

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD  
ALIMENTARIA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD  
ALIMENTARIA**

*ESTUDIO DEL EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS  
SOBRE EL SISTEMA INMUNE EN ESPECIES  
RELEVANTES PARA LA ACUICULTURA MARINA*

*Tesis Doctoral*

*Lorena Román Fuentes*

*Arucas, 2013*

D. FERNANDO REAL VALCÁRCEL, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

**INFORMA:**

Que la presente tesis doctoral titulada: “ESTUDIO DEL EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE EN ESPECIES RELEVANTES PARA LA ACUICULTURA MARINA” realizada por Dña. Lorena Román fuentes, Licenciada en Veterinaria, 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 así conste, firmo la presente en Arucas, 4 de Octubre de 2013.

**Fdo. Fernando Real Valcárcel**

D. FÉLIX ACOSTA ARBELO, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

**INFORMA:**

Que la presente tesis doctoral titulada: “ESTUDIO DEL EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE EN ESPECIES RELEVANTES PARA LA ACUICULTURA MARINA” realizada por Dña. Lorena Román fuentes, Licenciada en Veterinaria, 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 así conste, firmo la presente en Arucas, 4 de Octubre de 2013.

**Fdo. Félix Acosta Arbelo**

Dña. BEGOÑA ACOSTA HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

**INFORMA:**

Que la presente tesis doctoral titulada: “ESTUDIO DEL EFECTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE EN ESPECIES RELEVANTES PARA LA ACUICULTURA MARINA” realizada por Dña. Lorena Román fuentes, Licenciada en Veterinaria, 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 así conste, firmo la presente en Arucas, 4 de Octubre de 2013.

**Fdo. Begoña Acosta Hernández**

*“Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo. A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos. El mundo es eso -reveló-. Un montón de gente, un mar de fueguitos. Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.”*

**“El Mundo”  
Eduardo Galeano**

*A MI FAMILIA,*

# Índice General

Índice Tablas	I
Índice Figuras	IV
Índice Esquemas	VIII
Abreviaturas empleadas	IX
<b>I.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.-OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
II. 1.-Objetivo General	4
II. 2.-Objetivos específicos	4
<b>III.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
III. 1.-Acuicultura: Situación actual	5
III. 2.-El medio ambiente como determinante de enfermedad en las especies acuáticas	8
III. 3.-El control de Enfermedades en acuicultura	10
III. 3.1-Antibióticos	11
III. 3.2-Alternativas al uso de antibióticos	18
III. 4.-Probióticos	21
III.4.1.-La microbiota intestinal en organismos acuáticos	23
III. 4.2-Criterios de selección de cepas probióticas	25
III. 4.3.-Mecanismos de acción de los probióticos	27
III. 4.3.1-Producción de compuestos inhibidores	28
III. 4.3.2-Competencia por compuestos químicos o por energía disponible	31
III. 4.3.3.-Competencia por los lugares de fijación	32
III. 4.3.4.- Mejora de la calidad del agua	34
III. 4.3.5.- Aumento de la respuesta inmune	34

III. 4.3.6.- Contribución enzimática para la digestión	35
III. 4.3.7.- Fuente de macro-micro nutrientes	36
III. 4.3.8.- Efecto antiviral	37
III. 4.4.- Los probióticos y el sistema inmune de peces teleósteos	38
III. 4.4.1- Los probióticos y la inmunidad innata	38
III. 4.4.2- Factores que afectan al efecto inmunomodulador de los probióticos	43
III. 5.-El sistema inmune de los peces teleósteos	50
III. 5.1-Sistema inmune inespecífico	52
III. 5.2-Citoquinas	57
<b>IV.-MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>62</b>
IV. 1.-Material	62
IV. 1.1-Cepas bacterianas utilizadas	62
IV. 1.2-Instalaciones y peces de experimentación	62
IV. 2.-Métodos	63
IV. 2.1.-Cultivo y mantenimiento de las cepas probióticas	63
IV. 2.2.-Inactivación de las cepas probióticas	64
IV. 2.3.- Extracción de los productos extracelulares (ECPs) de <i>Vagococcus fluvialis</i> L21	65
IV. 2.4.-Extracción de leucocitos de riñón anterior	67
IV. 2.5.-Estudio de la explosión respiratoria	68
IV. 2.6.-Contenido en peroxidasa celular	69
IV. 2.7.-Actividad fagocítica	70
IV. 2.8.-Extracción de ARN	71
IV. 2.9.-Transcripción inversa	72
IV. 2.10.-Expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)	72
IV. 2.11.-Análisis estadístico	73
<b>V.- EXPERIENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>V. 1-Efecto inmunomodulador de cepas probióticas sobre leucocitos de especies con interés para la acuicultura</b>	<b>76</b>



V. 1.1.-Introducción	76
V. 1.2.-Diseño experimental	77
V. 1.3.-Resultados	82
V. 1.3.1- Resultados obtenidos con la cepa <i>Vagococcus fluvialis</i> L21	82
V. 1.3.1.1-Contenido en peroxidasa	82
V. 1.3.1.2-Actividad fagocítica	83
V. 1.3.1.3-Explosión respiratoria	84
V. 1.3.2- Resultados obtenidos con la cepa <i>Enterococcus gallinarum</i> L1	87
V. 1.3.2.1-Contenido en peroxidasa	87
V. 1.3.2.2-Actividad fagocítica	89
V. 1.3.2.3-Explosión respiratoria	91
V. 1.4.-Discusión	93
<b>V. 2-Efecto inmunomodulador de la cepa <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 sobre los leucocitos de lubina en la expresión de citoquinas</b>	98
V. 2.1.-Introducción	98
V. 2.2.-Diseño experimental	99
V. 2.3.-Resultados	103
V. 2.3.1-Expresión del gen Mx	103
V. 2.3.2.-Expresión del gen IL-1 $\beta$	105
V. 2.3.3.-Expresión del gen TNF- $\alpha$	107
V. 2.3.4.-Expresión del gen IL-6	109
V. 2.3.5.-Expresión del gen COX-2	111
V. 2.3.6.-Expresión del gen IL-10	113
V. 2.3.7.-Expresión del gen Casp-3	115
V. 2.4.-Discusión	117
<b>V. 3-Efecto inmunomodulador de los productos extracelulares (ECPs) de <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 sobre los leucocitos de lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</b>	122
V. 3.1.-Introducción	122
V. 3.2.-Diseño experimental	123
V. 3.3.-Resultados	127

V. 3.3.1-Expresión del gen Mx	128
V. 3.3.2.-Expresión del gen IL-1 $\beta$	130
V. 3.3.3.-Expresión del gen TNF- $\alpha$	132
V. 3.3.4.-Expresión del gen IL-6	134
V. 3.3.5.-Expresión del gen COX-2	136
V. 3.3.6.-Expresión del gen IL-10	138
V. 3.3.7.-Expresión del gen Casp-3	140
V. 3.4.-Discusión	142
<b>VI.-DISCUSIÓN GENERAL</b>	147
<b>VII.-CONCLUSIONES</b>	153
<b>VIII.-RESUMEN</b>	155
<b>IX.-SUMMARY</b>	157
<b>X.-BIBLIOGRAFÍA</b>	159
<b>XI.-ANEXOS</b>	199
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	202
<b>PUBLICACIONES DE LA TESIS EN REVISTAS JCR</b>	204

# Índice Tablas

<b>Tabla I.-</b>	Grupos antibióticos utilizados en acuicultura, importancia para la medicina humana. Resistencias de patógenos bacterianos y su fuente de aislamiento	14
<b>Tabla II.-</b>	Límites máximos de Residuos (LMR; µg/Kg) de antibióticos y quimioterápicos para la acuicultura en la Unión Europea. Adaptado del Reglamento (CEE) 2377/90, de junio de 1990, modificado por el Reglamento (CE) 1353/2007, de 20 de Noviembre de 2007	17
<b>Tabla III.-</b>	Secuencias de cebadores utilizados para la RT-PCR, T <sup>a</sup> de hibridación	73
<b>Tabla VI.-</b>	Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión de los diferentes genes	74
<b>Tabla V.-</b>	Valores del contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por el control.	83
<b>Tabla VI.-</b>	Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21 tanto viva como inactivada.	84
<b>Tabla VII.-</b>	Valores de explosión respiratoria de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control.	86
<b>Tabla VIII.-</b>	Valores del contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina tras ser incubados con la cepa <i>E. gallinarum</i> L1. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control.	88
<b>Tabla XIX.-</b>	Actividad fagocítica de los leucocitos de bocinegro, corvina, dorada y lubina tras ser incubados con la cepa <i>E. gallinarum</i> L1 tanto viva como inactivada.	90
<b>Tabla X.-</b>	Valores de explosión respiratoria de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina tras ser incubados con la cepa <i>E. gallinarum</i> L1. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control.	92

<b>Tabla XI.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen Mx a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	104
<b>Tabla XII.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$ a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	106
<b>Tabla XIII.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen TNF- $\alpha$ a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	108
<b>Tabla XIV.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen IL-6 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	110
<b>Tabla XV.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen COX-2 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	112
<b>Tabla XVI.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen IL-10 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	114
<b>Tabla XVII.-</b>	Valores de niveles de expresión del gen Casp-3 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa <i>V. fluvialis</i> L21.	116
<b>Tabla XVIII.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen Mx a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina .	129
<b>Tabla XIX.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$ a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	131
<b>Tabla XX.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen TNF- $\alpha$ a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	133

<b>Tabla XXI.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen IL-6 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	135
<b>Tabla XXII.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen COX-2 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	137
<b>Tabla XXIII.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen IL-10 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	139
<b>Tabla XXIV.-</b>	Valores de los niveles de expresión del gen Casp-3 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.	141

# Índice Figuras

<b>Figura I.-</b>	Aumento de la producción acuícola desde los años 80 hasta el 20 (FAO, 2012)	6
<b>Figura II.-</b>	Relación entre las condiciones ambientales, factores biológicos y prácticas de gestión acuícola y su influencia en la aparición de enfermedades infecciosas en los peces. Adaptado de Plumb (1999)	8
<b>Figura III.-</b>	Relación entre agente patógeno, hospedador y medio ambiente en el desarrollo de enfermedades infecciosas. Adaptado de Plumb (1999)	9
<b>Figura IV.-</b>	Representación de algunos de los mecanismos de acción de los probióticos	36
<b>Figura V.-</b>	Respuesta inmune del pez frente a un patógeno	52
<b>Figura VI.-</b>	Inactivación de cepas probióticas con luz ultravioleta	65
<b>Figura VII.-</b>	Contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada y lubina después de la incubación con la cepa de <i>V. fluvialis</i> L21, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (A=concentración; a: tratamientos)	83
<b>Figura VIII.-</b>	Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada y lubina que fueron incubados con la cepa de <i>V. fluvialis</i> L21 tanto viva como inactivada por calor y luz UV. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )	84
<b>Figura IX.-</b>	Leucocitos de dorada (A), lubina (B) incubados con la cepa de <i>V. fluvialis</i> L21. Tinción de panóptico rápido (10 X)	85
<b>Figura X.-</b>	Explosión respiratoria de los leucocitos de dorada y lubina, después de la incubación con la cepa de <i>V. fluvialis</i> L21, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (A=concentración; a: tratamientos)	86

<b>Figura XI.-</b>	Contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina después de la incubación con la cepa de <i>E. gallinarum</i> L1, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )	88
<b>Figura XII.-</b>	Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada, corvina, bocinegro y lubina que fueron incubados con la cepa de <i>E. gallinarum</i> tanto viva como inactivada por calor y luz UV. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )	90
<b>Figura XIII.-</b>	Leucocitos de dorada (A), lubina (B), corvina (C) y bonicegro (D), incubados con la cepa de <i>E. gallinarum</i> L1. Tinción de panóptico rápido (10 X)	91
<b>Figura XIV.-</b>	Explosión respiratoria de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina después de la incubación con la cepa de <i>E. gallinarum</i> L1, tanto viva como inactivada. Los resultados están expresados en índice de estimulación dividiendo el resultado de cada muestra por su respectivo control. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )	92
<b>Figura XV.-</b>	Expresión génica de Mx en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	104
<b>Figura XVI.-</b>	Expresión génica de IL-1 $\beta$ en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	106
<b>Figura XVII.-</b>	Expresión génica de TNF- $\alpha$ en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	108
<b>Figura XVIII.-</b>	Expresión génica de IL-6 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	110

<b>Figura XIX.-</b>	Expresión génica de COX-2 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	112
<b>Figura XX.-</b>	Expresión génica de IL-10 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	114
<b>Figura XXI.-</b>	Expresión génica de Casp-3 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control	116
<b>Figura XXII.-</b>	Gel de acrilamida al 12,5 %. Bandas proteicas de los ECPs de <i>Vagococcus fluvialis</i> L21 en relación al marcador de peso molecular (Broad Range , Biorad 161-0313).	127
<b>Figura XXIII.-</b>	Expresión génica de Mx en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	129
<b>Figura XXIV.-</b>	Expresión génica de IL-1 $\beta$ en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	131
<b>Figura XXV.-</b>	Expresión génica de TNF- $\alpha$ en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	133
<b>Figura XXVI.-</b>	Expresión génica de IL-6 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	135



<b>Figura XXVII.-</b>	Expresión génica de COX-2 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	137
<b>Figura XXVIII.-</b>	Expresión génica de IL-10 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	139
<b>Figura XXIX.-</b>	Expresión génica de Casp-3 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (*) Productos)	141

# Índice Esquemas

<b>Esquema I.-</b>	Esquema experiencia I	80
<b>Esquema II.-</b>	Esquema experiencia II	81
<b>Esquema III.-</b>	Esquema experiencia III	102
<b>Esquema IV.-</b>	Esquema experiencia IV	126

# Abreviaturas empleadas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AF</b>	Actividad fagocítica
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>APROMAR</b>	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BHIA</b>	Agar infusión cerebro corazón
<b>BHIB</b>	Caldo infusión cerebro corazón
<b>CANEXMAR</b>	Canarias Explotaciones Marinas
<b>Casp-3</b>	Caspasa-3
<b>CCNs</b>	Células citotóxicas no específicas
<b>CGEs</b>	Células granulares eosinofílicas
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>Ct</b>	Valores de umbral de ciclo
<b>CWP</b>	Proteínas de pared celular
<b>CTAB</b>	Cetiltrimetilamonio bromuro
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DHA</b>	Ácido Docohexanoico
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>ECPs</b>	Productos extracelulares
<b>EGHs</b>	Eosinófilos granulares homogéneos

<b>EPA</b>	Ácido Eicosapentanoico
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>HBSS</b>	Solución salina balanceada de Hanks
<b>HUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>ICCM</b>	Instituto Canario de Ciencias Marinas
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgM</b>	Inmunoglobulinas M
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>LAB</b>	Bacterias ácido-lácticas
<b>LMR</b>	Límite máximos de residuos
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazoilo
<b>NHI</b>	Necrosis Hematopoyética Infecciosa
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>OIE</b>	Oficina Internacional de Epizootias
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OMPs</b>	Proteínas de membrana externa
<b>ONGs</b>	Organizaciones no gubernamentales
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PKR</b>	Proteína Kinasa R

<b>PMA</b>	Acetato de forbol miristato
<b>POLY I:C</b>	Ácido poliinosínico-policitidinico
<b>PRS</b>	Porcentaje relativo de supervivencia
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TMB</b>	Tretrametilbenzidina hidrociorhídrica
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>ufc</b>	Unidad formadora de colonias
<b>UV</b>	Luz ultravioleta

## **I.-INTRODUCCIÓN**

El incesante incremento de la población mundial junto con el aumento de la demanda de productos marinos y el descenso de la pesca extractiva hacen que para el año 2030 sean necesarias 37 millones de toneladas adicionales de pescado para mantener los niveles actuales de consumo (FAO, 2008). Y, según esa misma fuente, en los últimos 25 años la acuicultura ha experimentado un crecimiento anual de 8,8%. Actualmente, alrededor del 45% de todo el pescado para el consumo humano (48 millones de toneladas) procede de la acuicultura. Estos datos nos indican que es necesaria la intensificación de las producciones para poder responder a la gran demanda de productos de acuicultura.

La acuicultura intensiva supone un mayor número de peces por volumen de agua, que sumado, en muchas ocasiones, a las malas condiciones higiénico-sanitarias, y junto al estrés de los animales, favorece la penetración y desarrollo de agentes patógenos y, como consecuencia, la aparición de enfermedades.

Si bien la quimioterapia es quizás el método más rápido para tratar las enfermedades bacterianas, hoy en día hay un creciente reconocimiento de sus limitaciones en acuicultura debido a que, en algunos casos, más que proporcionar una solución, puede ocasionar efectos adversos en la salud del animal mediante la activación de la toxicidad, la resistencia, producción de residuos, etc, dando lugar a graves consecuencias ambientales, ya que los residuos de los antibióticos pueden permanecer durante mucho tiempo en el medio acuático, y por ello ocasionar problemas en la salud pública (FAO, 2008).

Debido a los nuevos requisitos legales de los gobiernos de numerosos países, a la demanda por parte de los consumidores de productos más seguros y saludables, así como a la preocupación por la conservación del medio ambiente, se está reforzando la necesidad de aplicar un enfoque más integrador en el sector de la producción acuícola. Por esta razón, la Unión Europea ha planteado serias restricciones sobre el uso de antibióticos en acuicultura, sugiriendo la necesidad de utilizar métodos alternativos sostenibles medioambientalmente para el control de las enfermedades infecciosas en las producciones acuícolas.

Sin duda, un diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades, junto a unos estudios epidemiológicos adecuados, constituyen la clave para minimizar el impacto de las enfermedades en piscicultura. La prevención es una de las mejores herramientas de lucha, y ésta se puede realizar mediante el uso de vacunas, inmunoestimulantes, o mediante el uso de probióticos.

En el mercado existen vacunas comerciales para una gran variedad de enfermedades pero, en ocasiones, su aplicación no siempre es viable ni efectiva. Por ello, hoy en día las investigaciones se centran en la búsqueda de métodos profilácticos alternativos, mediante la manipulación microbiana de las poblaciones en el medio ambiente de cultivo. En este sentido, el uso de probióticos ha despertado gran interés en las últimas décadas, debido a los enormes beneficios que juegan las bacterias no patógenas en la salud y bienestar de su hospedador, demostrando efectos positivos sobre el control de enfermedades, crecimiento, supervivencia, y sobre la producción general.

Hasta la fecha se han ofrecido muchas definiciones sobre los probióticos, pero una de las más completas y reconocidas es la propuesta por Verschuere y cols. (2000a), que definen a un probiótico como *“un suplemento vivo microbiano que tiene efecto beneficioso en el hospedador, modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente”*. No obstante, la definición de probiótico está en continua evolución en un intento de adaptarse a los nuevos conocimientos que surgen de los trabajos de investigación con probióticos. En este sentido, se ha descrito que microorganismos inactivados, e incluso los componente celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso para el hospedador (Ouwehand y Salminen, 1998; Isolauri y cols., 2002; Díaz-Rosales y cols., 2006; Sharifuzzaman y cols., 2011; Román y cols. 2012). Por tanto, a la definición de probiótico se le debería añadir, como así sugieren Díaz-Rosales y cols. (2006): *“microorganismos, no necesariamente vivos, que tienen un efecto beneficioso en el hospedador”*.

Entre los numerosos efectos beneficiosos que los probióticos ejercen sobre los hospedadores, la modulación del sistema inmune es uno de los mecanismos más estudiados.

Por esta razón, y continuando con el estudio realizado por Sorroza y cols. (2012) y Sorroza y cols. (2013), la finalidad de este trabajo es estudiar el efecto de dos cepas identificadas y caracterizadas como probióticos en nuestro laboratorio, *Vagococcus fluvialis* L21 (Sorroza y cols., 2012) y *Enterococcus gallinarum* L1 (Sorroza y cols. 2013), sobre el sistema inmune inespecífico de diferentes especies de interés acuícola, para conocer con mayor exactitud el mecanismo por el cual estas cepas ejercen su acción sobre los hospedadores.



## **II.-OBJETIVOS**

Los objetivos que nos planteamos para este estudio son:

### **II.1-Objetivo general**

- Evaluar *in vitro* el efecto de las cepas probióticas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1 sobre el sistema inmune inespecífico de distintas especies de interés acuícola: Dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y el bocinegro (*Pagrus pagrus*).

### **II.2-Objetivos específicos**

- Determinar el efecto inmunomodulador y la dosis efectiva de la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, tanto viva como inactivada, sobre los leucocitos de dorada (*Sparus aurata*) y de lubina (*Dicentrarchus labrax*).
- Comprobar el efecto inmunomodulador y la dosis efectiva de la cepa *Enterococcus gallinarum* L1, tanto viva como inactivada, sobre los leucocitos de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y bocinegro (*Pagrus pagrus*).
- Estudiar el efecto de la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, tanto viva como inactivada, sobre las dinámica de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune inespecífica en los leucocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax*).
- Valorar el efecto de los productos extracelulares (ECPs) de la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 sobre la dinámica de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune inespecífica en los leucocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax*).

### **III.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **III.1-Acuicultura: situación actual**

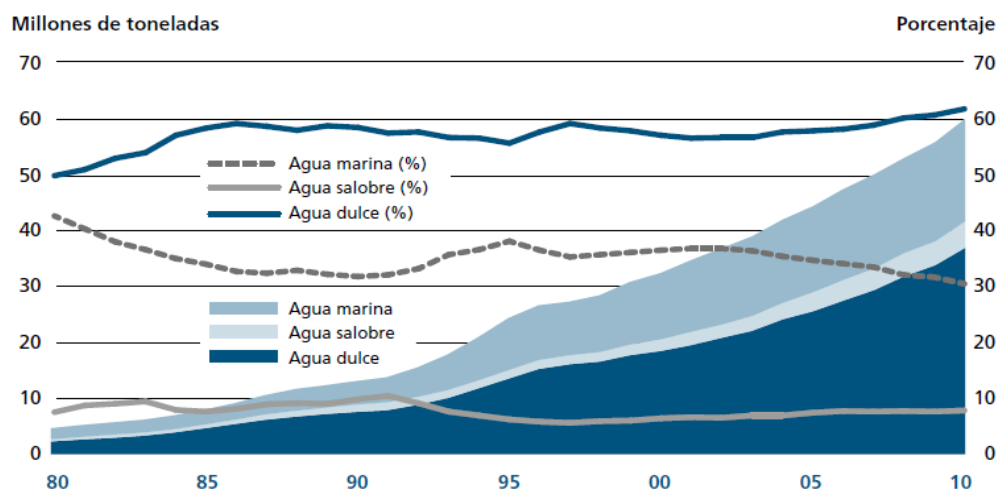
El término acuicultura engloba todas las actividades que tienen por objeto la producción, crecimiento (desarrollo) y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales, de aguas dulces, salobres o saladas. Esto implica el control de las diferentes etapas, desde huevo hasta la cosecha, proporcionando a los organismos los medios adecuados para su crecimiento y engorde.

El origen de las actividades relacionadas con la acuicultura datan del año 475 AC, cuando Fan-Li, en China, elaboraba el primer tratado sobre acuicultura. Un siglo más tarde Aristóteles menciona el cultivo de ostras en Grecia y Plinio lo hacía en Roma. Sobre el año 1400 en la región Indo Pacífica existían leyes para la protección de los acuicultores. En 1842 Remy y Gehin, dos pescadores franceses obtuvieron puestas viables de trucha consiguiendo alevines que desarrollaron con éxito en un estanque.

