



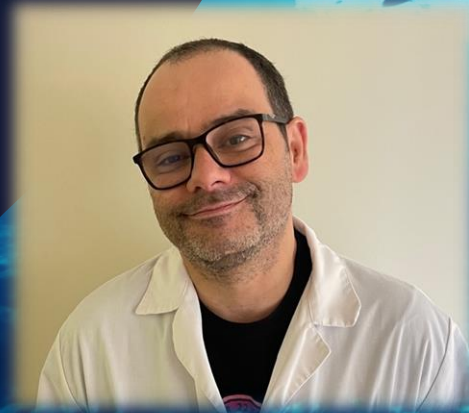
Aplicaciones biotecnológicas orientadas a la prevención de patologías en acuicultura

Federica Farabegoli, DVM

PhD in Ciencias Veterinarias, Universidad de Bologna, Italia

Dep. Biotecnología y Salud, ANFACO-CECOPESCA

Credits, Jorge Lago y Francisco Santaclara





Prácticas intensivas necesarias para satisfacer la creciente demanda del mercado.

Elevada densidad y difícil control de enfermedades potencialmente letales y zoonóticas.

Población mundial que se espera alcance los **10.000 millones en 2050**.

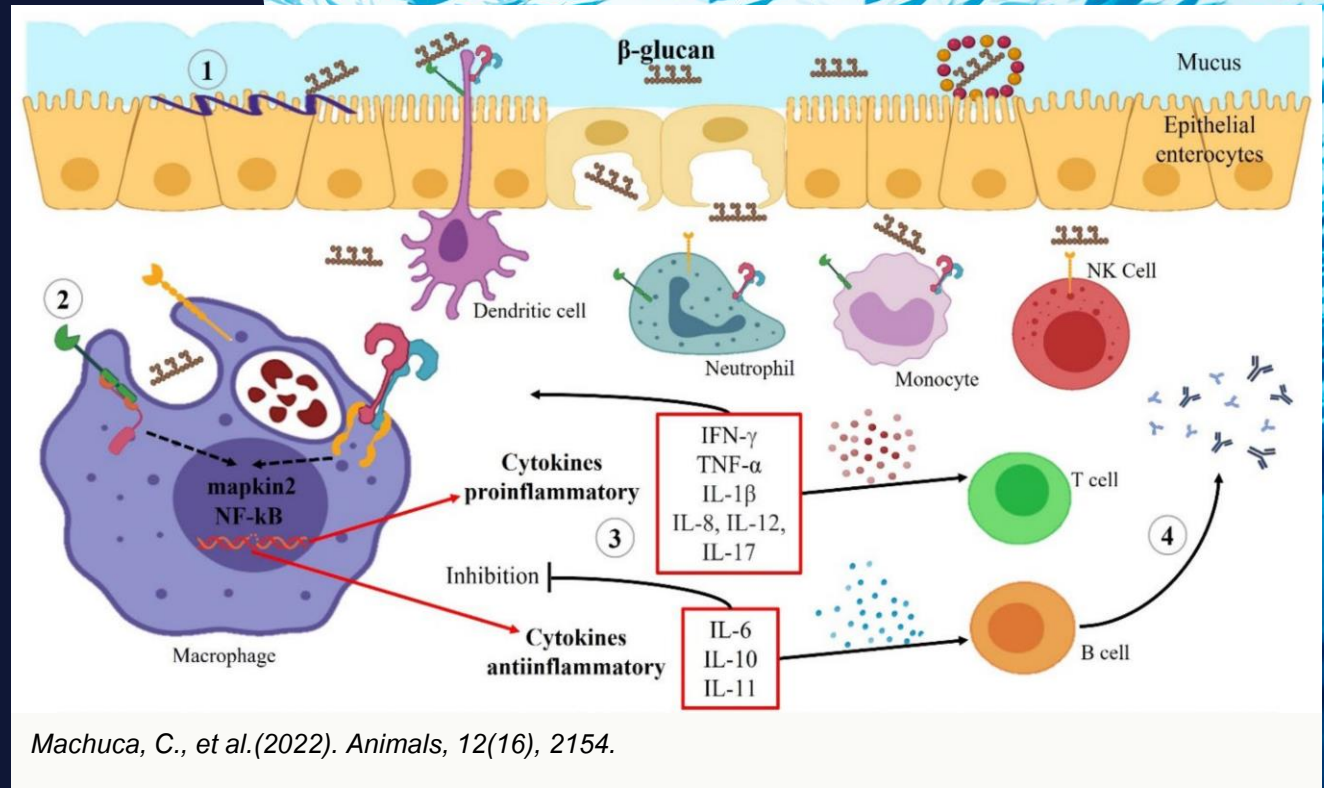
Objetivo: aumentar la producción mundial de la acuicultura de un 35% - 40% de aquí a 2030, intensificando y ampliando la producción sostenible.



