



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: “**SANIDAD ANIMAL**”

Título de la Tesis

**“VACUNAS INACTIVADAS FRENTE A *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE*
SUBSP. *PISCICIDA* EN DORADA (*SPARUS AURATA*): EFECTO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE CÉLULAS IGM POSITIVAS Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y MX”.**

Tesis Doctoral presentada por **D. Valentina Grasso**

Dirigida por el **Dr. Félix Acosta Arbelo** y por el **Dr. Daniel Padilla Castillo**

El Director

El Director

El Doctorando

Félix Acosta Arbelo

Daniel Padilla Castillo

Valentina Grasso

Arucas, a de de 2013

El Dr. Félix Acosta Arbelo, Profesor Titular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en el Departamento de Patología Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada "**VACUNAS INACTIVADAS FRENTE A *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* EN DORADA (*SPARUS AURATA*): EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS IGM POSITIVAS Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y MX**" realizada por Dña. Valentina Grasso, Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmo la presente en Arucas, a de de 2013

Fdo. Félix Acosta Arbelo

El Dr. Daniel Padilla Castillo, Profesor Asociado de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en el Departamento de Patología Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “**VACUNAS INACTIVADAS FRENTE A *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* EN DORADA (*SPARUS AURATA*): EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS IGM POSITIVAS Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y MX**” realizada por Dña. Valentina Grasso, Licenciada en Veterinaria, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmo la presente en Arucas, a de de 2013

Fdo. Daniel Padilla Castillo



Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado en **SANIDAD ANIMAL**

**“VACUNAS INACTIVADAS FRENTE A *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE*
SUBSP. *PISCICIDA* EN DORADA (*SPARUS AURATA*): EFECTO SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE CÉLULAS IGM POSITIVAS Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y MX”.**

Tesis Doctoral

Valentina Grasso

Arucas, 2013

Throughout my life my greatest benefactors have been
my dreams and my travels,
Very few men, living or dead have helped me in my struggle.

Nikos Kazantzakis. Prologue to “Zorba the greek”

“Occorre compiere fino in fondo il proprio dovere, qualunque sia il sacrificio da sopportare, costi quel che costi, perché in ciò sta l'essenza della dignità umana”

Giovanni Falcone

Es importante que sobre todo los jóvenes busquen activamente los desafíos que les permitan forjarse y adquirir fortaleza. Quienes disfrutan de abundancia material desde la juventud, y no trabajan duramente, no pueden llegar a ser personas de personalidad sobresaliente. Ni tampoco grandes líderes que puedan proteger a las personas. Espero que se empeñen tenazmente, sin escatimar esfuerzos, y se desarrollen como paladines indómitos, a quienes nada ni nadie puedan desalentar o perturbar.

Daisaku Ikeda

Índice

Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	VII
Índice de Esquemas	VIII
Resumen	IX
Summary	XI

I-REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.1.	Acuicultura como garantía de futuro	1
1.2.	Pasteurelisis por <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	5
1.2.1.	Etiología	5
1.2.2.	Morfología e identificación	7
1.2.3.	Epidemiología	8
1.2.4.	Patogenia	11
1.2.5.	Clínica y lesiones	13
1.2.6.	Tratamiento	15
1.2.7.	Control de la enfermedad	15
1.3.	Vacunas en Acuicultura	17
1.3.1.	Tipos de vacunas	18
1.3.1.1.	Clasificación microbiológica	18
1.3.1.2.	Clasificación según el tipo de formulación	20
1.3.2.	Vías de administración	22
1.3.3.	Vacunas frente <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	27

1.3.4. Aspectos económicos, legislativos y medioambientales	29
1.4. Sistema inmune en teleósteos	30
1.4.1. Sistema inmune adquirido	31
1.4.1.1. Linfocitos	31
1.4.1.2. Anticuerpos	33
1.4.2. Citoquinas	37
1.4.2.1. Interleuquinas	38
1.4.2.2. Interferón (IFN)	41
1.4.4.3. Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	44
1.4.3. Ciclooxigenasa 2 (COX-2)	46
1.4.4. Mx	47
1.5. Efecto de la vacunación sobre la expresión de citoquinas en peces	48
II-OBJETIVOS	51
III-MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Estandarización de los protocolos	53
3.1.1. Estandarización de los protocolos para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx en respuesta a la vacunación frente a <i>Phdp</i>	53
3.1.1.1. Cepa utilizada en el estudio	53
3.1.1.2. Formulación de las vacunas inactivadas frente a <i>Phdp</i>	54
3.1.1.2.1. Vacuna inactivada con formol	54
3.1.1.2.2. Vacuna inactivada con calor	55
3.1.1.2.3. Vacuna inactivada con radiación UVA	56
3.1.2. Estandarización de los protocolos para el estudio de las células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente <i>Phdp</i>	57
3.1.2.1. Peces experimentales	57
3.1.2.2. Extracción de leucocitos	57

3.1.2.3.	Citometría de flujo	60
3.2.	Ensayo definitivo	63
3.2.1	Ensayo definitivo para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx en respuesta a la vacunación frente a <i>Phdp</i>	63
3.2.1.1.	Cepa utilizada en el estudio	63
3.2.1.2.	Peces experimentales	63
3.2.1.3.	Vacunas	64
3.2.1.4.	Vacunación	64
3.2.1.5	Toma de muestras para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx a través de RT-PCR	67
3.2.1.6.	Extracción de RNA	68
3.2.1.7.	Transcripción inversa	69
3.2.1.8.	PCR Real Time (RT-PCR)	70
3.2.2.	Experimento definitivo para el estudio de las células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente <i>Phdp</i>	74
3.2.2.1.	Extracción de leucocitos y citometría de flujo	74
3.2.2.2.	Toma de muestras	74
3.3.	Análisis estadístico	76
IV-	RESULTADOS	77
4.1.	Estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx	77
4.1.1.	Expresión del gen IL-1 β	77
4.1.2.	Expresión del gen IL-1r2	79
4.1.3.	Expresión del gen TNF- α	81
4.1.4.	Expresión del gen COX-2	83
4.1.5.	Expresión del gen Mx	85
4.2.	Estudio de las células IgM positivas en respuesta a vacunación frente a <i>Phdp</i>	87
4.2.1.	Resultados de la estandarización de los protocolos	87
4.2.2.	Resultados de la experiencia definitiva para el estudio de las células IgM positivas	90

V-DISCUSIÓN	97
VI-CONCLUSIONES	117
VII-BIBLIOGRAFÍA	121
VII-AGRADECIMIENTOS	141

Índice de Figuras

Figura 1.	Aumento de la producción de acuicultura desde 1980 a 2010 (FAO 2012)	3
Figura 2.	Posición filogenética de <i>Phdp</i>	6
Figura 3.	Perfil bioquímico de <i>Phdp</i> mediante API 20E	7
Figura 4.	Lesiones granulomatosas en bazo de dorada afectada por <i>Phdp</i>	14
Figuras 5.	Estructura de las IgM	36
Figura 6.	Inactivación con formol, con calor y con radiación UVA	55
Figura 7.	Extracción de linfocitos de dorada	59
Figura 8.	Citómetro de flujo y ordenador con software para citometría	61
Figura 9.	Conjugación FITC en pequeña escala	62
Figura 10.	Vacunación por baño de peces experimentales y peces control	65
Figura 11.	Sonicado de las muestras	69
Figura 12.	Fórmula de Livak	73
Figura 13.	Expresión génica de IL-1 β en los peces vacunados	78

Figura 14.	Expresión génica de IL-1 β en los peces vacunados	80
Figura 15.	Expresión génica de TNF- α en los peces vacunados	82
Figura 16.	Expresión génica de Cox-2 en los peces vacunados	84
Figura 17.	Expresión génica de Mx en los peces vacunados	86
Figura 18.	Fluorescencia media emitida a diferentes cantidades de anticuerpo	87
Figura 19.	Leucocitos de dorada al citómetro de flujo después del protocolo de extracción	88
Figura 20.	Ejemplos de histogramas en 3D	89
Figura 21.	Incremento de la producción de células IgM positivas en las branquias de peces vacunados una vez	93
Figura 22.	Incremento de la producción de células IgM positivas en el bazo de peces vacunados una vez	94
Figura 23.	Incremento de la producción de células IgM positivas en las branquias de peces vacunados dos veces (booster)	95
Figura 24.	Incremento de la producción de células IgM positivas en el bazo de peces vacunados dos veces (<i>booster</i>)	96
Figura 25.	Calendario de vacunación propuesto frente a <i>Phdp</i>	115

Índice de Tablas

Tabla I.	Aislamiento de <i>Phdp</i> en peces	10
Tabla II.	Proteínas descritas en <i>Phdp</i>	12
Tabla III.	Vías de administración de vacunas, ventajas e inconvenientes	26
Tabla IV.	Vacunas realizadas frente a <i>Phdp</i> desde el año 2000	28
Tabla V.	Efecto de las vacunas sobre la producción de moléculas proinflamatorias y Mx	49
Tabla VI.	Protocolo de citometría utilizado para leucocitos de dorada	60
Tabla VII.	Secuencia cebadores empleados para la RT-PCR	71
Tabla VIII.	Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión génica de β actina	72
Tabla IX.	Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión génica Mx y TNF α y COX-2	72
Tabla X	Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión génica IL-1 β y IL-1r2	73

Índice de Esquemas

Esquema I.	Distribución aleatoria de los peces experimentales	66
Esquema II.	Toma de muestras	75

Resumen ~-----

La vacunación es una parte fundamental de la acuicultura ya que representa una manera eficaz de prevenir la aparición de enfermedades y al mismo tiempo limitar el uso de antibióticos. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) es el agente etiológico de la enfermedad conocida como pasteurelisis o pseudotuberculosis que cada año provoca ingentes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura.

En este trabajo hemos analizado el efecto de tres vacunas inactivadas (bacterinas) frente a *Phdp* suministradas por baño corto a alevines de dorada (*Sparus aurata*) de 5 g de peso inicial. El incremento en el número de células IgM positivas después de la inmunización fue medido a través de un nuevo protocolo de citometría de flujo diseñado y puesto a punto para leucocitos de bazo y branquias de dorada. También se analizó el efecto de las tres vacunas sobre la expresión génica de las moléculas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-1r2, COX-2 y el gen Mx.

Todos los grupos de peces inmunizados con las diferentes vacunas presentaron un incremento en el número de células IgM positivas con respecto al control; el incremento fue mayor en las branquias que en el bazo confirmando la importancia de este órgano en la vacunación por baño. La vacuna inactivada con

calor estimuló la expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-1r2, TNF- α y COX-2, la vacuna inactivada con formol estimuló la expresión de IL-1r2, mientras que la vacuna inactivada con radiación UVA fue la única que estimuló el gen Mx.

Vistos nuestros resultados sugerimos que la citometría de flujo es un método fiable y rápido que puede ser utilizado como técnica complementaria o sustitutiva para medir células IgM positivas de dorada. Aún así, creemos que es necesario seguir investigando sobre la producción de células IgM positivas en doradas después de la vacunación, sobre todo para conocer cuál es el momento exacto para revacunar a los peces. Con respecto a la expresión de citoquinas en nuestro estudio hemos podido comprobar que existen diferencias significativas en la expresión de estos genes según qué forma de inactivación que elijamos.

Summary

Vaccination is an essential part of aquaculture as it represents an effective way to prevent the onset of disease and at the same time to limit the use of antibiotics. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) is the etiological agent of the disease known as pasteurellosis or pseudotuberculosis which causes enormous economic losses in the aquaculture industry each year.

In this study we examined the effect of three inactivated vaccines (bacterins) against *Phdp* supplied by short bath to sea bream (*Sparus aurata*) juveniles of 5 g initial body weight. The increased number of IgM positive cells after immunization was measured by a new flow cytometry protocol designed for spleen and gills leukocytes of sea bream. We also analyzed the effect of the three vaccines on gene expression of the pro-inflammatory molecules IL-1 β , TNF- α , IL-1r2, COX-2 and the Mx gene.

All fish groups immunized with the different vaccines showed an increase in the number of IgM positive cells with respect to the control, the increase was higher in the gills than in the spleen, confirming the importance of this tissue in the bath vaccination. The heat-inactivated vaccine induced the expression of the cytokines IL-1 β , IL-1r2, TNF- α and COX-2, the formalin-inactivated vaccine

induced the expression of IL-1r2, whereas UV-light inactivated vaccine was the only vaccine that stimulated the Mx gene.

Our results suggest that flow cytometry is a reliable and fast method that can be used as complementary or alternative technique to measure IgM positive cells. Still, we believe that further research on the production of IgM positive cells after vaccination is needed, especially to understand when the exact time to booster fish is. With respect to the expression of cytokines in our study we have found that there are significant differences in the expression of these genes and that it depends on the way we inactivate the vaccine.



*Revisión
bibliográfica*

1.1. ACUICULTURA COMO GARANTÍA DE FUTURO

“Cuando hayamos cazado la última ballena el mar se llenará de medusas y de sepias”. Así profetizaba el capitán Nemo, Comandante del submarino *Nautilus* en Veinte mil leguas de viaje submarino. Hoy en día, y 150 años después, esa imagen visionaria de Julio Verne parece destinada a convertirse en realidad. Casi no quedan ballenas en nuestros mares, cada vez hay menos atunes, los arrecifes de coral están desapareciendo y así sigue una larga lista de especies amenazadas que luchan para sobrevivir en aguas sobreexplotadas. La clave para frenar, o al menos retrasar este proceso que parece irreversible es respetar los ciclos naturales y las pautas del medio marino creando zonas de pesca restringida, parques marinos protegidos y también a través de la cría controlada de peces, moluscos y otros organismos acuáticos.

La acuicultura, o sea el cultivo de organismos acuáticos, es una práctica milenaria que incrementa las posibilidades de obtener alimento año tras año, manteniendo estables las poblaciones salvajes y aumentando así la producción natural del medio. Después de los egipcios, las civilizaciones del continente asiático fueron las primeras en introducir la cría de peces en cautividad para el consumo humano, una industria que se expandió rápidamente tras el final de la Segunda Guerra Mundial, a mediados del pasado siglo XX, ante la necesidad de alimentar a una población en imparable expansión.

Revisión bibliográfica

En la actualidad la acuicultura representa el sector de la agricultura con el crecimiento más rápido a nivel mundial. Recientemente la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), en su dossier “Estado mundial de la pesca y acuicultura 2010”, nos da a conocer que este sector alcanzó en el año 2008 su máximo histórico en cuanto a producción, aportando el 50% del suministro total de pescado consumible. En China, el mayor productor acuícola del mundo, el 80,2 % del pescado consumido en 2008 procedió de la acuicultura, cifra muy superior al 23,6 % correspondiente a 1970.