Actualmente, la acuicultura es una actividad creciente de gran importancia como fuente de alimento de calidad en el mundo. Las previsiones de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO) apuntan a que la producción mundial de comida debe crecer un 70% entre 2010 y 2050. El incesante incremento de la población mundial junto con el aumento de la demanda de productos marinos contribuyen a que, actualmente, más de la mitad del total de los alimentos acuáticos consumidos en todo el mundo procedan de la acuicultura (APROMAR, 2012), convirtiéndose ésta en la ganadería con más proyección de futuro. En el año 2010, año más reciente del que se disponen datos de producción global de acuicultura de FAO, la

acuicultura produjo 78,9 millones de toneladas (MMT) de productos acuáticos, frente a las 89,5 MMT que fueron capturadas por la pesca.

La acuicultura tiene a nivel mundial un importante papel en los esfuerzos por erradicar el hambre y la malnutrición, proveyendo alimentos ricos en proteínas, aceites esenciales, vitaminas y minerales, destacando sobretodo la contribución de los aceites poli-insaturados omega-3 (EPA Y DHA) del pescado a la salud y calidad de vida de las personas. En la Figura I podemos observar el crecimiento de la producción acuícola en los últimos años, según el último informe sobre el Estado mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2012).



**Figura I:** Aumento de la producción acuícola desde los años 80 hasta el 2010 (FAO, 2012).

Mientras que a nivel mundial China es sin duda el mayor productor mundial de acuicultura llegando a producir casi 48 MMT; 1,2 MMT de productos de acuicultura fueron producidos en la Unión Europea en 2012.

En cuanto a la producción de peces marinos en las regiones del sur de Europa y el Mediterráneo, la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Psetta maxima*) son las principales especies cultivadas.

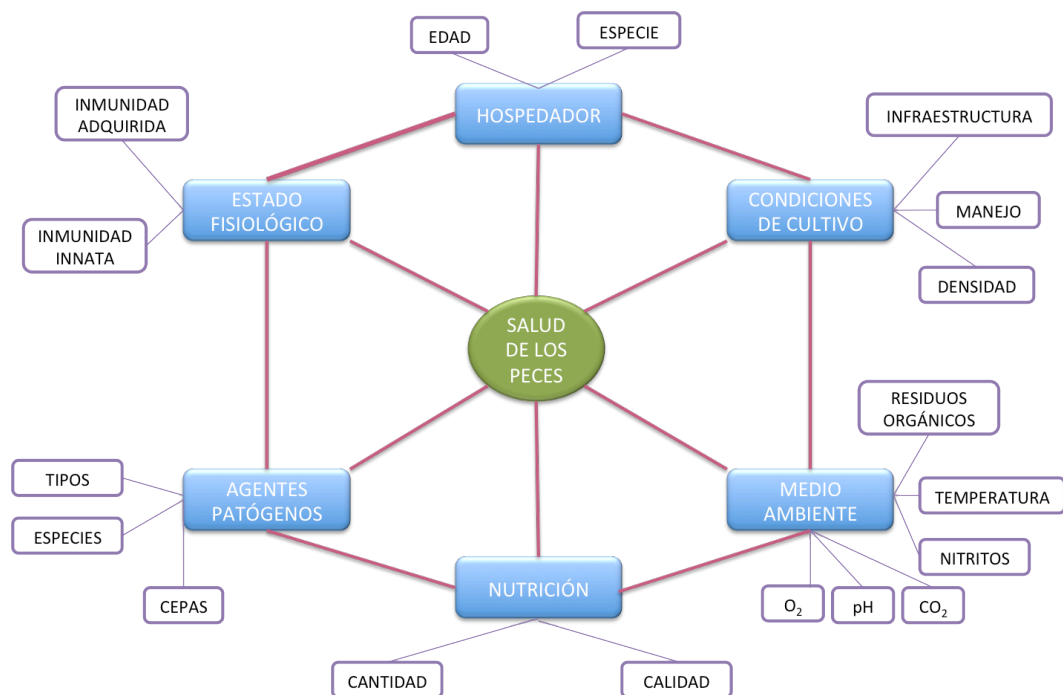
La mayor producción acuícola en España se corresponde con el cultivo de moluscos, especialmente el mejillón (*Mytilus mytilus*). Aunque también se producen peces tanto de acuicultura marina, como continental, entre los que podemos destacar: lubina, rodaballo, túnidos y especialmente la dorada.

Canarias es el principal productor de lubina en España, produciendo el 32% de la producción nacional total. También se cultivan otras especies como son la dorada (*Sparus aurata*), así como especies nuevas como son la corvina (*Argyrosomus regius*) y el lenguado (*Solea senegalensis*).

Hoy por hoy, teniendo en cuenta la escala de cambios de nuestro planeta, que la productividad natural de la tierra tiene límites, la pobreza, la hambruna, etc., otras fuentes alternativas son necesarias para suplir tanto las necesidades presentes como futuras de consumo. 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. Por tanto, existen retos importantes que deben ser superados por la acuicultura para abrir las puertas al futuro, como la optimización de las fuentes de ingredientes de piensos, los avances tecnológicos para adaptar sus granjas a condiciones marinas difíciles, el respeto al medio ambiente con un desarrollo sostenible y el control de la sanidad de las especies cultivadas.

### III.2-El medio ambiente como determinante de enfermedad en las especies acuícolas

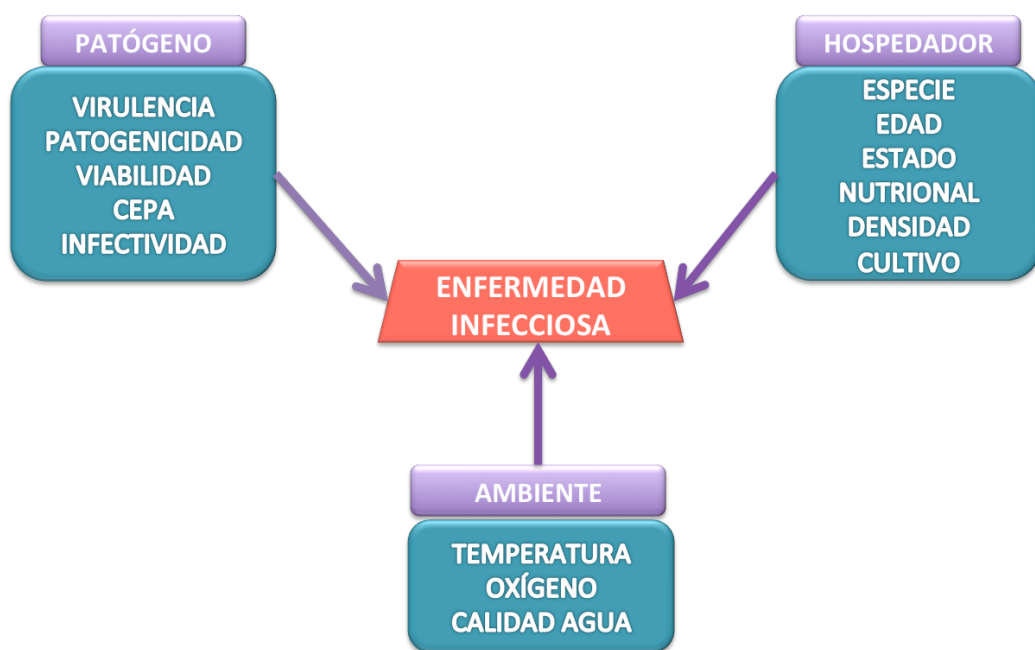
El rápido desarrollo de la acuicultura y, consecuentemente, la intensificación en las producciones se ha traducido inevitablemente en un aumento de los problemas asociados a la producción animal intensiva. El mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades con éxito y/o control no dependen de un solo factor sino que son la consecuencia de la integración de distintos factores así como una buena gestión de la relación que existe entre la calidad ambiental y la salud de los peces. (Plumb, 1999) (Figura II).



**Figura II:** Relación entre las condiciones ambientales, factores biológicos y prácticas de gestión acuícola y su influencia en la aparición de enfermedades infecciosas en los peces. Adaptado de Plumb (1999).

Bajo condiciones ambientales adecuadas, los peces se encuentran en buen estado de salud y sin signos clínicos ni lesiones, aunque pueden ser portadores asintomáticos

de agentes patógenos. Bajo condiciones ambientales estresantes, el hacinamiento, deficiencias nutricionales, prácticas de manejo inadecuado, condiciones higiénico-sanitarias inadecuadas, estos peces que en principio son portadores asintomáticos pueden desarrollar la enfermedad (Plumb, 1999) (Figura III). Por lo tanto, evitar el estrés mediante el mantenimiento de la calidad ambiental es esencial para mantener una población de peces sanos y libres de enfermedad.



**Figura III:** Relación entre agente patógeno, hospedador y medio ambiente en el desarrollo de enfermedades infecciosas. Adaptado de Plumb (1999).

Son muchas las enfermedades que pueden afectar a las granjas acuícolas, convirtiéndose en problema que se traduce, sobre todo, en grandes pérdidas económicas si no son controladas adecuadamente. En la bibliografía se describen numerosas enfermedades producidas por bacterias, virus, parásitos. La mayoría de estos microorganismos forman parte del medio marino, y sólo en determinadas

circunstancias van a sobrepasar las barreras defensivas de los peces causando así la enfermedad.

### **III.3-El control de las enfermedades en acuicultura**

La acuicultura es, sin duda, una de las industrias que más ha crecido en los últimos años en nuestro país, tanto respecto de la producción total obtenida como en cuanto al número de centros de crianza que existen. Esta expansión e intensificación de los cultivos, junto a unas condiciones medioambientales, muchas veces desfavorables, conlleva a la aparición de mayores riesgos sanitarios en las granjas, favoreciendo la colonización y desarrollo de agentes patógenos, y como consecuencia, la aparición de las enfermedades bacterianas (Kurath, 2008). Las enfermedades de los peces se han convertido en el principal obstáculo para el desarrollo óptimo de la acuicultura llegando a provocar grandes pérdidas económicas en el sector.

A diferencia de lo que ocurre en las granjas de animales terrestres, donde todos los parámetros ambientales están controlados, en el cultivo de peces las condiciones son altamente variables. Numerosos factores han contribuido a los problemas de salud a los que actualmente se enfrenta la acuicultura:

- Durante las tres últimas décadas, la acuicultura se ha expandido, intensificado y diversificado, basándose en gran medida en los movimientos de animales y sus productos, tales como reproductores, huevos y piensos. Estos movimientos están reconocidos como factores fundamentales en la introducción y propagación de agentes patógenos y enfermedades en el sector de la acuicultura. Además, aumenta el periodo de

permanencia de una instalación en un lugar determinado, lo que hace que el tiempo de residencia de los patógenos sea mayor y se “asienten”.

- La intensificación de la acuicultura ha implicado un aumento de la carga de población, induciendo ambientes desfavorables para la salud de los peces, como una alta densidad de población, problemas de estrés, manipulación y perturbaciones físicas (Bullock y Mclaughlin, 1970; Tarazona y Muñoz, 1995). La superpoblación acarrea una deficiente calidad del agua debido a la disminución del nivel de oxígeno, a productos metabólicos y acumulación de excrementos, a un rápido crecimiento y transmisión de parásitos nocivos, hongos, bacterias y virus (Zhao, 2001).

Hay que tener presente que la producción de peces tiene que ser sostenible, lo cual significa que deben utilizarse medidas preventivas aceptables desde un punto de vista biológico y ambiental para mantener los problemas sanitarios en la acuicultura de manera sostenible.

### **III.3.1-Antibióticos**

Los antibióticos pueden originarse a partir fuentes orgánicas o sintéticas, y todos tienen que ser no tóxicos para el hospedador. Como promotores del crecimiento animal se han empleado a dosis subterapéuticas desde los años cuarenta, cuando se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban sus índices de crecimiento. En la década de los sesenta numerosos autores demostraron la transmisión horizontal de los genes de resistencia a antibióticos de manera epidémica entre diferentes poblaciones y especies bacterianas, incluyendo patógenos de animales y humanos (Mäkelä y cols. 1962; Watanabe y cols. 1963; Anderson, 1968; Datta, 1971; Smith 1974). Paralelamente, en el Reino Unido se abrió una investigación en la Cámara de los Lores, redactándose en 1969 el llamado “informe



Swann". En este informe se señalaba que el uso excesivo de antibióticos en animales conduce a riesgos potenciales para la salud humana y animal, sugiriendo además que su utilización debiera ser restringida y regulada. A partir de entonces se decidió eliminar como promotores aquellos antibióticos que también fueran utilizados en la medicina humana o animal (FAO, 2002). De este modo se prohibía en Europa el empleo de tetraciclinas o  $\beta$ -lactámicos como promotores del crecimiento en el pienso de los animales.

En la acuicultura se utilizan mezclados con los alimentos mayoritariamente, aunque pueden utilizarse otras vías de administración tanto por vía parenteral, como por baños. Principalmente se usan de tres maneras:

- **Uso terapéutico:** utilizándose cuando la enfermedad ya está establecida.
- **Uso profiláctico:** utilizándose de manera individual o grupal para evitar el desarrollo de enfermedades y,
- **Uso metafiláctico:** refiriéndose a la aplicación en masa de antimicrobianos en un momento estratégico a un grupo de animales que experimentan una enfermedad bacteriana antes de la instauración de un cuadro clínico.

En los últimos años la FAO, la OMS, la OIE, además de varios gobiernos nacionales y decenas de ONGs han planteado la cuestión del uso irresponsable de antibióticos en todos los sectores de la producción animal, incluido el sector acuícola. Los riesgos que conlleva el uso irracional de dichos productos están relacionados con la salud pública y el deterioro del medio ambiente. Muchos gobiernos de todo el mundo han introducido,

modificado o fortalecido los reglamentos nacionales sobre el empleo de antibióticos en general, y particularmente en el sector acuícola (FAO, 2002).

En la cría de salmón y carpa todavía se siguen utilizando cantidades muy elevadas de estos medicamentos, muchas veces por encima de las recomendadas (lo cual ha provocado problemas en el comercio exterior y la necesidad de establecer acuerdos internacionales, por ejemplo entre Chile y Japón).

Otros abusos se han descrito en las granjas de langostinos de latino-américa, especialmente en *hatcheries* y en sistemas intensivos y semi-intensivos de producción. El uso profiláctico de furazolidona, cambiando a cloranfenicol cuando se desarrollaba resistencia bacteriana, era una práctica común en *hatcheries* de Ecuador. El uso de furazolidona (y otros nitrofuranos) y cloranfenicol en animales de producción está prohibido en la UE debido a efectos cancerígenos y genotóxicos de la primera, y por los posibles efectos secundarios adversos del cloranfenicol (depresión de la médula ósea irreversible que puede derivar en anemia aplásica).

La Tabla I muestra la resistencia a determinados antibióticos por parte de patógenos importantes para la acuicultura así como la importancia en medicina humana.

**Tabla I: Grupos de antibióticos utilizados en acuicultura, importancia para la medicina humana. Resistencias de patógenos bacterianos y su fuente de aislamiento.**

Tipo	Importancia para el humano	Ejemplo	Resistencia bacteriana	Aislado en	Referencia
<b>Aminoglucósidos</b>	Críticamente importante	Estreptomicina	<i>Edwardsiella ictulari</i> *	Tiburón malayo ( <i>Pangasianodon hypophthalmus</i> )	Dung y cols., 2008
<b>Anfenicoles</b>	Importante	Florfenicol	<i>Enterobacter</i> sp y <i>Pseudomonas</i> sp	Grajas de salmón en Chile	Fernández-Alcarón y cols., 2010
<b>Betalactámicos</b>	Críticamente importante	Amoxicilina	<i>Vibrio</i> * sp, <i>Aeromonas</i> sp y <i>Edwardsiella tarda</i>	Diferentes granjas acuícolas, Australia	Akinbowale y cols., 2006
<b>Betalactámicos</b>	Críticamente importante	Ampicilina	<i>Vibrio harveyi</i> *	Granja de camarones, Indonesia	Teo y cols., 2000
<b>Fluoroquinolonas</b>	Críticamente importante	Enrofloxacina	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) y lenguado ( <i>Solea senegalensis</i> ), España y Portugal	Avendaño-Herrera y cols., 2008
<b>Macrólidos</b>	Críticamente importante	Eritromicina	<i>Salmonella</i> * sp	Pescado comercializado, China	Broughton y Walker., 2009
<b>Nitrofuranos</b>	Críticamente importante	Furazolidona	<i>Vibrio anguillarum</i> *	Doradas ( <i>Sparus aurata</i> ) y lubinas ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), Grecia	Smith y Chritofilogiannis, 2007
<b>Nitrofuranos</b>	Importante	Nitrofurantoina	<i>Vibrio harveyi</i> *	Camarones, Taiwán	Liu y cols., 1997
<b>Quinolonas</b>	Críticamente importante	Ácido Oxolínico	<i>Aeromonas</i> * sp, <i>Pseudomonas</i> sp y <i>Vibrio</i> sp	Agua de estanques y en el camarón tigre ( <i>Penaeus monodon</i> ), Filipinas	Tendencia y de la Peña., 2010
<b>Tetraciclinas</b>	Muy importante	Tetraciclina	<i>Aeromonas hydrophila</i> *	Agua de las granjas de tilapias, Egipto	Das y cols., 2009
<b>Tetraciclinas</b>	Muy importante	Oxitetraciclina	<i>Aeromonas salmonicida</i> *	Salmón atlántico ( <i>Salmo salar</i> ), Canadá	Mcintosh y cols. 2008

(\*)Patógenos bacterianos, indican resistencias múltiples

Actualmente, muchos de estos antimicrobianos ya no son eficaces para el tratamiento de algunas enfermedades en la acuicultura. Así Karunasagar y cols. (1994), observaron mortalidad masiva en larvas de langostino jumbo (*Penaeus monodon*)

causada por cepas con resistencias múltiples de *Vibrio harveyi* al cotrimoxazole, cloranfenicol, eritromicina y estreptomicina; los dos primeros muy utilizados como profilácticos.

Generalmente, la resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos se puede adquirir de dos maneras: mediante mutación o por la adquisición de plásmidos (determinantes genéticos móviles). Las mutaciones cromosómicas no son transferibles a otras bacterias, al contrario que los plásmidos, que se pueden transmitir rápidamente produciendo un alto porcentaje de bacterias patógenas que pueden llegar a desarrollar las resistencias en un corto período de tiempo (Lewin, 1992). Determinantes de resistencia situados en plásmidos transferibles e integrones se han encontrado en patógenos como *Aeromonas* sp, *Citrobacter* sp, *Edwardsiella* sp, *Photobacterium* sp y *Vibrio* sp (Sørum, 2006; Ishida y cols., 2010) Consecuentemente, estos determinantes de resistencia pueden transmitirse de manera horizontal a bacterias del entorno terrestre, incluyendo a patógenos de humanos y animales terrestres, como ha sido demostrado en el caso de *Salmonella enterica* serotipo *typhimurium* y *Vibrio cholerae* (Cabello y cols., 2006). Por tanto, el amplio intercambio genético probablemente bidireccional entre bacterias de los ambientes acuáticos y terrestres estaría siendo demostrado por la evidencia de que bacterias acuáticas, patógenos de peces y patógenos de humanos comparten ampliamente los mismos determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos (Rhodes y cols., 2000; Furushita y cols., 2003; Miranda y cols., 2003; Gordon y cols., 2008; Macintosh y cols., 2008).

Esta evidencia demostraría que las bacterias del ambiente acuático no están aisladas de las bacterias del ambiente terrestre y que las bacterias de ambos

ecosistemas comparten información genética, probablemente, a través de la transferencia horizontal de genes mediada por diversos mecanismos que transfieren variados elementos genéticos (Van Elsas y cols., 2002; Mazel, 2006; Sørum, 2006; Summers, 2006, Norman y cols., 2009). Por ejemplo, el elemento genético de resistencia a antibióticos SXT/R391, capaz de conjugación e integración en el cromosoma bacteriano, se encuentra ampliamente distribuido en los patógenos humanos *Vibrio cholerae*, *Providencia* y *Proteus*, del patógeno de peces *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* y en la bacteria marina *Shewanella* sp (Burrus y cols., 2006; Pembroke y Piterina, 2006; Osorio y cols., 2008; Wozniack y Waldor, 2010). Los genes transferibles de resistencia a las quinolonas que han aparecido últimamente en patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *V. cholerae* y *Klebsiella* sp, aparentemente se originaron en bacterias marinas como *Vibrio* y *Shewanella* y se encuentran también presentes en otras bacterias marinas (Poirel y cols., 2005). Plásmidos de amplio rango de hospedador, probablemente originados en el ambiente acuático y que confieren resistencia a antibacterianos como estreptomicina, tetraciclina, sulfamidas y trimetoprim, son compartidos por los patógenos humanos *Yersinia pestis*, *Salmonella* y el patógeno de peces *Yersinia ruckeri*, como resultado de intercambios genéticos aparentemente recientes (Welch y cols., 2007; Fricke y cols., 2009).

Por tanto, son cada vez más las regulaciones estrictas en cuanto al uso de los antimicrobianos así como la presencia de residuos de antibióticos en los productos de acuicultura (FAO, 2002). En Europa, el Reglamento (CEE) 2377/90 de junio de 1990 modificado por el Reglamento (CE) 1353/2007, de 20 de Noviembre de 2007, prohíbe el uso de cloranfenicol y nitrofuranos como tratamiento en las granjas acuícolas Europeas.

Por todo lo expuesto, el uso de antibióticos en acuicultura se reducido en un 60% (en EEUU y Japón) pero los abusos anteriores han alarmado las autoridades sanitarias y consiguientemente se han establecido límites y prohibiciones. Los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la comisión del *Codex Alimentarius* para los antibióticos autorizados para su uso en la Unión Europea para la cría de peces se indican en la Tabla II.

**Tabla II.** Límites máximos de Residuos (LMR;  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) de antibióticos y quimioterápicos para la acuicultura en la Unión Europea. Adaptado del Reglamento (CEE) 2377/90, de junio de 1990, modificado por el Reglamento (CE) 1353/2007, de 20 de Noviembre de 2007.

Antibiótico	LMR	Especie	Reglamento
Sulfonamidas	100	Productoras de alimentos	508/1999/EC
Trimethoprim	50	Peces	
Amoxicilina	50	Productoras de alimentos	
Ampicilina	50	Productoras de alimentos	
Benzilpenicilina	50	Productoras de alimentos	
Cloxacilina	300	Productoras de alimentos	
Dicloxacilina	300	Productoras de alimentos	
Oxacilina	300	Productoras de alimentos	
Sarafloxacina	30	Salmónidos	
Clortetraciclina	100	Productoras de alimentos	
Oxitetraciclina	100	Productoras de alimentos	
Tetraciclina	100	Productoras de alimentos	
Flumequine	600	Salmónidos	2728/1999/EC
Ácido oxolínico	300	Peces	807/2001/EC
Florfenicol	1000	Peces	1322/2001/EC
Eritromicina	200	Productoras de alimentos	1181/2002/EC

Los efectos directos sobre la salud humana son el desarrollo de resistencias a los antibióticos por parte de las bacterias patógenas (uno de los riesgos más graves de la

salud humana a nivel mundial), y también algunos efectos específicos como es el caso de la anemia aplásica relacionada con el cloranfenicol.

A parte de las repercusiones negativas para la salud humana, hay que tener presente los problemas medioambientales que pueden provocar los antibióticos en acuicultura. La vida media de algunos antibióticos, como la oxitetraciclina, en sedimentos de granjas de salmónidos puede variar de 9 días hasta casi 14 meses dependiendo de las corrientes de agua y de otros factores ambientales (FAO, 2002).