Potenciar la respuesta inmune de los peces para controlar las enfermedades, las infecciones como alternativa al empleo de antibióticos.

RESPUESTA INMUNE

*El sistema inmune puede definirse como el conjunto de órganos, tejidos y, sobre todo, células y proteínas que trabajan en colaboración para defender al organismo de cualquier agresión que el cuerpo entienda como potencialmente peligrosa. Es el llamado **sexto sentido**, ya que actúa como detector de la presencia de "sustancias extrañas" (antígenos) y reacciona ante ellas con gran sensibilidad y especificidad.*



Blalock, J. E., & Smith, E. M. (2007) Behavior, and Immunity, 21(1), 23-33



OBJETIVOS:

- 1** Investigar en el sistema inmune de especies pesqueras de interés (rodaballo, lubina, trucha)
- 2** Proponer estrategias sostenibles potenciar la respuesta inmune de los peces
- 3** Impulsar el empleo de ensayos de screening *in vitro*, fiables y validados





RedFISHEALTH



Eje 1. Capacitación tecnológica

Actividad 1.1: Modelos animales representativos

Establecimiento de protocolos de evaluación de la acción inmunomoduladora/imunoestimulante, antioxidante y evaluación de la biodisponibilidad en líneas celulares de peces.

Actividad 1.2: Desarrollo de estrategia de prevención

Aislamiento de compuestos activos de interés.

Actividad 1.3: Control y diagnóstico

Herramientas moleculares.



ACTIVIDAD 1.2

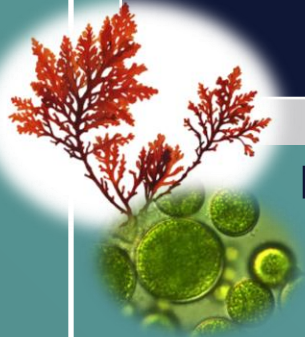
Aislamiento de compuestos activos.

+

Screening de
biomasa

Selección de
compuestos
bioactivos

Puesta a punto
ensayos *in vitro*



Macroalgas

Microalgas

Otros

- Rendimiento
- Funcionalidad

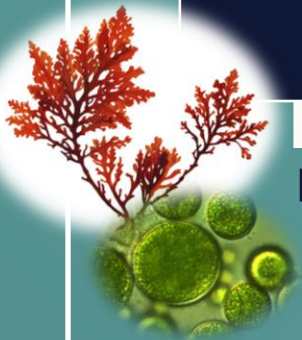
ACTIVIDAD 1.1
Protocolos en líneas celulares/tejidos.



ACTIVIDAD 1.2

Aislamiento de compuestos activos.

