

ACTAS DEL
XV

CONGRESO NACIONAL Y
I CONGRESO IBÉRICO DE
ACUICULTURA

CASA COLÓN 13/16 OCTUBRE
HUELVA 2015
ACUICULTURA, CULTIVANDO EL FUTURO



ORGANIZAN:



Sociedad
Española de
Acuicultura



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Organismos organizadores:

- Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía
- Sociedad Española de Acuicultura (SEA)

Editores:

José Ignacio Navas
María Luisa Cordero
Salvador Cárdenas

Editoriales:

IFAPA
SEA

Año de Publicación: 2015

ISBN: 978-84-608-2878-5

Depósito Legal: M-32497-2015

Vacunas DNA frente a nodavirus. Administración oral y transferencia materna para proteger los estadios larvarios más vulnerables de lubina

Y. Valero¹, A. Cuesta² y E. Chaves-Pozo^{1*}

¹ Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía, Carretera de la Azohía s/n, 30860, Puerto de Mazarrón.
E-mail: elena.chaves@mu.ieo.es.

² Fish Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.

Abstract

Nodavirus (NNV) produces the viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease and triggers high mortalities in larvae and juveniles of European sea bass and other important fish species for the marine Mediterranean aquaculture. In this work, we have performed two different administration methods for a DNA vaccine against NNV: (i) we orally administered a DNA-chitosan nanoparticles vaccine and (ii) we injected the DNA vaccine into females of a broodstock in order to increase the maternal transfer of immunity against NNV to their fry. We have got excellent results that point to the need of further studies to determine the molecular mechanisms involved in order to enhance the efficacy of this vaccine protocols.

Resumen

Nodavirus (NNV) es el agente causal de la retinopatía y encefalopatía viral (VER) que genera elevadas mortalidades en larvas y juveniles de lubina y de otras especies potencialmente importantes para la acuicultura Mediterránea. Por ello, en este trabajo hemos evaluado dos formas distintas de administración de una vacuna DNA: (i) la vacunación oral de una vacuna encapsulada en partículas de quitosano y (ii) la vacunación de hembras para potenciar la transferencia materna de inmunidad a la descendencia. Hemos obteniendo resultados favorables en ambos procedimientos, aunque estudios más exhaustivos serían necesarios para determinar los mecanismos implicados en estas respuestas y poder así mejorar la eficacia de los tratamientos.

Justificación

Nodavirus (NNV) es el agente casual de la retinopatía y encefalopatía viral (VER) de peces que produce elevadas mortalidades, fundamentalmente en larvas y juveniles, de diferentes especies de peces y en consecuencia elevadas pérdidas económicas en la acuicultura (Munday et al., 2002). La vacunación es el método más efectivo de mejorar la respuesta inmune de peces frente a un patógeno en particular. En el caso de NNV, se han probado vacunas inactivadas, recombinantes y de DNA. El quitosano se ha demostrado un excelente vector policatiónico para vacunas DNA (MacLaughlin et al., 1998) que permite su administración oral, ruta de administración predilecta por ser una técnica no invasiva, que permite vacunar animales pequeños y en gran número. En este trabajo hemos usado nanopartículas de quitosano como vector para adherir una vacuna de DNA frente a NNV y administrarla en dieta.

La transferencia materna de la inmunidad está relacionada con la transferencia de proteínas y RNA mensajero desde la madre a la descendencia con el fin de proteger su proge en las primeras fases de desarrollo. Esta transferencia ha sido descrita en vertebrados incluidos los peces (Hanif et al., 2004; Hasselquist and Nilsson., 2009). Sin embargo, en peces, no se sabe nada de su regulación, de las proteínas y RNAm involucrados, ni de los mecanismos moleculares que permiten dicho fenómeno. Es de destacar que a pesar que la inmunidad transferida disminuye conforme el ejemplar se desarrolla (Lillehaug et al., 1996; Hanif et al., 2004), el conocimiento y control de estos procesos permitiría desarrollar estrategias específicas de vacunación de hembras con el fin de proteger un gran número de individuos y en particular en sus etapas más vulnerables como es el desarrollo larvario. Por ello, en este estudio también hemos explorado por primera vez en peces la posibilidad de estimular la transferencia materna de inmunidad usando una vacuna DNA en hembras con el fin de proteger a su descendencia.