Los riesgos medioambientales originados por el uso continuado de antibióticos están relacionados con su presencia en el medio acuático e incluyen: a) el aumento de resistencia a patógenos obligados y oportunistas, b) el consumo por la fauna silvestre y en especial moluscos filtradores, de restos de alimentos medicados, y c) la destrucción no selectiva de las comunidades microbianas en el sedimento (FAO, 2002). El primer y el segundo problema pueden repercutir en la salud de hombres y animales, mientras que el tercero, tiene como efecto la reducción del índice de degradación de la materia orgánica, afectando adversamente a la calidad del agua.

### **III.3.2-Alternativas al uso de antibióticos**

La creciente preocupación económica y social para reducir el uso de antibióticos, ha favorecido que se hayan estimulado enfoques más respetuosos con el medio ambiente para el control de enfermedades. (Hansen y Olafsen, 1999; Verschueren y cols., 2000b).

Hay varias estrategias para enfrentar el problema causado por el uso descontrolado de antibióticos en acuicultura. Una es conseguir niveles aceptables de

estos fármacos y otra es evitar su uso cuando sea posible. La primera estrategia consiste en limitar el empleo de antibióticos en las empresas acuícolas y al mismo tiempo establecer y aplicar obligatoriamente los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en el *Codex Alimentarius* (Tabla II). En algunos países también se prohíbe el uso de ciertos antimicrobianos. La segunda estrategia consiste en evitar que los animales enfermen utilizando vacunas específicas, inmunoestimulantes o bien a través del uso de los probióticos.

La profilaxis mediante el diagnóstico y utilización de medios alternativos para la prevención de patologías, como la vacunación son una alternativa real y una necesidad ligada al desarrollo de la acuicultura (Shao, 2001; Bowden y cols., 2003; FAO, 2006).

La vacunación es una herramienta tradicionalmente utilizada en acuicultura como método profiláctico para el control de enfermedades infecciosas. El primer ensayo en peces fue descrito por Duff en 1942, quien vacunó oralmente truchas contra la forunculosis con una cepa de *Aeromonas salmonicida* inactivada con formol. La primera vacuna comercial se registró en Estados Unidos y fue contra la enfermedad de la boca roja en 1976. Actualmente, la vacunación es una de las medidas más importantes para prevenir enfermedades bacterianas en peces cultivados. Laboratorios como Hypra, Europharma y Schering-Plough tienen en el mercado vacunas comerciales como Icthiovac-TM, Icthiovac-VR, Icthiovac-PD, Alpha Marine, Aquavac, Garvetil, Furovac y Vibrogen 2, que actúan frente a la mayoría de las enfermedades infecciosas que afectan a la acuicultura, entre las que se encuentran la vibriosis, forunculosis, pastereiosis, enfermedad de la boca roja, flavobacteriosis, septicemia entérica causada por *Edwardsiella sp.*, lactococosis, estreptococosis y piscirickettsiosis (Somerset y cols., 2005).



Los principales métodos de vacunación en los peces utilizan la inmersión en la solución vacunal, la inyección intraperitoneal, inyección intramuscular (para vacunas ADN), administración oral, infiltración anal y el método de spray (Penagos y cols., 2009).

De manera general, una sustancia que refuerza el sistema inmune se le denomina inmunoestimulante. Durante los últimos años, los estudios se han enfocado para conseguir la dosis óptima de diferentes productos que puede tener un efecto inmunomodulador en un hospedador. Un inmunoestimulante se puede definir como un producto químico o sustancia biológica que tiene un efecto modulador de la respuesta innata o no específica al interactuar directamente con las células del sistema inmune (Sakai, 1999). En la práctica, todos los inmunoestimulantes son suplementos dietéticos y su uso está bastante extendido, ya que permite a los animales poseer mayor resistencia frente a infecciones virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias, pero algunas de estas sustancias utilizadas no siempre son adecuadas en la acuicultura (Robertsen y cols., 1990). A pesar de que el desarrollo de inmunoestimulantes es complicado, debido al conocimiento limitado que se tiene de sus mecanismos de acción, su uso es bastante habitual en el sector acuícola con el objetivo de incrementar la supervivencia ante cualquier situación estresante, como puede ser el transporte, cambios de temperatura, manipulación periódica, o problemas patológicos.

En el mercado existen numerosas sustancias que se han utilizado en peces, tanto marinos como de agua dulce así como en crustáceos. Estos compuestos incluyen una amplia gama de productos bioactivos, que van desde los productos sintéticos como el levamisol a sustancias biológicas que incluyen a los prebióticos como los derivados bacterianos o polisacáridos como quitina y oligosacáridos; los extractos de plantas y

animales; los factores nutricionales como la vitamina C; y finalmente las hormonas, citoquinas y otros compuestos como el interferón, lactoferrina, hormona del crecimiento o prolactina (Sakai, 1999). Pueden administrarse mediante inyección intraperitoneal, mediante inmersión y administración junto con el alimento, siendo ésta última la más utilizada.

### **III.4-Probióticos**

La mayoría de las definiciones de probiótico hacen referencia más a la especie humana y otros mamíferos. Durante muchos años las investigaciones se han centrado en estas especies, y cuándo se referían al término probiótico, normalmente lo hacían considerando bacterias ácido-lácticas, la mayoría pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* (Verschuere y cols. 2000a).

En las especies acuáticas, a diferencia de los animales terrestres, la microbiota depende en gran medida del medio en el que viven, es decir, del flujo de agua que está en contacto con el tracto digestivo, con el que está en constante interacción, siendo este medio y la dieta los responsables de la microbiota. Moriarty (1999) sugiere que la definición de probiótico en acuicultura debe incluir la adición de una fuente viva de bacteria tanto a los tanques como a los estanques donde viven los peces. Sin embargo, hay que precisar, que la influencia del medio ambiente es mucho mayor en los animales acuáticos que en los terrestres. Además del tracto intestinal, las bacterias probióticas pueden ser activas en las branquias y en la piel, e incluso en el agua. Esto implica que muchos probióticos se obtienen del entorno del pez (Fuller, 1992). Una definición más completa, en la que se incluye la importancia de la microbiota ha sido propuesta: “*Un probiótico es un suplemento vivo microbiano que tiene efecto beneficioso en el hospedador*

*modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente*” (Verschuere y cols., 2000a). Más tarde, Reid y cols. (2003) modificaron esta definición incluyendo la frase *“cuando son administradas en cantidades adecuadas confieren un beneficio saludable para el hospedador”*. Una definición más reciente es la ofrecida por Salminen y cols. (2005), que sugieren que los probióticos pueden ser parte de la microbiota gastrointestinal saludable y que su adición puede ayudar a devolver a la normalidad una microbiota alterada.

No obstante, la definición de probiótico está en continua evolución en un intento de adaptarse a los nuevos conocimientos que surgen de los trabajos de investigación con probióticos. En este sentido, se han descrito que microorganismos inactivados, e incluso los componente celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso para el hospedador (Ouwehand y Salminen, 1998; Isolauri y cols., 2002; Díaz-Rosales y cols., 2006; Sharifuzzaman y cols., 2011; Román y cols. 2012). Por tanto, a la definición de probiótico se le debería añadir, como así sugieren Díaz-Rosales y cols. (2006): *“microorganismos no necesariamente vivos, que tienen un efecto beneficioso en el hospedador”*.

Por tanto, en el tracto digestivo de las especies acuáticas se han aislado cepas tanto gram positivas pertenecientes a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* (Irianto y Austin, 2002b) como bacterias gram negativas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Vine y cols. 2006) así como levaduras hongos (Burr y cols., 2005). Los probióticos más usados en acuicultura pertenecen a diferentes grupos, como las bacterias ácidos lácticas y los Géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*. Asimismo, aunque en menos interés los Géneros *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, al igual que algas unicelulares y levaduras (Ringo y cols., 2010).

### **III.4.1- La microbiota intestinal en los organismos acuáticos**

La microbiota intestinal juega un papel muy importante e influye de manera directa sobre la nutrición y la salud de los animales en general. Por ello, al alterarla se afecta el estado fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento, su desarrollo general y la calidad final del producto obtenido para la especie (Al-Harbi y Uddin, 2005).

A diferencia de los animales terrestres, en los animales acuáticos, la microbiota intestinal no existe como una entidad en sí misma, sino que hay una gran interacción y un constante intercambio entre tal microbiota y el medio ambiente, siendo la influencia del factor ambiental mucho más importante en los animales acuáticos que en los terrestres. Debido a este intercambio continuo, una amplia variedad de bacterias oportunistas y patógenas pueden colonizar las superficies tanto internas como externas de los peces. Como consecuencia directa, el estado de salud de los peces está condicionado por el entorno inmediato (Ellis, 2002; Gómez y Balcázar, 2008). Debido a todo lo expuesto, a la hora de utilizar cepas bacterianas como probióticos hay que tener en cuenta la influencia del medio ambiente.

El tracto gastrointestinal de peces dulceacuícolas y marinos, se caracteriza por ser un nicho ecológico favorable para el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos ya que la población de bacterias beneficiosas y patógenas observadas en el intestino de los animales es normalmente más abundante en comparación con la que se encuentra en el medio ambiente que los rodea (Cahill, 1990). Sin embargo, los microorganismos del medio ambiente y sus variaciones estacionales, influyen de

manera determinante en los géneros y las especies que se puedan encontrar en la microbiota de los animales (Cahill, 1990).

El desarrollo de la microbiota y la barrera gastrointestinal es un proceso gradual que comienza después del nacimiento. Bacterias Gram-positivas anaerobias facultativas o anaerobias estrictas son las dominantes en los humanos y en los animales terrestres de producción (Gournier-Chateau y cols., 1994), siendo la microbiota materna la fuente inicial de colonización bacteriana. Por el contrario, en los animales acuáticos el contenido bacteriano está determinado por el contacto con el medio ambiente circundante, e influida por la ingesta de alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes, así como por la aparición de proteínas y de enzimas digestivas.

Bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas prevalecen en el tracto digestivo de peces y mariscos en un inicio, pero la variabilidad poblacional depende del tipo de dieta que ingieran, de la edad, la ubicación geográfica, los tratamientos con medicamentos y del estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri y cols., 2001).

Aunque existen autores que evidencian la presencia de levaduras en el tracto intestinal de los peces (Gatesoupe, 2007) las bacterias siguen siendo los principales componentes de la microbiota de éstos (Spanggaard y cols., 2000; Pond y cols., 2006; Gómez y Balcázar, 2008). Predominan fundamentalmente las bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas pertenecientes a los géneros *Actinobacter* spp, *Alteromonas* spp, *Aeromonas* spp, *Flavobacterium* spp, *Moraxella* spp, *Pseudomonas* spp, y *Vibrio* spp (Cahill, 1990; Onarheim y cols., 1994; Blanch y cols., 1997; Gómez y Balcázar, 2008).

Esta microbiota intestinal autóctona inhibe el crecimiento de microorganismos no autóctonos y patógenos. Además, interactuará con el sistema inmunológico, ya que los productos resultantes del metabolismo bacteriano contactan con la red de citoquinas dando como resultado una falta de reactividad inmunológica y tolerancia a la microbiota (Gómez y Balcázar, 2008). Cuando esta tolerancia se rompe, la inflamación da lugar a daños en la mucosa. Por tanto, el establecimiento de la microbiota de protección es esencial para mantener la salud del pez mediante el proceso de exclusión competitiva y facilita el desarrollo y maduración del sistema inmune (Balcázar y cols., 2006; Gómez y Balcázar, 2008).

Es importante conocer esta microbiota. Este conocimiento nos permite establecer nuevas estrategias para el control de las enfermedades. Por tal motivo, la utilización de bacterias antagónicas de microorganismos patógenos en sistemas de cultivo ha despertado últimamente un enorme interés para los investigadores. En este sentido, los probióticos se presentan como una alternativa potencial y efectiva, tanto como promotores del crecimiento, o como protectores frente a enfermedades infecciosas. En general, a nivel experimental, son muchas las cepas probióticas utilizadas como herramientas útiles para mejorar la producción y el estado de salud de los peces (Nikoskelainen y cols., 2001a; Kesarcodi-Watson y cols., 2008; Dimitroglou y cols., 2011).

#### **III.4.2-Criterios de selección de cepas probióticas**

En acuicultura, la selección de cepas probióticas es un proceso bastante complejo ya que el hábitat microbiano está sometido a constantes alteraciones, y permite cambios en la composición estructural y funcional de las comunidades microbianas, debido a su interacción con el ambiente (Verschuere y cols., 2000a). Algunas investigaciones

sugieren que los probióticos deben ser seleccionados del propio hospedador en los cuales van a ser usados, y de esta manera, minimizar los efectos provocados por las diferencias entre los ambientes en que se desarrollan los organismos (Duwat y cols., 2000), aunque existen numerosos trabajos donde se ha demostrado el efecto beneficioso de bacterias aisladas de otros hospedadores sobre la salud de los peces (Gatesoupe, 2007; Liu y cols., 2012).

En general, para que una cepa sea considerada como cepa probiótica, debe cumplir una serie de características:

✚ **Antagonismo frente a patógenos:** Esta es una vía muy común para la primera selección de los posibles probióticos, donde cepas patógenas son expuestas *in vitro* a cepas probióticas o a sus productos extracelulares, siendo éste requisito fundamental para muchos autores, a la hora de escoger una cepa como probiótica (Fuller, 1989; Austin y cols., 1995; Chang y Liu, 2002; Irianto y Austin, 2002b).

✚ **Resistencia al pH y a la bilis:** La habilidad para sobrevivir el tránsito a través del tracto intestinal es una capacidad que presentan pocos microorganismos, debido a las variaciones en el pH que presenta dicha zona orgánica. Los microorganismos que se puedan utilizar como probióticos deberán resistir a las enzimas de la cavidad oral (lisozima, amilasa), el pH bajo del estómago, y también resistir a las concentraciones de sales biliares y jugos pancreáticos segregados en el intestino delgado (Duwat y cols., 2000). Es importante analizar inicialmente si la cepa candidata seleccionada tiene capacidad de llegar viva al intestino, mantenerse y proliferar de manera eficiente, una vez ha sido ingerida, y poder observar su efecto a largo plazo, o en su defecto ser adicionada regularmente en la dieta (Duwat y cols., 2000; Nikoskelainen y cols., 2001b).

✚ **Inocuidad y efecto beneficioso para el hospedador:** Los microorganismos utilizados como probióticos deben ser no patógenos y no tóxicos, y por tanto, no producir efectos indeseables al administrarlos a los animales acuáticos (Irianto y Austin, 2002b). No sólo es necesario que protejan al hospedador frente a enfermedades, sino que ofrezcan efectos beneficiosos en la interacción con el mismo (Fuller, 1992; Irianto y Austin, 2002b).

✚ **Capaz de adherirse a células intestinales:** Para sobrevivir y competir en un ecosistema complejo como el intestino, es necesario que la cepa seleccionada pueda adherirse a la mucosa intestinal, siendo este criterio importante a la hora de evaluar una cepa como probiótica, ya que solo las cepas capaces de adherirse podrían llegar a colonizar el intestino, y a su vez formar parte de la primera barrera defensiva de los peces frente a los patógenos que utilizan este tracto como puerta de entrada. En caso contrario, la cepa se convertirá en un microorganismo transitorio, limitando sus posibles efectos positivos (Verschuere y cols., 2000a; Vine y cols., 2006).

### III.4.3- Mecanismos de acción de los probióticos

Durante las últimas décadas muchas son las publicaciones en la que se hace referencia a los mecanismos de acción de los probióticos (Balcázar y cols., 2006; Kesarcodi-Watson, 2008; Dimitroglou y cols., 2011). La capacidad de los probióticos para ejercer su acción depende fundamentalmente de la exactitud con la que alcancen el lugar específico donde deben actuar (Verschuere y cols., 2000a). Ejercer su acción protectora en el hospedador está relacionada con sus diferentes mecanismos de acción, que son evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los mecanismos de acción que han sido descritos para los probióticos podemos destacar los siguientes:



### III.4.3.1-Producción de compuestos inhibidores

Algunos hongos y cepas bacterianas producen sustancias bactericidas o con efecto bacteriostático, que afecta al desarrollo y crecimiento de otros microorganismos. Estas cepas pueden alterar la relación entre el grupo de bacterias presentes, ya que influyen en la competencia por la disponibilidad de energía y sustancias químicas. La presencia de microorganismos que producen sustancias inhibitorias en el intestino, constituyen una barrera en contra de la proliferación de patógenos oportunistas (Naidu y cols., 1999). En general, el efecto antimicrobiano de las bacterias es debido a la producción de compuestos antimicrobianos como, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, alteración del pH por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta y diacetilo (Verschure y cols., 2000; Vine y cols., 2006), entre otros compuestos.

a) Producción de antibióticos y de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas, lisozimas, proteasas y peróxidos de hidrógeno

Entre los principales compuestos antimicrobianos se encuentran las bacteriocinas, metabolitos peptídicos de síntesis ribosomal producidos por distintos tipos de bacterias, como el grupo de las ácido-lácticas. Estos compuestos peptídicos se encuentran altamente distribuidos en la naturaleza, siendo aislados por primera vez de *Escherichia coli*. Por lo general, en la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas, y han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas. Actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de pequeños compuestos, o alterando la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Chikindas y cols., 1993; Montville y Chen, 1998). Géneros como *Streptococcus* y

*Leuconostoc* producen generalmente la bacteriocina niacina la cual ha sido empleada ampliamente en el procesamiento de alimentos. *Lactococcus lactis* produce la nisina. Otros géneros como *Enterococcus* producen enterocina (A, B, I, L, o P), *Carnobacterium* sp. produce divercina y piscicocina, *Pediococcus* sp. la pediocina y la bacteriocina ALP 57. Asimismo, *Lactobacillus* sp. puede producir sakacina, curvacina, o plantaricina. Todos estos géneros bacterianos han sido ampliamente utilizados a nivel experimental como probióticos en animales acuáticos por inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Campos y cols., 2006; Motta y Brandelli, 2008; Desriac y cols., 2010). Existen multitud de estudios acerca de la actividad inhibitoria producida por bacterias ácido lácticas mediante la producción de bacteriocinas (Klenhamer, 1993).

Otro metabolito antimicrobiano importante es el peróxido. En la naturaleza la mayor parte de las bacterias catalasa negativas, producen peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en presencia de oxígeno libre, pero las más estudiadas son las bacterias ácido lácticas. Éstas utilizan el oxígeno para formar peróxidos mediante flavoproteína-oxidasa o peroxidasa. El peróxido producido y liberado al medio resulta extremadamente tóxico para otras bacterias que comparten el hábitat y que son así eliminadas del tracto intestinal (Bruno y Montville, 1993; Bjorn y cols., 2003).

El primer estudio sobre la existencia de antagonismo bacteriano se atribuye a Gaixa (1889), que estudió el efecto inhibitorio frente a *Vibrio* spp. Posteriormente Rosenfeld y Zobell (1947) realizaron estudios sobre la producción de antibióticos por los microorganismos marinos, y desde entonces se empezaron a desarrollar técnicas para utilizar microorganismos como agentes antimicrobianos. *Thalassboacter utilis*, muestra efecto inhibitorio frente *Listonella anguillarum*. Esta cepa aumenta la

supervivencia de la larva del cangrejo y reduce la cantidad de *Vibrio* spp. en el agua usada para el cultivo larvario del cangrejo (Nogami y Maeda, 1992; Nogami y cols., 1997).

Olsson y cols. (1992) estudiaron cepas bacterianas asociadas a la mucosa branquial e intestinal del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) que disminuían el crecimiento de *Listonella anguillarum*. Patógenos de peces como *V. alginolyticus* han sido utilizados, sin embargo, para aumentar la supervivencia y el crecimiento del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en criaderos ecuatorianos (Gómez-Gil y cols., 2002).

b) Alteraciones del pH por la producción de compuestos orgánicos de cadena corta

Los ácidos orgánicos de cadena corta son compuestos inhibitorios que causan alteraciones del pH dentro de la célula, y son altamente tóxicos para los microorganismos porque atraviesan la membrana bacteriana en forma no ionizada y se acumulan en forma ionizada en el interior de la célula (Aguirre, 1993). Algunas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*) y bacterias, en su mayoría ácido lácticas, son evaluadas como probióticos en acuicultura por ser consideradas inocuas y por su gran capacidad fermentativa, produciendo cantidades significativas de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido acético, fórmico, láctico) a partir de carbohidratos simples, lo cual produce un aumento en la acidez intestinal que limita el asentamiento y crecimiento de bacterias patógenas (Ten Brink y cols., 1987; Mombelli y Gismondo, 2000; Klewicki y Klewicka, 2004; Balcázar y cols., 2007a). Y así, por ejemplo, algunos estudios *in vitro* han demostrado que el ácido acético y el ácido

láctico son los responsables de la disminución del crecimiento de *Carnobacterium piscicola*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio pelagius* y *Vibrio splendidus* (Vázquez y cols., 2005).

En general, en organismos acuáticos se han realizado varios trabajos en los que se ha demostrado la presencia de cepas bacterianas que presentan inhibición *in vitro* contra patógenos conocidos (Bruno y Montvile, 1993; Naidu y cols., 1999; Bjorn y cols., 2003). Sin embargo, no se ha demostrado la producción de compuestos inhibitorios bajo condiciones *in vivo*.

#### c) Diacetilo

Algunos géneros bacterianos como *Enterococcus* pueden producir diacetilo a partir del citrato siguiendo la vía del piruvato, que es el metabolito intermediario. Este compuesto, que es producido en la fermentación no ácida, presenta un potente efecto inhibitorio frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, siendo muy utilizado en la industria alimenticia (Vallejo y cols., 2008).

#### **III.4.3.2-Competencia por compuestos químicos o por energía disponible**

Los compuestos químicos y la energía disponible son factores que determinan la coexistencia y dominancia de las distintas poblaciones microbianas en un mismo ecosistema (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Entre los microorganismos existe competencia por los nutrientes que hay en el medio y por la energía que pudiera obtenerse de ellos. La competencia por los nutrientes juega un papel muy importante en la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal así como de los microorganismos presentes en el medio ambiente de cultivo que rodea a las especies que se producen en acuicultura (Verschuere y cols., 2000b).

Un compuesto químico importante para la mayoría de los microorganismos es el hierro, ya que las principales funciones reguladas por este elemento en las bacterias son aquellas que involucran la asimilación del mismo. Los microorganismos producen sideróforos, agentes hierro-específicos de bajo peso molecular. En un ecosistema, los colonizadores dominantes presentan formas más avanzadas de sideróforos-hierro que les permite inhibir el crecimiento de otros microorganismos privándolos de este nutriente (Sullivan, 2001). En este sentido, Smith y Davey (1993) demostraron que una cepa de *Pseudomonas fluorescences* inhibía competitivamente el crecimiento de *Aeromonas salmonicida*.

Las bacterias beneficiosas productoras de sideróforos se pueden usar como probióticos, ya que inhiben el crecimiento de microorganismos cuya patogenicidad depende de la disponibilidad de hierro para su crecimiento (Sullivan, 2001).

#### **III.4.3.3- Competencia por los lugares de fijación**

Un posible mecanismo para prevenir la colonización de microorganismos patógenos es la competencia por los lugares de fijación tanto en el intestino como en otros tejidos (Verschuere y cols., 2000a). Así el establecimiento de la microbiota es un componente clave para promover la salud de los animales por mecanismos competitivos (Tapia-Paniagua y cols., 2010). La mucosa intestinal en los peces representa uno de los principales lugares en los que las bacterias presentes en el medio ambiente interactúan con la microbiota intestinal, y así, los tejidos linfoides asociados al intestino desarrollan mecanismos de defensa para diferenciar entre los microorganismos patógenos y los comensales (Pérez y cols., 2010).