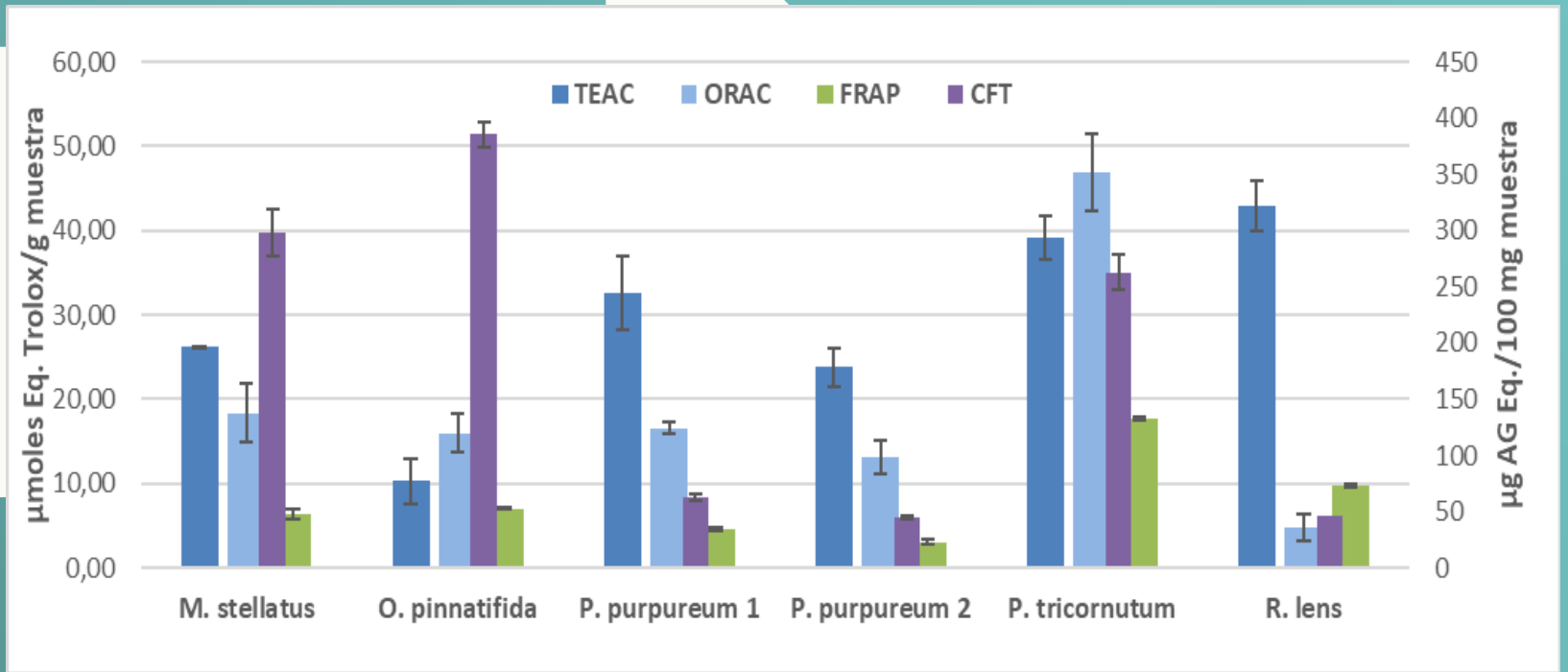
Screening de biomasa



Macroalgas

Microalgas

Otros



ACTIVIDAD 1.2

Aislamiento de compuestos activos.



Polisacáridos

Compuestos fenólicos

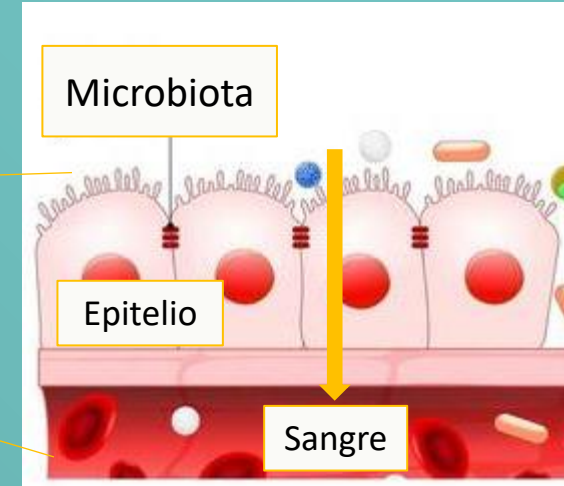
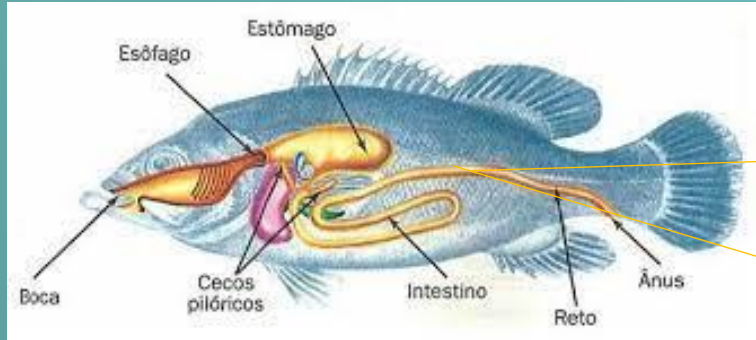
Screening de
biomasa

Selección de
compuestos
bioactivos

Puesta a punto
ensayos *in vitro*

- Rendimiento
- Funcionalidad

○



Puesta a punto ensayos *in vitro*

- Inmunomodulación (RTS-11) macrófagos de **trucha arcoíris**
- Bioaccessibilidad/biodisponibilidad (RTpi-MI y RTdi-MI) enterocitos de **trucha arcoíris**
- Estado antioxidante y acción antioxidante a nivel de mucosas
- Propiedad prebiótica



Oncorhynchus mykiss

ACTIVIDAD 1.1 Protocolos en líneas celulares/tejidos.