Una industria con tan rápido crecimiento y tan buenos resultados a nivel mundial merece que se invierta esfuerzo en ella, aportando nuevas tecnologías, uniformando las normativas y minimizando cualquier tipo de pérdida. Además, la acuicultura es una actividad que abarca muy variadas prácticas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción. Su dimensión económica ofrece nuevas oportunidades socioeconómicas en las regiones en las que se implanta gracias a la creación de empleo, la utilización más eficaz de los recursos naturales y al fomento del comercio local e internacional (APROMAR, 2009).

El control de las enfermedades puede ser de vital importancia en la mejora de este sector. En la Figura 1 podemos observar al crecimiento de la producción acuícola en los últimos años según el informe sobre pesca y acuicultura de la FAO.

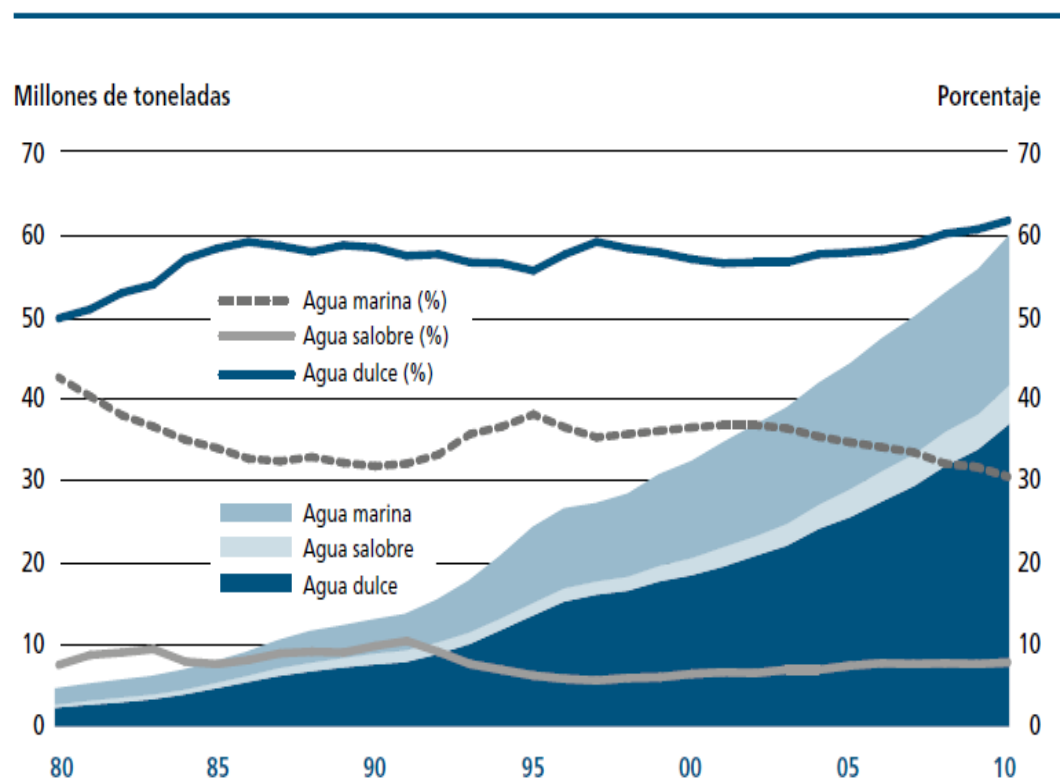


Figura 1. Aumento de la producción de acuicultura desde 1980 a 2010 (FAO 2012)

En 2010 la NASS (National Agriculture Statistics Service) mostró que las enfermedades son la principal causa de pérdidas en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En los últimos años la situación sanitaria en la piscicultura marina española ha empeorado, con un aumento de la incidencia y de la gravedad de varias patologías. Las causas de este empeoramiento en el estado de salud general se podrían englobar en cuatro factores principales (Zarza, 2007):

- *Expansión e intensificación del cultivo*

Las granjas acuícolas modernas trabajan con mayores densidades, es decir, con más biomasa en riesgo; las instalaciones tienen más “edad” con lo que el tiempo de residencia de los patógenos también aumenta y éstos se van “asentando”.

- *Factores medioambientales*

El cambio climático llega también a la piscicultura. Las temperaturas medias anuales aumentan y con ellas las enfermedades estacionales asociadas a aguas más calientes. Por otro lado, el sistema de cultivo que favorece la degradación más rápida de la calidad del agua tiene más probabilidad de sufrir ciertas patologías.

- *Factor humano*

Lamentablemente, la gran mayoría de las enfermedades de piscicultura está relacionada con una gestión sanitaria deficiente.

- *Disponibilidad de medicinas*

Muy pocos medicamentos, a excepción de algunas vacunas, están registrados y autorizados en España. El vacío terapéutico en tema de anestésicos,

productos para baño y premezclas medicamentosas se hace cada vez más grande al mismo tiempo que aumenta la necesidad de combatir nuevas enfermedades.

1.2. PASTERELOSIS POR *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA*

1.2.1. Etiología

El género *Photobacterium* ha sido descrito por primera vez por Martin Beijerinck en 1889, que le asignó ese nombre debido a la capacidad de emitir luz de algunas cepas. En un primer momento, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) había sido clasificada como perteneciente al Género *Pasteurella* (Snieszko y cols., 1964) y se le había proporcionado el nombre de *Pasteurella piscicida* (o “fish killer”) y la enfermedad producida se denominó pasterelosis o pseudotuberculosis debido a los nódulos blanquecinos que aparecían en el bazo de los peces infectados. Posteriormente, Nicolas y cols. (1994) a través del análisis del ácido ribonucleico (ARN) ribosómico reclasificaron esta bacteria como una nueva subespecie de *Vibrio damsela*, pero no fue hasta el año 1995 cuando Gauthiery cols. propusieron la asignación del nombre *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* y aclararon su posición taxonómica. Dicha bacteria pertenece a la Clase *Gamaproteobacteria* y a la Familia *Vibrionaceae*. En la Figura 2 podemos ver la posición filogenética de *Phdp*.

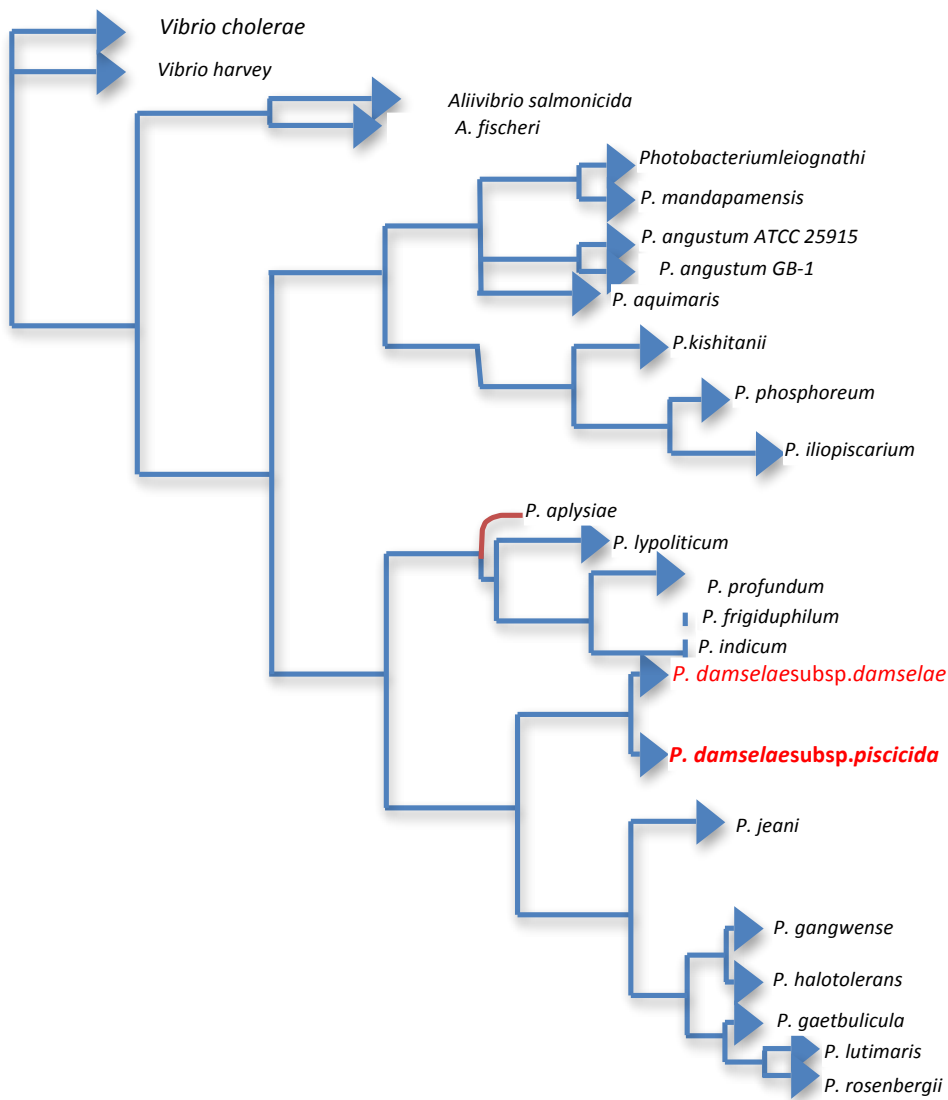


Figura 2. Posición filogenética de *Phdp*

1.2.2. Morfología e identificación

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es una bacteria Gram negativa, bacilo corto, inmóvil, oxidasa y catalasa positivo, y que metaboliza la glucosa. Su identificación se puede hacer a través de la galería bioquímica miniaturizada API 20E donde puede presentar varios perfiles, y entre ellos uno de los más comunes es el que corresponde al código 2005004 (Figura 3).



Figura 3. Perfil bioquímico de *Phdp* mediante el sistema API 20E

Muestra un crecimiento muy bueno en 48 horas a 22 °C en agar infusión cerebro/corazón (BHIA), agar soja/triptona (TSA), agar sangre (AS) y agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) suplementados con un 2 % de NaCl y también en Agar Marino. Las colonias son pequeñas y blanquecinas, el aspecto es pleomórfico. No crece a temperaturas inferiores a los 15 °C ni tampoco a temperaturas superiores a los 37 °C. Es halófilo obligado (no crece en ausencia de NaCl) y concentraciones de NaCl superiores al 7 % inhiben su crecimiento. Es resistente al agente vibriostático O/129 y a la novobiocina. En las colonias viejas se puede observar hemólisis. En caldo soja/triptona (TSB) el crecimiento es más rápido, llegando a un pico de crecimiento a las 24 horas.

1.2.3. Epidemiología

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es el agente etiológico de la enfermedad conocida como pasterelosis o pseudotuberculosis. Dicha enfermedad apareció por primera vez en una población salvaje de perca blanca (*Morone americanus*) y de lubina estriada (*Morone saxatilis*) en el año 1963 en la bahía de Chesapeake, Estados Unidos. Tan sólo tres años después de su aparición en EEUU, las pérdidas económicas causadas por la pasterelosis eran ya de interés mundial afectando sobre todo los cultivos de seriola en Japón. Europa se consideró libre de esta enfermedad hasta los años 90 cuando empezaron a aparecer casos en Francia (Baudin-Laurencin y cols., 1991), Italia (Ceschia y cols., 1991), España (Toranzo y cols., 1991), Grecia (Bakopoulos y cols., 1995), Turquía (Candan y cols., 1996), Portugal (Baptista y cols., 1996), Malta (Bakopoulos y cols., 1997) y Canarias (Real y cols., 1997). La enfermedad tiene lugar en zonas donde se realiza acuicultura marina en regiones templadas y se produce desde la primavera tardía hasta mediados de otoño. Se ha descrito en más de veinte especies de peces marinos, tanto salvajes como de piscifactoría, entre las que podemos citar: perca o lubina blanca, lubina estriada, medregal del Japón, dorada, lubina, bocinegro, salmón Atlántico, múgil, jurel y pejerrey.

Los reservorios están representados por portadores asintomáticos (generalmente peces adultos), resistentes a enfermar, y que mantienen la infección en los colectivos hasta el momento en el que se dan condiciones ambientales

favorables para que aparezca la enfermedad. Son especialmente sensibles los alevines y juveniles. El periodo de incubación varía, de 2 a 4 días, dependiendo de la concentración bacteriana, la virulencia de la cepa, la especie (rodaballo>lubina>dorada) y la edad de los animales (Galeotti y cols., 2002). Existe una clara diferencia en el grado de virulencia entre diferentes especies de peces, y así, las doradas, a partir de los 20gramos son poco sensibles a la enfermedad, mientras que la lubina sigue siendo muy sensible con pesos superiores a los 60gramos. Mortalidades en peces adultos son raras, pero posibles. Los peces manifiestan una mayor sensibilidad a enfermarse en los meses de verano, sobre todo cuando la temperatura del agua es cercana a los 25°C. Como la bacteria es muy sensible en el medio ambiente y solo sobrevive en el agua por corto espacio de tiempo, la transmisión de la enfermedad ocurre pez a pez. Las tasas de morbilidad y mortalidad son muy variables en función de la edad de los peces y de las condiciones ambientales que los rodean.

Aunque *Phdp* únicamente se había aislado de peces enfermos y nunca de portadores asintomáticos o del medio ambiente, Magariños y cols., (1994), demostraron que el medio ambiente marino constituye un importante reservorio, donde la bacteria permanece en un estado de letargia, esto es, viva pero no cultivable, aunque manteniendo su capacidad infectante. Romalde y cols. (1999), encontraron presencia del patógeno en los fluidos seminal y ovárico, y también en huevos ya fecundados, sugiriendo la transmisión vertical de la enfermedad,

Revisión bibliográfica

posteriormente confirmada en dorada (Hanif y cols., 2004). En la Tabla I se muestran las principales especies de peces de donde se ha aislado *Phdp*.