Mientras que la adhesión a las superficies tisulares es importante durante los primeros estadios de la infección (Krovacek y cols., 1987) la competencia de los microorganismos por los sitios de fijación con los patógenos debe ser uno de los primeros efectos que deben tener los probióticos (Montes y cols., 1993).

Según Andlid y cols. (1995), la habilidad de adhesión a la mucosa entérica y paredes intestinales es necesaria para que una bacteria se establezca en el tracto gastrointestinal de los peces. Durante la utilización de bacterias probióticas, la adhesión es importante para que la colonización por parte de estas bacterias se lleve a cabo, y de esta manera inhiban la fijación y proliferación de bacterias patógenas dentro del intestino. Este fenómeno se conoce como exclusión competitiva, y si esto no se lleva a cabo, las bacterias beneficiosas se consideran como microorganismo de tránsito y se eliminan junto con las heces, sin haber ejercido su función probiótica de la manera adecuada. Como consecuencia, este mecanismo se considera como un pre-requisito para seleccionar una cepa como probiótica (Olsson y cols., 1992; Jöborn y cols., 1997; Gatesoupe, 1999).

Este mecanismo de adhesión y posterior exclusión de patógenos puede estar basado en factores físico-químico como la hidrofobicidad, o factores específicos donde intervienen las adhesinas que se unen a células receptoras presentes en el epitelio intestinal, y que están presentes en la superficie de las cepas probióticas (Salminen y cols., 1996). En los peces la capacidad de adhesión *in vitro* de bacterias con capacidad probiótica y la capacidad de excluir patógenos han sido evaluadas por varios autores en diferentes cepas probióticas (Nikoskelainen y cols., 2001b; Namba y cols., 2007; Van der Marel y cols., 2008; Balcázar y cols., 2009; Vendrell y cols., 2009).

#### **III.4.3.4-Mejora de la calidad del agua**

Muchos estudios señalan que mejorar la calidad de agua en los sistemas de cultivo mediante la adición de cepas probióticas es un factor importante para mantener el bienestar del hospedador. Varios miembros de los Géneros *Bacillus* y *Phenibacillus* son utilizados como bacterias “biorremediadoras”, convirtiendo la materia orgánica en CO<sub>2</sub> (Antony y Philip, 2006).

Asimismo, existen muchos estudios donde se utilizan géneros como *Nitrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* y *Rhodopseudomonas* en cultivo de peces y crustáceos, proporcionando un impacto favorable sobre el medio (Zhou, 2010).

Muchas de estas bacterias nitrificantes, son utilizadas para controlar los niveles de amoníaco y nitritos en tanques o acuarios, debido a que estos compuestos son un problema de enorme trascendencia para diferentes cultivos (Lewis y Morris, 1986; Chen y Chen, 2001; Lee y cols., 2002; Wang, 2004; Wang y Han, 2007).

#### **III.4.3.5-Aumento de la respuesta inmune**

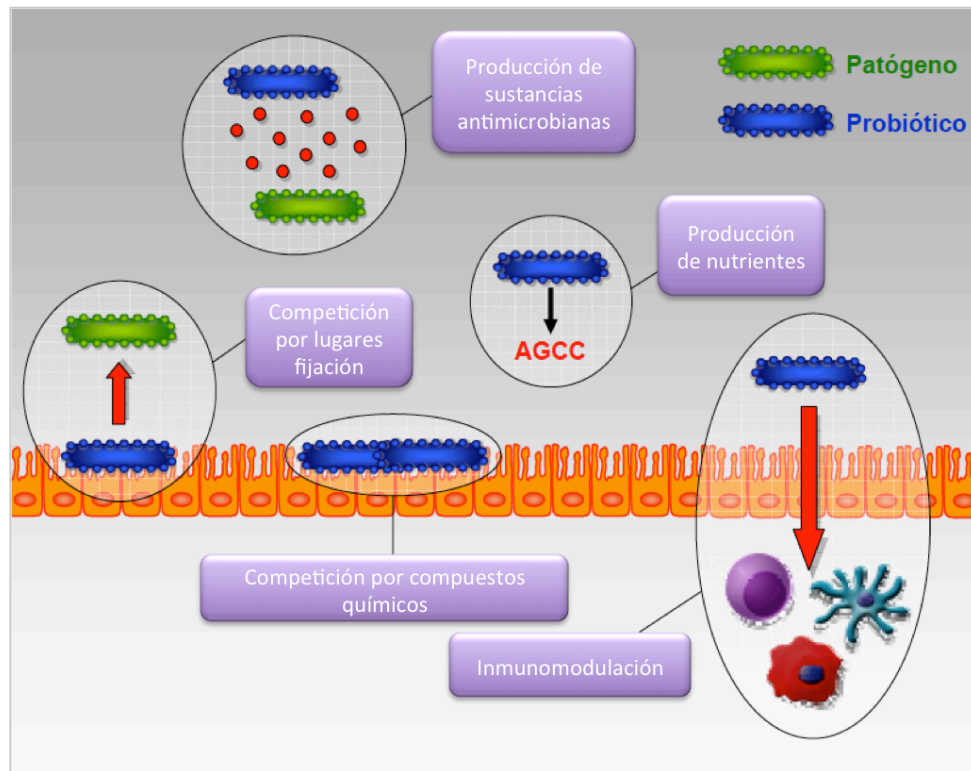
Está bien documentado, y muchos son los trabajos en los que se evalúa el efecto de los probióticos sobre el sistema inmune favoreciendo así la salud de los peces (Villamil y cols., 2002; Balcázar y cols., 2007b; Salinas y cols., 2008; Son y cols., 2009; Chiu y cols., 2010). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual los probióticos estimulan la respuesta inmune, se cree es debido a que los componentes de las paredes celulares de los microorganismos (lipopólisacáridos, peptidoglicanos,  $\beta$ -glucanos) mantienen alerta a los mecanismos de defensa. Por otro lado, muchos de éstos microorganismos producen ácidos grasos poliinsaturados (HUFA) que constituyen componentes

esenciales de las membranas celulares, de forma que mejoran las capacidades receptoras, las actividades enzimáticas y las funciones de modulación, lo que se traduce en un mayor rendimiento en presencia de microorganismos patógenos. A continuación se desarrollará este punto en el apartado III.4.4

#### **III.4.3.6-Contribución enzimática para la digestión**

Varios estudios han descrito el efecto nutricional de algas, cepas probióticas y levaduras sobre el sistema digestivo de peces y crustáceos, mejorando su crecimiento, supervivencia y asimilación de nutrientes (Askarian y cols., 2011). Estudios *in vitro* han evaluado que bacterias aisladas del propio sistema digestivo de los peces aumentan la actividad enzimática de su hospedador, produciendo un efecto positivo sobre la digestión de proteínas, almidón y lípidos (Gatesoupe y cols., 1997). Otros ensayos realizados con larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con levadura viva (*Debaryomyces hansenii*) mostraron un incremento en la actividad enzimática y concentración de tripsina y lipasas mediante el mRNA, sugiriendo la maduración temprana del sistema digestivo de las larvas (Tovar y cols., 2004). Por otra parte, también se ha descrito una alta tasa de crecimiento en lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) tras la administración en la dieta de las cepas probióticas liofilizadas Pdp11 y Pdp13 (Sáenz de Rodríguez y cols., 2009).





**Figura IV:** Representación de algunos de los mecanismos de acción de los probióticos.

#### III.4.3.7-Fuente de macro-micro nutrientes

Otro mecanismo de acción de las cepas probióticas puede ser el aporte de nutrientes. Estas bacterias pueden producir varias vitaminas como metabolitos secundarios, y entre ellas, la vitamina B12 es la más analizada. Esta vitamina ha sido aislada de microorganismos presentes en el intestino de una gran variedad de peces, como la carpa (*Cyprinus carpio*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sugita y cols., 1991), sugiriendo que si estas bacterias que producen vitaminas están en los peces, no necesitarían su administración en la dieta (Sugita y cols., 1998).

Sabemos que los carotenoides actúan como antioxidantes en los tejidos de los peces compactando los lípidos dañados por radicales libres. La selección de cepas que

produzcan diversos pigmentos (amarillo o naranja brillante) sobre medios de cultivo, puede ser un primer paso para la utilización de estas bacterias como potenciales probióticos, partiendo de la base de que estos microorganismos sean inocuos, y que tengan la habilidad de producir estos metabolitos beneficiosos (Holmstrom y cols., 2002).

#### **III.4.3.8-Efecto antiviral**

Existen evidencias de que algunas cepas utilizadas como probióticos presentan efectos antivirales, aunque el mecanismo de acción aún se desconoce. No obstante, la inactivación viral puede deberse a la existencia de sustancias químicas y/o biológicas como extractos de algas marinas y determinados agentes extracelulares.

Se ha comprobado que algunas cepas de *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp., aislados de salmónidos presentan actividad antiviral frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). La administración de estas cepas ha desencadenado una disminución de la incidencia de la enfermedad de hasta el 50% (Kamei y cols., 1988). Por otro lado, Harikrishnan y cols., (2010), observaron un aumento en la supervivencia en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) cuando fueron alimentadas durante 30 días con dos productos comerciales (Lactobacil® y Sporolac®) tras ser infectados con linfoquistis. Liu y cols. (2012) apreciaron un aumento en la supervivencia frente a una infección mixta frente a *Iridovirus* y *Streptococcus* en el mero (*Epinephelus coioides*) alimentados con la cepa probiótica *Bacillus subtilis* E20.

#### **III.4.4-Los Probióticos y el sistema inmune de peces teleósteos**

Entre los numerosos efectos beneficiosos de los probióticos, la modulación del sistema inmune es uno de los efectos más estudiados, sobre todo en humanos y animales terrestres (Nayak, 2010). La mayoría de los estudios realizados con probióticos en peces estaba relacionado, hasta no hace mucho tiempo, con la capacidad protectora y la capacidad de promover el crecimiento (Nayak, 2010). En los últimos años, una gran cantidad de trabajos cercioran el efecto beneficioso de los probióticos tanto *in vivo* como *in vitro* sobre el sistema inmune de los peces teleósteos (Díaz-Rosales y cols., 2006; Balcázar y cols., 2007b; Brunt y cols., 2007; Panigrahi y cols., 2007; Kim y Austin, 2008; Balcázar y cols., 2009).

En la literatura se indica que los probióticos, tanto de manera individual como combinados, pueden mejorar tanto de forma sistémica como de forma localizada la inmunidad en los peces. A continuación se van a detallar algunos efectos de los probióticos sobre el sistema inmune de los peces así cómo los factores que pueden determinar dicha respuesta.

##### **III.4.4.1-Los probióticos y la inmunidad innata**

Los estudios realizados en humanos y animales con probióticos nos pueden proporcionar una idea de cómo influyen éstos sobre la inmunidad de los peces (Mishra y cols., 2008). Pueden estimular en los peces diferentes parámetros inmunes. Interactúan con células fagocíticas (monocitos y macrófagos), con leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), así como con células *natural killer* (NK) mejorando la respuesta innata inespecífica. Al igual que en los vertebrados superiores, los probióticos pueden

aumentar el número de eritrocitos, granulocitos, macrófagos y linfocitos en diferentes especies acuícolas (Irianto y Austin, 2002a; Kumar y cols., 2008). Del mismo modo, tanto *in vivo* como *in vitro*, estimulan activamente la proliferación de linfocitos B en los peces. El aumento de las inmunoglobulinas producido por la suplementación con probióticos se ha demostrado en muchas especies animales, incluidos los peces (Panigrahi y cols., 2004; Nayak y cols., 2007; Al-Dohail y cols., 2009). Diferentes cepas bacterianas pertenecientes a las bacterias ácido-lácticas (LAB), ya sean viables o no, puede aumentar las inmunoglobulinas en los peces (Panigrahi y cols., 2005), incluso con sólo una semana de suplementación de las cepas con el alimento, como demostraron Nikoskelainen y cols. (2003), que observaron diferencias significativas en la cantidad de inmunoglobulinas de la truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con  $2,8 \times 10^8$  ufc/g de alimento de *Lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, Balcázar y cols. (2007c) no observaron diferencias significativas en la cantidad de inmunoglobulinas de la trucha común (*Salmo trutta*), cuando se alimentaron durante dos semanas con una mezcla de  $10^6$  ufc/g de alimento de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides*.

a) Actividad fagocítica:

La actividad fagocítica es la responsable de la activación temprana de la respuesta inflamatoria antes de la producción de anticuerpos, y juega un papel importante en las defensas frente a las bacterias. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus acidophilus* aumentan la actividad fagocítica en diversos animales (Rutherford-Markwick y Gill, 2004). Muchos de éstos probióticos se han utilizado en la práctica acuícola suplementados en el pienso, ya sea de forma viva o inactivada,

observándose efectos beneficiosos sobre la actividad fagocítica (Irianto y Autin, 2003; Panigrahi y cols., 2004; Brunt y Austin, 2005; Brunt y cols., 2007; Pieters y cols., 2008). Pirarat y cols. (2006) observaron en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) un aumento significativo en la actividad fagocítica de los leucocitos tras dos semanas de alimentación con *Lactobacillus rhamnosus*. Igualmente, Sakai y cols. (1995) encontraron un aumento en la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón anterior en trucha arcoíris, tras la administración oral de *Clostridium butyricum*. Sin embargo, *Lactobacillus lactis* aumenta la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón anterior en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Villamil y cols., 2002).

#### b) Explosión respiratoria

La explosión respiratoria es un importante mecanismo de defensa innata de los peces. Los resultados obtenidos para la explosión respiratoria en los estudios realizados con probióticos en peces son a menudo contradictorios. Mientras que por un lado existen estudios en los que se demuestra que no hay efecto de los probióticos sobre la explosión respiratoria (Nayak y cols., 2007; Sharifuzzaman y Austin, 2009; Díaz-Rosales y cols., 2009), otros trabajos realizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que los probióticos ejercen su acción sobre la explosión respiratoria de muchos animales acuáticos, incluidos los peces. *Bacillus subtilis* y ciertas cepas pertenecientes a las bacterias ácido-lácticas (LAB) pueden estimular la actividad de la explosión respiratoria en los peces (Ortuño y cols., 2002; Salinas y cols., 2005; Salinas y cols., 2006; Zhou y cols., 2010). Salinas y cols. (2006), observaron *in vitro* que  $5 \times 10^7$  ufc/ml de *Lactobacillus delbrueckii* subps. *lactis* y *B. subtilis* inactivadas con calor eran capaces de

estimular al explosión respiratoria en los leucocitos de riñón anterior de la dorada (*Sparus aurata*).

c) Lisozima:

La lisozima es una de las enzimas más importantes de la respuesta innata inespecífica que ayuda al hospedador a combatir los agentes infecciosos (Rutherford-Markwick, 2004). Los probióticos, sólo o combinados, pueden aumentar la actividad lisozima del suero en los peces teleósteos, como *L. rhamnosus*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens* en trucha arcoiris (Panigrahi y cols., 2004; Kim y Austin, 2006) o *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. mesenteroides* y *L. sakei* en trucha común (Balcázar y cols., 2007b). A parte de aumentar la lisozima del suero, también pueden mejorar el nivel de lisozima en el mucus de la piel de los peces (Taoka y cols., 2006; Song y cols., 2006).

d) Contenido en peroxidasa

La peroxidasa es una enzima que utiliza radicales oxidativos para producir ácido hipocloroso para matar patógenos. Se produce sobre todo durante la explosión respiratoria, y es liberada principalmente por los gránulos de los neutrófilos. Wang y cols. (2008) observaron que *Enterococcus faecium*, administrado a través del agua, aumenta el contenido en peroxidasa del suero en la tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*). Reyes-Becerril y cols. (2008), apreciaron diferencias significativas en el contenido en peroxidasa de doradas alimentadas durante 4 semanas con  $10^6$  ufc/g de alimento con la levadura *Debaryomyces hansenii*. Por el contrario, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *B. subtilis* administrados durante 3 semanas no aumentaron el contenido en

peroxidasa de los leucocitos de riñón anterior de la dorada (*Sparus aurata*) (Salinas y cols. 2006).

e) Actividad del complemento

En los teleósteos, el sistema complemento desempeña un papel clave en la respuesta inmune, ya que ayuda a la quimiotaxis, opsonización, fagocitosis y a la degradación de los patógenos. Se ha demostrado que el sistema complemento puede ser estimulado tanto por cepas probióticas vivas (Panigrahi y cols., 2007; Salinas y cols., 2008) como inactivadas, como comprobaron Choi y Yoon (2008), tras las administración durante 4 semanas de cepas probióticas pertenecientes a la Familia *Vibrionaceae* (Pdp11 y 51M6).

f) Citoquinas

Las citoquinas son mediadores producidos por las células del sistema inmune y ayudan a contribuir al crecimiento y a la diferenciación celular, entre otras funciones (Peddie y cols., 2002). En la literatura se indica que numerosos probióticos pueden modular la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias, tales como la interleuquina-1 (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), así como citoquinas antiinflamatorias tales como la interleuquina-10, el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en muchos animales (Christensen y cols., 2002; Peddie y cols., 2002; Niers y cols., 2005). Probióticos como *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *Lactobacillus paracascei* pueden regular la expresión de citoquinas en diferentes hospedadores (Kato y cols., 1999; Rutherford-Markwick, 2004). Los probióticos como *L.*

*rhamnosus*, *E. faecium* y *B. subtilis* son capaces de regular la expresión que citoquinas como la IL-1 $\beta$  y el TGF- $\beta$ , tanto en el bazo como en el riñón anterior de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Panigrahi y cols., 2007). Resultados similares obtuvieron Kim y Austin (2006) con una sobre estimulación de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  en los leucocitos de riñón anterior de trucha arcoíris que fueron alimentadas con *C. maltaromaticum* y *C. divergens*, sugiriendo que estas cepas posiblemente están involucradas en la respuesta antiinflamatoria. Por otro lado, Picchietti y cols. (2009) observaron inhibición en la expresión de la Ciclooxygenasa-2 (Cox-2), junto con la inhibición de la expresión de la IL-1 $\beta$  y el TGF- $\beta$  en los leucocitos de larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con *Lactobacillus delbrueckii*, suplementada a través de alimento vivo (artemia y rotíferos).

#### **III.4.4.2-Factores que afectan al efecto inmunomodulador de los probióticos**

Con respecto al consumo de probióticos en animales terrestres y en humanos, la modulación de la respuesta inmune es uno de los efectos más estudiados (Medina y cols., 2007). Los peces tampoco son una excepción en cuanto a este efecto inmunomodulador, siendo el mecanismo de acción de este efecto uno de los más desconocidos (Gibsson, 1999; Corr y Gahan, 2009). Factores como el estrés, las condiciones medio ambientales, la dieta, pueden determinar la colonización y asentamiento de los probióticos en el tracto gastrointestinal (Skjermo, 1999). En el caso del efecto inmunomodulador se sabe que el origen y fuente de los probióticos (Sharifuzzaman y Austin, 2009), la viabilidad (Gill, 2001), la dosis (Donnet-Hughes, 1999) y la duración de la suplementación en la dieta con probióticos puede regular la respuesta inmune del hospedador (Vollstad y cols., 2006). Utilizar una dosis y un tiempo



inadecuado en la suplementación, en ocasiones, pueden provocar efectos indeseados (Vollstad y cols., 2006). Por lo tanto, el tipo de cepa probiótica, la cinética de la dosis y el método de alimentación resultan factores importantes para poder regular la respuesta inmune en los peces.

### **I. Cepas utilizadas**

El grupo de cepas bacterianas más comúnmente utilizado como probióticos en peces, pertenece al grupo de las bacterias ácido-lácticas (LAB), a cepas pertenecientes al género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. lincheniformis*, *B. circulans*) y al grupo de las bifidobacterias. Por otra parte, ciertas cepas del género *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*), *Vibrio* (*Vibrio fluvialis*), *Pseudomonas* y algunas enterobacterias se están utilizando como probióticos (Kesarcodi-Watson y cols., 2008). Todas estas bacterias difieren en gran medida en su modo de acción incluyendo la capacidad de desencadenar la respuesta inmune. Cada una de estas cepas probióticas difieren entre sí por su papel funcional (Nayak, 2010) y tienen propiedades únicas que de manera general no deben extrapolarse a otras cepas (Pineiro y cols., 2007). Recientemente, los estudios en animales gnotobióticos han ayudado a dilucidar la diferencias específicas de las cepas respecto de la estimulación del sistema inmune (Prioult, 2003; Shima y cols., 2008).

De manera similar, estudios previos en peces han evidenciado diferencias en cuanto a inmunomodulación de cepas probióticas, tanto entre especies como dentro de la misma especie (Salinas y cols., 2005; Panigrahi y cols., 2007; Pieters y cols., 2008; Díaz-Rosales y cols., 2009).

Díaz-Rosales y cols. (2009) observaron diferencias en la explosión respiratoria entre las cepas de *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica* en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Similares resultados en la respuesta inmune celular se demostraron, tanto *in vivo* como *in vitro*, con las cepas 51M6, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *B. subtilis* (Irianto y Austin, 2003; Salinas y cols., 2005; Salinas y cols., 2006; Díaz-Rosales y cols., 2008). Pieters y cols. (2008) no sólo observaron diferencias en cuanto a la respuesta inmune, sino también con respecto al efecto protector de dos cepas probióticas de *Aeromonas sobria* y *Bacillus thermosphacta* en la trucha arcoíris (*O. mykiss*).

- *Endógenas vs exógenas*

Como ya se indicó en el apartado 4.3 (Criterios de selección de cepas probióticas), esta selección es un proceso complicado, ya que en algunas ocasiones podemos obtener efectos indeseados en el hospedador (Gómez-Gil y Roque, 1998). Hoy en día muchos de los probióticos utilizados en animales terrestres se utilizan en la práctica acuícola. Aunque estos probióticos son exógenos (es decir, no son propios del hospedador dónde se van a utilizar), no pueden pasar desapercibidos en la acuicultura por los efectos beneficiosos que producen en los peces. Sin embargo, en algunas ocasiones cepas probióticas comerciales son ineficaces en los peces, ya sea porque no son viables en el intestino o porque no son capaces de sobrevivir al tracto gastrointestinal de los peces, entre otras razones (Moriarty, 1996; Ghosh y cols., 2007; Abraham y cols., 2008). Por otro lado, el hecho de utilizar las cepas bacterianas del mismo hospedador o de su entorno es una actividad muy común en la práctica acuícola (Verschuere y cols., 2000a).

La estrategia de aislar cepas bacterianas de animales adultos y, sobretodo, de los supervivientes de algún brote de enfermedad, y utilizarlos como probióticos en animales de otros estadios del crecimiento, ha sido muy aplicado en los peces (Gildberg y cols., 1997; Gatesoupe, 1999; Gram y cols., 1999; Gómez-Gil y cols., 2000). Existe un consenso general entre los investigadores, por el que los probióticos de origen autóctono tienen mayores posibilidades de competir por los microorganismos del intestino y de convertirse en predominantes, incluso una vez se haya eliminado como suplemento en el alimento (Goldin y Gorbach, 1992; Gómez-Gil y cols., 2000).

- *Mono-especies vs multi-especies*

Hoy en día se comercializan una gran gama de productos probióticos tanto mono-especies, como multi-especies. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, los efectos de ambas formas de suministrar los probióticos. Sin embargo, se consideran más efectivos y más eficaces, las mezclas de cepas probióticas, ya que las cepas homólogas de cultivos mixtos pueden tener efectos sinérgicos (Timmerman y cols., 2004).