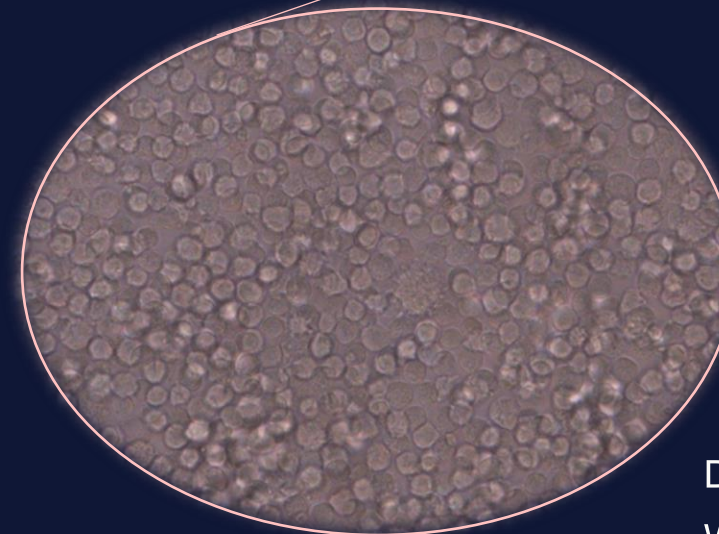
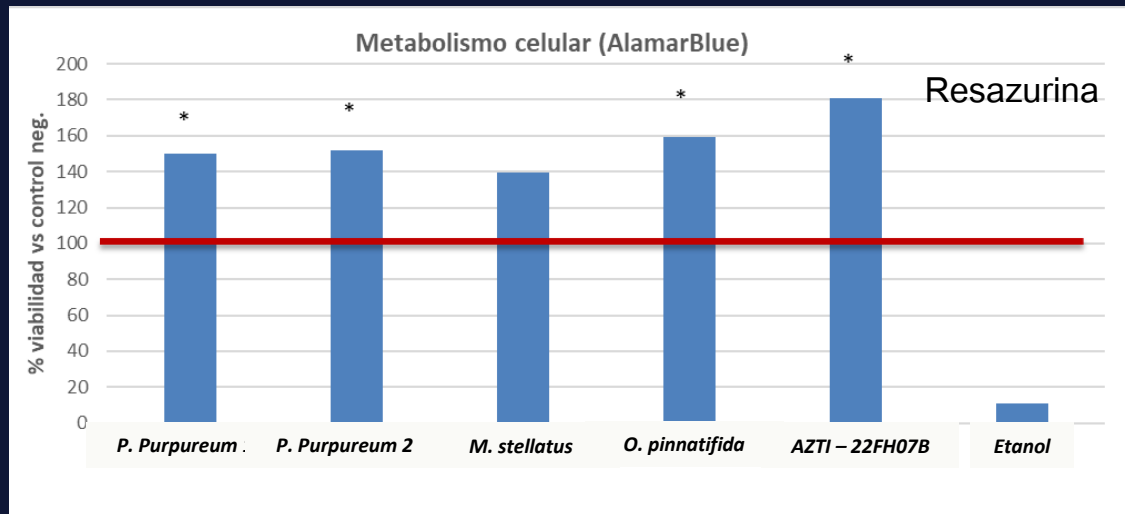


ENSAYOS DE INMUNOMODULACIÓN (RTS-11)

1. Puesta a punto de protocolo de mantenimiento del cultivo celular
2. Viabilidad celular y proliferación (AlamarBlue, CyQUANT®, CFDA-AM)



Grupo de Investigación en
Inmunología y Patología de
los Peces. CSIC.
Carolina Tafalla Piñeiro



Dr. Niels Bols (Universidad de
Waterloo, Canadá)

Ganassin, R.C. and Bols, N.C. 1998. Development from the rainbow trout spleen of a cell line, RTS11, in the monocyte/macrophage lineage. Fish & Shellfish Immunol.8: 457-476.