Especie de la que se aisló	Especie de la que se aisló	Referencia
Nombre común	Nombre científico	
Lubina Blanca	<i>Morone americanus</i>	Sniesko y cols., 1964
Lubina Rayada	<i>Morone saxsatis</i>	Sniesko y cols., 1964
Lisa	<i>Mugil cephalus</i>	Lewis y cols., 1970
Medregal	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Kubota y cols., 1970
Dorada Negra	<i>Mylio macrocephalus</i>	Muroga y cols., 1977
Dorada Roja	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Yasunaga y cols., 1983
Pez Ballesta	<i>Navodan modestus</i>	Yasunaga y cols., 1983
Mero rojo	<i>Epinephelus okaara</i>	Ueki y cols., 1990
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	Toranzo y cols., 1991
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	Toranzo y cols., 1991
Lenguado	<i>Solea solea</i>	Baudin-Laurencin y cols., 1991
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Baudin-Laurencin y cols., 1991
Bocinegro	<i>Pagrus pagrus</i>	Ceschia y cols., 1991
Salmón Atlántico	<i>Salmo salar</i>	Speilberg y cols., 1991
Lenguado	<i>Solea senegalensis</i>	Zorrilla y cols., 1999

Tabla I. Aislamiento de *Phdp* en peces

1.2.4. Patogenia

Una vía de infección no clara es el agua. Para comprobar el interés que tiene en los mecanismos de transmisión, Magariños y cols. (1994) realizaron unas infecciones por baño en rodaballo y dorada, obteniendo que las doradas fueran susceptibles de infectarse por esa vía (DL_{50} de 10^5 - 10^6 células/ml) mientras que el rodaballo se mostraba resistente.

El mecanismo de acción patógena de *Phdp* no está demasiado claro, aunque el hecho de provocar lesiones granulomatosas durante la infección crónica, sugiere que esta bacteria sea capaz de resistir dentro de las células fagocíticas del hospedador (Toranzo y cols., 1991).

Desde hace dos décadas se sabe que los productos extracelulares (ECPs) de *Phdp* son letales para muchas especies de peces (Magariños y cols., 1992). Muchos estudios sobre proteínas (extracelulares, periplásmicas, etc) de *Phdp* se han llevado al cabo para aclarar su patogenia. En el estudio de Do Vale y cols. (2005) se comprobó que todas las cepas virulentas de *Phdp* analizadas eran capaces de producir una exotoxina de 56 KDa llamada AIP56 (*Apoptotic Inducing Protein*). Dicha proteína, como indica su nombre, es capaz de inducir apoptosis en las células inmunitarias (neutrófilos y macrófagos) de muchas especies de peces provocando, además, una necrosis secundaria debida a la falta de remoción de las células dañadas y como resultado último un daño tisular irreversible que conlleva a

Revisión bibliográfica

la muerte del animal. La AIP56 de *Phdp* por sí sola es capaz de reproducir la enfermedad y matar al pez afectado, y por lo tanto cabe pensar que esta proteína sea uno de los principales mecanismos de patogénesis de *Phdp*. En la Tabla II se muestran las principales proteínas descritas en *Phdp* y posiblemente asociadas a su patogénesis.

Proteína	Características	Efecto	Referencia
Damselina	Proteína extracelular	Hemólisis en eritrocitos de conejo	Cutter y Kreger, 1990
AIP56	Proteína extracelular Presente sólo en las cepas patógenas analizadas	Induce apoptosis en granulocitos y macrófagos de peces	Do Vale y cols., 2005
Proteína transportadora de vitamina B12	Proteína periplásmica	Transporta la vitamina B12 en el interior de la célula	Boiani y cols., 2009
Metaloproteasa	Proteína extracelular	Letal en cobia <i>Rachycentron canadum</i>	Liu y cols., 2011
Lipoproteína PDP_0080	Lipoproteína de membrana	Adherencia	Andreoni y cols., 2013

Tabla II. Proteínas descritas en *Phdp*

1.2.5. Clínica y lesiones

La tasa de mortalidad por pastereiosis varía entre especies desde baja, en las formas sub-clínicas que ocurre a bajas temperaturas, hasta alta (90%) en algunos casos de infección sobreaguda. Normalmente se estima que las pérdidas son alrededor de un 10%. Externamente el pez presenta melanosis y, a veces zonas hemorrágicas alrededor de las branquias y en el área cefálica, aunque otras veces no presenta ningún síntoma. De hecho, una de las características de esta enfermedad es la ausencia de signos patognomónicos. Roberts (1978) reconoce que este patógeno no produce signos externos o anormalidades en los peces afectados. En la necropsia se observan cambios patológicos diferentes según la enfermedad tenga un curso agudo, subagudo o crónico. En la forma aguda los órganos internos muestran focos de necrosis, en la crónica se aprecian nódulos blanquecinos en diferentes tejidos como bazo (Figura 4) y riñón, aunque su formación depende de la especie y de si la infección es natural o experimental (Magariños y cols., 1996).

A veces aparecen nódulos también en hepatopáncreas, corazón y en menor medida en mesenterio, vejiga natatoria, branquias y peritoneo (Kubota y cols., 1970). Los nódulos suelen tener forma esférica aunque a veces son irregulares. En la infección subaguda los peces se vuelven portadores de la enfermedad y liberan el patógeno al medio ambiente, aunque este tipo de infección también se puede

Revisión bibliográfica

ocasionar a bajas temperaturas (Magariños y cols., 2001). Se ha demostrado que los juveniles de dorada son más susceptibles a la enfermedad (Toranzo y cols., 2005) y que a partir de los 20-25 gramos se vuelven menos susceptibles.

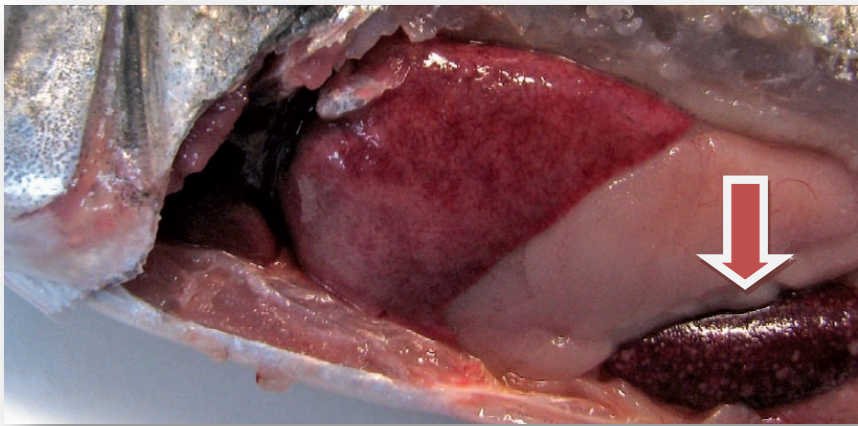


Figura 4. Lesiones granulomatosas en bazo de dorada afectada por *Phdp* (fuente revista *Skretting informa primavera 2007*)

1.2.6. Tratamiento

El tratamiento de los animales enfermos se basa en la quimioterapia, aunque algunas cepas de *Phdp* presentan bastantes resistencias a algunos antibióticos a través de la adquisición de plásmidos R transferibles (Kim y Aoki, 1993). Toranzo y cols. (1991) estudiaron el uso del cloranfenicol y la oxitetraciclina para el control del primer brote de pasterelosis en dorada descrito en España.

1.2.7. Control de la enfermedad

Si bien *Phdp* es muy susceptible al antibiótico ampicilina, la tendencia general es reducir el uso de productos antibióticos en acuicultura. Los antibióticos son un remedio muy a corto plazo y además generan resistencia bacteriana, por lo que es imprescindible buscar alternativas a estos medicamentos. Entre las posibles alternativas encontramos los probióticos, los inmunoestimulantes y las vacunas. Los probióticos se definen como “*suplemento vivo microbiano que cuando se ingieren en cantidades adecuadas producen efectos beneficiosos en el hospedador*” (Fuller, 1992). Dentro de los numerosos efectos beneficiosos de los probióticos, la modulación del sistema inmunológico es uno de los aspectos más estudiados en los últimos años. Los probióticos comúnmente usados en acuicultura pertenecen a diferentes grupos bacterianos, pero también se han utilizado algas unicelulares y levaduras. Hoy en día, existen en el mercado varios productos probióticos, pero solo el *Pediococcus acidilactic* (Bactocell®) está aprobado por la

Revisión bibliográfica

Unión Europea para ser utilizado en acuicultura de salmónidos y crustáceos. Entre los inmunoestimulantes hay que destacar los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, que estimulan la proliferación de las células inmunes y activan varias vías de transducción de señales para producir diferentes citoquinas inflamatorias, tanto en mamíferos como en peces (Secombes y Fletcher, 1992). Actualmente la vacunación es una de las medidas más importantes para prevenir enfermedades bacterianas en los peces de cultivo, y el mejor indicador del efecto de la vacunación como medida profiláctica es la reducción del uso de antibióticos en la fase de producción.

1.3. VACUNAS EN ACUICULTURA

La vacunación se está volviendo una parte fundamental de la acuicultura ya que representa una manera eficaz de prevenir la aparición de enfermedades y al mismo tiempo limitar el uso de antibióticos. La primera publicación científica sobre vacunación en peces data de 1942 y hace referencia a una vacuna oral frente a *Aeromonas salmonicida* que resultó ser muy eficaz (Duff, 1942). Después de esta publicación hubo un vacío de 30 años, probablemente debido al uso masivo de antibióticos, hasta los años 70 cuando la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos impulsó otra vez el interés en desarrollar vacunas eficaces. La primera patente se registró en Estados Unidos en 1976, una vacuna oral frente a *Yersinia ruckeri*, agente etiológico de la enfermedad de la boca roja. En 1981 se patentaron dos vacunas más, una vacuna por baño frente a *Vibrio anguillarum* y otra por inyección intraperitoneal frente a *A. salmonicida*. A estas vacunas siguen muchas otras hasta llegar a la fecha actual. A día de hoy existe un considerable interés científico sobre este tema, tanto para desarrollar nuevas vacunas como para mejorar las ya existentes en el mercado. Otro aspecto de interés es la inmunidad maternal, ya que el proceso de transferencia de inmunoglobulinas de los progenitores a la descendencia todavía no está muy claro. La vacunación de hembras poco antes de la puesta podría producir la inmunización temprana de las larvas, sobre todo frente a patógenos que afectan en las primeras etapas de vida

como *Edwardsiella ictaluri*, *Flavobacterium psychrophilum* o *Phdp* (Hanif y cols., 2004).

1.3.1. Tipos de vacunas

Existen diferentes maneras de clasificar las vacunas. La clasificación general se hace desde el punto de vista microbiológico (agente etiológico frente al que se quiere vacunar) e incluye tres grandes grupos: Vacunas frente a bacterias, vacunas frente a virus y vacunas frente a parásitos. Éstas, a su vez, pueden ser clasificadas según el tipo de formulación.

1.3.1.1. Clasificación microbiológica

a) Vacunas frente a virus

Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces, los virus constituyen el mayor problema, debido a las altas mortalidades que producen, así como el hecho de que frente a ellos no existen tratamientos eficaces. Hasta hace pocos años tan solo existían tres vacunas autorizadas frente a virus de peces: una vacuna frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (NPI) para salmón en Noruega, una frente a iridovirus en Japón y otra frente al virus hemorrágico de la carpa en China (Gudding y cols., 1999). En 2009 la casa farmacéutica Novartis patentó una vacuna elaborada con nodavirus inactivado. Sin embargo las enfermedades virales como las producidas por rabdovirus no tienen adía de hoy una vacunación eficaz. En el grupo rabdovirus (virus en forma de bala) se

incluyen el virus de la septicemia hemorrágica viral (SHV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). Por lo que se refiere al grupo orthomixovirus, la enfermedad más importante es la anemia infecciosa del Salmón (AIS), una enfermedad con grandes efectos en la producción de salmones, ya que provoca importantes mortalidades entre los grupos infectados. Muchos estudios sobre vacunas frente estos virus han sido llevados al cabo, sobre todo con vacunas de ADN, pero hasta la fecha su aplicación ha sido únicamente a nivel experimental. A diferencia de las bacterias, la elaboración de vacunas frente a virus es muy complicada y poco viable debido al hecho que se necesitan cultivos celulares para multiplicar el virus y esto complica extraordinariamente (y encarece) el proceso de producción de la vacuna. Por tanto, por lo que se refiere a enfermedades víricas el mejor tratamiento sigue siendo la prevención. En el caso de instalaciones libres de virus es aconsejable hacer un blindaje sanitario y no entrar animales del exterior sin que previamente hayan pasado un periodo de cuarentena. Para las instalaciones ya afectadas por virus habrá que aplicar otras medidas sanitarias y de manejo (control de densidad de cultivo, evitar estrés, etc.) sobre todo con el fin de evitar la aparición de casos clínicos.

b) Vacunas frente a parásitos

Si bien las enfermedades producidas por parásitos son un hecho bastante recurrente en las piscifactorías mediterráneas, hasta la fecha no existen en el mercado vacunas efectivas frente a dichas patologías.

c) Vacunas frente bacterias

El mayor éxito en el desarrollo de vacunas de uso masivo en acuicultura ha sido contra las enfermedades bacterianas. En la actualidad existen numerosas vacunas disponibles en el mercado frente a enfermedades bacterianas como: Vibriosis por *Vibrio anguillarum*, forunculosis por *Aeromonas salmonicida*, enfermedad de la boca roja por *Yersinia ruckeri*, lactococosis por *Lactococcus garviae*, estreptococosis por *Streptococcus iniae* y frente a la enfermedad bacteriana del riñón por *Renibacterium salmoninarum*. Por lo que se refiere la pastereiosis producida por *Phdp* también existen vacunas en el mercado (apartado “Vacunas frente a *Phdp*”).

