

**Título:** DESARROLLO DE HERRAMIENTAS INMUNOLÓGICAS Y ESTUDIO DE LA ORGANOGÉNESIS DEL SISTEMA OLFATORIO DEL RODABALLO (SCOPHTHALMUS MAXIMUS, L.).

**Nombre:** MANTILLA ALDANA, LEONARDO

**Universidad:** Universidad de Vigo

**Departamento:** FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Fecha de lectura:** 21/01/2014

**Programa de doctorado:** Acuicultura

**Dirección:**

- > **Codirector:** AFRICA GONZALEZ FERNANDEZ
- > **Codirector:** SUSANA MAGADAN MOMPÓ
- > **Codirector:** ENCARNACION DE MIGUEL VILLEGAS

**Tribunal:**

- > **presidente:** Ysabel Santos Rodríguez
- > **secretario:** Francisco Gambón Deza
- > **vocal:** CAROLINA TAFALLA PIÑEIRO

**Descriptores:**

- > INMUNOLOGIA
- > ICTIOLOGIA
- > ACUICULTURA MARINA
- > DESARROLLO ANIMAL

**El fichero de tesis** no ha sido incorporado al sistema.

**Resumen:** La acuicultura es una importante actividad económica dentro del sector de alimentación. Se encuentra en constante crecimiento, tanto en lo que respecta a la cantidad de biomasa producida por especie, como de especies nuevas a cultivar. Este aumento en la producción acuícola, hace necesaria una correcta prevención que evite la exposición de los peces a potenciales patógenos y un mejor conocimiento de sus sistemas de defensa. A nivel europeo el rodaballo, *Scophthalmus maximus*, es una de las 10 especies ícticas más cultivadas, y en la comunidad gallega presenta un notable crecimiento en su producción acuícola. El rodaballo es una especie relativamente nueva dentro de la acuicultura, en comparación con otras especies como la trucha o la carpa. Es por ello que sólo en los últimos años está surgiendo la necesidad de conocer en mayor profundidad la función de sus sistemas, especialmente la del sistema inmunológico (tipos celulares, mecanismos de respuesta), y otros como el nervioso vinculado a la recepción sensorial que gobierna muchos de los comportamientos de la especie. Los objetivos generales que se proponen en esta tesis son los siguientes:

1) Desarrollo de herramientas destinadas a ampliar el conocimiento del sistema inmune del rodaballo, con la generación de anticuerpos monoclonales que permitan identificar células inmunitarias en timo y bazo. Empleando para esto la generación de anticuerpos monoclonales (AcMos) murinos, capaces de reconocer diferentes poblaciones de células mononucleares purificadas del timo y bazo del rodaballo, así como también la caracterización y validación de los diferentes AcMos obtenidos mediante diversas técnicas inmunológicas (ELISA, inmunohistoquímica sobre tejidos parafinados, Citometría de flujo y Western blot).

2) Uso de librería de fagos para la obtención de anticuerpos recombinantes dirigidos frente a células de sangre periférica de rodaballo, utilizando la producción de anticuerpos recombinantes mediante la técnica de Phage Display, capaces de reconocer a poblaciones de células mononucleares purificadas de la sangre periférica del rodaballo y la posterior caracterización de los fragmentos scFv portados por los diversos fagos obtenidos mediante Cell-based ELISA (CB-ELISA), Citometría de Flujo y Western blot.

3.) Estudio del desarrollo del sistema olfatorio, describiendo la organogénesis del órgano olfatorio periférico y del bulbo olfatorio mediante técnicas histológicas convencionales e inmunohistoquímica. Los componentes del sistema se identificaron por su inmunoreactividad a la calretinina y su capacidad proliferativa fue puesta de manifiesto mediante la detección de PCNA en inmunohistoquímica.

El desarrollo de los objetivos anteriores, proporcionó la generación de un total de 307 hibridomas secretores de AcMos, de los cuales RoD4, RoA3, RoA4, 3.5 y 88.18 son reactivos frente a células tímicas y en especial el AcMo RoD4, reconoce específicamente un antígeno (25-30 kDa) de membrana de una población minoritaria de timocitos de rodaballo, permitiendo su identificación tanto por inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y Western blot. Otro grupo de AcMos (96.4, 75.10, 93.5 y 93.16) reconocen específicamente subpoblaciones de eritrocitos de rodaballo por inmunohistoquímica y/o citometría.

Se estandarizó el uso de la tecnología de anticuerpos recombinantes mediante Phage Display para reconocer células de rodaballo, generándose fagos (P1D9, P2A5 y P2B2) capaces de reconocer subpoblaciones eritrocitarias y emplearse mediante técnicas como CB-ELISA y citometría.

En el desarrollo del sistema olfatorio del rodaballo se encontró que la diferenciación morfológica del órgano olfatorio periférico es anterior a la emergencia del bulbo olfatorio. El crecimiento inicial de la placoda es parcialmente independiente de la proliferación de sus células. La diferenciación de las células olfativas en el rodaballo, sigue una secuencia temporal precisa, en las que las células ciliadas y con microvellosidades aparecen antes. Las células sensoriales del epitelio contienen calretinina. La morfogénesis del bulbo olfatorio es lenta antes de la etapa juvenil y los campos terminales presentan características inmaduras. En conjunto, la histogénesis del sistema olfatorio puede asociarse con la adquisición de comportamientos etológicos de la especie asociados con la alimentación, defensa y reproducción.