Muchos trabajos demuestran que cepas probióticas aumentan la respuesta inmune innata (Irianto y Austin, 2002b; Salinas y cols., 2006; Aly y cols., 2008). Aly y cols. (2008) observaron un aumento en la explosión respiratoria y en la actividad lisozima de la trucha común (*O. niloticus*) alimentadas con una mezcla de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus*. A parte de los efectos inmunes a nivel sistémico, también se ha comprobado que mezclas las probióticas pueden aumentar a nivel local la inmunidad intestinal. Salinas y cols. (2008), apreciaron un aumento en la cantidad de inmunoglobulinas M (IgM) en la mucosa intestinal de doradas alimentadas durante 3

semanas con mezclas probióticas de *B. subtilis* y *L. delbrueckii*, mientras que cuando se administraban de manera individual durante el mismo tiempo no producían el mismo efecto. Pero no siempre las mezclas probióticas producen efectos sinérgicos, como es el caso de dos cepas probióticas Pdp11 y 51M6, pertenecientes a la Familia *Vibrionaceae*, que no lo produjeron en la trucha común (Choi y Yoon, 2008).

○ *Viable vs no viable*

Los probióticos, por definición, se consideran microorganismos viables que tienen efectos beneficiosos para la salud del hospedador. La viabilidad de las cepas les proporciona la capacidad para adherirse y colonizar el tracto gastrointestinal (Kennedy y cols., 1998). Sin embargo, ciertas cepas probióticas inactivadas han proporcionado efectos en los hospedadores, muy similares en comparación con los ejercidos por la cepa viable. Por tanto, como sugieren Díaz-Rosales y cols. (2006), la definición de probiótico debería indicar lo siguiente “*microorganismos no necesariamente vivos, que tienen un efecto beneficioso en el hospedador*”. Además, ciertas cepas probióticas inactivadas, que no se han adherido a la mucosa gastrointestinal (Hood y cols., 1988; Coconier y cols., 1993) han ejercido efectos beneficiosos tanto en la respuesta inmune sistémica como local del hospedador (He y cols., 2005).

El hecho de utilizar cepas probióticas inactivadas es una práctica en auge en la actividad acuícola, por una lado, para evitar interacciones indeseadas con el medio ambiente (Salinas y cols., 2005), y por otro, porque se han obtenido buenos resultados en cuanto a la modulación de la respuesta inmune tanto *in vivo* (Panigrahi y cols., 2005) como *in vitro* (Salinas y cols., 2006) con cepas inactivadas, y respecto al control de enfermedades (Irianto y Austin, 2003).

La actividad inmunomoduladora de las cepas probióticas inactivadas podría atribuirse, posiblemente, a que los microorganismos inactivados conservan ciertos componentes de la pared celular, tales como polisacáridos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos, que son potentes estimuladores del sistema inmunológico de los peces (Miettinen y cols., 1996; Haller y cols., 2000).

## II. Dosis recomendadas

La dosis de probióticos utilizada podría ser un factor determinante para la obtención de efectos beneficiosos en el hospedador (Kishi y cols., 1996; Minelli y Benini, 2008). Es necesario saber cuál es la dosis óptima a utilizar de un probiótico, no solo para garantizar su asentamiento y colonización en el intestino, sino para garantizar conferir todos sus efectos beneficiosos, incluido el inmunomodulador. Numerosos estudios, *in vivo* e *in vitro*, demuestran que la respuesta inmune de los peces varía con la concentración usada de probióticos. Brunt y cols. (2007) determinaron que la dosis eficaz de la cepa probiótica perteneciente al Género *Bacillus* era  $2 \times 10^8$  ufc/g, dosis con la que obtuvieron la menor mortalidad, después de un desafío en la trucha arcoíris. Por otro lado, se conoce que el efecto inmunomodulador *in vitro* de las cepas Pdp11 y 51M6, así como de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *B. subtilis* es dependiente de la dosis (Salinas y cols., 2006). Igualmente, el efecto *in vivo* de algunas cepas, LAB y de *B. subtilis*, es dosis-dependiente (Panigrahi y cols., 2005; Kumar y cols., 2008).

En acuicultura, la dosis recomendada de probióticos suele variar entre  $10^6$  y  $10^{10}$  ufc/g de alimento. La dosis óptima utilizada también puede variar con respecto al hospedador y con respecto a los parámetros inmunes que se pretenden estimular. Panigrahi y cols. (2007) encontraron valores elevados de actividad lisozima y

complemento del suero, así como un aumento en la actividad fagocítica de los leucocitos del riñón anterior de la trucha común, alimentadas durante 30 días con una dosis de  $10^{11}$  ufc/g de alimento de *L. rhamnosus*, que no observaron cuando las truchas eran alimentadas durante el mismo tiempo y con la misma cepa con una dosis de  $10^9$  ufc/g de alimento. Son y cols. (2009) en el mero (*Epinephelus coioides*), obtuvieron los mejores resultados en cuanto a crecimiento, respuesta inmune y protección frente a un patógeno, con la dosis de  $10^8$  ufc/g de alimento, comparados con las dosis de  $10^6$  y  $10^{10}$  ufc/g de *L. plantarum*.

Además, se ha comprobado, que las dosis bajas pueden no estimular la respuesta inmune, mientras que las dosis altas pueden provocar efectos no deseados (Gildberg y Mikkelsen, 1998). Son y cols. (2009) no observaron un efecto protector con la dosis más alta utilizada de  $10^{10}$  ufc/g de alimento de *L. plantarum*, a pesar de que tenía un efecto beneficioso sobre el sistema inmune. Anteriormente, Nikoskelaien y cols. (2001a) obtuvieron una mayor mortalidad después de un desafío en trucha arcoiris que fueron alimentadas con una dosis de  $10^{12}$  ufc/g de alimento de *L. rhamnosus* con respecto a las que fueron alimentadas con  $10^{10}$  ufc/g.

### **III. Tiempo de administración**

La duración de la alimentación con probióticos es otro factor que puede favorecer a la inducción de la respuesta inmune en el hospedador. En la mayoría de los estudios realizados *in vivo* el aumento de peso, la mejora de la respuesta inmune así como la resistencia a enfermedades se han registrado entre la semana 1 y 10 posteriores a la alimentación con probióticos. Pero hay que destacar que en la mayoría de las ocasiones, el tiempo necesario de alimentación para la inducción de la respuesta inmune depende

en gran medida del parámetro inmune a valorar así como de la cepa probiótica objeto de estudio, que puede ser distinto incluso para cepas probióticas de la misma familia (Choi y Yoon, 2008). Díaz-Rosales y cols. (2009) observaron diferencias significativas en la explosión respiratoria, tras 60 días de alimentación con probióticos. En cambio, Sharifuzzaman y Austin (2009) observaron los mayores valores en parámetros inmunes, tanto humorales como celulares, tras dos semanas de alimentación con probióticos y que disminuyeron en la tercera y cuarta semana de dicha alimentación.

Existe bastante controversia en cuanto al tiempo de suplementación con probióticos. Mientras algunos investigadores creen que la suplementación larga no es conveniente (Choi y Yoon, 2008), otro opinan que un régimen de alimentación más corto puede provocar un descenso en la respuesta inmune de los peces (Panigrahi y cols., 2005). Por tanto, futuras investigaciones son necesarias para poder establecer los tiempos óptimos de administración, favoreciendo mucho más el efecto de los probióticos en el hospedador.

### **III.5-El sistema inmune de los peces teleósteos**

El sistema inmune de los peces, como en los vertebrados superiores, se divide generalmente en dos componentes integrales:

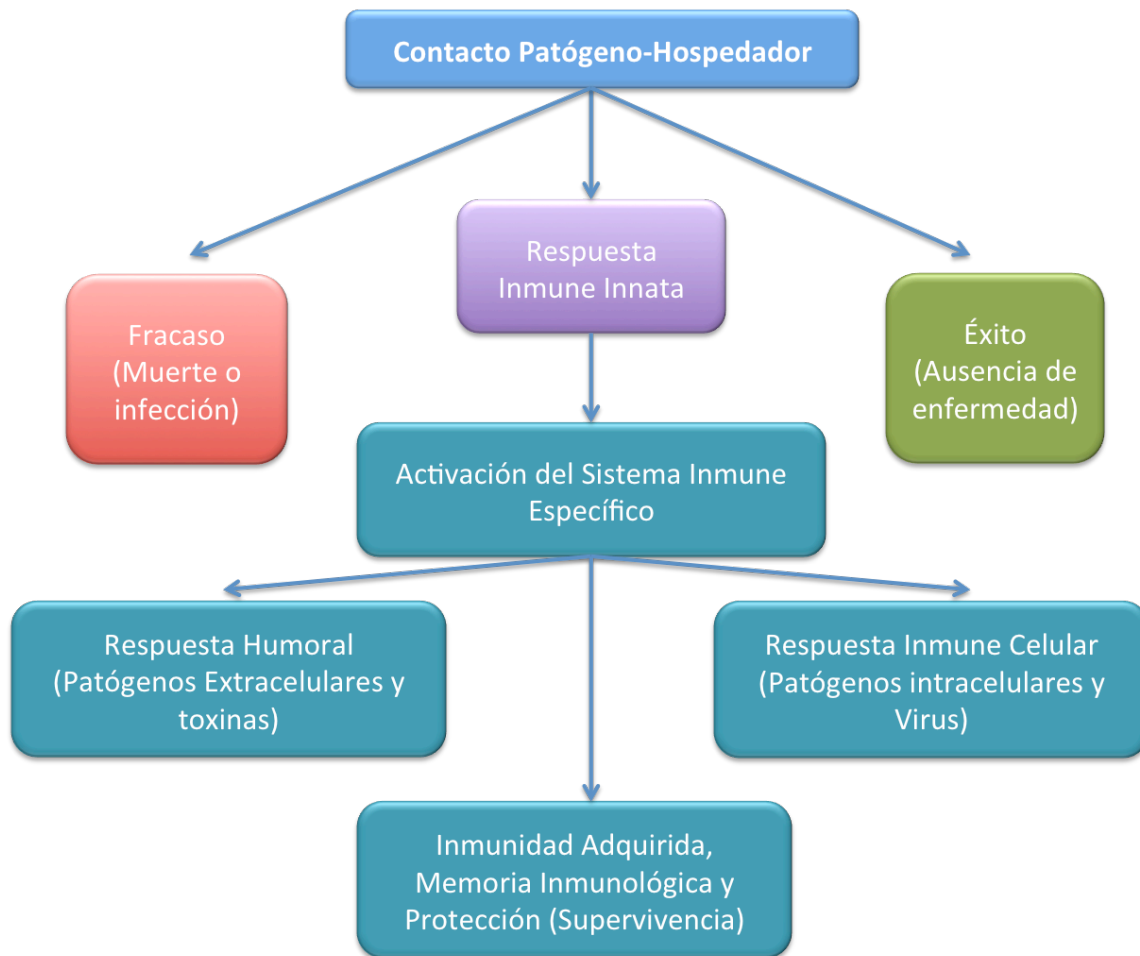
1. **El sistema de defensa innato, natural o inespecífico** formado por una serie de componentes celulares y humorales y,
2. **El sistema inmune adaptativo, adquirido (específico)**, que se caracteriza por la respuesta humoral inmune a través de la producción de anticuerpos y la

respuesta inmune celular mediada por linfocitos T, capaces de reaccionar específicamente con antígenos (Gómez y Balcázar, 2008).

Aunque lo habitual, a la hora de describir el sistema inmune inicialmente es hacer una clasificación, cada vez hay más evidencias, tanto en peces como en mamíferos, que ambos sistemas se complementan para mantener un máximo nivel de inmunocompetencia por parte del hospedador (Magnadóttir, 2006).

La respuesta inmune innata generalmente precederá a la respuesta adaptativa, activando y determinando la naturaleza de esta última y cooperando en el mantenimiento de la homeostasis (Fearon y Locksley, 1996; Fearon, 1997; Magnadóttir, 2006) por contacto directo célula-a-célula, que implicará a su vez, el contacto con otras moléculas y por la producción de agentes químicos como citoquinas, que pueden inducir diversos mecanismos a través de las diferentes células diana (Engelsma y cols., 2002; Gómez y Balcázar, 2008). Las citoquinas que regulan la respuesta inmune innata son producidas por los macrófagos, por células citotóxicas no específicas (CCN) y por linfocitos, y van a mediar en la inflamación con la consecuente migración de leucocitos al lugar de la infección, como respuesta a los antígenos microbianos o compuestos liberados por las células dañadas (Gómez y Balcázar, 2008). Así, cuando un patógeno se pone en contacto con el hospedador, la respuesta inmune innata se activa y puede dar lugar a tres situaciones: (1) el éxito y ausencia de enfermedad e infección; (2) la activación del sistema inmune específico; ó (3) fracaso, infección y/o muerte, tal como se indica en la Figura V.





**Figura V: Respuesta inmune del pez frente a un patógeno**

### III.5.1.-Sistema inmune inespecífico

Los mecanismos de defensa inespecíficos en los peces constituyen la primera barrera de defensa y engloban aquellos mecanismos que se desencadenan sin necesidad de un contacto previo con el agente invasor, dando una respuesta rápida frente a una amplia variedad de estímulos (Bayne y Gerwick, 2001; Bayne y cols., 2001; Ellis, 2001; Rauch y cols., 2006). Por tanto, la inmunidad innata se caracteriza por representar una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal que reconocen dos tipos de patrones moleculares (Magnadóttir, 2006): Los asociados a patógenos (PAMPS) como las glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y

hongos, el ADN bacteriano, el ARN viral y otras moléculas (Elward y Gasque, 2003) y, por otro lado, los patrones moleculares del propio hospedador, que son el resultado del daño tisular debido a la infección o trauma, cambios necróticos o muerte celular programada natural (Matzinger, 1998).

Los principales órganos linfoides de los peces teleósteos son el timo, el riñón y el bazo (Ellis, 1988). La carencia de médula ósea y ganglios linfáticos en los peces es una de las principales diferencias con los mamíferos. Mientras que en mamíferos el tejido hematopoyético se localiza en el hígado fetal, el bazo y la médula ósea de los adultos, en los teleósteos el tejido linfoide y el hematopoyético están estrechamente ligados, encontrándose ambos tejidos en riñón y bazo, por lo que algunos autores optan, por denominar a los órganos que ejercen estas funciones en los peces como órganos linfohematopoyéticos (Zapata y Cooper, 1990).

Los componentes del sistema inmune inespecífico en el que nos vamos a centrar en este trabajo se dividen en tres grupos: (1) barreras físicas, (2) las células del sistema inmune y (3) los factores humorales.

### **Barreras físicas**

La primera barrera contra la infección incluye la dermis, epidermis, escamas y mucosidad (Ellis, 2001; Magnadóttir, 2006; Gómez y Balcázar, 2008).

Al sistema inmune inespecífico pertenecen las mucosas desde los primeros estadíos de vida de los peces (Olafsen y Hansen, 1992). Estas barreras físicas y químicas evitan la entrada de agentes patógenos al interior del pez, constituyendo la primera barrera de defensa. Entre los componentes estructurales del mucus, producido

normalmente en función del grado de infección y de estrés, podemos destacar las mucinas, pero también otros componentes biológicos como lectinas, pentraxinas, lisozima, enzimas proteolíticas, proteína C-reactiva, péptidos antibacterianos y la inmunoglobulina M(IgM) (Alexander e Ingram, 1992; Rombour y cols., 1993; Nagashima y cols., 2001; Hellio y cols., 2002. Gómez y Balcázar, 2008), que ayudan a prevenir la colonización de agentes patógenos.

### **Células del sistema inmune innato**

Los componentes celulares del sistema inmune innato lo forman las células fagocíticas (monocitos/macrófagos, granulocitos y neutrófilos) y las células citotóxicas no específicas (CCNs), así como células epiteliales que participan también en la defensa del pez (Magnadóttir, 2006).

El principal componente celular en este tipo de respuesta son los macrófagos, que son presentadores primarios de antígenos en el sistema inmune adquirido, además de ser los principales fagocitos de los peces que liberan citoquinas proinflamatorias (Blazer, 1991; Dalmo y cols., 1997). Los macrófagos aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades y juegan un papel crucial en la patogénesis de algunos procesos, como la estreptococosis y la aeromoniasis, en las cuales son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evadir así la respuesta inmune (Ewart y cols., 2008).

Por otra parte, pertenecen al componente celular del sistema inmune innato leucocitos granulares, formados por los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los primeros tienen funciones fagocíticas, quimiotácticas y bactericidas, actividad de mieloperoxidasa,

explosión respiratoria, y poseen capacidad de degranulación de gránulos primarios (Hine, 1992; Fernández y cols., 2002; Palic y cols., 2007). Los neutrófilos tiene también la habilidad de sintetizar trampas extracelulares compuestas por gránulos de proteína y componentes nucleares, que atrapan y destruyen bacterias (Palic y cols., 2007).

Los eosinófilos granulares homogéneos (EGHs) o células granulares eosinófilas (CGEs) se encuentran asociados al tejido conectivo, sobre todo en el tracto intestinal y las branquias (Noya y Lamas, 1996; Fergusson, 2006). Se encuentran en procesos inflamatorios, donde liberan su contenido granular (Fergusson, 2006). Asimismo, no poseen actividad de mieloperoxidasa ni de fosfatasa ácida, pero se movilizan en sangre y llegan al peritoneo y otros tejidos en respuesta a infecciones bacterianas (Noya y Lamas, 1996). Parece que su actividad principal es pinocítica y excretora, y su función es la de modular la respuesta inmune de superficies (Mainwaring y Rowley, 1985; Noya y Lamas, 1996).

Los basófilos son células con citoplasmas ligeramente basófilo y grandes gránulos redondeados, que a menudo ocultan el núcleo. Según estudios ultraestructurales y citoquímicos, se pueden confundir con eosinófilos y no se pueden hacer analogías con células de mamíferos (Hine, 1992).

### **Factores humorales**

Entre los factores humorales se encuentran sustancias solubles, mayoritariamente de naturaleza proteica, presentes en los fluidos del pez, y moléculas expresadas como receptores de superficie de las células del sistema inmune

(Magnadóttir, 2006). Según su actividad o los patrones moleculares que reconocen, los factores humorales inespecíficos pueden clasificarse, a su vez en:

1. Inhibidores del crecimiento: Como pueden ser la transferrina o el interferón, que actúan eliminando nutrientes esenciales para el microorganismo o interfiriendo en su metabolismo (Heppel y Davis, 2000; Fernández y cols., 2002)
2. Inhibidores de proteasas: Están presentes en el suero y otros fluidos corporales del pez (Hjelmeland, 1983; Dabrowski y Cieroszki, 1994; Aranishi, 1999). Los peces generan estos inhibidores de proteasas para contrarrestar la acción de las enzimas proteolíticas producidas por algunos microorganismos.
3. Hidrolasas como la lisozima y quitinasa, catepsinas, enzimas líticas, el sistema complemento y otros bacteriolíticos o enzimas hemolíticas que se encuentran en tejidos y fluidos corporales de los peces, actúan de forma individual o en cascada contra las bacterias (Alexander e Ingram, 1992).
4. Las ciclooxigenasas (COX) son unas enzimas que intervienen en el proceso inflamatorio, y concretamente catalizan la reacción que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas. En peces se han descrito dos isoformas: COX-1 (Zou y cols., 1999) y COX-2 (Buonocore y cols., 2005), siendo la primera una enzima constitutiva. La expresión de la COX-2 se induce, principalmente, por la acción de los antígenos bacterianos y es producida por macrófagos y monocitos, considerándose una de las enzimas proinflamatorias más importantes.
5. Citoquinas: son moléculas que conforman una red que controla y coordina las respuestas de la inmunidad innata y adquirida. En este trabajo nos vamos a

centrar en ellas y le hemos dedicado un subapartado dentro de este punto del sistema inmune.

### **III.5.2-Citoquinas**

Existen evidencias de que en los peces, al igual que en los mamíferos, existe una red de citoquinas que influye en la respuesta inmune innata y adquirida. Pero, además, estas moléculas regulan muchos otros procesos biológicos importantes como son el crecimiento y la activación celular, la inflamación, la reparación tisular, la fibrosis y la morfogénesis.

Las citoquinas son proteínas (glicoproteínas) de bajo peso molecular que son secretadas por las células del sistema inmune, generalmente por la inducción de parásitos, bacterias y virus (Salazar-Mather y Hokeness, 2006). La secreción de citoquinas se puede regular de forma autocrina o paracrina, una vez se hayan unido a los receptores correspondientes. Estos receptores son también 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” donde intervienen un gran número de moléculas. El resultado final es la activación de unos genes específicos y la obtención del efecto biológico deseado.

Las citoquinas son producidas por macrófagos, linfocitos, granulocitos, mastocitos, células dendríticas y células epiteliales, y pueden dividirse en interleuquinas (IL), interferones(IFNs), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de

crecimiento celular (TGFs) y quimiocinas (Savan y Sakai, 2006). En este trabajo nos vamos a centrar en los tres primeros grupos citados.

Las **Interleuquinas (ILs)** engloban un grupo de citoquinas con efectos sobre los leucocitos. La IL-1 fue una de las primeras citoquinas descritas (Dinarello, 1994) y también una de las más estudiadas en peces (Bird y cols., 2002; Huisling y cols., 2004; Kaiser y cols., 2004; Scapigliati y cols., 2004; Subramaniam y cols., 2004). Esta glicoproteína inicia o aumenta la expresión de una gran cantidad de genes no estructurales, particularmente otras citoquinas, que se expresan de forma característica durante la inflamación (Dinarello, 1994; Bird y cols., 2002) y además, participa en la proliferación y maduración de muchos tipos de células inmunes (Dinarello, 1997). Este grupo de citoquinas ha sido ampliamente estudiado en peces como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), donde se han secuenciado y realizado estudios de expresión de la IL-1 $\beta$ , la IL-6, la IL-11 y la IL-18 (Koussounadis y cols., 2004; Zou y cols., 2004; Wang y cols., 2005; Benedetti y cols., 2006; Iliev y cols., 2007; Roca y cols., 2007). En dorada (*Sparus aurata*) se ha estudiado la IL-1 y sus receptores (López-Castejon y cols., 2007; Roca y cols., 2007), y se ha comprobado que sustancias como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) incrementan la expresión de esta proteína. En lubina (*Dicentrarchus labrax*) se han caracterizado interleuquinas implicadas en la inflamación como la IL-1, IL-10 y la IL-12 (Benedetti y cols., 2006; Nascimento y cols., 2007; Chistiakov y cols., 2007; Pinto y cols., 2007).

**Factor de necrosis tumoral (TNFs)**, descubierto y clonado en 1985, es una molécula capaz de producir necrosis hemorrágica en neoplasias y producir la muerte de algunas líneas celulares tumorales. Estas citoquinas tan sólo han sido aisladas en

mamíferos y peces. En humanos se han clonado 18 moléculas pertenecientes a la superfamilia TNF. En algunas especies de peces se han descrito dos formas de esta molécula; TNF- $\alpha$  o caquexina y el TNF- $\beta$ , también conocido como linfotoxina.

El TNF- $\alpha$  es el más conocido en los peces, y es sintetizado por diferentes tipos celulares (incluyendo monocitos-macrófagos, linfocitos y células NK) bajo estimulación con endotoxinas, mediadores de la inflamación o citoquinas como la IL-1 y, de manera autocrina, bajo estimulación con el propio TNF- $\alpha$  (Camussi y cols., 1991). Este factor desempeña varias actividades terapéuticas, que incluyen inmunoestimulación, resistencia a agentes infecciosos, resistencia a tumores (Vilcek y Lee, 1991) y desarrollo embrionario (Wride y Sanders, 1995). Sin embargo, el principal papel del TNF- $\alpha$  parece estar relacionado como mediador en la resistencia frente a infecciones parasitarias, bacterianas y víricas (Czarniecki, 1993; Goldfeld y Tsai, 1996; Steinshamn y cols., 1996). Roca y cols. (2007) secuenciaron y realizaron estudios de expresión del TNF- $\alpha$  de trucha arcoíris. Liu (2005) lo hizo en lubina. También se han llevado a cabo estudios funcionales en rodaballo con la proteína recombinante del TNF- $\alpha$  (Ordás y cols., 2007). En dorada se ha descrito que el TNF- $\alpha$  se expresa de forma constitutiva en distintos órganos del pez pero, a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, su expresión no parece aumentar después de un tratamiento con sustancias como el LPS bacteriano (García-Castillo y cols., 2002). Sin embargo, presenta funciones pro-inflamatorias y proliferativas cuando se administra *in vivo*, sugiriendo un papel similar al descrito en los mamíferos (García-Castillo y cols., 2004).