1.3.1.2. Clasificación según el tipo de formulación

a) Vacunas inactivadas o muertas

La mayoría de las vacunas utilizadas en acuicultura son vacunas inactivadas. Las vacunas inactivadas o muertas elaboradas frente a bacterias también se conocen como bacterinas, y son elaboradas a partir de un cultivo líquido de la

cepa a utilizar. El cultivo es inactivado normalmente con formalina a diferentes concentraciones, con calor (choque térmico) o con radiación ultravioleta suficiente para matar las bacterias pero que al mismo tiempo altera mínimamente los antígenos. Las mejores vacunas son las que incluyen la bacteria entera más los productos extracelulares (Toranzo y cols., 2009). Estas vacunas pueden incluir toda la célula o fracciones de la misma, tanto proteica como polisacárida.

b) Vacunas vivas atenuadas

La vacunación con vacunas vivas es, a todos los efectos, una infección (Toranzo, 2000) y tiene como ventaja la de estimular la parte celular del sistema inmune. En acuicultura se han desarrollado de forma experimental vacunas vivas atenuadas frente a *A. salmonicida* (Vivas y cols., 2004), *A. hydrophila* (Wang y cols., 2013), *Edwardsiella tarda* (Xiao y cols., 2011), *E. ictaluri* (Pridgeon y cols., 2011) y *V. anguillarum* (Yu y cols., 2012). No obstante, todavía quedan muchos problemas sanitarios por resolver, como por ejemplo el riesgo de desencadenar la enfermedad, la persistencia en el medio ambiente, la posibilidad de contagio a peces salvajes que se aproximan a las jaulas, etc. En la actualidad existe una vacuna viva atenuada frente *E. ictaluri* (suministrada por baño a los alevines de apenas 9 días) cuya patente ha sido registrada en Estados Unidos.

c) Vacunas de ADN

Los esfuerzos para desarrollar vacunas eficaces para las diferentes especies acuícolas ha hecho que se vayan utilizando cada vez más las biotecnologías, y las vacunas de ADN son un ejemplo de este avance. Las vacunas de ADN ofrecen varias ventajas sobre las vacunas convencionales. Son fáciles de producir, no requieren altos gastos económicos, existiendo la posibilidad de producir vacunas polivalentes incluyendo en la composición varios plásmidos. Además, el ADN es una molécula muy estable y no es necesario utilizar bajas temperaturas para su conservación y la inmunidad que confiere este tipo de vacuna suele ser de larga duración y no requiere revacunación (*booster*) (Heppell y cols., 2000).

1.3.2. Vías de administración

Según el tipo de vacuna, la situación sanitaria de la piscifactoría y el tamaño del pez, la vía de administración de las vacunas será distinta (Tabla III). En general las técnicas más utilizadas son:

a) Inyección

Con esta vía conseguimos inocular cantidades conocidas de antígeno en cada pez y la protección suele ser bastante duradera (Mitchell, 1995). Como aspectos negativos tenemos el estrés producido en el pez por la manipulación y el costo elevado debido a la mano de obra. Además no se considera práctico por

debajo de los 20 gramos ya que no se consigue vacunar un número considerable de peces de forma rápida (Horne, 1997). Es posible vacunar por inyección con vacunas polivalentes, hasta pentavalentes, formuladas por ejemplo, con bacterinas y proteínas virales. De esta forma los gastos producidos se compensarían con el tiempo ahorrado ya que estamos vacunando frente a varias enfermedades a la vez. En el caso de vacunas polivalentes hay que tener en cuenta que no haya competición entre los diferentes antígenos u otro tipo de interferencia con el sistema inmune del pez. Otra ventaja de esta vía es que el uso de adyuvantes a menudo refuerza el efecto inmunógeno, aunque a veces tienen efectos secundarios como lesiones en el punto de inoculación, adhesiones entre órganos, etc. En general podemos afirmar que la vacunación por inyección es un buen método de administración que se emplea de manera rutinaria, pudiendo realizarse de forma manual o automática. En el caso de ser manual se requiere anestesia previa para limitar el estrés causado al animal. Un individuo bien entrenado consigue vacunar entre 1000 y 1200 peces cada hora (Ellis, 2002), mientras que las máquinas pueden vacunar entre 7000 y 9000 peces/hora pero la talla de los peces ha de ser mayor y lo más homogénea posible. Un ejemplo es el sistema automático “*Auto Fish System (SV5)*” desarrollado por el Northwest Marine Technology, Inc. en el que los peces sin anestesiar siguen un flujo de agua y son inyectados sin ser manipulados ni sacados nunca del medio. Con este sistema los niveles de cortisol hemáticos se mantienen más bajos que con inyección manual (Sharpe, 2007).

b) Baño

La vacunación por baño es probablemente el método de vacunación más sencillo pero no es adecuado para todos los tipos de granjas (Plant y cols., 2011). Asimismo reproduce la vía de infección natural, es decir el antígeno penetra en el organismo por las branquias, piel y órgano de la línea lateral. A lo largo de los últimos años se han desarrollado varios métodos de vacunación por baño que incluyen la infiltración hiperosmótica, inmersión directa y espray. La infiltración hiperosmótica consiste en sumergir el pez primero en una solución de urea o cloruro de sodio. Los resultados sobre la eficacia de este sistema son contradictorios. Algunos autores afirman que no hay incremento de captación de antígeno y de respuesta humoral en comparación con la inmersión directa. Para otros autores es más eficaz que el baño solo. De todas formas la infiltración hiperosmótica no es muy usada en la práctica. La inmersión directa consiste en sumergir los peces en un baño de vacuna diluida con agua de mar por un cierto periodo de tiempo (baño corto o largo), según el tiempo de exposición la vacuna será más o menos concentrada. Una gran desventaja de este sistema es la cantidad elevada de antígeno que se requiere (Nakanishi y Ototake, 1997) aunque, por otro lado, conseguimos vacunar grandes cantidades de peces y de tamaño muy pequeño que no sería posible vacunar con otro método. Es un procedimiento muy utilizado en la práctica común, sobre todo por baños cortos de 60 segundos. La vacunación por espray fue originalmente diseñada para suministrar vacunas frente

a vibrios en peces de más de 20 gramos, pero el estrés que provoca sigue siendo mayor que la inmersión directa (Ellis, 1988). Actualmente existen otros métodos de vacunación por baño que están todavía en fase de estudio o no son muy usados, como por ejemplo la inmersión en baño de ultrasonido o el método desarrollado por Naganishi en 2002 de baño/inyección combinado. En el método Naganishi un instrumento produce múltiples pequeñas lesiones en el lomo de trucha arcoíris mientras el pez recibe un baño con una bacterina de *S.iniae*. La supervivencia fue un 50% más alta en los peces vacunados que en el control (Naganishi y cols., 2002). En los baños de ultrasonido la frecuencia del sonido a 20 kHz aumenta la permeabilidad de la piel y mejora la entrada del antígeno.

c) Vía oral

Algunas vacunas se pueden suministrar con el pienso mezclando el antígeno con los componentes del *pellet* (o microdieta) durante su preparación o bien pulverizando el pienso con la vacuna y dejándolo secar. El pienso así preparado y almacenado a temperaturas de refrigeración se conserva por largo tiempo. De esta manera conseguimos vacunar grandes biomasas de animales con el mínimo estrés, gasto económico y tiempo. Por otro lado, es muy difícil calcular la dosis exacta que ingerirá cada pez y también la inmunidad conferida no es de larga duración. Esto probablemente se debe al paso del antígeno por el tramo intestinal, que según la especie sea gástrica o agástrica, se verá afectado por más o menos degradación. Actualmente se está invirtiendo mucho esfuerzo para mejorar las vacunas orales,

como por ejemplo incluyendo el antígeno en microalgas con las que se alimentan las larvas (Siripornadulsil y cols., 2007), encapsulándolo en nano y micro partículas o con alginados y quitosano. Este último es un polisacárido natural aislado en crustáceos y que tiene gran potencial para la elaboración de vacunas orales.

Vías de administración	Ventajas	Inconvenientes
Inyección	Cantidades conocidas de antígeno Protección duradera	No es práctica < 20 g Estresante y cara
Baño	Fácil, rápida y económica Se pueden vacunar peces muy pequeños (Inmunidad temprana)	Grandes cantidades de antígeno Inmersión hiperosmótica es muy estresante
Oral	No supone estrés Inmunización de grandes biomásas	No hay control de dosis Tramo intestinal puede degradar antígeno

Tabla III. Vías de administración de vacunas, ventajas e inconvenientes

1.3.3. Vacunas frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Desde la primera aparición de un brote letal de *Phdp* en Estados Unidos y posteriormente en Europa, muchos investigadores se han esforzado para diseñar y conseguir una vacuna eficaz contra este patógeno. Muchas formulaciones han sido probadas, desde vacunas orales microencapsuladas, bacterinas suplementadas con diferentes proteínas antigénicas o elaboradas con diferentes concentraciones de sal, vacunación de reproductores para estudiar la inmunidad vertical, vacunas por baño para la inmunización temprana de alevines, etc. En la Tabla IV se resume, ordenándolas por orden cronológico, las últimas publicaciones científicas sobre vacunas realizadas frente *Phdp* desde el año 2000 hasta hoy.

Especie	Características	Tipo de formulación	Vía de administración	Resultados obtenidos	Referencia
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Alevines	Bacterina	Baño corto	Las branquias son el órgano con más producción de anticuerpos específicos frente <i>Phdp</i>	Dos Santos y cols., 2001
<i>Morone Saxatilis</i>		Bacterinas con diferentes concentraciones de NaCl (0,5-2,5 %)	Inyección		Nitsan y cols., 2004
<i>Sparus aurata</i>	Reproductores	Bacterinas	Inyección I.P.	Se demuestra la existencia de inmunización vertical.	Hanif y cols., 2004
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Alevines de 12-22 g	Bacterinas con o sin adyuvantes	I.P.	Los adyuvantes causan efectos adversos en el pez	Afonso y cols., 2004
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Peces de dos tamaños distintos 2 y 20 g	Bacterinas	Baño Oral I.P.	En los alevines de 2 g la mejor respuesta se obtuvo con inmunización por baño	Bakoupoulus y cols., 2003
<i>Solea senegalensis</i>	Alevines de 5-10 g	Vacunas monovalentes y divalentes (frente <i>Phdp</i> y <i>Vibrio harvey</i>) Enriquecidas con ECPs	Baño corto Baño largo I.P.	La vacuna confiere protección duradera de hasta 4 meses	Arijo y cols., 2005
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Alevines de 2 g	Bacterinas	Oral Baño I.P.	Mejor inmunidad con vacunación I.P	Paolini y cols., 2005
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Peces salvajes y de jaula entre 10 - 48 g	Vacuna oleosa elaborada con bacterinas	I.P.	Los peces vacunados muestran una mayor producción de anticuerpos con respecto al control y un pico entre la 3-4 semana post-vacuna	Gravningen y cols., 2007

Tabla IV. Vacunas realizadas frente *Phdp* desde el año 2000

1.3.4. Aspectos económicos, legislativos y medioambientales

Desde el punto de vista legislativo, todos los productos inmunológicos que se vayan a usar en la Unión Europea, incluidas las vacunas para peces, tienen que cumplir con la legislación nacional que es regulada, a su vez, por la Directiva CEE 90/667/EC. En España, la Ley de Cultivos Marinos 23/1984 y la creación del Libro Blanco de la acuicultura intentan uniformizar los controles sanitarios entre las distintas Comunidades Autónomas. En la actualidad las dos únicas vacunas comercializadas en Europa frente a *Phdp* son la vacuna por baño Icthiovac® PD de la casa comercial Hipra (España) y la vacuna por inyección Aquajet® 2000 para doradas y lubinas producida por la casa farmacéutica Pharmaq y comercializada tan solo en Grecia y Chipre.

1.4. SISTEMA INMUNE EN TELEÓSTEOS

El sistema inmunológico nos protege de una muerte segura frente las infecciones, pues cualquier animal vertebrado o invertebrado inmunodeficiente está expuesto a un peligro mortal. La inmunología es la ciencia que estudia el sistema inmune, así denominada desde que se observó que un ser vivo capaz de recuperarse de una infección conseguía volverse “inmune” frente a ella si era contagiado una segunda vez. Cualquier sustancia capaz de desencadenar una respuesta inmune se denomina antígeno (generador de anticuerpos). Sorprendentemente el sistema inmune de los vertebrados superiores es capaz de reconocer y reaccionar de forma única y específica frente a un número exorbitante de moléculas y, al mismo tiempo, es capaz de reconocer antígenos muy similares entre sí, por ejemplo dos proteínas que se distinguen por un único aminoácido o dos diferentes isómeros óptico de la misma molécula. Existen dos tipos de respuesta inmune, la respuesta específica anticuerpo mediada y la inespecífica célula-mediada, aunque hoy en día se reconoce cierto grado de especificidad también a la componente “inespecífica”. El sistema inmunitario de los peces se sitúa desde el punto de vista evolutivo en un escalón intermedio entre vertebrados superiores e insectos, estando presentes ambas componentes inmunitarias, las específicas y las inespecíficas, aunque estas últimas son mucho más desarrolladas que las primeras. En este estudio nos centraremos sobre el sistema inmune específico o adquirido.

1.4.1. Sistema inmune adquirido

Podemos distinguir tres grandes sectores del sistema inmunitario específico, distintos pero íntimamente conectados entre sí.

1. Los órganos linfoides primarios: Timo y riñón anterior (que en los peces ejerce la función de medula ósea)
2. Órganos linfoides secundarios: Bazo, ganglios y agregados linfoides.
3. Células efectoras: Linfocitos B y T.

Las células efectoras, a diferencia de los granulocitos y macrófagos que representan la primera intervención y que son inespecíficos, tienen un comportamiento estrictamente específico dirigiendo su acción hacia una sola entidad extraña, considerándose por tanto, células inmune “*in sensu strictu*”.

1.4.1.1. Linfocitos

Los linfocitos representan el mayor componente celular en la sangre después de los hematíes, pero su papel en la respuesta inmune no se describió hasta los años cincuenta. Los linfocitos son las células más sofisticadas de la respuesta inmunitaria, tienen un pequeño tamaño (7-10 μm de diámetro) siendo apenas más grandes que un eritrocito, presentando un núcleo esférico relativamente grande, poco citoplasma, pocos orgánulos y casi nada de retículo endoplasmático. Después de su activación, debida al encuentro con un antígeno, empieza una

transformación blástica con considerable aumento de tamaño y aparición de un citoplasma típico de células metabólicamente activas, es decir, con muchas mitocondrias, ribosomas, retículo endoplasmático, etc. En el riñón anterior se originan dos tipos de linfocitos, los linfocitos T que se irán a diferenciar en el timo y los linfocitos B que se diferencian en el riñón anterior. Una vez maduros los linfocitos B y T alcanzan los órganos linfoides secundarios. Dichas células se pueden distinguir morfológicamente solo después de su activación con el antígeno, pues las células no estimuladas (en reposo o “*resting*”) son muy parecidas incluso en microscopía electrónica. La diferencia más importante entre linfocitos B y T es que los linfocitos B son capaces de sintetizar inmunoglobulinas (Ig) mientras que los linfocitos T no. Según el estadio de maduración las Ig pueden permanecer dentro del citoplasma del linfocito B (célula inmadura o pre-B), ser expresada en la superficie de la membrana plasmática (linfocito B maduro) o ser activamente secretada en los líquidos orgánicos (plasma células). Las plasma células se desarrollan en dos o tres días a partir del estímulo, secretan una considerable cantidad de Ig y después mueren en una semana. Son células de moderado tamaño (12-20 μm) con núcleo periférico, heterocromatina distribuida en forma de rueda y citoplasma rico en ribosomas y retículo endoplasmático rugoso. Los linfocitos T o “T-helper” tienen la capacidad de amplificar la respuesta de las otras células, y de hecho ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos y a secretarlos, así como estimular a los macrófagos y otras células no

específicas. Hay otra clase de linfocitos T que se diferencia del primero por el fenotipo de membrana, son los linfocitos T citotóxicos o “*suppressor*”, y su función es la de destruir células extrañas y también células propias alteradas o infectadas. Su acción puede ser directa o a través la producción de sustancias solubles.