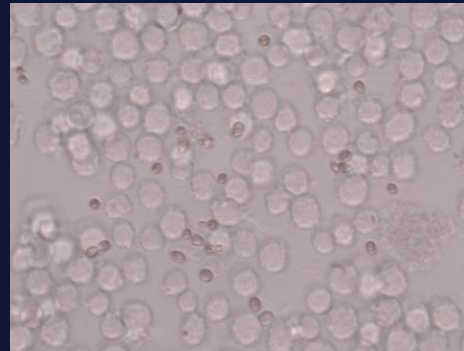




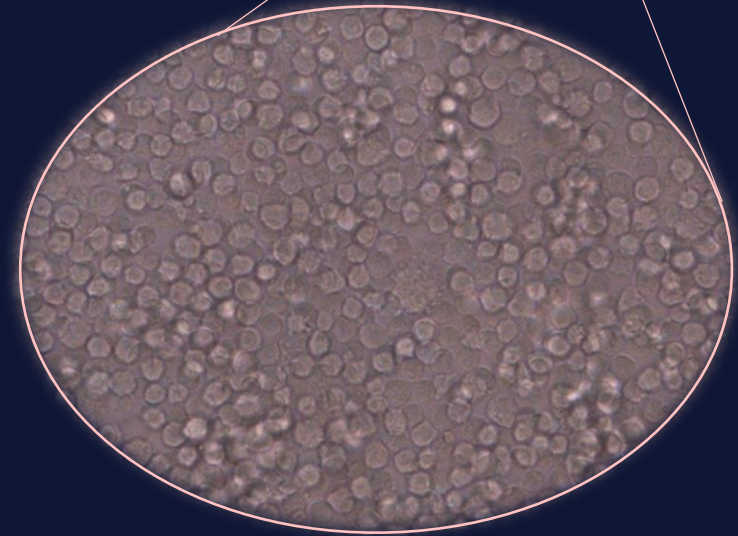
ENSAYOS DE INMUNOMODULACIÓN (RTS-11)

1. Puesta a punto de protocolo de mantenimiento del cultivo celular
2. Viabilidad celular y proliferación (AlamarBlue, CyQUANT®, CFDA-AM)
3. Actividad de la lisozima (*Micrococcus lysodeikticus*)
4. Actividad fagocítica (Rojo Congo, citometría de flujo)

5. Actividad antiinflamatoria (liberación de factores de inflamación, TNF- α y IL-6)



Saccharomyces cerevisiae



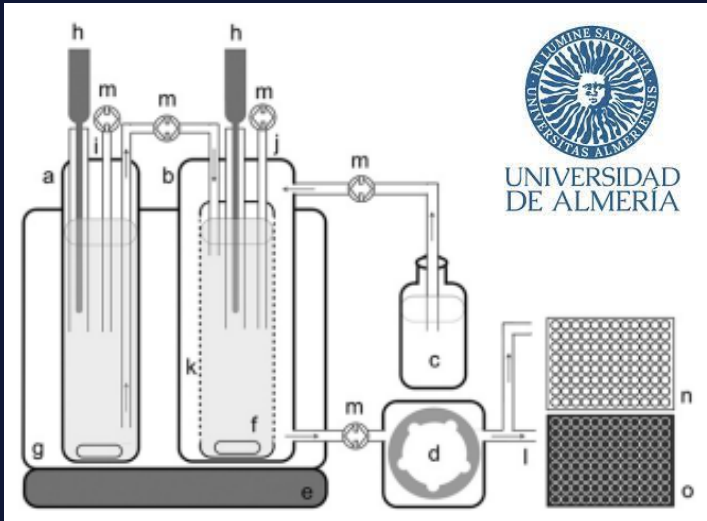


BIOACCESSIBILIDAD/BIODISPONIBILIDAD

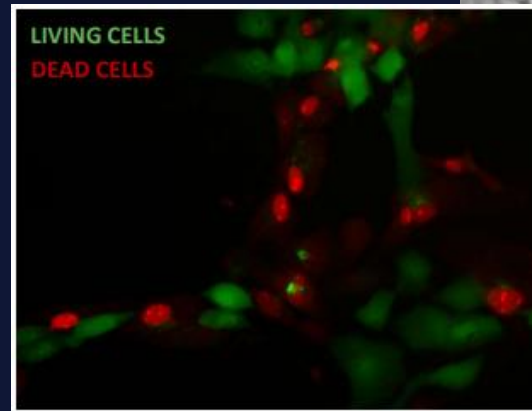
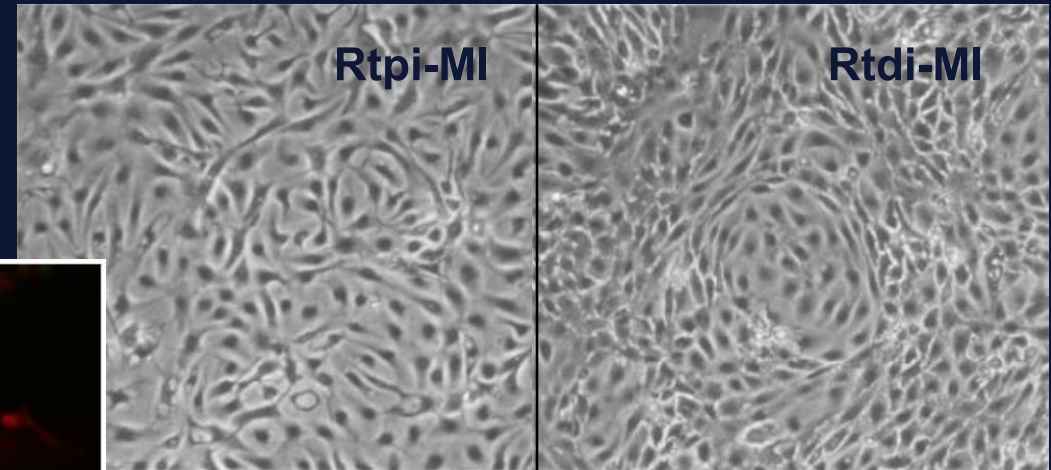
1. Caracterizar los extractos fenólicos por LC-MS/MS
2. Viabilidad celular (Live/Dead, Neutral Red)
3. Interacción compuestos fenólicos y medio de cultivo