**Los interferones (IFNs)** son glicoproteínas, pH resistentes, producidas por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células *natural killer* (NK) en respuesta a una infección viral,



una estimulación inmune o diferentes estimuladores químicos (Dorson y cols., 1975; Graham y Secombes, 1990). En humanos se han descrito tres tipos de interferón,  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Los dos primeros son muy similares y constituyen el IFN tipo I que puede ser producido por cualquier tipo celular y es inducido por una infección viral. Por el contrario el IFN  $\gamma$ , constituye el tipo II, y no está relacionado con ninguno de los otros dos anteriores. El IFN tipo II lo producen principalmente las células NK y los linfocitos T activados por estímulos antigénicos y mitógenos o en respuesta a las IL-12 e IL-18. La actividad antiviral es inferior a la del IFN tipo I, pero es un potente activador de macrófagos (MAF).

En los peces, se ha demostrado la actividad de moléculas tipo IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arcoíris (De Kinkelin y cols., 1982). Las características físicas de esta molécula y la forma de inducir su producción mediante infección vírica, hacen pensar que se trata de una molécula similar al IFN tipo I de los mamíferos. En el sistema IFN son regulados más de 300 genes, incluyendo los que codifican las proteínas antivirales inducidas por IFN como la PKR (Proteína Kinasa K), OAS (2',5'-oligoadenilato sintetasa) y proteínas Mx (proteínas resistentes a myxovirus) (Secombes y cols., 1996; Stark y cols., 1998; Leong y cols., 1998; Ellis, 2001; Samuel, 2001).

Mx es una proteína antiviral inducida por IFN tipo I (Robertsen, 2006) y, a día de hoy, es el gen estimulado por IFN más estudiado que confiere resistencia al virus de influenza en ratones y determina la susceptibilidad al virus de la hepatitis C, hepatitis B y sarampión en humanos (Haller y cols., 1998; Lau y Horvath, 2002; Sadler y Williams, 2008). En los peces 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 Atlántico (Jensen y cols., 2002), platija japonesa (Lee y cols., 2000), pez globo (Yap y cols., 2003) y dorada (Tafalla y cols., 2004). Hoy en día se sabe, con certeza, que la inducción de Mx no es debida únicamente a virus, sino también a lipopolisacáridos de membrana, a ADN sintético y también en respuesta a vacunas inactivadas frente a bacterias (Acosta y cols. 2006).

## **IV- MATERIAL Y MÉTODOS**

En este capítulo se detallarán los materiales y métodos generales y específicos que se utilizaron en las distintas experiencias.

### **IV.1-Material**

#### **IV.1.1-Cepas bacterianas utilizadas**

En este trabajo se han utilizado dos cepas bacterianas que tanto por su características *in vivo* como *in vitro*, probadas en nuestro laboratorio, son cepas candidatas a ser utilizadas como probióticos en acuicultura.

✚ Cepa *Vagococcus fluvialis* L21: Esta cepa aislada de intestino de lenguado (*Solea solea*) ha sido identificada y caracterizada en nuestro laboratorio como probiótico de peces (Sorroza y cols., 2012).

✚ Cepa *Enterococcus gallinarum* L1: Aislada de intestino de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y corvina (*Argyrosomus regius*), fue igualmente identificada y caracterizada en nuestro laboratorio como probiótico de peces (Sorroza y cols., 2013).



#### **IV.1.2-Instalaciones y peces de experimentación**

En este trabajo se han empleado peces de la especie dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), bocinegro (*Pagrus pagrus*) y corvina (*Argyrosomus regius*) de diferentes orígenes en función de la época del año así como del experimento a realizar. Algunos ejemplares se obtuvieron de la empresa de acuicultura CANEXMAR,


S.L., situada al este de la isla de Gran Canaria entre el Morro de Tufia y la Puntilla del Morro Gordo, en el Municipio de Telde, empresa que está dedicada al cultivo de dorada y de lubina. Los peces utilizados de esta empresa fueron doradas y lubinas con un peso medio de 200 g, así como corvinas con un peso medio de 300 g.

Otros ejemplares que se utilizaron para otras experiencias fueron lubinas y bocinegros que se obtuvieron de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), en esa fecha perteneciente al Gobierno de Canarias, situada en el muelle de Taliarte, municipio de Telde al este de la isla de Gran Canaria. Las lubinas y bocinegros tenían un peso medio de 120 g. Estos ejemplares se mantuvieron en tanques de 500 l con flujo continuo de agua a 22°C, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y alimentados con pienso comercial (Skretting, Burgos).

## **IV.2-Métodos**

A continuación se detallan los métodos generales utilizados para las diferentes experiencias realizadas en este trabajo de investigación.


### **IV.2.1-Cultivo y mantenimiento de las cepas probióticas**


 ***Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1:** Tanto para mantener las cepas en el laboratorio, como para las diferentes experiencias, se cultivaron en Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHIA) (Pronadisa) y/o en Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHIB) (Pronadisa), preparado según las instrucciones del fabricante (Anexo I). Las cepas se incubaron a 22° C durante 24 horas de manera general. En

algunos experimentos las cepas se cultivaron durante 16 horas a la misma temperatura, utilizándolas así en la fase exponencial de crecimiento.

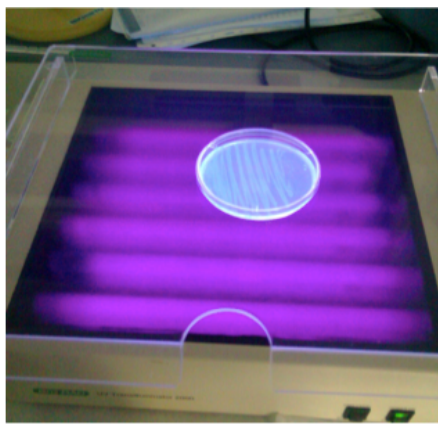
#### **IV.2.2.-Inactivación de las cepas probióticas**

Para la realización de las diferentes experiencias en este trabajo, la cepa de *Vagococcus fluvialis* L21 y la cepa de *Enterococcus gallinarum* L1, se utilizaron tanto vivas, como inactivadas con calor y por luz ultravioleta (UV):

 **Inactivación con calor:** Las cepas se cultivaron en tubos falcon (BIOGEN) con 10 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHIB) durante 24 horas a 22°C. Finalizado el período de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm, se eliminó el medio líquido de cultivo y se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino estéril (PBS). Seguidamente, se ajustó mediante espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, AG) a 1 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para obtener una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/ml para ambas cepas, previamente confirmada por recuento en placa mediante diluciones seriadas. Finalmente, la solución bacteriana se depositó en microtubos para la inactivación con calor. Dicha inactivación se realizó en un termostato (Thermostat plus, Eppendorf) a una temperatura de 60°C durante dos horas. Tras el período de inactivación las cepas fueron conservadas en congelación a -80°C hasta su posterior utilización.

 **Inactivación con luz ultravioleta:** Las cepas se cultivaron en placas de BHIA y se incubaron durante 24 horas a 22°C. Transcurrido el tiempo de incubación las placas se depositaron sobre una lámpara de luz ultravioleta (Transiluminator 2000, Biorad) (Figura V), y se inactivaron durante dos horas y media. Finalmente el cultivo se

recogió con una asa de siembra y se hicieron dos lavados con PBS. Seguidamente se ajustó mediante espectrofotometría a 1 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para obtener una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/ml, que fue posteriormente confirmada por recuento en placa, mediante diluciones seriadas. Tras el período de inactivación las cepas fueron conservadas en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.



**Figura VI: Inactivación de cepas probióticas con luz ultravioleta.**

Para comprobar la inactivación tanto por calor como por luz UV de las cepas de *E. gallinarum* L1 y de *V. fluvialis* L21 se depositaron  $100\ \mu\text{l}$  de cada una de las suspensiones inactivadas en placas de BHIA, y tras el período de incubación de 24 horas a  $22^{\circ}\text{C}$ , se comprobó la ausencia de crecimiento bacteriano en las placas.

#### **IV.2.3-Extracción de los productos extracelulares (ECPs) de *Vagococcus fluvialis* L21**

La extracción de los productos extracelulares de *Vagococcus fluvialis* L21 se realizó siguiendo la metodología de Barbey y cols. (2009) con modificaciones.

Inicialmente se cultiva la cepa bacteriana en placas de BHIA durante 24 horas a 22°C. Pasado el tiempo de incubación se coge una colonia con el asa y se cultiva en 10 ml de BHIB a 22°C durante 24 horas. Finalmente, los 10 ml de cultivo se pasan a 1l de BHIB, y se cultiva en agitación a 22°C durante 16 horas para extraer los productos extracelulares en la fase exponencial de crecimiento bacteriano.

Tras el período de incubación, centrifugamos a 20000 g a 4°C (J2-MI-Centrifuge, Beckman) durante 30 minutos, observando la formación del *pellet*, y con cuidado retiramos el sobrenadante con el que nos quedamos. El sobrenadante se pasa a través de un filtro de 0,22 micras (Millex-GS, Millipore), para asegurarse de que no pasa ningún microorganismo.

Seguidamente, añadimos el mismo volumen de ácido tricloroacético (TCA) (Panreac) a una concentración final de 10% (p/v), se agita en un vórtex (VWR, International) durante 1 minuto, y se mantiene en un baño de hielo durante 3 horas. Pasado el tiempo de precipitación en frío volvemos a centrifugar a 20000 g a 4°C, se recoge el precipitado que depositaremos en un eppendorf de 1,5 ml. Finalmente, se realizan dos lavados con metanol 70% frío (Panreac), dejamos secar los tubos en la campana para eliminar los restos de este producto y finalmente realizamos dos lavados con PBS.

EL recuento de los mg/ml de proteínas de los productos extracelulares (ECPs) de *Vagococcus fluvialis* L21 se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este proceso de extracción de los productos extracelulares se llevó a cabo tantas veces como fueran necesarias para obtener el volumen y la concentración de mg/ml de proteínas de ECPs necesarios para realizar el experimento, aproximadamente se obtuvieron 15 ml de ECPs a una concentración de 0,35 mg/ml. Una vez extraído el volumen necesario de producto extracelular se preparó un gel de acrilamida al 12,5 % (SDS-PAGE) para observar las bandas proteicas de la extracción siguiendo la metodología de LaFrentz y cols.(2004).

#### **IV.2.4-Extracción de leucocitos del riñón anterior**

La extracción de leucocitos del riñón anterior se realizó siguiendo la metodología de Secombes (1990), utilizando un gradiente de Ficoll (Lonza).

Inicialmente extraemos los leucocitos del riñón anterior de los peces objeto de estudio en función del experimento que realicemos de manera aséptica, se filtra a través de una membrana de Nylon de 100  $\mu$ m, y se resuspenden en medio Leibovitz (L-15) (Gibco) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB)(Sigma), 500 U/ml de penicilina-estreptomicina (Sigma), 0,005 mg/ml de gentamicina (Sigma), 10 U heparina/ml (Chiesi).

Realizamos una primera centrifugación a 400 g durante 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5804R, Eppendorf). En tubos de vidrio en los que previamente hemos depositado 2 ml de Ficoll, añadimos 1 ml de la suspensión de células obtenida tras la centrifugación.

Las muestras se centrifugan a 1100 g durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo de centrifugación se recoge la interfase con una pipeta Pasteur estéril y se



deposita el sobrenadante en un nuevo tubo de vidrio. Realizamos un lavado, centrifugando a 400 g durante 10 minutos para resuspender posteriormente en 1 ml de medio L-15 suplementado con antibiótico y sin suero, para favorecer que las células se fijen en las placas de poliestireno (Nunc, Thermo).

Observamos la viabilidad de las células mediante tinción vital de Tripan Blue (Biorad) y ajustamos a una concentración de  $10^7$  células/ml con la cámara de Neubauer. Finalmente, los leucocitos se fijan en placas de 6 pocillos (Nunc, Thermo), depositando 500  $\mu$ l, ó en placas de 96 pocillos, depositando 100  $\mu$ l dependiendo del ensayo a realizar. Después de tres horas de incubación a 22<sup>o</sup> C se eliminan las células no adherentes, y sustituimos con medio L-15 suplementado con antibiótico y con 2% de suero fetal bovino. Las placas se mantienen en la estufa durante una noche, hasta su utilización al día siguiente.

#### **IV.2.5-Estudio de la explosión respiratoria**

La explosión respiratoria se realizó siguiendo la técnica descrita por Secombes (1990) y Boesen y cols. (2001). Inicialmente, lavamos los leucocitos depositados en las placas de 96 pocillos con medio L-15 y con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para eliminar restos de antibióticos. Seguidamente, añadimos 100  $\mu$ l de Nitroazul de tetrazoilo (NBT, Sigma) disueltos en 1 mg/ml de HBSS con 100  $\mu$ l de cada una de las suspensiones bacterianas quedando una concentración final de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  ufc/ml, incubamos a 22<sup>o</sup> C durante 30 minutos. Como control positivo utilizamos pocillos con leucocitos y 1  $\mu$ g/ml acetato de forbol miristato (PMA, Sigma). Para analizar la especificidad de la reacción se utilizó 300 UI/pocillo de superóxido dismutasa (SOD, Sigma) a algún pocillo que contenía PMA y leucocitos. Después de la incubación

retiramos el sobrenadante y añadimos metanol al 70%. Dejamos secar las muestras en una campana de extracción hasta el día siguiente. Una vez evaporadas las muestras, añadimos 120  $\mu\text{l}$  de KOH 2M y 140  $\mu\text{l}$  de superóxido dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma). Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (MultiskanFc, Thermo) a 620 nm de longitud de onda. Los resultados se expresaron como índice de estimulación dividiendo cada muestra por su control.

#### **IV.2.6-Contenido en peroxidasa celular**

El contenido de peroxidasa presente en los leucocitos se determinó siguiendo la metodología de Quade y Roth (1997). Inicialmente, lavamos los leucocitos depositados en las placas de 96 pocillos con medio L-15 y con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para eliminar restos de antibióticos. Posteriormente se incubaron los leucocitos con 100  $\mu\text{l}$  de tres concentraciones  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  ufc/ml, de la cepa de *Vagococcus fluvialis* L21 y de la cepa de *Enterococcus gallinarum* L1, tanto utilizando las cepas vivas como inactivadas, durante 30 minutos. Tras el período de incubación retiramos el sobrenadante y realizamos un lavado de la muestra. Seguidamente añadimos 75  $\mu\text{l}$  de cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB, Sigma) al 0,02% durante 5 minutos para lisar las células. Tras los cinco minutos añadimos 50  $\mu\text{l}$  de 10mM 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina hidrociorhídrica (TMB, Sigma) y 25  $\mu\text{l}$  de 5mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produciéndose una reacción de color. Pasados 2 minutos añadimos 50  $\mu\text{l}$  2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , parando la reacción coloreada. Finalmente, cogemos 150  $\mu\text{l}$  de esa mezcla y lo pasamos a una placa nueva para medir a 450 nm de absorbancia con el espectrofotómetro. Como controles negativos se utilizaron los leucocitos incubados con PBS. Los resultados serán expresados como índice de estimulación dividiendo cada muestra por su control.

#### IV.2.7- Actividad fagocítica

La actividad fagocítica (AF) de los leucocitos de dorada, lubina, corvina y bocinegro se estudió siguiendo la técnica descrita por Puangkaew y cols. (2004). Inicialmente, lavamos los leucocitos depositados en las placas de 6 pocillos dónde previamente habíamos depositado una lentilla de 20 micras, con medio L-15 y con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para eliminar restos de antibióticos. Los leucocitos fueron inoculados con 10  $\mu$ l de una solución bacteriana de  $10^9$  ufc/ml de *Vagococcus fluvialis* L21, tanto de la cepa viva como inactivada (MOI 1:1; ratio bacterias/leucocitos), así como de  $10^9$  ufc/ml de la cepa de *E. gallinarum* L1, tanto con la cepa viva como inactivada, y se incubaron durante 1 hora a 22<sup>o</sup> C.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con medio L-15 sin antibiótico, y cuidadosamente se retiraron las lentillas y se pusieron a secar en la campana. Una vez secas las lentillas se tiñeron con un kit de tinción panóptico rápido (Diff Quick, Panreac). Una vez teñidas se realizó el montaje de las lentillas en un portaobjetos. Para el cálculo de la actividad fagocítica se contaron 300 leucocitos por lentilla teniendo en cuenta los leucocitos que tenían la bacteria en el interior del fagosoma, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$PA = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células fagocitadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

#### IV.2.8-Extracción de ARN

La extracción de ARN de los leucocitos de riñón anterior se realizó siguiendo la metodología descrita en el kit comercial de extracción RNeasy® Mini Kit (Qiagen).

##### **Extracción de ARN con el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen):**

Este kit comercial se basa en la extracción del ARN a través de una columna de extracción donde tiene distintas resinas para atrapar el ARN.

Por lo general, a no ser que se especifique lo contrario, la extracción de ARN de leucocitos se realizará a partir de las células fijadas en placas de poliestireno.

Inicialmente, ponemos sobre la placa donde están las células ya sin medio de cultivo, 350 µl del buffer RLT con 10 µl de 2-mercaptoetanol por cada 1 ml de buffer. Dejamos que actúe durante dos minutos y recogemos las células y las pasamos a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Añadimos el mismo volumen de etanol frío al 70%, y mezclamos con la pipeta sin centrifugar. Una vez homogeneizada la muestra, pasamos la mezcla a la columna de extracción previamente adaptada a un tubo de 2 ml de capacidad y centrifugamos a 11000 rpm (Minispin plus, Eppendorf)

Tras la centrifugación, desechamos el líquido restante y realizamos dos lavados con 500 µl buffer de lavado. Tras la centrifugación transferimos la columna a un nuevo tubo de 2 ml.

Añadimos 500 µl de RPE que tenemos preparado previamente, y al que se le ha añadido 4 veces el volumen de etanol al frasco, y centrifugamos a 11000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, volvemos a añadir 500 µl de RPE y centrifugamos a 11000 rpm durante 3 minutos. Al finalizar este paso hay que comprobar que no queden restos de

RPE para no degradar el RNA. Finalmente, añadimos entre 30 a 50  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsa (agua DEPC) y centrifugamos a 11000 rpm durante 1 minuto.

EL ARN obtenido de la extracción se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 ajustando a una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Las muestras se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

#### **IV.2.9-Transcripción inversa**

Este paso consiste en convertir el ARN extraído en ADNc, para ello es necesaria la enzima transcriptasa inversa, la cual se encarga de construir la cadena complementaria de ácidos nucleicos de la cadena de ARN molde. La cadena iniciadora hibridará en el extremo 3' de la cadena molde. En este paso tomamos 2  $\mu\text{l}$  de ARN previamente ajustado a una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  de tampón 10X (Biorad) y 12  $\mu\text{l}$  de agua DEPC, incubamos 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ , y mantenemos las muestras en frío (manteniéndolas en una cubeta helada), mientras añadimos 1  $\mu\text{l}$  de enzima transcriptasa inversa (iScript-Biorad) y 5  $\mu\text{l}$  de agua DEPC. Posteriormente, la mezcla se incubó 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , 50 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$  y 15 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ , finalizando el ciclo a  $16^{\circ}\text{C}$ .

#### **IV.2.10-Expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)**

Para el estudio de la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune de la lubina se utilizó la PCR semicuantitativa (qPCR), estudiando los niveles de expresión de los siguientes genes: Mx, Interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10), Ciclooxigenasa-2 (COX-2), Caspasa-3 (Casp-3) y Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Los cebadores correspondientes para cada uno de ellos, así como la temperatura de hibridación utilizados se indican en la Tabla III. Por un lado,

se utilizaron cebadores ya descritos, como es el caso de la IL-6 y la COX-2 (Sepulcre y cols., 2007), o el caso de la IL-10 (Pichiatti y cols., 2009). El resto de los cebadores fueron diseñados por nosotros en el laboratorio utilizando el software “Gene Runner”, utilizando las secuencias depositadas en GeneBank con sus respectivos números de acceso.

**Tabla III: Secuencias de cebadores utilizados para la RT-PCR y T<sup>a</sup> de hibridación.**

Gen	Secuencia de los cebadores		T <sup>a</sup> hibridación	Fuente
IL-10	Forward	5'-ACCCCGTTTCGCTTGCCA-3'	59.3°C	AM268529 Picchiatti y cols. (2009)
	Reverse	5'-CATCTGGTGACATCACTC-3'		
COX-2	Forward	5'-AGCACTTCACCCACCAGTTC-3'	59.3°C	AJ630649 Sepulcre y cols. (2007)
	Reverse	5'-AAGCTTGCCATCCTTGAAGA-3'		
Mx	Forward	5'-GGTCAAGGAGCAGATCAAACAG3'	57.7°C	AM228974 Genne runer
	Reverse	5'-CTCGCATCAGGTTAGGGAATC-3'		
Casp-3	Forward	5'-ACGAAGCAGGTCAATCATCC-3'	59.3°C	DQ345774 Genne runer
	Reverse	5'-GCAGTTTAAGGGTATCCAGAGC-3'		
TNF-α	Forward	5'-GCCAAGCAAACAGCAGGAC-3'	60°C	DQ200910 Genne runer
	Reverse	5'-ACAGCGGATATGGACGGTG-3'		
IL-6	Forward	5'-ACTTCCAAAACATGCCCTGA-3'	59.3°C	AM490062 Sepulcre y cols. (2007)
	Reverse	5'-CCGCTGGTCAGTCTAAGGAG-3'		
β-actina	Forward	5'-ATGTGGATCAGCAAGCAGG-3'	57.7°C	AJ537421 Genne runer
	Reverse	5'-AGAAATGTGTGGTGTGGTTCG-3'		
IL-1β	Forward	5'-ATTACCCACCACCCACTGAC-3'	57.7°C	AJ269472 Genne runer
	Reverse	5'-TCTCTTCCACTATGCTCTCCAG-3'		

Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo con un termociclador (IQ-5, Biorad). La amplificación se realizó en 25 µl de volumen final, conteniendo 2 µl de ADNc, 12 µl de IQ SYBR Green Supermix (Biorad), 0,5 µl de cada uno de los cebadores, y el resto agua ultrapura (SIGMA) hasta completar el volumen final de 25 µl por cada reacción. El protocolo general se describe en la Tabla IV.

**Tabla IV: Protocolo de ciclos de RT-PCR empleados para la expresión de los diferentes genes**

Ciclos	Pasos	Tª/Tiempo
<b>Ciclo 1 (1x)</b>	Paso 1	95º C x 5'
<b>Ciclo 2 (40x)</b>	Paso 1	95º C x 15''
	Paso 2	Tª hibridación(*) x 30''
	Paso 3	72º C x 30''
<b>Ciclo 3 (1x)</b>	Paso 1	95º C x 1'
<b>Ciclo 4 (1x)</b>	Paso 1	70º C x 1'
<b>Ciclo 5 (81x)</b>	Paso 1	55º C x 30''
<b>Ciclo 6 (1x)</b>	Paso 1	16º C x ∞

\* Se trabajó a la temperatura de hibridación correspondiente a cada gen

Se usó el método comparativo CT ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) de cuantificación relativa para determinar el nivel de expresión de los genes analizados (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los genes analizados fue normalizada usando la  $\beta$ -actina como control interno. El método de 2 delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores de Ct de la muestra y los valores de Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

#### IV.2.11- Análisis estadístico

Para el estudio estadístico en todas las experiencias se utilizó el software SPSS versión 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Dependiendo del experimento realizado, los datos obtenidos se estudiaron con un análisis de la varianza (ANOVA) de una o de dos vías. En los casos en los que fue necesario también se utilizó el *Test de TUKEY*. Las

diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).