1.4.1.2. Anticuerpos

¿Cómo puede el sistema inmune producir tal variedad de anticuerpos específicos? La hipótesis más considerada por la comunidad científica en la actualidad es la del teoría de la selección de clones. Según dicha teoría, durante la ontogénesis cada linfocito se compromete (linfocito comprometido o “*committed*”) a reaccionar frente a un determinado antígeno, incluso antes de ser expuesto al mismo. La célula certifica tal compromiso expresando en su membrana un receptor específico para dicho antígeno. En los vertebrados superiores existen 5 isotipos de anticuerpos o inmunoglobulinas, la IgM, IgG, IgA, IgE e IgD (Figura 5). Las IgM están presentes en todos los linfocitos B, son las inmunoglobulinas más grandes y hasta hace muy poco tiempo se pensaba que eran el único tipo de inmunoglobulinas que existía en los peces teleósteos. Recientemente, Zhang y cols. (2011) han descrito otras clases de inmunoglobulinas presentes en peces, como las IgT en la mucosa de trucha y las IgZ en el pez cebra. La estructura de las inmunoglobulinas está constituida por 4 cadenas polipéptidicas, y más precisamente por dos cadenas pesadas (H) de

Revisión bibliográfica

50.000 Da y dos cadenas ligeras (L) de 25.000 Da unidas entre sí por un enlace no covalente (fuerzas electroestáticas y puentes disulfuro entre las dos moléculas frontales de cisteína). Las cadenas son iguales de 2 en 2 dando lugar a la característica forma de “Y”. Las diferencias entre un anticuerpo y otro residen en la parte N-terminal de las cadenas H y L, y la diferente secuencia del aminoácido es la que determina la diferencia, por lo que dicho fragmento se denomina “variable” o simplemente V. En lo que queda de cadena la secuencia del aminoácido es prácticamente idéntica en todos los tipos de Ig y por lo tanto se denomina segmento constante o C (un segmento constante en la cadena L y 3 ó 4 en la cadena H). Dentro de la zona V, la variabilidad es particularmente elevada en una pequeña porción que se conoce como zona hipervariable, que es donde el anticuerpo se une al epítipo. Las IgM son las Ig más grandes, y esto se debe no solo a su mayor peso molecular (950.000 Da) sino también a la capacidad de unirse a otras 4 moléculas de IgM para formar un pentámero (5 moléculas unidas entre sí en el centro) con elevada capacidad de opsonizar determinados antígenos y que se denomina “macroglobulina”. La ontogénesis de los linfocitos B (productoras de IgM) en peces teleósteos es de vital importancia para la determinación de la respuesta inmune y del momento efectivo para vacunar (Zapata y cols., 2006). Hasta la fecha, la presencia y diferenciación de linfocitos B en teleósteos varía mucho entre diferentes especies y también según el método utilizado para el recuento de dichas células (inmuno-histoquímica, citometría de

flujo, ELISPOT o hibridación *in situ*). Salinas y cols. (2011) indicaron algunas características generales para todas las especies:

1. Las células productoras de Ig aparecen primero en el riñón anterior, luego en el bazo y por último en el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT).
2. La expresión de Ig ocurre antes en la superficie que en el citoplasma de las células productoras.
3. Las Ig son producidas antes en peces de agua dulce que en peces de agua salada (probablemente debido al mayor tamaño del huevo y más rápido desarrollo de la larva que conlleva un más rápido desarrollo del sistema inmune).

Además del riñón anterior y bazo, los linfocitos B se pueden encontrar en abundancia en el MALT de los peces teleósteos, formado por tejido linfoide asociado al intestino (*Gut-associated lymphoid tissue* o GALT), tejido linfoide asociado a la piel (*Skin-associated lymphoid tissue* o SALT) y tejido linfoide asociado a las branquias (*Gill-associated lymphoid tissue* o GIALT). A diferencia de los vertebrados superiores, los peces no tienen un GALT bien organizado, y de hecho, carecen de placas del Peyer y ganglios mesentéricos, y la mayoría de los linfocitos B están presentes en la lamina propia del epitelio de los enterocitos (Rombout y cols., 2010). Las branquias representan una superficie mucosa muy

Revisión bibliográfica

extensa y de fundamental importancia en la lucha contra la entrada de patógenos. Hasta la fecha existen muy pocos trabajos que han analizado la distribución y producción de linfocitos B en las branquias. En el SALT la presencia de elementos del sistema inmune ha sido confirmada tanto en peces teleósteos como en peces cartilagosos (Wolfle y cols., 2009).

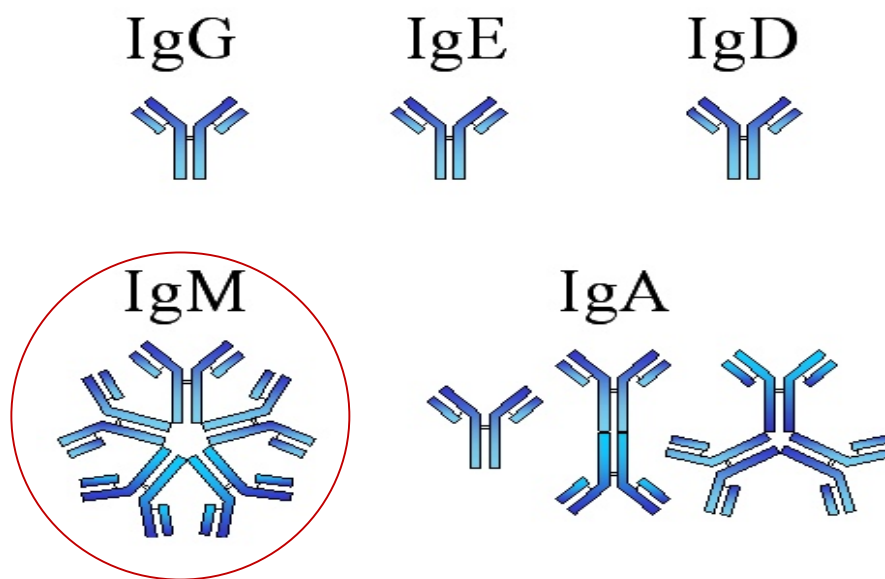


Figura 5. Estructura de las IgM.

Fuente: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca043.htm>

1.4.2. Citoquinas

Las citoquinas son un grupo de proteínas glicosiladas, generalmente de bajo peso molecular, secretadas por células inmunes como los linfocitos T y los monocitos en respuesta a un estímulo inflamatorio. Antiguamente se creía que cada una de estas moléculas procedía de una célula determinada (linfoquinas en los linfocitos, monoquinas en los monocitos, etc.) o tenían una actividad muy específica; quimoquinas, interleuquinas, interferón.

Hoy en día se sabe que estas sustancias pueden ser producidas por diferentes líneas celulares y que pueden tener varias funciones biológicas a la vez, o bien tener el mismo efecto pero en distintos lugares (efecto pleiotrópico). Lo cierto es que son mensajeros químicos muy potentes ya que actúan a bajas concentraciones y de forma muy específica (reaccionando con un receptor de membrana) y por lo tanto se definen como las “hormonas” del sistema inmune.

Los receptores para las citoquinas son glicoproteínas de membrana presentes en la superficie de la célula diana o en forma de moléculas solubles presentes en el suero. Su función es la de transmitir la señal al interior de la célula generando una serie de reacciones “en cascada” en donde intervienen un gran número de moléculas. El resultado final es la activación de unos genes específicos y la obtención del efecto biológico deseado. Se pueden clasificar en función de su estructura química o bien en función de su efecto biológico. Esta última

clasificación es la más relevante desde un punto de vista clínico, pudiéndose clasificar en 4 superfamilias con diferente función:

- Interleuquinas
- Interferones (IFNs)
- Factores de necrosis tumoral (TNFs)
- Factores de crecimiento

En este trabajo nos centraremos sobre las primeras tres superfamilias

1.4.2.1. Interleuquinas (IL)

Las **interleucinas o interleuquinas** (del griego λευκός, -leukós, blanco y κινή, -kiné, movimiento), son un conjunto de moléculas sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algún caso también pueden intervenir en su producción células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es regular la activación, diferenciación o proliferación de los linfocitos, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y también la de regular la producción de otras citoquinas. A día de hoy solo pocas IL han sido clonadas en peces debido a su baja homología con las IL humanas y al hecho que aparecen en el organismo solo en respuesta a determinados estímulos. En este trabajo nos vamos a centrar sobre la interleuquina 1 *beta* (IL-1 β) y su receptor IL-1r2. En trucha arcoíris han sido clonadas dos diferentes genes que codifican para la IL-1 β (Zou y cols., 1999; Pleguezuelos y cols., 2000). En lubina

también ha sido clonado el gen de la IL-1 β (Buonocore y cols., 2004) y se ha demostrado que su producción aumenta después de la infección experimental del pez con lipopolisacáridos (LPS) (Scapigliati y cols., 2001) y también en respuesta a parasitosis de las branquias (Faliex y cols., 2008), observándose que en particular, el incremento en la producción de esta citoquina se observa a nivel de riñón anterior y bazo.

Existe una amplia gama de los efectos biológicos mediados por la IL-1 β , entre ellos está su propiedad de inducir la expresión de genes tales como los de prostaglandinas y leucotrienos, IL-8, e incluso de su propio gen (Dinarello y cols., 1987). También favorece la estabilización de mRNA como el del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) e inhibe la expresión de genes como el de la albúmina y del citocromo p450 (Ghezzi y cols., 1986).

A nivel fisiológico, la IL-1 puede inhibir las contracciones del músculo liso de la pared vascular y de músculo cardiaco, por medio de la producción de óxido nítrico (Finkel y cols., 1992). También puede actuar como un fuerte pirógeno en sistema nervioso central. Adicionalmente se le ha atribuido un papel en el incremento de la síntesis de proteínas hepáticas y en la inhibición de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno, componentes de la matriz extracelular y de los cartílagos.

Los efectos biológicos de la IL-1 β se pueden resumir en:

- a) Producción de óxido nítrico (células cardíacas)
- b) Aumento de la producción de proteínas (células hepáticas)
- c) Actividad pirogénica (células del Sistema Nervioso Central)
- d) Actividad quimiotáctica (granulocitos)
- e) Inducción/inhibición a la proliferación celular
- f) Producción de factores de crecimientos
- g) Inducción a la diferenciación celular
- h) Incremento de la actividad fagocítica

Los principales inductores de la IL-1 β son virus, bacterias, productos microbianos solubles así como los TNFs, los IFNs, la IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13. La familia IL-1 incluye la IL-1 β , la IL-1 α y la IL-18 aunque la IL-1 β es la que tiene la acción más potente a nivel humoral. Otras importantes interleuquinas proinflamatorias son la IL-4 relacionada con inflamación alérgica, IL-8 potente factor quimiotáctico para neutrófilos, la familia IL-6 (que incluye IL-6 e IL-11) y la IL-12 cuya acción es crucial en la defensa frente parásitos, virus y bacterias intracelulares.

1.4.2.2. Interferón (IFN)

El término interferón fue acuñado en 1957 por Isaacs y Lindenmann. El nombre hace referencia a un factor celular inducible que interfiere con la capacidad de una amplia gama de virus para infectar células, y de hecho, esta molécula fue descubierta durante un estudio sobre la infección viral. Si a lo largo de una infección vírica aparece otro virus en el organismo (homólogo o heterólogo con el anterior), su proliferación es inhibida por una sustancia que es secretada por las células infectadas.

Los IFNs poseen propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas, pero fueron sus propiedades antivirales las que primero llamaron la atención de los científicos y las que hoy día sirven como base para el bioensayo. Los IFNs no actúan aisladamente, sino que influyen y son influidos por la mezcla de citoquinas y las demás situaciones celulares en las que intervienen. Cualquier efecto atribuido a un IFN o a cualquier otra citoquina puede ser diferente bajo condiciones distintas. Las acciones de los IFNs se han estudiado principalmente *in vitro* y en modelos animales y, para la mayor parte de ellas, aún no se sabe si se aplican al ser humano *in vivo*. En mamíferos se pueden distinguir tres familias de IFNs (IFN Tipo I, IFN tipo II y tipo IFN λ) dependiendo de la estructura génica, proteica y de las propiedades funcionales. Los IFNs tipo I incluyen al menos 8 subclases (entre ellos los IFNs α y IFNs β) y son proteínas codificadas por un gen que carece de intrones. El IFN tipo II se identifica con el IFN γ , mientras que el

IFN λ presenta características similares a los IFN tipo I con la diferencia que está codificada por un gen que contiene intrones (Robertsen, 2006). El IFN α y el IFN β representan la primera línea de defensa frente a un virus y tienen un peso molecular entre 16 y 26 KDa.

El IFN γ corresponde al dicho "Interferón Inmune", siendo producido por las células Natural Killer (NK) y por los linfocitos T activados por estímulos antigénicos y mitógenos, o en respuesta a la interleuquina-12 (IL-12) y 18 (IL-18), presentando actividad antiviral inferior a los dos precedentes, pero siendo más eficaz a la hora de inhibir microorganismos intracelulares como *Rickettsia*, *Listeria*, etc. De hecho, el IFN γ es un potente factor de activación de macrófagos (MAF) induciendo la activación de células como las células NK y los macrófagos. La existencia de una sustancia IFN-like ha sido demostrada en muchas especies de peces. Gravell y Malsberger en el año 1965 observaron que el virus de la necrosis pancreática infecciosa no se replicaba en cultivos mantenidos a 34°C, mientras que sí replicaba a 23°C, atribuyéndose este fenómeno a la existencia de una sustancia IFN-like y no como un efecto directo de la temperatura sobre la replicación viral. También en el pez gato la infección de las células del ovario (CCO) inducida por un *Reovirus* inactivado por radiación UV, provocó la aparición de un factor que bloqueaba el efecto citopático del herpes virus del pez gato del canal (CCV) (Cinchar y cols., 1998).