Developing an artificial intestine for the sustainable farming of healthy fish



Compatibilidad



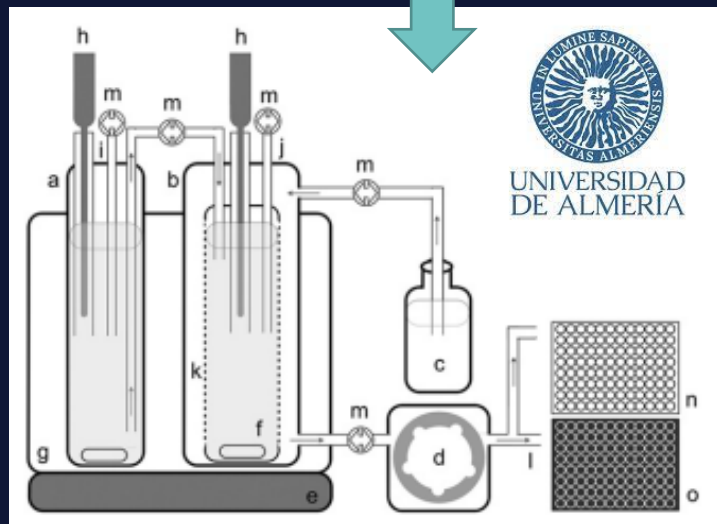
Prof. Gandolfi Fulvio (Universidad de Milán, Italia)

Pasquariello, R. et al. (2021). Cells, 10(6), 1555.

BIOACCESSIBILIDAD/BIODISPONIBILIDAD



1. Pienso dopado
2. Pienso real

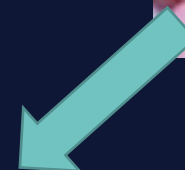
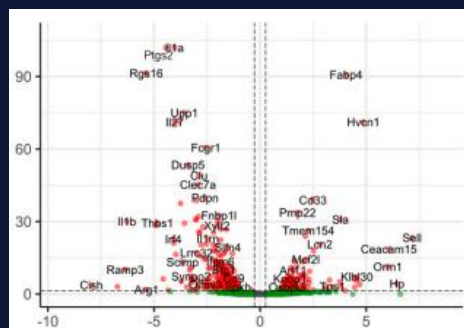


%Bioaccessibilidad
Modelización



Millicell® Cell Culture Inserts

Expresión genica



%Biodisponibilidad
**Propiedad antioxidante
y antiinflamatoria**



Diagrama esquemático del dispositivo utilizado como modelo gastrointestinal.

