las cuales se traducen aproximadamente en 217.500 millones de dólares (USD), más aún, de toda esa producción, 136 millones de toneladas son exclusivamente destinadas a consumo humano. Esto demuestra el potencial presente en esta industria, la que se ve año a año afectada por mortalidades debidas a la perdida del equilibrio antes mencionado, generándose cuantiosas pérdidas a nivel comercial.

Los inmunoestimulantes han surgido como una opción viable, escalable y económica para solventar parte de los problemas de la acuicultura, fortaleciendo, en distintos estadíos de desarrollo, la capacidad de respuesta inmune de los organismos cultivados. No obstante existen distintas estrategias de inducción de la inmunomodulación, como por ejemplo vacunas, suspensión oral y liberación en el alimento, entre otras.

La liberación en dieta es una estrategia que ha demostrado ser una opción viable y no invasiva para la entrega de vacunas o inmunomoduladores. Un tema crucial es establecer la evaluación del efecto modulador de los inmunoestimulantes.

La inmunidad de mucosas en teleósteos ha sido recientemente objeto de investigación en los últimos años, debido a su diversidad y características. Las branquias de los peces son, en término de superficie expuesta, el mayor tejido en muchas especies de teléosteos, siendo el órgano principal para mantener la homeostasis del pez por la ingesta de nutrientes y sustancias, así como también formando una barrera activa en contra de la entrada de patógenos. Existen antecedentes de la presencia células relacionadas con la respuesta inmune, como macrófagos, granulocitos, y linfocitos B y T, evidenciando el potencial de este órgano para evaluar el efecto de moléculas inmunomoduladoras y su efecto en la ingesta del pez.

En este estudio se utilizó una dieta en base a harina de pescado y otros nutrientes con la cualidad de contener Zimosán A para ser liberado en la alimentación de especímenes de trucha arcoiris. Durante 28 días de tratamiento muestras de tejido branquial fueron obtenidas para evaluar la capacidad de respuesta inmune que refleja el organismo con este inmunoestimulante en su dieta. La capacidad

de respuesta inmune fue cuantificada y caracterizada considerando la expresión y disponibilidad de moléculas reguladoras y efectoras de inmunidad. Por su rol en la respuesta inmune los marcadores seleccionados a estudiar fueron: TNF- α , IL-1 β , IL-1 β , IL-12, IFN- γ e iNOS. Mediante ensayos de PCR en tiempo real se pudo evaluar que la respuesta reflejada a la inducción por este β -glucano empieza a levantarse con respecto a los controles con dieta sin inmunoestimulante pasado el día 14 del estudio y se mantiene hasta el día 28 en la mayoría de los casos. Teniendo en común estas fechas para todos los marcadores evaluados.

La disponibilidad de estas moléculas fue evaluada mediante ELISA indirecto, obteniendo resultados de aumento de esta a partir del día 21 de muestreo. Mediante inmunohistoquímica de fluorescencia en el propio tejido, se comprobó que el incremento de la actividad transcripcional se corresponde posteriormente con la disponibilidad tisular de las moléculas.

De esta forma con los datos obtenidos se generó una matriz de correlación donde se pudo determinar que la inmunoestimulación vía dieta con *Zimosán A* puede ser evaluada a partir de la tercera semana de alimentación en base a parámetros de cuantificación, tanto a nivel transcripcional como de proteínas, especialmente en el pro-inflamatorio TNF- α y el activador de macrófagos IFN- γ .

Las herramientas generadas en esta tesis son un gran aporte para mejorar los análisis de campo, usando un método de entrega de inmunoestimulantes no invasivo y estableciendo los marcadores y los tiempos para evaluar la respuesta inmune de los peces en cultivo.

Abstract

Oncorhynchus mykiss gill tissue as a model to evaluate the immunomodulatory effect of β -glucan Zymosan supplemented diets.

The loss of balance between Environment \leftrightarrow Pathogen \leftrightarrow Host is one of the main causes of fish diseases in the global aquaculture. Because of this, a comprehensive understanding of the fish immune system is required to generate new approaches that can overcome this paradigm. This is especially important in the fish farming industry, which produces annually 158 million tons of fish equals to approximately 217,500 million dollars. Furthermore, 136 million tons of this global production is exclusively focused on human consumption. This demonstrates the importance of this industry and the need of controlling the massive losses of commercial and human capital because fish mortalities.

Immunostimulants have emerged as viable, scalable and economical option to solve in part the problems of aquaculture, strengthening the immune response of farmed species at different stages of development. . Several strategies for inducing immunomodulation, such as vaccines, exposure to immunostimulants baths, inclusion of immunostimulants in the food, among others, are currently available.

The inclusion of immunostimulants diets is a strategy that has been proven to be a viable option for non-invasive delivery. A crucial fact on this subject is to establish the proper evaluation of the immunomodulatory effect.

Mucosal immunity has recently been considered to be fundamental in teleost because its diversity and features. The gills of fish are the largest tissue in many teleost species in terms of exposed surface,. This organ has a central role in the maintenance of the homeostasis of the fish because the intake of nutrients and substances function and by forming an active barrier against pathogen entry. Several studies showed the existence of related immune cells, such as macrophages, granulocytes and lymphocytes B and T in the gills, showing the potential of this organ to assess the effect of immunomodulatory molecules and their intake effect on fish.

In this study we evaluated the immune response in the gill tissue of rainbow trout fed with 0.3 % zymosan-supplemented diet. Gills were dissected at 0, 7, 14, 21 and 28 days during the experimental trial to assess the expression of different regulatory and effector immune molecules. Because their central role in the immune response, the regulators and effectors immune molecules were : TNF- α ,

IL-1 β , IL-12, IFN- γ and iNOS. Results on the gene expression by qPCR showed that the expression of several immune genes to the zymosan supplemented diet increase after 14 days of treatment, which is maintained until day 28 in most of the cases. The availability of these molecules at the protein level was observed from day 21 by indirect ELISA. Through immunohistochemical fluorescence analysis in the gill tissue, it was found that the increase in transcriptional activity of the pro-inflammatory TNF- α and the macrophage activator IFN- γ was correlated with the availability of the protein.

Finally, a correlation matrix was generated with the obtained data. It was determined that the oral immunostimulation with a Zymosan A supplemented diet can be evaluated from the third week of feeding using quantification parameters, either at the transcriptional level as well as availability of proteins, for TNF- α and IFN- γ .

The tools generated in this study are a great contribution to improve the analysis of the immunostimulatory effects of supplemented diets in fish. We succeed in establishing a non-invasive method of delivery of immunostimulants determining immune response markers and the precise time points to evaluate the immunomodulation in the rainbow trout.