Atendiendo especialmente a sus efectos antivirales, se ha propuesto una serie de criterios sobre lo que constituye un IFN. Un IFN debe:

- ✓ Ejercer efectos inhibidores sobre una amplia gama de virus no emparentados entre sí.
- ✓ Tener una actividad celular que demuestre la necesidad de una síntesis concurrente de proteínas y ARN.
- ✓ Diferenciarse de cualquier actividad de interferencia por viriones vivos o inactivados.
- ✓ No estar relacionado con efectos tóxicos inespecíficos en las células que limiten el crecimiento viral.
- ✓ Mostrar una pérdida de la actividad biológica después de un tratamiento con enzimas proteolíticas.
- ✓ Mostrar una relativa especificidad de especie.
- ✓ Mostrar la neutralización de su actividad biológica por un anticuerpo específico

La actividad antiviral del IFN es indirecta, siendo ejecutada por otras sustancias. De hecho, bajo el estímulo IFN las células sintetizan nuevas proteínas y aumentan el nivel de las que ya se estaban produciendo (Stark, 1998). Una vez producido, el IFN se une a un receptor específico presente en la membrana plasmática de varias células, el complejo IFN-receptor es transportado en el citoplasma donde, a nivel de la membrana nuclear, activa una serie de reacciones

bioquímicas que tienen como resultado final la producción de otras proteínas. No se sabe en qué estadio se bloquea la replicación viral, sin embargo, el IFN actuaría sobre un gen de la célula, localizado en el cromosoma 21 del ser humano capaz de sintetizar proteínas antivirales que inhiben la replicación del virus en el interior de la célula (RNAm).

El IFN induce la activación de alrededor de 100 genes incluyendo los que codifican la 2,5 oligoadenilatosintetasa (OAS), la proteína kinasa dependiente del dsRNA (PKR) y las proteínas Mx (proteínas de resistencia a myxovirus). Estas proteínas sintetizadas por el estímulo IFN pueden mediar, suprimir o ampliar la respuesta inmune. La ampliación de la respuesta inmune es debida a la degradación, o prevención de la síntesis del ARN viral.

1.4.2.3. Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

Como indica su nombre, el factor de necrosis tumoral, descubierto y clonado en 1985, es una molécula capaz de producir necrosis hemorrágica en neoplasias y producir la muerte de algunas líneas celulares tumorales. Desafortunadamente su uso en medicina como terapia contra el cáncer ha sido obstaculizado debido a su elevada toxicidad. En humanos se han clonado 18 moléculas pertenecientes a la superfamilia TNF (TNFSF) y 29 receptores específicos para dichas moléculas (TNFRSF). TNFSF y TNFRSF son cruciales en algunas reacciones como la inflamación, apoptosis, homeostasis de linfocitos y desarrollo de tejidos. Los receptores para TNF son proteínas transmembrana formadas por un extremo N-

terminal intracelular y un extremo C-terminal extracelular (Wiens y Glenney, 2011). En peces, homólogos de TNF humano han sido descritos en una amplia variedad de especies como platija japonesa (Hirono y cols., 2000) trucha arcoiris (Liang y cols., 2001), dorada (Garcia-Castillo y cols., 2002), pez gato (Zou y cols., 2002), carpa (Saeij y cols., 2003), lenguado (Ordas y cols., 2007), perca china (Xiao y cols., 2007) y carpín (Grayfer y cols., 2008). La superfamilia TNF incluye dos moléculas muy parecidas entre sí: TNF α conocido también como factor responsable de la caquexia o caquectina y TNF β también conocido como linfoxina. El TNF α es seguramente el más conocido, y es producido por los macrófagos activados, los linfocitos T, las células NK, los astrocitos y las células de Kupffer. Sus funciones son las siguientes:

- a- Lisis de células tumorales
- b- Incrementa expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II
- c- Activa quimiotaxis y fagocitosis de los macrófagos
- d- Activa células polimorfonucleadas (eosinófilos y neutrófilos sobre todo)
- e- Induce catabolismo del cartílago (activación de osteoclastos)
- f- Actividad antiviral
- g- Es el principal mediador del shock séptico y de la caquexia
- h- Estimula los linfocitos T y B

i-Favorece el crecimiento de los fibroblastos y de las células endoteliales (angiogénesis)

j-Sinergia con IFN γ , IL-1 β , IL-3, IL-6, GM-CSF y factor inmunomodulador

1.4.3. Ciclooxigenasa 2 (COX-2)

Las moléculas proinflamatorias son las que promueven la inflamación. Las ciclooxigenasas (COX) son enzimas proinflamatorias que catalizan la reacción que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas. Pueden actuar como dioxigenasas o como peroxidasas. Son proteínas de membrana inhibidas por los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el ácido acetil salicílico. Tienen como función mediar en los procesos de inflamación y en la señalización por prostanoideos. La COX-1 y la COX-2 difieren entre ellas por un solo aminoácido, pero mientras que la COX-1 es constitutiva, la COX-2 se expresa tras inducción inflamatoria. La COX-2 es la isoforma de la enzima inducida por estímulos proinflamatorios y se considera que es principalmente responsable de la síntesis de los mediadores prostanoideos del dolor, la inflamación y la fiebre. La expresión de la COX-2 es provocada por diversos mediadores inflamatorios (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , factores de crecimiento, etc.) en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, condrocitos y osteoblastos) y tejidos (aparato reproductor, sistema nervioso central, estómago, riñón, etc.). Homólogos de la COX-2 humana han sido clonados en varias especies de peces como trucha arcoíris (Zou y cols.,

1999), trucha (Roberts y cols., 2000), pez cebra (Grosser y cols., 2002), lubina (Buonocore y cols., 2005) y galludo (Yang y cols., 2002).

1.4.4. Mx

Los genes que codifican para Mx han sido clonados en diferentes especies como la trucha arcoíris (Trobridge y cols., 1995; Trobridge y cols., 1997), salmón Atlántico (Robertsen y cols., 1997), halibut del Atlántico (Jensen y cols., 2000), platija japonesa (Lee y cols., 2000), pez globo (Yap y cols., 2003) y dorada (Tafalla y cols., 2004). Las proteínas Mx pertenecen a la familia de GTPasas y son proteínas inducidas por el IFN tipo I en vertebrados.

La presencia y conservación de estas proteínas en mamíferos, aves, y peces teleósteos, sugiere su importancia en los mecanismos de defensa frente a virus. Su acción antiviral en peces ha sido confirmada en salmón, y así el virus de la necrosis pancreática infecciosa resulta fuertemente inhibido cuando las células de esta especie expresan elevadas concentraciones de proteínas Mx en respuesta a IFN o al ácido poliinosínico-polictidílico (Poly I:C) (Jensen y cols., 2002, Larsen y cols.; 2004; Mc Beath y cols., 2007). También en caso de infección con el virus de la septicemia hemorrágica viral (SHV) los leucocitos de trucha arcoíris producen Mx (O'Farrell y cols., 2002). Hoy en día se sabe con certeza que la inducción de Mx no se debe solo a virus sino también a lipopolisacáridos de

membrana, a ADN sintético y también en respuesta a vacunas inactivadas frente a bacterias (Acosta y cols., 2004).

1.5. EFECTO DE LA VACUNACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y DEL GEN MX

El efecto beneficioso de las citoquinas en la defensa del organismo está ampliamente reconocido por la comunidad científica, y de hecho algunos grupos de investigación están trabajando para poder suministrar citoquinas a los peces como inmunoestimulantes. El efecto de muchas vacunas sobre el sistema inmune y en particular sobre estas moléculas no ha sido del todo aclarado. La mayoría de los estudios se han efectuado en salmón Atlántico y en trucha arcoíris. Por lo que se refiere a especies mediterráneas, hay muy poca o ninguna información sobre el tema. En la Tabla V se resume la bibliografía encontrada sobre el efecto de la vacunación en peces en la producción de moléculas proinflamatorias y del gen Mx.

Vacuna	Especie	Vía de administración	Moléculas analizadas	Resultados	Referencia
Vacuna trivalente Frente a <i>A. salmonicida</i> <i>V. anguillarum</i> y <i>Moritella viscosa</i>	<i>Salmo salar</i>	I.P. IM	IL-1 β Mx	Sobre-expresión	Haughland y cols. (2005)
Bacterina frente <i>A. salmonicida</i>	<i>Onchorhynchus gorbuscha</i> y <i>O. keta</i>	I.P.	IL-1 β TNF α	Sobre-expresión	Fast y cols. (2006)
Bacterina frente <i>Y.ruckeri</i>	<i>O. mykiss</i>	I.P.	IL-1 β IFN γ	Sobre-expresión	Raida y Buchmann (2007)
Bacterina frente <i>Y.ruckeri</i>	<i>O. mykiss</i>	Baño	TNF α IFN γ	Sobre-expresión	Raida y Buchmann (2008)
Vacuna ADN frente VHSV	<i>O. mykiss</i>	I.P.	IL-1 β IFN γ Mx	Sobre-expresión	Cuesta y Tafalla (2008)
Inmunoestimulante PLGA	<i>Salmo salar</i>	I.P.	TNF α IL-1 β	Sobre-expresión	Fredriksen y cols. (2011)
Vacuna comercial frente <i>Y.ruckeri</i>	<i>O. mykiss</i>	I.P.	IL-1 β IFN γ	Sobre-expresión	Hanur y cols. (2011)
Vacuna frente <i>Vibrio anguillarum</i>	<i>D. labrax</i>	I.P.	COX-2	Sobre-expresión	Buonocore y cols. (2005)

Tabla V. Efecto de las vacunas sobre la producción de moléculas proinflamatorias y Mx



Objetivos

2. OBJETIVOS:

- 1) Estudiar el efecto de tres vacunas inactivadas frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* sobre la expresión génica de las moléculas proinflamatorias IL-1 β , IL-1r2, TNF- α , COX-2 y el gen Mx en dorada.
- 2) Comparar el efecto de tres diferentes vías de inactivación de la vacuna frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* sobre la producción de células IgM positivas en el bazo y en las branquias de dorada.
- 3) Desarrollar un protocolo de citometría de flujo eficaz para el recuento de las células IgM positivas en el bazo y en las branquias de juveniles de dorada (*Sparus aurata*).
- 4) Estudiar la cinética de producción de las células IgM positivas a lo largo de la vacunación y revacunación.



*Materialles
y Métodos*

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS

En este apartado vamos a describir los procedimientos previos que fueron necesarios para poner a punto los protocolos utilizados en el ensayo definitivo

3.1.1. Estandarización de los protocolos para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx en respuesta a la vacunación frente *Phdp*

En este apartado se describe cómo fueron preparadas las vacunas utilizadas para inmunizar los peces experimentales.

3.1.1.1. Cepa utilizada en el estudio

En este estudio hemos utilizado la cepa 94/99 de *Phdp* aislada por nuestro grupo de investigación de un brote natural ocurrido en Canarias en el año 1999. Hemos procedido a la identificación de la bacteria por métodos de observación directa, tinción de Gram, identificación bioquímica a través de la galería miniaturizada API 20E (BioMérieux®, España) y por métodos de biología molecular a través de PCR convencional. Una vez identificada la bacteria se conservó liofilizada a 4 °C.

3.1.1.2. Formulación de las vacunas inactivadas frente *Phdp*

En el ensayo previo se probaron tres vías de inactivación (Figura 6) con el fin de elaborar tres bacterinas a partir de la cepa *Phdp* 94/99. Las vías de inactivación elegidas fueron:

1. Con formaldehído a una concentración del 5 ‰ (Acosta y cols., 2000)
2. Con choque térmico de 10 min a 80 °C (López-Doriga y cols., 2000 modificado)
3. A través de exposición a radiación ultravioleta (UVA)

3.1.1.2.1. Vacuna inactivada con formol

Previamente se realizó una curva de crecimiento de la cepa 94/99. Para ello se sembró una colonia de esta cepa en 200 ml de caldo BHIB (ANEXO I) enriquecido con 1,5 ‰ de sal y se dejó crecer en agitación continua a 25 °C. Se midió la absorbancia a 600 nm de longitud de onda, midiendo a diferentes tiempos de crecimiento y a través de diluciones seriadas se hizo un recuento en placa del número de ufc/ml. Se estableció así la relación entre ufc/ml y absorbancia. Se volvió a sembrar una nueva colonia en caldo BHI y se dejó crecer en las mismas condiciones, cuando el cultivo alcanzó el valor de absorbancia igual a 1,2 se añadió el formaldehído al 5 ‰ y se dejó actuar 24 horas en agitación continua. Se comprobó que el formaldehído a esta concentración fue suficiente para inactivar el

cultivo líquido de 200 ml y se resembraron 100 μ l del cultivo inactivado en medio de cultivo para confirmar la ausencia de crecimiento.

3.1.1.2.2. Vacuna inactivada con calor

Se probaron dos tipos de choque térmico, en estufa y en baño maría. El choque térmico en estufa a 80 °C no fue suficiente para inactivar el cultivo líquido de la bacteria. Se probó entonces con la inactivación por baño. Para ello se introdujo un matraz con 200 ml de cultivo a una concentración de 10^8 ufc/ml en un baño María a 80 °C y cuando la temperatura en el interior del matraz alcanzó los 80 °C se empezaron a contar diez minutos. Con este sistema se logró inactivar el cultivo líquido por choque térmico. Se resembraron 100 μ l del cultivo inactivado en medio de cultivo para confirmar la ausencia de crecimiento.