BIOACCESSIBILIDAD/BIODISPONIBILIDAD



1. Pienso dopado
2. Pienso real

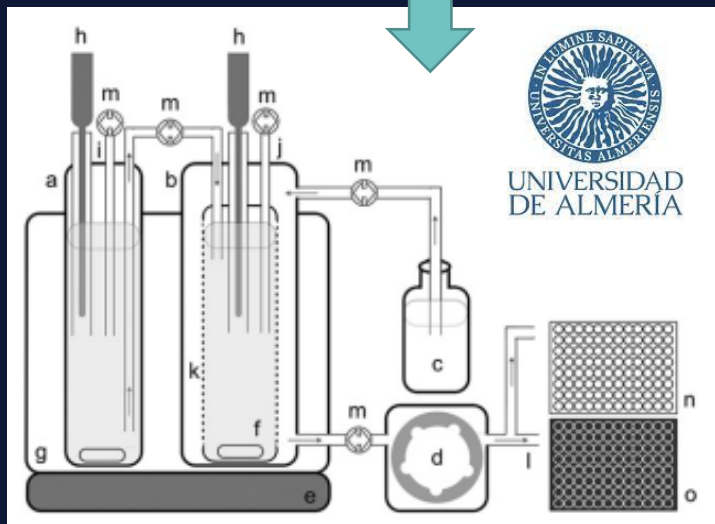
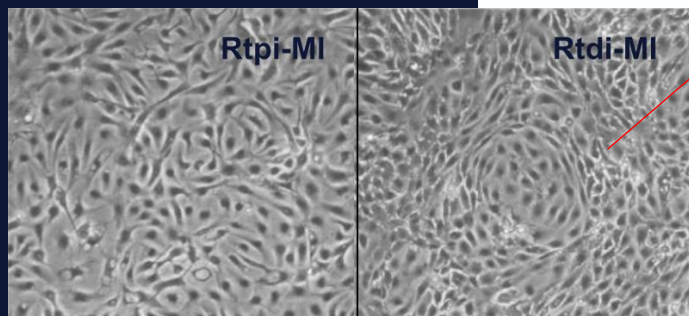
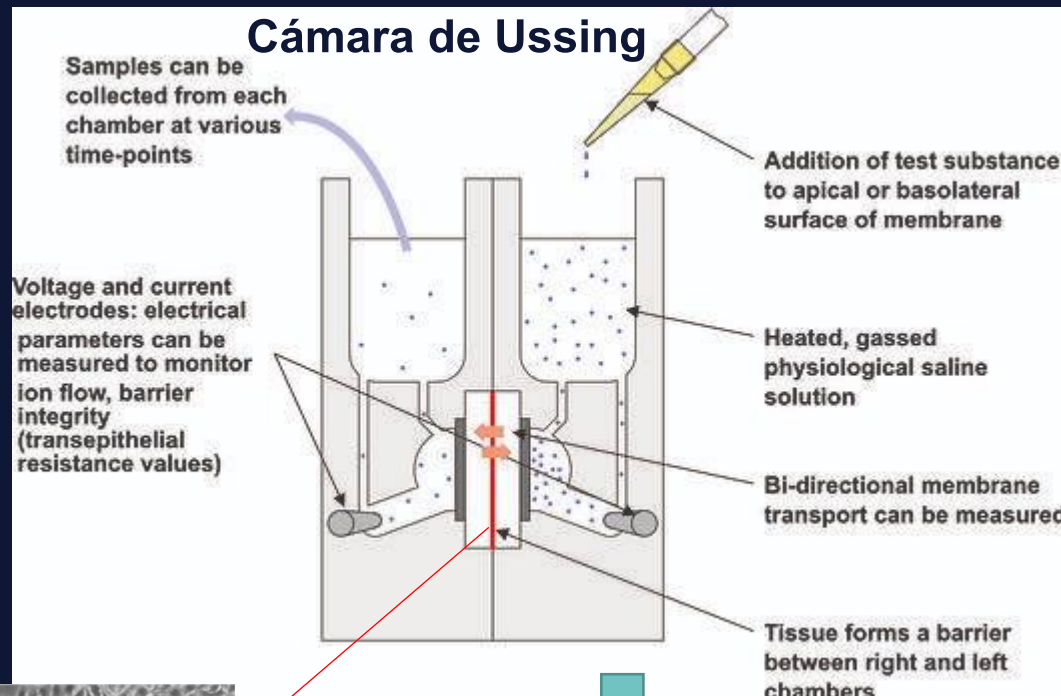


Diagrama esquemático del dispositivo utilizado como modelo gastrointestinal.



% Biodisponibilidad



RedFISHEALTH

CULTIVO PRIMARIO INMORTALIZADO

Especies de interés para la acuicultura (lubina, lenguado o rodaballo)



ESTADO ANTIOXIDANTE Y ACCIÓN ANTIOXIDANTE A NIVEL MUCOSAL

Actividad enzimática antioxidante en el hígado

FRAP en mucosa bucal e intestinal

PROPIEDAD PREBIÓTICA

Ensayo de fermentación de microbiota intestinal

Herramientas biomoleculares (NGS) para estudio metagenómico



1.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES:



TÉCNICAS

INVASIVAS

LARVAS

JUVENILES

ADULTOS



Sangre

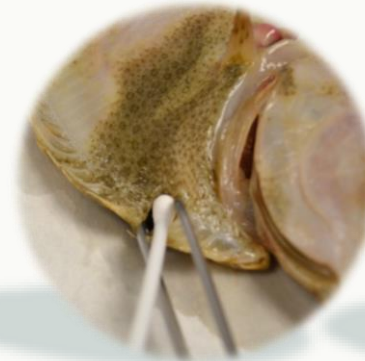
Hígado
Bazo
Riñón
Ciego Intestinal
Músculo
Branquias
Aletas
...