## **V.-EXPERIENCIAS**

### **V.1.-Efecto inmunomodulador de cepas probióticas sobre leucocitos de especies con interés para la acuicultura.**

#### **V.1.1-Introducción**

Como bien se ha documentado anteriormente, en los últimos años ha aumentado el uso de probióticos e inmunoestimulantes en la práctica acuícola, en la mayoría de los casos para controlar enfermedades evitando así el uso excesivo de antibióticos (Thyssen y Ollevier, 2001). El impacto ambiental causado por la presencia de agentes quimioterapéuticos en el medio marino y la aparición de resistencias bacterianas son las principales razones por las que los probióticos y los inmunoestimulantes son considerados como excelentes candidatos para el control de enfermedades de los peces (Gatesoupe, 1999; Panigrahi y cols., 2004; Balcázar y cols., 2006; Díaz-Rosales y cols., 2009; García de la Banda y cols., 2010; Sharifuzzaman y Austin, 2010).

Hay algunas limitaciones a la administración de cepas bacterianas vivas como probióticos en la acuicultura, por su posible interacción con el medio marino. Una de las alternativas para evitar esta limitación es utilizar cepas probióticas inactivadas (Díaz-Rosales y cols., 2006). Entre los numerosos efectos beneficiosos de los probióticos, en los últimos años, la modulación de la respuesta inmune es uno de los efectos más estudiados (Irianto y Austin, 2003; Nikoskelainen y cols., 2003; Panigrahi y cols., 2005; Salinas y cols., 2005; Díaz-Rosales y cols., 2009; García de la Banda y cols., 2010; Sharifuzzaman y cols., 2011). A pesar de que existen numerosos trabajos *in vivo* donde se evalúa el efecto inmunomodulador de los probióticos (Nayak, 2010), son pocos los

trabajos realizados *in vitro*, que estudien el efecto de los probióticos sobre las células inmunes (Salinas y cols., 2006; Román y cols., 2012). Teniendo en cuenta que en la mayoría de los estudios, los resultados obtenidos *in vitro* muestran correspondencia con los obtenidos *in vivo* (Salinas y cols., 2005; Díaz-Rosales y cols., 2006), los ensayos *in vitro* se están desarrollando para poder determinar y evaluar de forma más fiable la capacidad inmunomoduladora de las cepas probióticas (Morelli, 2000).

Por todo lo expuesto, el objetivo de este experimento fue determinar el efecto inmunomodulador *in vitro* y la dosis efectiva, de dos cepas probióticas, *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas, sobre los leucocitos de especies de gran interés para la acuicultura marina como son la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), bocinegro (*Pagrus pagrus*) y corvina (*Argyrosomus regius*). Para ello se estudió la actividad fagocítica, el contenido en peroxidasa y la explosión respiratoria de los leucocitos de riñón anterior tras la incubación con tres concentraciones diferentes de las cepas probióticas citadas, y añadiendo las cepas vivas e inactivadas.

### **V.1.2-Diseño experimental**

Para estudiar el efecto inmunomodulador de las dos cepas probióticas objeto de estudio se utilizaron diferentes especies acuícolas de interés para la acuicultura marina, dependiendo de la disponibilidad de peces en el momento de realizar las experiencias.

Para el estudio del efecto inmunomodulador de la cepa probiótica *Vagococcus fluvialis* L21 (Esquema I) se utilizaron 30 doradas y 30 lubinas con un peso medio de 200 g. procedentes de la empresa de acuicultura CANEXMAR S.L. Por otro lado, para el estudio

del efecto inmunomodulador de la cepa probiótica *Enterococcus gallinarum* L1 (Esquema II) se utilizaron 30 ejemplares de cada una de las especies a utilizar con peso medio de 200 g. Las doradas, lubinas y corvinas procedían la empresa de acuicultura CANEXMAR S.L, mientras que los bocinegros fueron cedidos por el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM).

Todas las especies citadas se utilizaron para la posterior extracción del riñón anterior. Los peces fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico (2-Fenoxietanol) y, posteriormente, los ejemplares fueron trasladados al laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

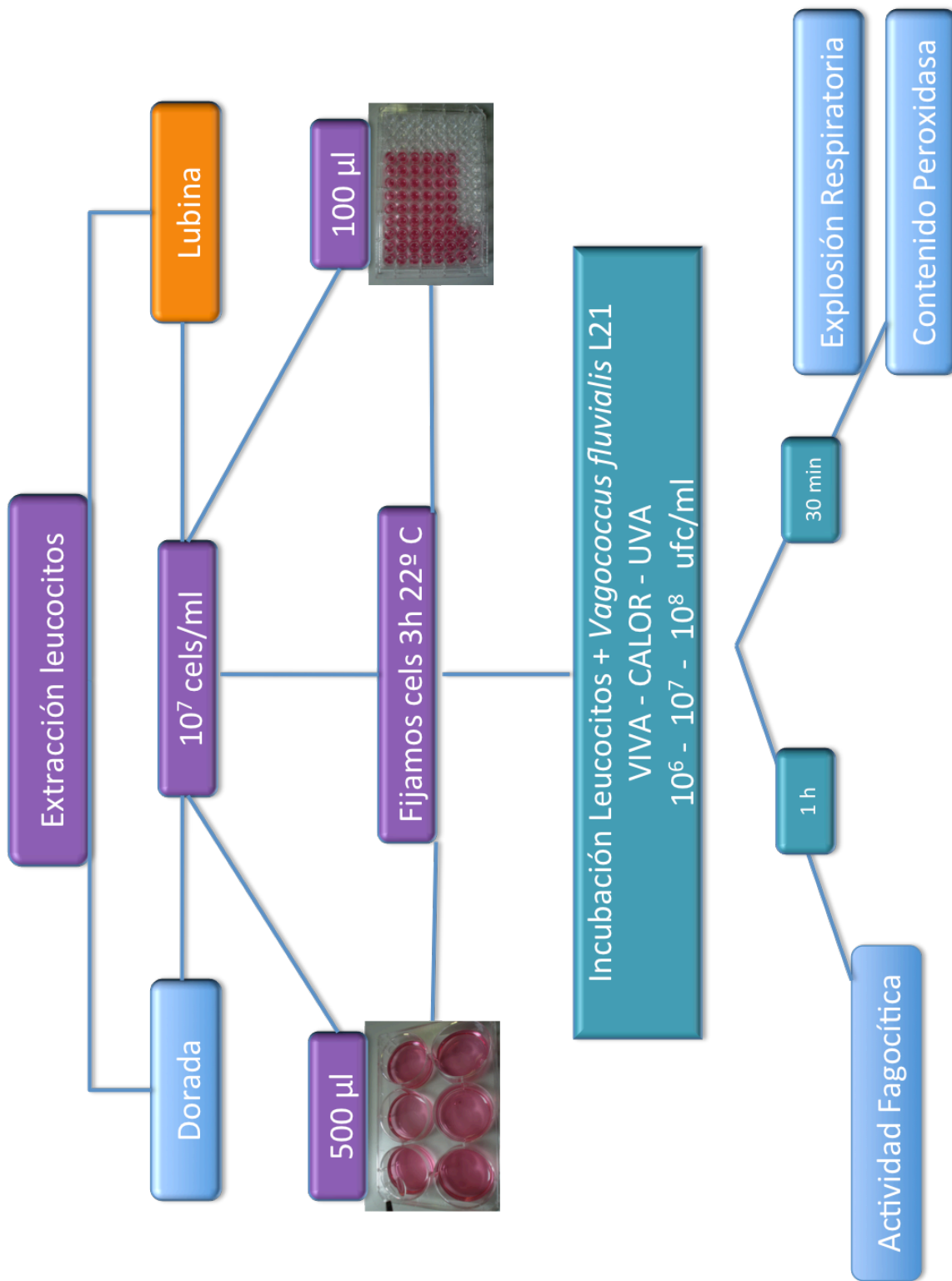
Se utilizaron 10 peces de cada especie para la extracción de los leucocitos de riñón anterior, siguiendo la metodología de Secombes (1990), utilizando un gradiente de Ficoll. Cada una de las extracciones se realizó por triplicado. Una vez realizada la extracción de los leucocitos de riñón anterior observamos la viabilidad de las células con la tinción vital de Tripán Blue y ajustamos a una concentración de  $10^7$  cels/ml con la cámara de Neubauer. Finalmente, los leucocitos se fijaron en placas de 6 pocillos en las que previamente se había depositado una lentilla de 20 micras, añadiendo en ese caso 500  $\mu$ l; o en placas de 96 pocillos, depositando entonces 100  $\mu$ l, dependiendo del ensayo a realizar. Después de tres horas de incubación a 22<sup>o</sup> C se eliminaron las células no adherentes y sustituimos con medio L-15 suplementado con antibiótico y con 2% de suero fetal bovino. Las placas se dejaron en la estufa a 22<sup>o</sup>C hasta su utilización al día siguiente.

Las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas, se ajustaron en PBS a  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  ufc/ml, y 100  $\mu$ l de cada suspensión bacteriana se añadió a los pocillos donde previamente se habían fijado los leucocitos, quedando una concentración final de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  ufc/ml, respectivamente.

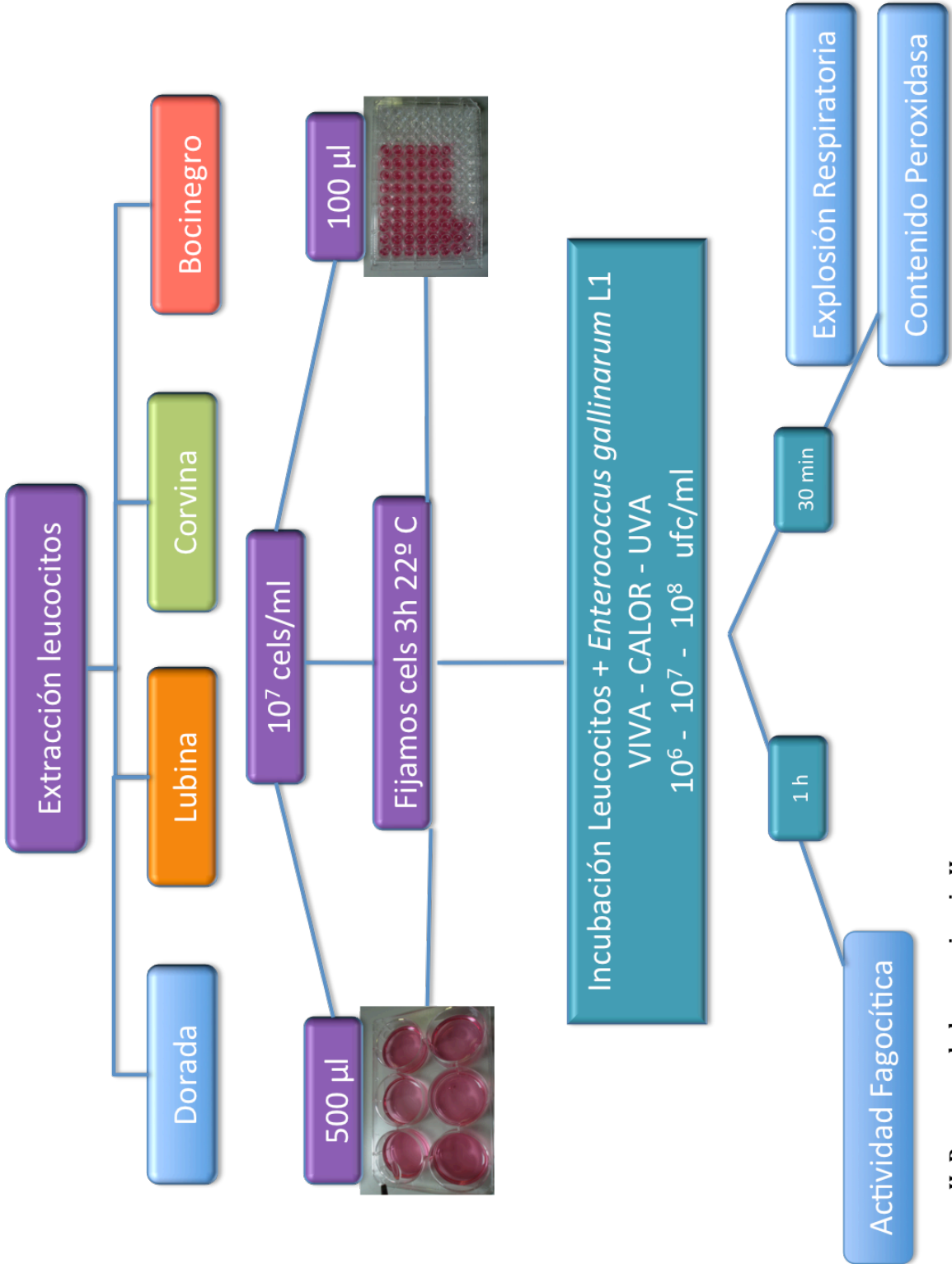
Después de 30 minutos de incubación se midió la explosión respiratoria de los leucocitos de cada una de las especies objeto de estudio, siguiendo la metodología de Secombes (1990) y Boesen y cols. (2001), y el contenido en peroxidasa, siguiendo la metodología de Quade y Roth (1997). Para la actividad fagocítica se utilizó una MOI 1:1 (ratio bacterias/leucocitos), y se midió esta actividad tras una hora de incubación con las cepas *V. fluvialis* L21 y *E. gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas.

Para el estudio estadístico particular de esta experiencia de los datos obtenidos para la explosión respiratoria y el contenido en peroxidasa se realizó un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA), y también se realizó el *test de TUKEY*. Y para los datos obtenidos en el caso de la actividad fagocítica, se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Todos los protocolos utilizados en el desarrollo de esta experiencia están detallados en el apartado IV "Material y métodos".



**Esquema I: Resumen de la experiencia I**



Esquema II: Resumen de la experiencia II

### **V.1.3-Resultados**

A continuación se detallarán por separado los resultados obtenidos para cada una de las cepas utilizadas en este experimento.

#### **V.1.3.1-Resultados obtenidos con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21.**

##### **V.1.3.1.1.-Contenido en peroxidasa**

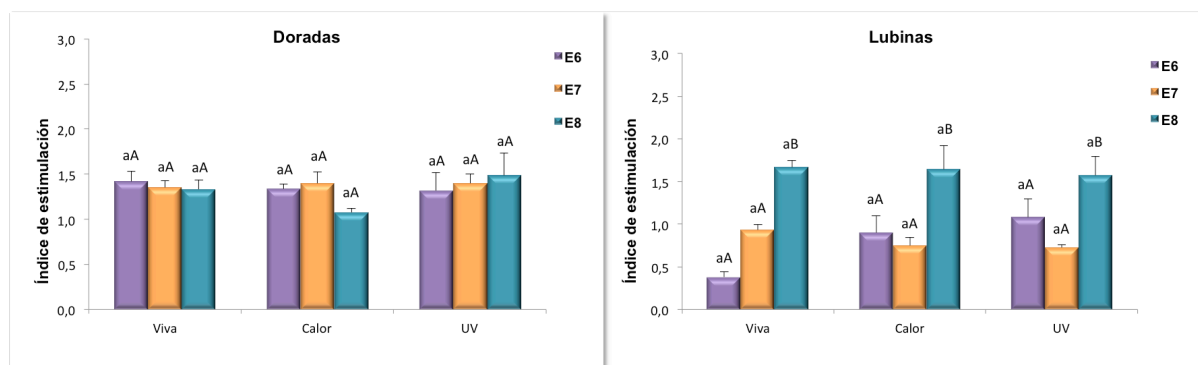
La Tabla V y Figura VII muestran los resultados obtenidos para el contenido en peroxidasa de los leucocitos de riñón anterior de dorada y lubina, tras ser incubados con la cepa probiótica *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada. Puede observarse que, tanto la cepa viva como inactivada, es capaz de estimular *in vitro* a los leucocitos de dorada y de lubina.

Esta estimulación es dosis dependiente sólo en los leucocitos de lubina. En esta última especie se obtuvo el valor máximo de contenido en peroxidasa, alcanzando valores superiores a 1 con la dosis de  $10^8$  ufc/ml en todos los tratamientos de *V. fluvialis* L21. Por el contrario, en la dorada, aunque no se obtuvieron los valores más elevados de contenido en peroxidasa, éstos fueron superiores a 1 en todos los tratamientos y en todas las dosis. El análisis estadístico reveló que las diferencias son significativas ( $p < 0,05$ ) sólo en el caso de los leucocitos de lubina incubados con  $10^8$  ufc/ml con respecto a las otras concentraciones utilizadas.

**Tabla V:** Valores del contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa *V. fluvialis* L21. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por el control.

DOSIS (1)	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	1,41 ± 0,11	1,33 ± 0,05	1,31 ± 0,19	0,38 ± 0,06	0,38 ± 0,06	1,07 ± 0,21
E <sup>7</sup>	1,35 ± 0,07	1,38 ± 0,12	1,39 ± 0,10	0,93 ± 0,06	0,93 ± 0,06	0,72 ± 0,03
E <sup>8</sup>	1,33 ± 0,09	1,07 ± 0,04	1,48 ± 0,25	1,66 ± 0,07	1,66 ± 0,07	1,56 ± 0,22

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de dorada y lubina con la cepa *V. fluvialis* L21 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura VII:** Contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada y lubina después de la incubación con la cepa de *V. fluvialis* L 21, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). (A=concentración; a: tratamientos).

### V.1.3.1.2.- Actividad fagocítica

La Tabla VI y Figura VIII muestran los resultados de la actividad fagocítica (AF) de los leucocitos de dorada (A) y lubina (B), incubados con  $10^7$  ufc/ml de la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada por calor y luz ultravioleta. Los valores más elevados para la actividad fagocítica se obtuvieron con los leucocitos de lubina incubados con la

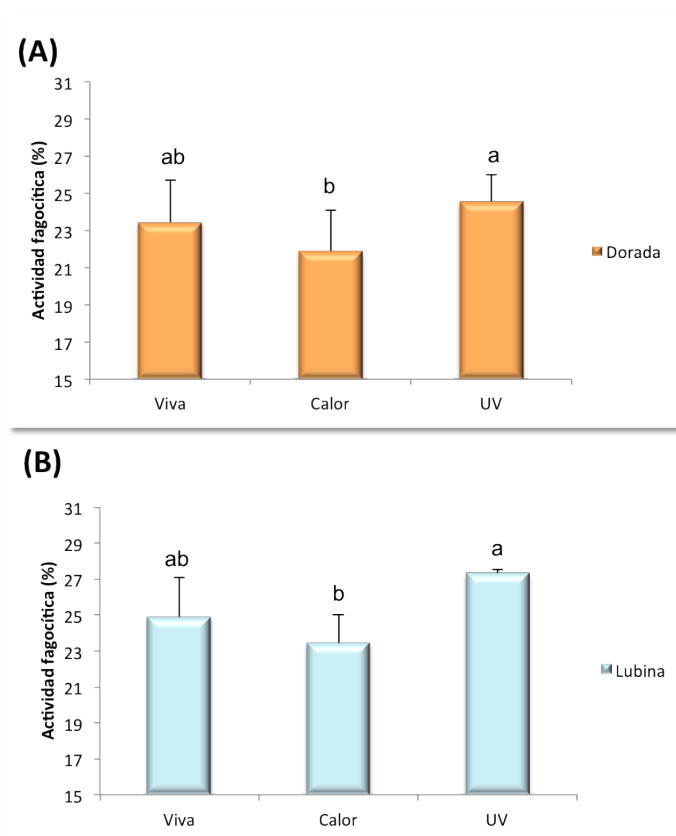


cepa L21 inactivada mediante la luz ultravioleta (27,33 %  $\pm$  1,45). El análisis estadístico reveló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos de calor y UV, tanto en leucocitos de dorada como en los de lubina. En ambas especies se observó la formación de vacuolas intracelulares con la cepa probiótica en su interior (Figura VIII).

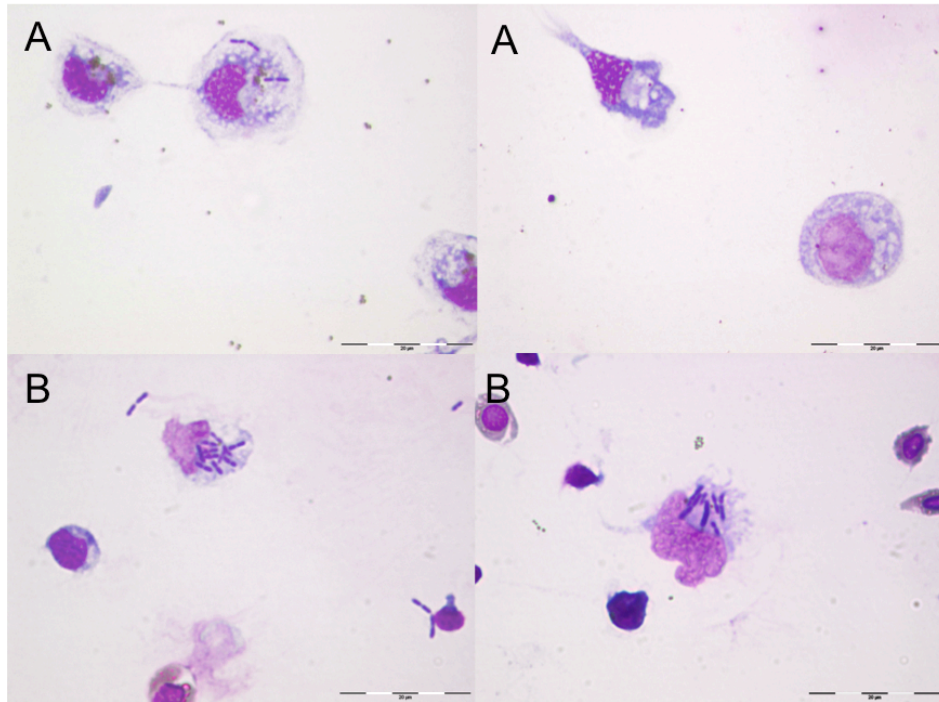
**Tabla VI:** Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa *V. fluvialis* L21 tanto viva como inactivada.

DOSIS <sup>(1)</sup>	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X}$ (%) $\pm$ s	Calor $\bar{X}$ (%) $\pm$ s	UV $\bar{X}$ (%) $\pm$ s	Viva $\bar{X}$ (%) $\pm$ s	Calor $\bar{X}$ (%) $\pm$ s	UV $\bar{X}$ (%) $\pm$ s
E7	23,44 $\pm$ 2,26	21,88 $\pm$ 2,21	24,55 $\pm$ 1,45	24,88 $\pm$ 2,21	23,44 $\pm$ 1,57	27,33 $\pm$ 0,21

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de dorada y lubina con la cepa *V. fluvialis* L21 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura VIII:** Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada y lubina que fueron incubados con la cepa de *V. fluvialis* L21 tanto viva como inactivada por calor y luz UV. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura IX:** Leucocitos de dorada (A), lubina (B) incubados con la cepa de *V. fluvialis* L21. Tinción de panóptico rápido (10 X).