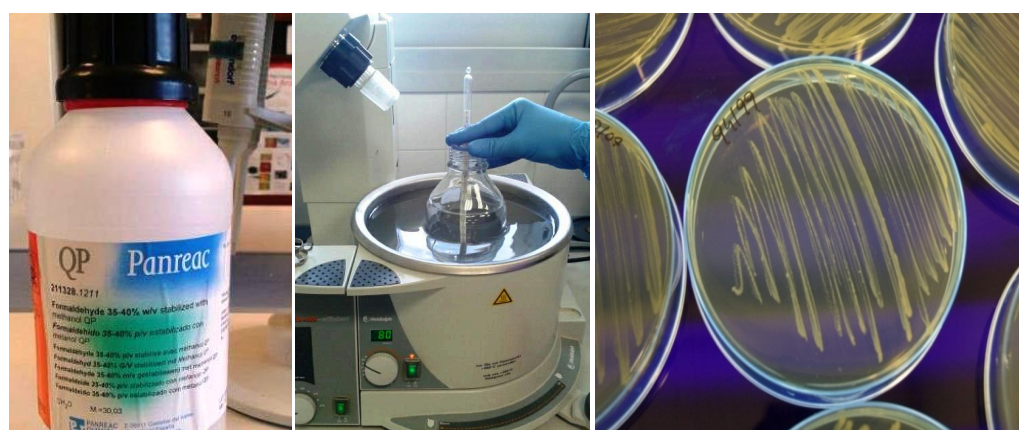


Figura 6. Inactivación con formol, con calor y con radiación UVA

3.1.1.2.3. Vacuna inactivada con radiación UVA

Con respecto a la inactivación por radiación UVA, se probaron dos tipos de inactivación; en matraz (cultivo líquido) y en medio de cultivo sólido. También se probaron diferentes tiempos de exposición a la radiación (1, 2, 3 y 4 horas). Para la inactivación en matraz se utilizó una lámpara de radiación UVA, se cogieron muestras desde una hora de radiación hasta cuatro horas, y ninguna fue suficiente para inactivar un cultivo líquido de 10^8 ufc/ml. Por ello se probó la inactivación en medio de cultivo. Se sembró una colonia de la cepa 94/99 en varias placas de BHIA (ver ANEXO I) y una vez crecidas se inactivó con un transiluminador BIORAD UV (transiluminator 2000). Finalmente, después de dos horas de exposición se consiguió inactivar el cultivo. Se confirmó la eficacia de la inactivación sembrando en medio BHIA y observando la ausencia de crecimiento. Se recogieron las colonias inactivadas en placa con un bastoncillo estéril y se resuspendieron en caldo BHI. Se ajustó la concentración a 10^8 ufc/ml para obtener una concentración final de 10^7 ufc/ml a la hora de vacunar (dilución 1:10 en agua de mar).

3.1.2. Estandarización de los protocolos para el estudio de las células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente *Phdp*

En este apartado se describe la puesta a punto de los protocolos de extracción de leucocitos de bazo y branquias de dorada así como de los protocolos de citometría de flujo utilizados para medir las células IgM positivas.

3.1.2.1. Peces experimentales

En el ensayo preliminar se utilizaron 40 doradas cedidas por la empresa local ADSA (Alevines y Doradas S.A., Gran Canaria) para poner a punto un protocolo de extracción de leucocitos del bazo y de las branquias y, una vez obtenidas los leucocitos, poner a punto un protocolo de citometría de flujo para el marcaje de las células IgM positivas.

3.1.2.2. Extracción de leucocitos

Para la extracción de leucocitos de bazo y branquias hemos seguido el protocolo descrito por Dos Santos y cols. (2000) con algunas modificaciones. Los bazos y branquias extraídos en el día 4, 9, 11, 14, 18 y 23 post vacunación (Esquema II) de ocho peces por tanque se guardaron en placas Petri con medio MEM modificado por Dulbecco (Sigma Aldrich) y se mantuvieron en hielo (Figura 7 A y B) y posteriormente se trituraron de forma manual con un mortero

Materiales y Métodos

estéril y se filtraron a través de una membrana de nylon de 100 μm (Figura 7 C y D). Las células así filtradas se centrifugaron, se resuspendieron en medio MEM y se pasaron a nuevo tubo con 2 ml de Lymphoprep[®]. Este producto consigue separar las diferentes células en base a su densidad, así que centrifugamos y nos quedamos con un pellet (Figura 7 E) de células más pesadas (alguna célula somática y eritrocitos) y una interfase de células blancas (Figura 7 F) más ligeras que recolectamos con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Nos quedamos con las células blancas, las lavamos y las resuspendemos en 1 ml de PBS estéril. Contamos las células en una cámara de Neubauer y ajustamos la concentración final a 10^6 cel/ml y las guardamos en medio MEM al 10 % de dimetilsulfoxido (DMSO) a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis por citometría de flujo.

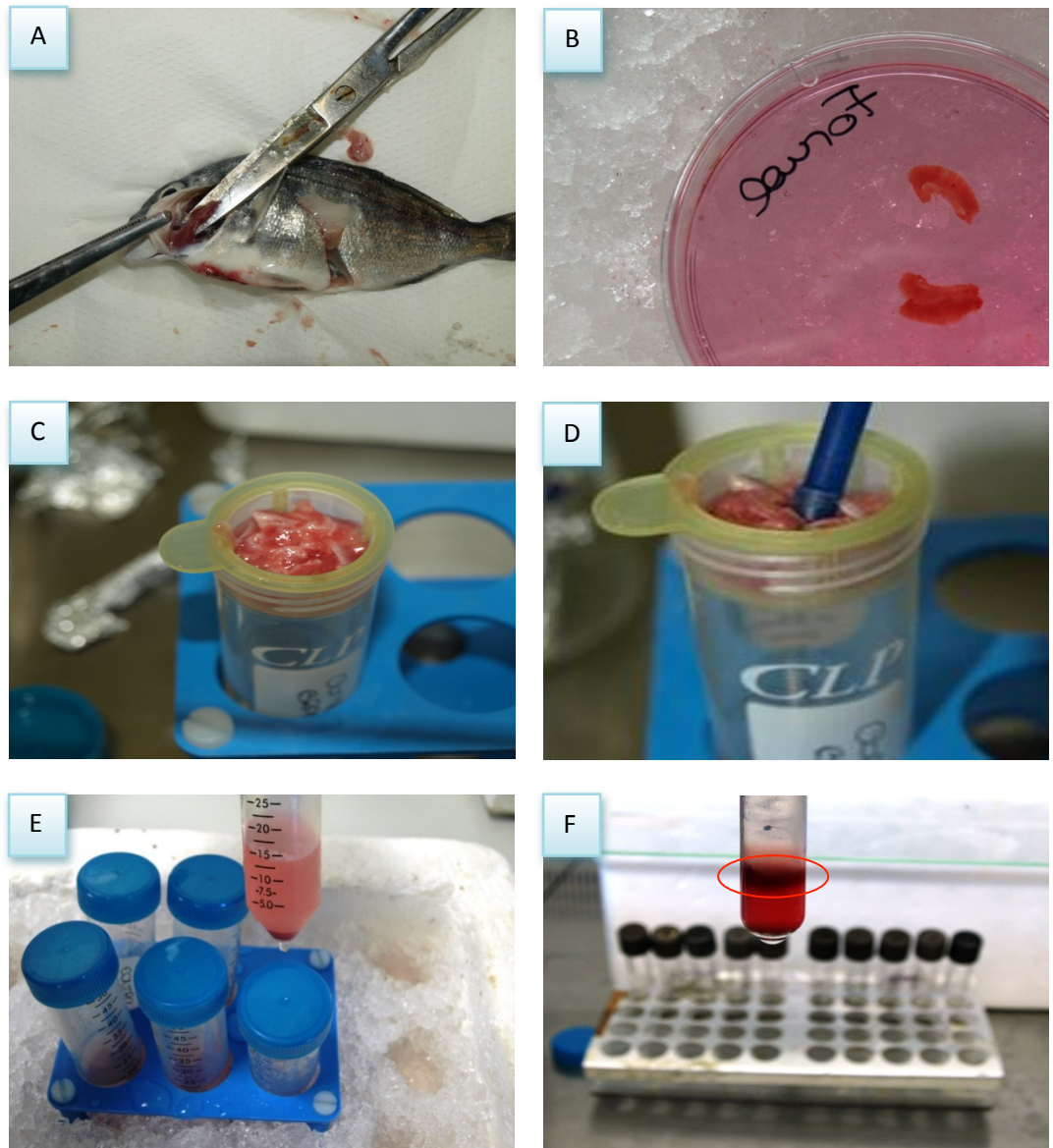


Figura 7. Extracción de leucocitos de bazo y branquias

3.1.2.3 Citometría de flujo

Para los análisis de citometría de flujo hemos utilizado un citómetro Beckam Coulter (Figura 8) y hemos puesto a punto un protocolo idóneo para células inmunes de dorada (Tabla VI). Para ello hemos extraído leucocitos con la técnica anteriormente descrita y hemos analizado las poblaciones celulares presentes en el bazo y en las branquias. El índice de emisión de luz hacia adelante o forward scatter (FSC) nos da una indicación sobre el tamaño de nuestra células, a mayor emisión de luz corresponde un mayor tamaño celular. El índice Side scatter (SSC), o sea emisión de luz hacia los lados, representa la luz que se dispersa lateralmente debido a la presencia de orgánulos dentro de la célula, es decir nos da una idea de la “complejidad” celular. De esta forma, un macrófago que es una célula grande y compleja tendrá un FSC y un SSC mayor que un linfocito que es una célula de dimensiones más reducida.

Parámetro	Voltios	Ganancia
FSC	5	5
SSC	5	7.5
FL1	630	1
AUX	5	10

Tabla VI. Protocolo de citometría utilizados para leucocitos de dorada

Una vez localizados los linfocitos dentro de las subpoblaciones presentas en las muestras, hemos puesto a punto un protocolo de tinción de éstos con el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceina) que emite fluorescencia verde a una longitud de onda de 488 nm Para que las IgM de dorada emitieran fluorescencia los hemos marcado con un anticuerpo monoclonal frente a IgM de dorada (AquaMab, Stirling), al que posteriormente conjugamos con FITC. Para la conjugación del anticuerpo con el fluorocromo hemos utilizado la columna de conjugación en pequeña escala de la casa SIGMA. El protocolo a seguir para la conjugación es indicado por el fabricante (Figura 9).



Figura 8. Citometro de flujo y ordenador con software para citometría

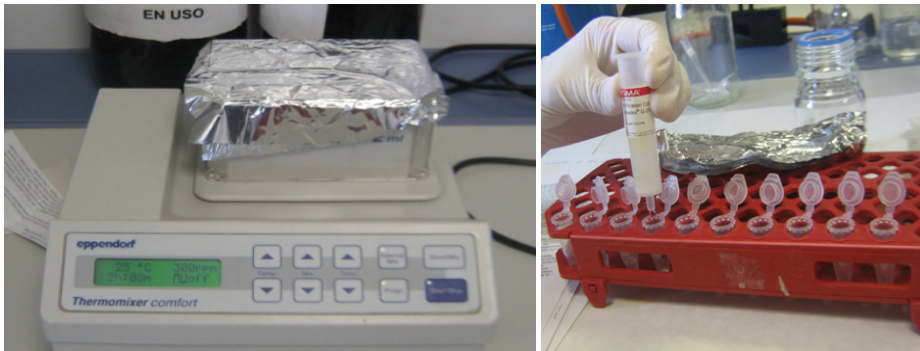


Figura 9. Conjugación FITC en pequeña escala

Una vez conjugado el FITC con el anticuerpo, el último paso es establecer cuál es la concentración mínima de anticuerpo capaz de teñir nuestras células. Para ello hicimos una prueba de conjugación de cantidades decrecientes de anticuerpo con cantidades decrecientes de células.

Se probaron diferentes cantidades de anticuerpo (20, 10 y 5 μ l) anti-IgM de dorada a una concentración conocida con diferentes volúmenes de células (100, 50, 25 y 12,5 μ l) a la misma concentración (10^6 cél/ml) y se estableció la menor cantidad de anticuerpo capaz de emitir fluorescencia.

3.2. ENSAYO DEFINITIVO

3.2.1. Ensayo definitivo para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx en respuesta a la vacunación frente *Phdp*

3.2.1.1. Cepa utilizada en el estudio

La bacteria 94/99 liofilizada fue rehidratada en 1 ml de PBS estéril (ANEXO I) y 100 µl del cultivo rehidratado se incubaron durante 48 horas a 25 °C en Agar sangre (ANEXO I) enriquecido con el 1,5 % de sal y el 1 % de glucosa. El suplemento del 1 % de glucosa al medio de cultivo permite que *Phdp* produzca una capsula (Acosta y cols., 2004). Una vez comprobada la inexistencia de contaminación se resembró una colonia de 94/99 en BHIA con el 1,5 % de sal y se dejó incubar 48 horas a 25 °C. La bacteria así crecida se utilizó para preparar las vacunas.

3.2.1.2. Peces experimentales

1500 doradas de 0,1 g de peso inicial procedentes del Mesocosmos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) fueron mantenidas en dos tanques de 500 l de capacidad con circuito de agua abierto, temperatura del agua de 25 °C, aireación constante y fotoperiodo natural de 12 horas. Los peces fueron

Materiales y Métodos

alimentados diariamente hasta saciedad aparente con microdieta de la casa comercial Skretting hasta alcanzar el peso necesario para empezar el experimento. Una vez alcanzado el peso de 5 gramos los peces fueron distribuidos de forma aleatoria y aclimatados en 10 tanques de 500 l (esquema I).

3.2.1.3. Vacunas

Las vacunas fueron preparadas según se los protocolos puestos a punto anteriormente (3.1.1.2.). Para la vacuna inactivada con calor se eligió la técnica de inactivación por baño María, mientras que para la vacuna inactivada con radiación UVA se eligió inactivar en placa (cultivo sólido) durante 2 horas. Como control positivo se utilizó la vacuna comercial Icthiovac-PD® producida por la casa comercial Hipra.