Material y métodos

Juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*), con 180 días post-eclosión (dph), se dividieron en 4 grupos experimentales y fueron alimentados con pienso comercial (grupo C) o suplementado con nanopartículas de quitosano conteniendo una vacuna DNA contra NNV (grupo ChV), un plásmido vacío (grupo ChP) o solas (grupo Ch). La vacuna fue añadida al pienso con el fin de administrar 10 µg de DNA por pez (n=30) alimentados con un 1% de su biomasa en pienso/día. La vacunación fue llevada a cabo durante dos días consecutivos y los peces fueron muestreados después de 7, 30 y 90 días post-vacunación (n=6 peces/grupo y tiempo), estudiándose la expresión génica en el intestino posterior y la resistencia frente a una infección por NNV.

Hembras maduras de lubina, de $2.202.7 \pm 140$ g de peso corporal (n=10) fueron divididas en dos grupos y a cada grupo se le añadieron 15 machos ($1.290.1 \pm 62$ g de peso corporal). Las hembras fueron vacunadas mediante inyección intraperitoneal con 1 µg de una vacuna DNA contra NNV (grupo vacunado) o con 1 µg de plásmido vacío (grupo control) a día 0 y 15 del inicio del experimento, a día 16 se les extrajo sangre a las hembras. Los ejemplares fueron dejados en condiciones de fotoperiodo y temperatura natural y se recogió la primera puesta después de la vacunación que se produjo a día 51 del inicio del experimento. Se muestrearon huevos y larvas de 2, 5, 7, 9, 12, 15, 19, 23, 26, 40 y 69 días post-eclosión (dph) para análisis de la expresión génica y ensayos funcionales de actividades de la respuesta innata humoral (Chaves-Pozo et al., 2008; Valero et al., 2014, 2015).

Todos los experimentos se han llevado a cabo según el comité de ética en experimentación animal (CEEAA) de la UMU (REGA ES300305440012).

Resultados y discusión

La administración oral de una vacuna de nanopartículas de DNA-quitosano se reveló como un método efectivo de vacunación ya que produjo un aumento significativo de la expresión de los genes que codifican para moléculas efectoras anti-virales, tales como Mx, y para marcadores de linfocitos T y B. Además, la vacuna oral confirió protección frente a una infección con NNV a más del 20% de la población.

El experimento de vacunación de hembras demostró que existe transferencia materna de la inmunidad en lubina tal y como se ha descrito para otras especies de peces teleósteos (Swain y Nayak, 2009; Zhang et al., 2013), siendo éste el primer estudio en donde se utiliza una vacuna DNA para estimular la respuesta inmune de las hembras y la transferencia pasiva de inmunidad a la descendencia. Nuestros datos demuestran que existe una transferencia génica pero también proteica de moléculas relacionadas con la inmunidad innata humoral. Además, también indican que existe una transferencia materna de factores de regulación que hacen que las actividades y la expresión de algunos genes estudiados sean estimuladas en las larvas procedentes del grupo vacunado.

Bibliografía

- Chaves-Pozo, E., S. Liarte, L. Fernández-Alacid, E. Abellán, J. Meseguer, V. Mulero y A. García-Ayala. 2008. Pattern of expression of immune-relevant genes in the gonad of a teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Molecular Immunology* 45: 2998-3011.
- MacLaughlin, F.C., R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe y A.P. Rolland. 1998. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release* 56: 259-272.
- Munday, B.L., J. Kwang y N. Moody. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 25: 127-142.
- Swain, P. y S.K. Nayak. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 89-99.
- Valero, Y., A. García-Alcázar, M.A. Esteban, A. Cuesta, y E. Chaves-Pozo. 2015. Antimicrobial response is increased in the testis of European sea bass, but not in gilthead seabream, upon nodavirus infection. *Fish & Shellfish Immunology* 44: 203-213.
- Valero, Y., A. García-Alcázar, M.A. Esteban, A. Cuesta y E. Chaves-Pozo. 2014. Seasonal variations of the humoral immune parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 39: 185-187.
- Zhang, S., Z. Wang y H. Wang. 2013. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 39: 72-78.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado mediante proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación y fondos FEDER (AGL2013-43588-P) y de la Fundación Séneca (04538/GERM/06). Y. Valero agradece al Instituto Español de Oceanografía su beca pre-doctoral.

ORGANIZAN



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

PATROCINAN



COLABORAN