NO INVASIVAS

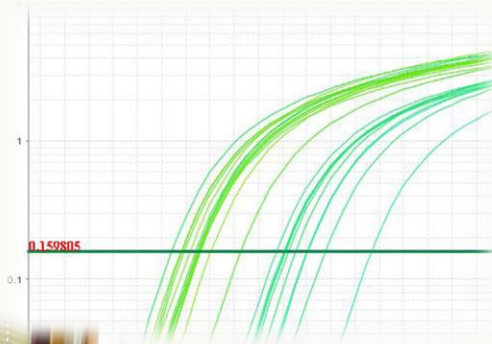
HISOPOS

RASPADO SUPERFICIES

AGUAS: FILTRACIÓN y CENTRIFUGACIÓN



1.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES: PCR MULTIPLEX EN TIEMPO REAL



Detección **rápida** y **precoz** de enfermedades **recurrentes** y **emergentes** para las principales especies de peces de la **acuicultura española**.

Diagnóstico simultáneo de **patógenos** de **diferentes**

Por **HOSPEDADOR** (especie pescado) Por **SINTOMATOLOGÍA**

PATÓGENOS

- *Vibrio* (*V. harveyi* y *V. anguillarum*)
- *Aeromonas salmonicida*
- *Yersinia ruckeri*
- *Flavobacterium psychrophilum*
- *Lactococcus garviae*
- *Photobacterium damsaleae* (subespecies *piscicida* y *damsaleae*)



1.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES: DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Panel de genes de resistencia
(44 genes que confieren
resistencias específicas)
dirigido al análisis de los 6
antibióticos de uso más
frecuente en acuicultura.

RESULTADOS RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

FLORFENICOL



OXITETRACICLINA



SULFADIAZINA



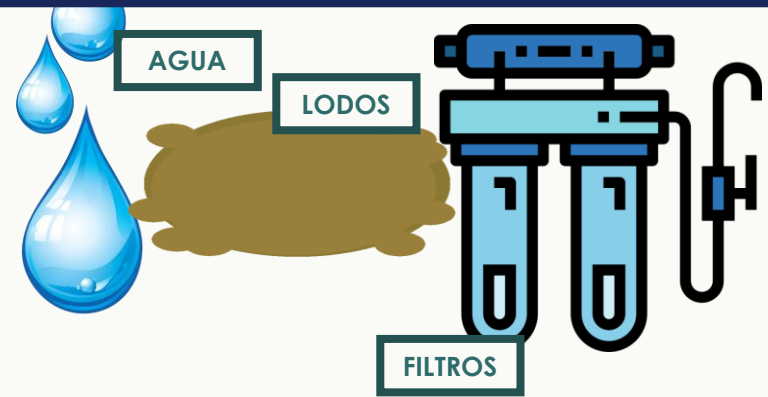
TRIMETOPRIM



AMOXICILINA



DOXICICLINA



MUESTRAS
AMBIENTALES



EXTRACCIÓN ADN



ADN



PCR
MULTIPLEX



SECUENCIACIÓN
MASIVA NGS



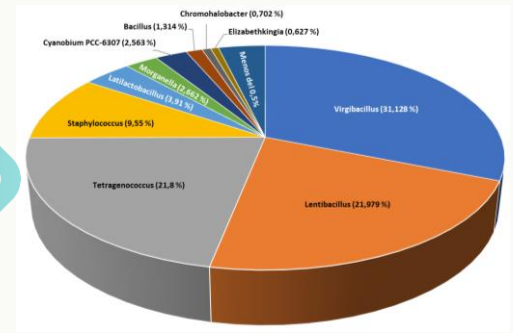
1.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES: SECUENCIACIÓN MASIVA: METAGENÓMICA



FLUJO DE TRABAJO



ABUNDANCIAS RELATIVAS DE MICROORGANISMOS



1.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES: SECUENCIACIÓN MASIVA: METAGENÓMICA





RedFISHEALTH



Jorge Lago



ffarabegoli@anfaco.es

jlago@anfaco.es

fsantaclara@anfaco.es



Francisco Santaclara



GRACIAS POR LA ATENCIÓN