3.2.1.4. Vacunación

Los peces experimentales fueron divididos en cinco grupos por duplicado como se detalla a continuación:

Grupo I-Vacuna inactivada con formol (150 peces/tanque)

Grupo II-Vacuna inactivada con calor (150 peces/tanque)

Grupo III-Vacuna inactivada con radiación UVA (150 peces/tanque)

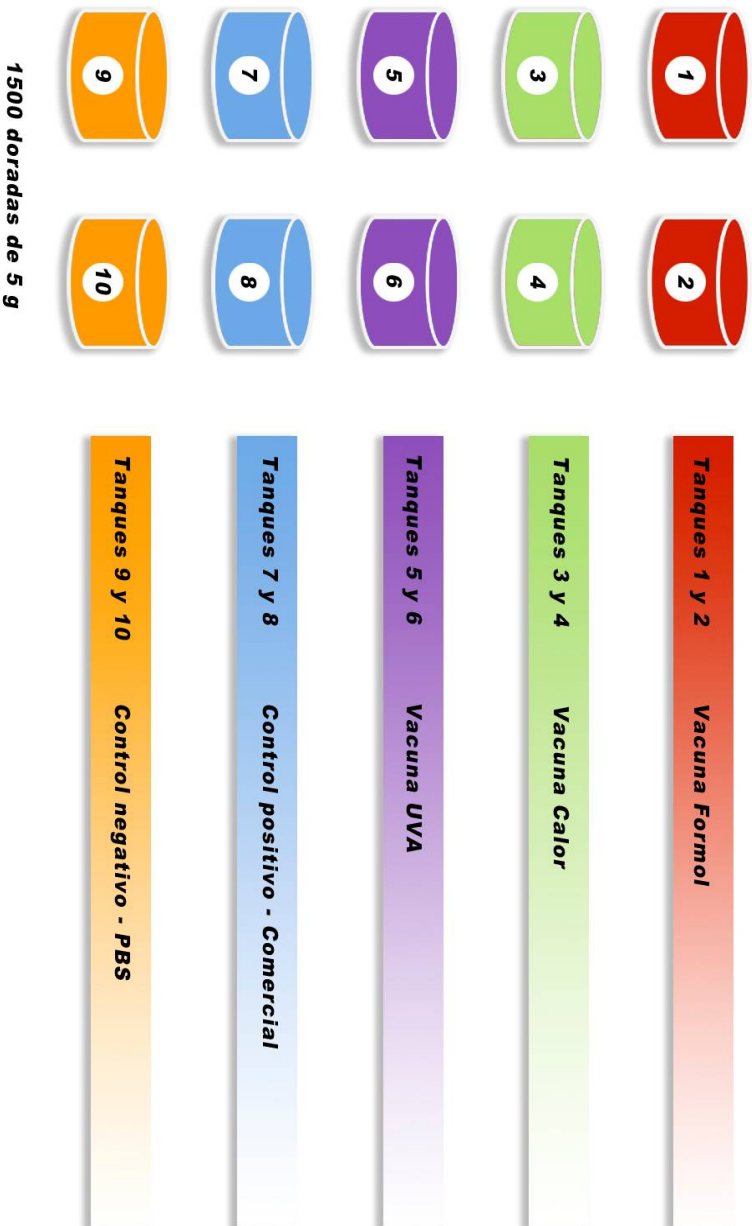
Grupo IV-Control positivo (150 peces/tanque)

Grupo V-Control negativo (150 peces/tanque)

Los peces fueron distribuidos de forma aleatoria en diez tanques como se muestra en el esquema I. Una vez aclimatados (día 0) los peces de cada grupo se vacunaron por baño corto (60 segundos) en una dilución 1:10 de agua de mar(1 litro de vacuna: 10 litros de agua de mar).Durante el baño se mantuvo una aireación muy fuerte (Figura 10) y una vez vacunados los peces se devolvieron a sus respectivos tanques. Como control negativo se utilizó un grupo de peces que recibió un baño de 60 segundos en fosfato buffer salino (PBS), y como control positivo un grupo de peces que fue vacunado con la vacuna comercial IcthiovacPD® (Hipra, España). Al día 31 post vacunación los peces fueron revacunados (*booster*) siguiendo el mismo procedimiento descrito en la primera vacunación.



Figura 10. Vacunación por baño de peces experimentales y peces control



Esquema 1. Distribución aleatoria de los peces experimentales

3.2.1.5. Toma de muestras para el estudio de la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx a través de RT-PCR

Los días 1, 2, 3 y 4 post-vacunación se sacrificaron tres peces por tanque por sobredosis de anestésico (fenoxietanol) y se extrajo el hígado de forma aséptica utilizando una hoja de bisturí estéril. El tejido así extraído se cortó en dos (muestras por duplicado) y se guardó una parte en eppendorf estéril con 500 μ l de Tripure y otra parte en eppendorf estéril con 500 μ l de RNA later. Las muestras en Tripure se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis mientras que las muestras en RNA-later fueron almacenadas a -80 °C. En el Esquema II se puede observar la cronología de la toma de muestras.

3.2.1.6.Extracción de ARN

Se procedió a la extracción de ARN de las muestras guardadas con Tripure. Las muestras fueron homogenizadas a través de un sonicador Sartorius “Labsonic® M” (amplitud 100 %, ciclos 100) que permitió romper la pared celular y hacer que el ARN quedara libre (Figura 11). Una vez que las muestras estaban completamente homogenizadas, se añadió un 10 % del volumen de cloroformo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. En este punto podemos observar cómo el tejido se queda en el fondo del eppendorf mientras que el ARN se queda en el sobrenadante transparente. Con una pipeta cogemos el sobrenadante y lo pasamos a un tubo limpio. Añadimos la misma cantidad de isopropanol y mezclamos por inversión hasta ver cómo se va formando una suspensión blanca. Centrifugamos otra vez como antes para que se quede un pellet, quitamos el sobrenadante y lavamos con etanol frío al 75 % dos veces. Volvemos a centrifugar, esta vez 10 minutos, y desecharmos el sobrenadante. Finalmente tenemos el ARN limpio en el pellet y lo resuspendemos en 100 µl de agua con Dietilpirocarbonato (DEPC, ver ANEXO I). Una vez tengamos el ARN lo vamos a cuantificar por espectrofotometría a 260 y 280 nm de longitud de onda. Antes de medir diluimos 5µl de ARN puro en 995 µl de blanco, en este caso agua DEPC.

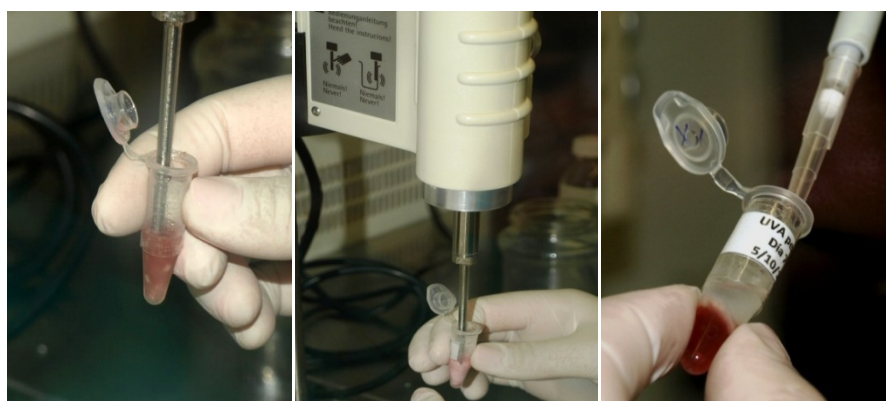


Figura 11. Sonicado de las muestras

3.2.1.7. Transcripción inversa

El ARN obtenido por extracción se midió con un espectrofotómetro NanoDrop-1000, se ajustó la concentración a 2 ng/ml y se utilizaron 2 μ l para hacer una transcripción inversa y obtener así ADN complementario. Para ello se precalentó cada muestra con una mezcla de 5 μ l de tampón más 12 μ l de agua DEPC durante diez minutos a 70 °C. Sucesivamente a cada muestra pre-calentada se le añadió una mezcla de 5 μ l de agua DEPC más 1 μ l de la enzima retro-Transcriptasa iScriptTM(cDNA synthesis kit BIORAD)(200 U ml⁻¹). Se incubó a 25 °C durante 10 minutos, se precalentó 50 minutos a 42 °C y finalmente 15 minutos a 70 °C.

3.2.1.9. PCR Real Time (RT-PCR)

A 2 μ l de ADN complementario se le añadió una pre mezcla con 10 μ l de SYBR Green, 12 μ l de agua DEPC y 1 μ l de cada primer (0,5 μ l de forward y 0,5 μ l de reverse). El volumen total de reacción fue de 25 μ l. Para los cebadores de IL-1 β , TNF α y COX-2 se utilizó la secuencia descrita por Sepulcre y cols. (2007). Para IL-1r2 se utilizó la secuencia descrita por Roca y cols. (2012) y para β actina la descrita por Bravo y cols. (2011). Mientras que para Mx la secuencia fue diseñada por nosotros con el software “*Gene Runner*” utilizando la secuencia del gen completo descrita por Tafalla y cols. (2004) y depositada en Gene bank (número de acceso AF491302). El uso de SYBR Green implica un diseño muy cuidadoso de los cebadores con el fin de evitar dímeros de cebadores, y evitar la amplificación de DNA genómico contaminante en la muestra de cDNA.

En la Tabla VII podemos observar la secuencia de los cebadores que hemos utilizado. Como control hemos utilizado el gen β actina. En las Tablas VIII, IX y X podemos observar los protocolos utilizados para cada gen.

Gen	Secuencia (5'-3')	Concentración por µl	Fuente	
IL-1β	Forward	AGC GAC ATG GCA CGA TTT	10 pmol	Sepulcre y cols., 2007
	Reverse	GCA CTC TCC TGG CAC ATA TCC		
Mx	Forward	GAC AGG GAG CGG CAT TGT TAC	10 pmol	Diseñado en <i>Gene-Runner</i>
	Reverse	TCG TCC AGC TCT TCC TCG TG		
TNFα	Forward	TCG TTC AGA GTC TCC TGC AG	10 pmol	Sepulcre y cols., 2007
	Reverse	CAT GGA CTC TGA GTA GCG CGA		
β actina	Forward	TCT GTC TGG ATC GGA GGC TC	10 pmol	Bravo y cols., 2011
	Reverse	AAG CAT TTG CGG TGG ACG		
Cox 2	Forward	GAG TAC TGG AAG CCG AGC AC	10 pmol	Sepulcre y cols., 2007
	Reverse	GAT ATC ACT GCC GCC TGA GT		
IL-1r2	Forward	AAG GAC TCC AGC TCC ACT GA	10 pmol	Roca y cols., 2012
	Reverse	ACG CCT TCT ACA TGG ACC AC		

Tabla VII. Secuencia cebadores empleados para la RT-PCR.

Materiales y Métodos

Ciclo 1 (1x)	Paso 1	95 °C x 5'
Ciclo 2 (40x)	Paso 1	95 °C x 15"
	Paso 2	58,3 °C x 30"
	Paso 3	72 °C x 30"
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	95 °C x 1'
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	70 °C x 1'
Ciclo 5 (81x)	Paso 1	55 °C x 30"
Ciclo 6 (1x)	Paso 1	16 °C x ∞

Tabla VIII. Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión génica de β actina

Ciclo 1 (1x)	Paso 1	95 °C x 5'
Ciclo 2 (40x)	Paso 1	95 °C x 15"
	Paso 2	60 °C x 30"
	Paso 3	72 °C x 30"
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	95 °C x 1'
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	70 °C x 1'
Ciclo 5 (81x)	Paso 1	55 °C x 30"
Ciclo 6 (1x)	Paso 1	16 °C x ∞

Tabla IX. Protocolo de ciclos de PCR real time empleados para la expresión génica de Mx y TNF α y COX-2

Ciclo 1 (1x)	Paso 1	95 °C x 5'
Ciclo 2 (40x)	Paso 1	95 °C x 15"
	Paso 2	59,7 °C x 30"
	Paso 3	72 °C x 30"
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	95 °C x 1'
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	70 °C x 1'
Ciclo 5 (81x)	Paso 1	55 °C x 30"
Ciclo 6 (1x)	Paso 1	16 °C x ∞

Tabla X. Protocolo de ciclos de PCR real time empleados para la expresión génica de IL-1 β y IL-1r2

Para la cuantificación de la Ct se utilizó la fórmula de Livak (Livak & Schmittgen, 2001) (Figura 12). Los cálculos en cuantificación relativa de expresión génica se basan en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Los resultados fueron expresados como aumento sobre los valores del control negativo.

$$X = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde $\Delta\Delta Ct = [Ct_{(\text{gen analizado})} - Ct_{(\beta \text{ actina})}] \text{ tiempo X grupo vacunados} - [Ct_{(\text{gen analizado})} - Ct_{(\beta \text{ actina})}]$

tiempo X grupo control negativo

Figura 12. Fórmula de Livak

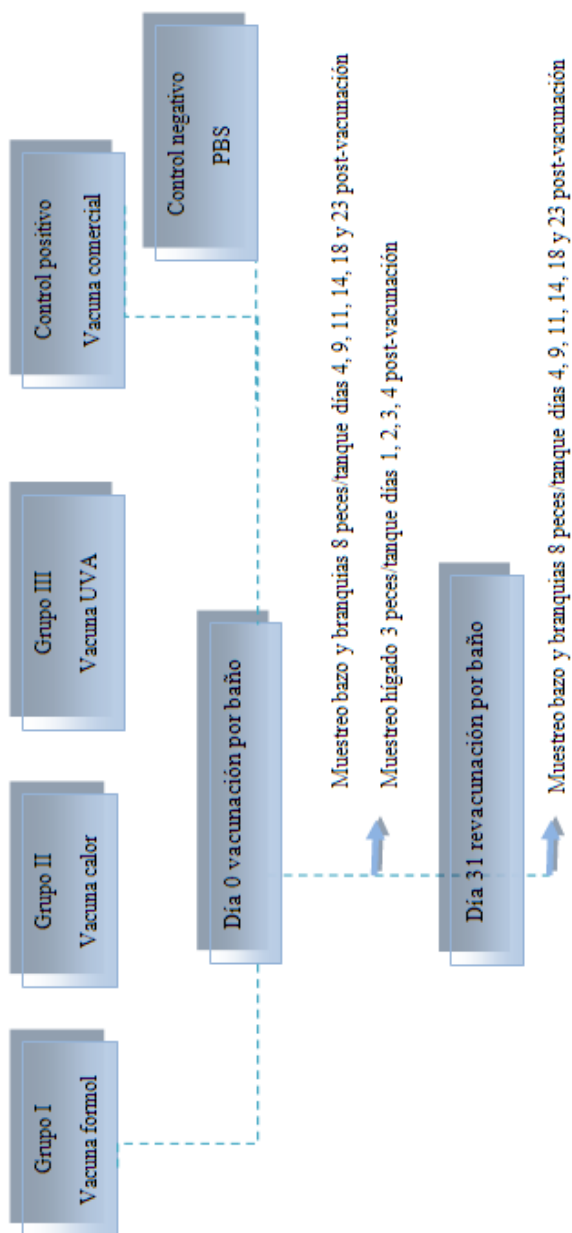
3.2.2. Experimento definitivo para el estudio de las células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente *Phdp*

3.2.2.1. Extracción de leucocitos y citometría de flujo

Para la extracción de leucocitos de bazo y branquias y el estudio de las células IgM positivas a través de la citometría de flujo se siguieron los protocolos descritos anteriormente.

3.2.2.2. Toma de muestras

Para el estudio de las células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente *Phdp* se sacrificaron ocho peces por tanque los días 4, 9, 11, 14, 18 y 23 post-vacunación. Se procedió a la extracción de los leucocitos de bazo y branquias como se detalla en el apartado 3.1.2.2. Se repitió la misma pauta de toma de muestras después de la segunda vacunación (Esquema II).



Esquema II. Toma de muestras

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los resultados de expresión génica se llevó a cabo un análisis estadístico con el software SPSS versión 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y también se realizó un test de TUKEY. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ($p < 0,05$). En el caso de los datos de citometría de flujo al realizarse pool de muestras (ocho muestras en cada punto de muestreo) no se pudo efectuar un análisis estadístico.