### V.3.3.1.3.- Explosión respiratoria

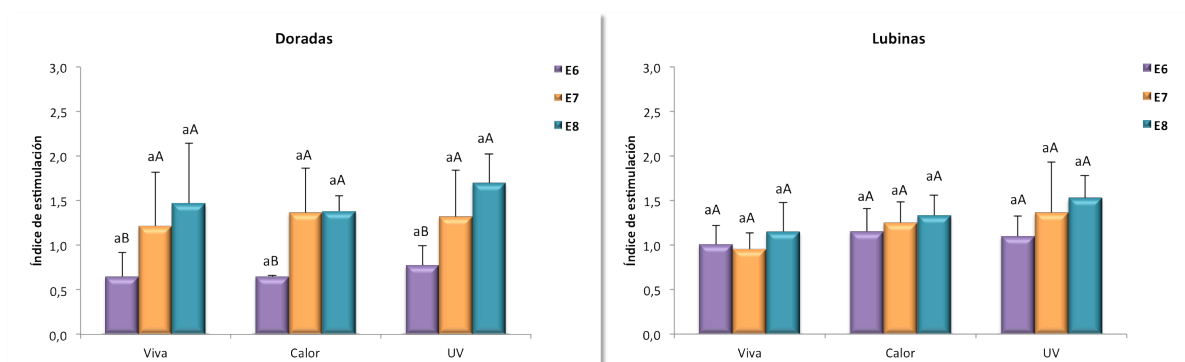
En la Tabla VII y Figura X podemos observar los resultados obtenidos para la explosión respiratoria en los leucocitos de dorada y de lubinas, tras ser incubados con la cepa L21 de *V. fluvialis*, tanto viva como inactivada. Después de la incubación con  $10^6$  ufc/ml de la cepa probiótica no hubo estimulación de la explosión respiratoria en los leucocitos de dorada, existiendo una ligera estimulación en los leucocitos de lubina a esa misma dosis. Sin embargo, cuando incubamos con  $10^7$  y  $10^8$  ufc/ml de la cepa L21 de *V. fluvialis* los índices de estimulación exceden de 1, tanto con los leucocitos de dorada como los de lubina, observando sólo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dosis utilizadas con los leucocitos de dorada. Los índices máximos de explosión respiratoria fueron observados con los leucocitos de dorada, tras la estimulación con  $10^8$  ufc/ml de la

cepa *V. fluvialis* L21 inactivada con luz UV. La cepa probiótica utilizada en este caso, produjo una respuesta dosis dependiente mas marcada sólo en los leucocitos de dorada.

**Tabla VII:** Valores de explosión respiratoria de los leucocitos de dorada y lubina tras ser incubados con la cepa *V. fluvialis* L21. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control .

DOSIS (1)	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	0,64 ± 0,27	0,64 ± 0,01	0,77 ± 0,21	1,00 ± 0,21	1,15 ± 0,25	1,09 ± 0,22
E <sup>7</sup>	1,21 ± 0,60	1,36 ± 0,50	1,31 ± 0,52	0,95 ± 0,18	1,24 ± 0,23	1,36 ± 0,56
E <sup>8</sup>	1,46 ± 0,21	1,38 ± 0,53	1,69 ± 0,52	1,14 ± 0,32	1,33 ± 0,23	1,52 ± 0,25

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de dorada y lubina con la cepa *V. fluvialis* L21 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura X:** Explosión respiratoria de los leucocitos de dorada y lubina, después de la incubación con la cepa de *V. fluvialis* L 21, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (A=concentración; a: tratamientos).

### **V.1.3.2.-Resultados obtenidos con la cepa *E. gallinarum* L1**

#### **V.1.3.2.1.-Contenido en peroxidasa**

En la Tabla VIII y Figura XI podemos observar que los resultados obtenidos para el contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina, incubados tanto con la cepa probiótica viva como inactivada, son diferentes para las cuatro especies estudiadas.

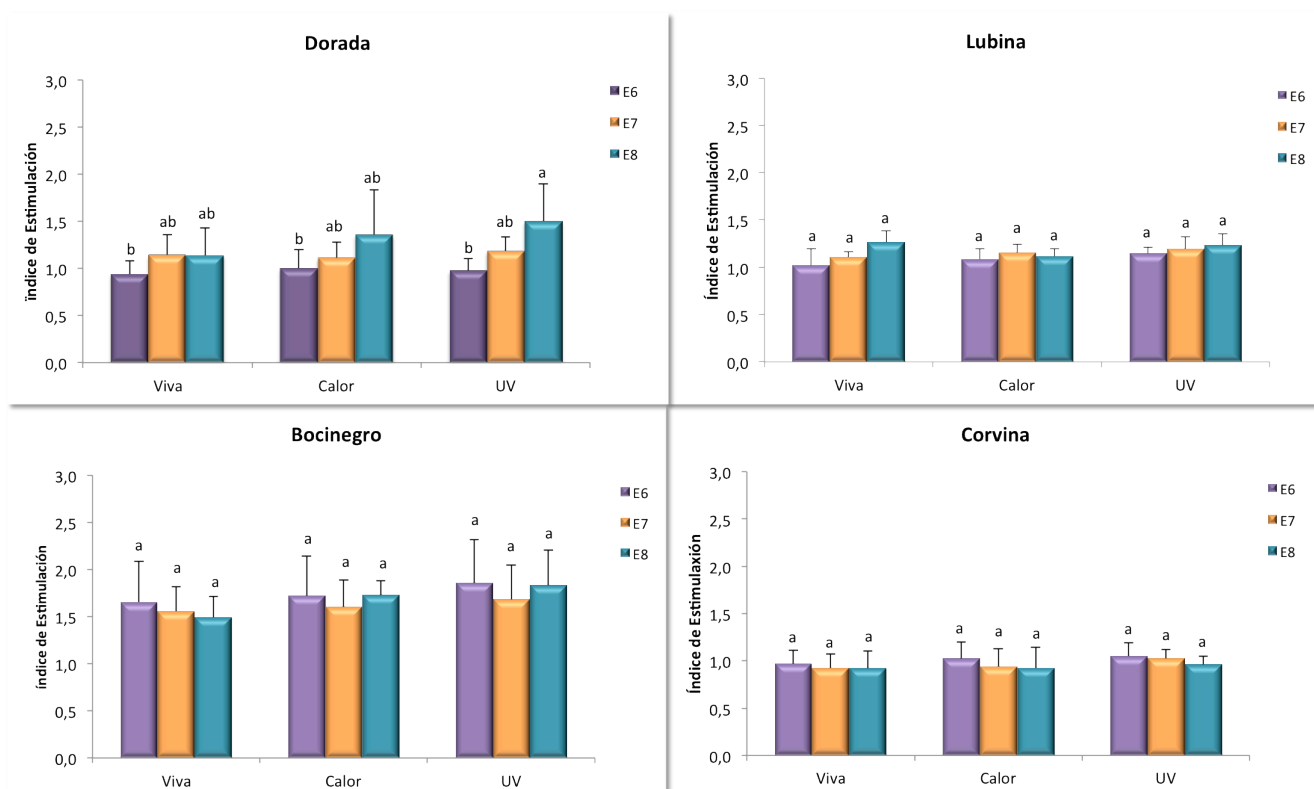
La cepa *E. gallinarum* L1 tanto viva como inactivada, es capaz de estimular *in vitro* a los leucocitos de todas las especies objeto de estudio, excepto a los leucocitos de corvina. La estimulación del contenido en peroxidasa es dosis dependiente, solamente en los leucocitos de dorada y de lubina. Los valores mayores de peroxidasa se observaron en los leucocitos de bocinegro, donde los índices de estimulación son superiores a 1 en todos los tratamientos de la cepa probiótica y con todas las dosis utilizadas.

En la corvina sólo hubo estimulación del contenido en peroxidasa en los leucocitos que fueron incubados con  $10^6$  ufc/ml de la cepa inactivada por calor, así como  $10^6$  y  $10^7$  ufc/ml para la cepa inactivada con luz ultravioleta, donde el índice de estimulación excede ligeramente de 1. El análisis estadístico indica que únicamente el contenido en peroxidasa de los leucocitos incubados con  $10^8$  ufc/ml de la cepa de *E. gallinarum* inactivada por luz ultravioleta mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), respecto a los demás tratamientos y dosis utilizadas en las cuatro especies estudiadas.

**Tabla VIII:** Valores del contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina tras ser incubados con la cepa *E. gallinarum* L1. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control.

DOSIS <sup>(1)</sup>	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	0,93 ± 0,14	1,00 ± 0,19	0,97 ± 0,12	1,01 ± 0,18	1,08 ± 0,10	1,14 ± 0,06
E <sup>7</sup>	1,14 ± 0,21	1,11 ± 0,17	1,18 ± 0,14	1,10 ± 0,05	1,15 ± 0,08	1,19 ± 0,12
E <sup>8</sup>	1,13 ± 0,29	1,35 ± 0,47	1,50 ± 0,39	1,26 ± 0,08	1,11 ± 0,12	1,23 ± 0,08
DOSIS <sup>(1)</sup>	BOCINEGRO			CORVINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	1,65 ± 0,42	1,72 ± 0,42	1,85 ± 0,46	0,96 ± 0,14	1,02 ± 0,17	1,05 ± 0,13
E <sup>7</sup>	1,55 ± 0,26	1,60 ± 0,28	1,68 ± 0,36	0,95 ± 0,14	0,94 ± 0,19	1,02 ± 0,09
E <sup>8</sup>	1,48 ± 0,22	1,72 ± 0,15	1,83 ± 0,37	0,92 ± 0,18	0,92 ± 0,22	0,96 ± 0,09

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina con la cepa *E. gallinarum* L1 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura XI:** Contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina después de la incubación con la cepa de *E. gallinarum* L1, tanto viva como inactivada. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

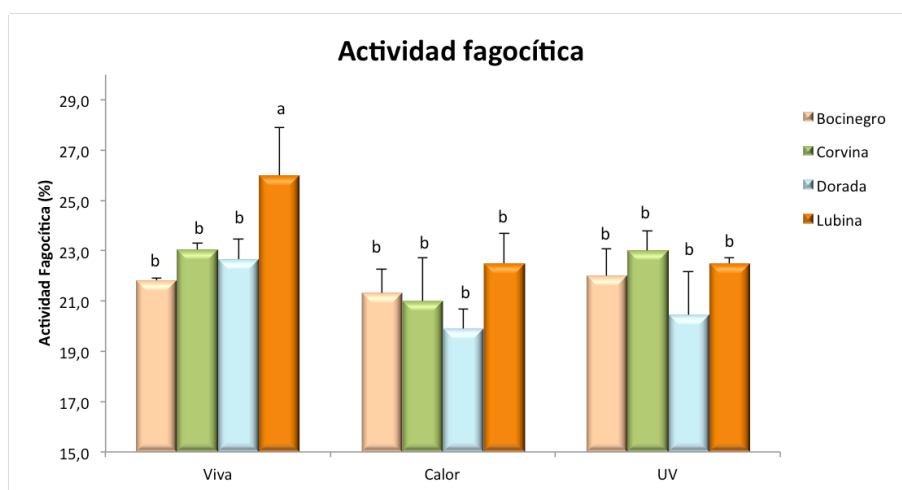
#### **V.1.3.2.2.-Actividad fagocítica**

La Tabla XIX y Figura XII muestra los resultados obtenidos en la actividad fagocítica (AF) de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina, incubados con  $10^7$  ufc/ml de la cepa de *E. gallinarum* L1, tanto viva como inactivada por calor y por luz ultravioleta. El valor más elevado de actividad fagocítica lo presentaron los leucocitos de lubina incubados con la cepa viva de *E. gallinarum* L1 ( $26 \% \pm 1,88$ ) observándose, en este caso, diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con las demás especies y tratamientos realizados. En todas las especies se visualizan vacuolas en los leucocitos con o sin bacteria digerida en el interior (Figura XII).

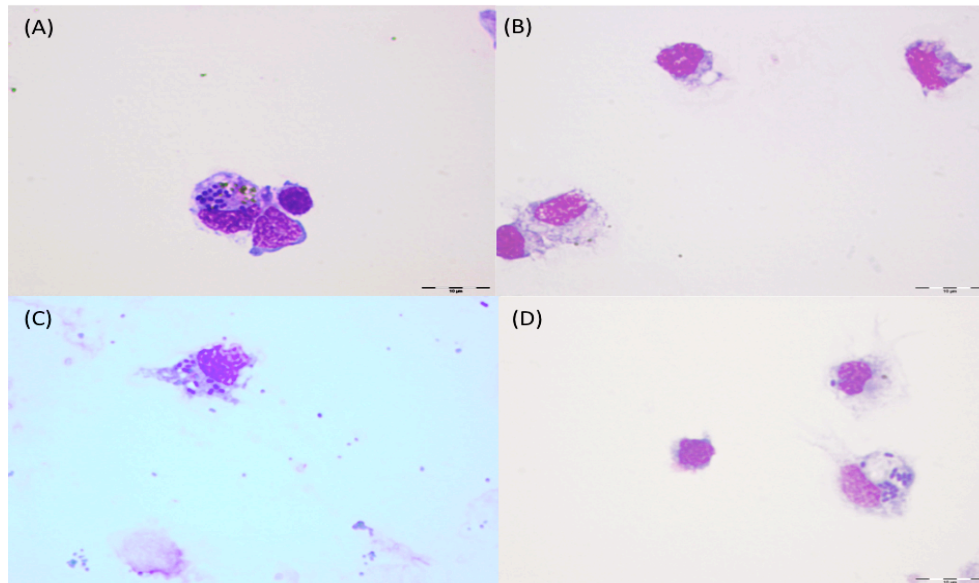
**Tabla XIX: Actividad fagocítica de los leucocitos de bocinegro, corvina, dorada y lubina tras ser incubados con la cepa *E. gallinarum* L1 tanto viva como inactivada.**

DOSIS <sup>(1)</sup>	BOCINEGRO			CORVINA		
	Viva $\bar{X} (\%) \pm s$	Calor $\bar{X} (\%) \pm s$	UV $\bar{X} (\%) \pm s$	Viva $\bar{X} (\%) \pm s$	Calor $\bar{X} (\%) \pm s$	UV $\bar{X} (\%) \pm s$
E7	21,83 ± 0,07	21,33 ± 0,94	22,00 ± 1,09	23,05 ± 0,24	21,00 ± 1,73	23,00 ± 0,78
DOSIS <sup>(1)</sup>	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X} (\%) \pm s$	Calor $\bar{X} (\%) \pm s$	UV $\bar{X} (\%) \pm s$	Viva $\bar{X} (\%) \pm s$	Calor $\bar{X} (\%) \pm s$	UV $\bar{X} (\%) \pm s$
E7	22,67 ± 1,88	19,89 ± 1,78	20,44 ± 0,23	26,00 ± 0,78	22,50 ± 0,78	22,50 ± 1,72

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de bocinegro, corvina, dorada y lubina con la cepa *E. gallinarum* L1 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura XII: Actividad fagocítica de los leucocitos de dorada, corvina, bocinegro y lubina que fueron incubados con la cepa de *E. gallinarum* L1 tanto viva como inactivada por calor y luz UV. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).**



**Figura XIII:** Leucocitos de dorada (A), lubina (B), corvina (C) y bonicentro (D), incubados con la cepa de *E. gallinarum* L1. Tinción de panóptico rápido (10 X)

#### V.1.3.2.3.-Explosión respiratoria

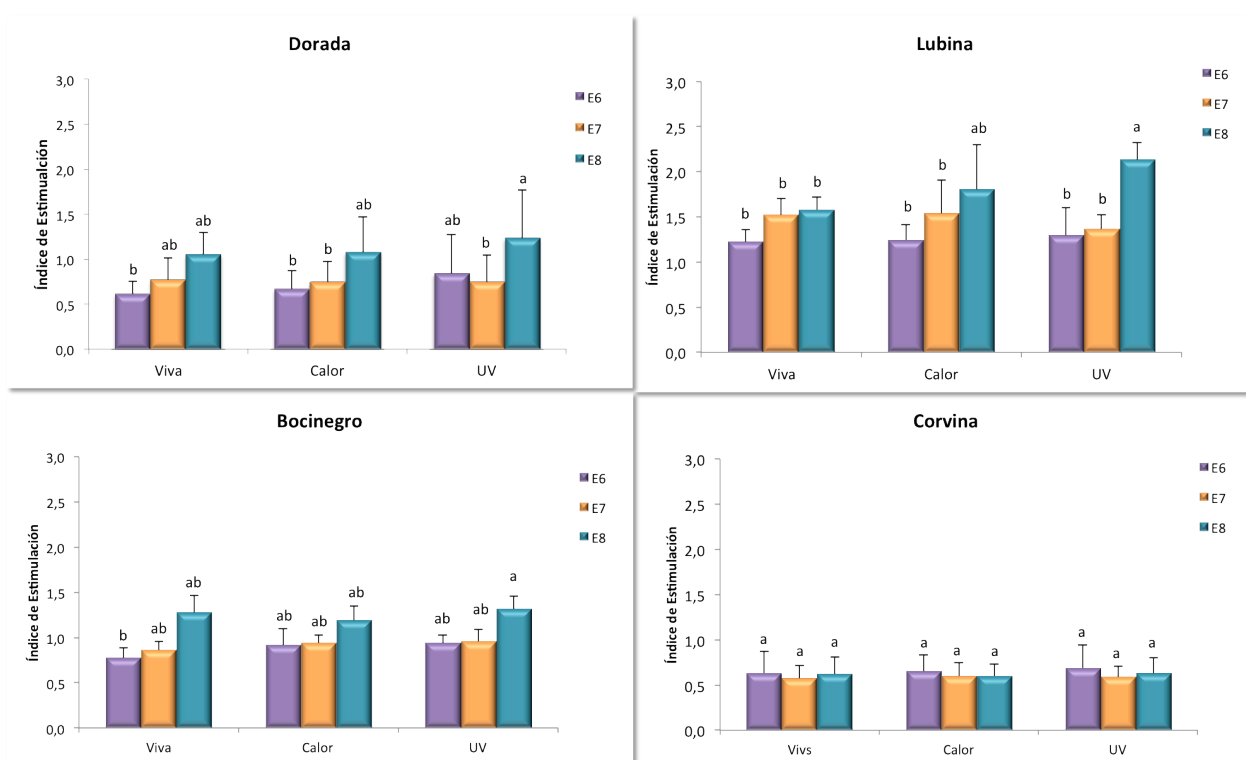
La Tabla X y Figura XIV muestra los resultados de la explosión respiratoria de los leucocitos de dorada, lubina, corvina y bocinegro, después de la incubación con la cepa de *E. gallinarum* L1, tanto viva como inactivada, y utilizando las tres concentraciones citadas en el diseño experimental. Después de la incubación con  $10^6$  y  $10^7$  ufc/ml de la cepa *E. gallinarum* no observamos estimulación de la explosión respiratoria con los leucocitos de dorada ni de bocinegro. Sin embargo, tras la incubación con  $10^8$  ufc/ml, los índices de estimulación de la explosión respiratoria exceden de 1 en estas dos especies. Los valores máximos de explosión respiratoria se obtuvieron en los leucocitos de lubina, después de la incubación con  $10^8$  ufc/ml de la cepa de *E. gallinarum* L1, inactivada por luz ultravioleta. *E. gallinarum* L1 produce una respuesta dosis dependiente en la explosión respiratoria de los leucocitos de bocinegro, dorada y lubina, excepto en los leucocitos de corvina, donde el índice de estimulación fue inferior a 1 en todos los casos.



**Tabla X: Valores de explosión respiratoria de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina tras ser incubados con la cepa *E. gallinarum* L1. Valores expresados en índice de estimulación obtenidos al dividir cada valor por su control.**

DOSIS (1)	DORADA			LUBINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	0,61 ± 0,14	0,68 ± 0,24	0,83 ± 0,24	1,23 ± 0,13	1,24 ± 0,17	1,29 ± 0,30
E <sup>7</sup>	0,77 ± 0,20	0,74 ± 0,23	0,74 ± 0,24	1,52 ± 0,18	1,53 ± 0,36	1,36 ± 0,15
E <sup>8</sup>	1,05 ± 0,43	1,07 ± 0,30	1,23 ± 0,53	1,58 ± 0,32	1,80 ± 0,23	2,15 ± 0,25
DOSIS (1)	BOCINEGRO			CORVINA		
	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$	Viva $\bar{X} \pm s$	Calor $\bar{X} \pm s$	UV $\bar{X} \pm s$
E <sup>6</sup>	0,77 ± 0,11	0,91 ± 0,18	0,94 ± 0,09	0,61 ± 0,24	0,65 ± 0,18	0,68 ± 0,25
E <sup>7</sup>	0,86 ± 0,09	0,93 ± 0,09	0,95 ± 0,13	0,57 ± 0,14	0,60 ± 0,14	0,58 ± 0,12
E <sup>8</sup>	1,27 ± 0,18	1,18 ± 0,15	1,31 ± 0,13	0,62 ± 0,18	0,59 ± 0,12	0,62 ± 0,17

(1) Dosis utilizada para estimular los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina con la cepa *E. gallinarum* L1 viva e inactivada por calor y luz ultravioleta



**Figura XIV: Explosión respiratoria de los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina después de la incubación con la cepa de *E. gallinarum* L1, tanto viva como inactivada. Los resultados están expresados en índice de estimulación dividiendo el resultado de cada muestra por su respectivo control. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).**

#### V.1.4.-Discusión

Actualmente, los probióticos se han convertido en una parte integral en las prácticas de cultivo para mejorar el crecimiento y la resistencia a enfermedades. La estimulación del sistema inmune por parte de los probióticos es un mecanismo crucial para el control de enfermedades infecciosas en los sistema de producción (Salinas y cols., 2006). El mecanismo exacto, por el cual los probióticos ejercen la acción sobre el sistema inmune no se conoce (Corr y cols., 2009) y, por tanto, actualmente se llevan a cabo numerosos estudios para comprender mejor este proceso. A la hora de caracterizar un probiótico es importante tener en cuenta no sólo las características microbiológicas y la capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, la supervivencia, etc, sino también tener en cuenta la realización de estudios *in vitro* donde poder estudiar si los probióticos que se estudian estimulan la respuesta inmune y cómo lo hacen, en su caso. Por ello, los estudios *in vitro* nos permiten orientar sobre el efecto inmunomodulador de las cepas probióticas. Nos pueden servir para valorar qué dosis de probiótico es la mejor para, en el futuro, administrar a los peces (dosis con el alimento), o estudiar cómo afecta la viabilidad de las cepas (vivas o inactivadas) al sistema inmune de los peces.

Este experimento se ha realizado con las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, que fueron identificadas y caracterizadas en nuestro laboratorio como posibles cepas probióticas (Sorroza y cols., 2012; Sorroza y cols., 2013). Ambas cepas demostraron características favorables, tanto *in vitro* como *in vivo*, que indicaba su posible uso como probióticos. Para ello se estudió *in vitro* el antagonismo frente a patógenos, la producción de sustancias antibacterianas, resistencia a la bilis y pH ácidos, adhesión y crecimiento en el mucus intestinal; *in vivo* se estudió su

inocuidad, y el efecto protector frente a *V. anguillarum* en la lubina. En todas estas pruebas se obtuvieron resultados satisfactorios para las dos cepas. A modo de conocer más sobre el mecanismo de acción por el cual la cepa *V. fluvialis* L21 y *E. gallinarum* L1 ejercen su acción sobre los hospedadores, quisimos estudiar su efecto sobre los leucocitos de diferentes especies de interés para la acuicultura. Por cuestiones de disponibilidad de peces a la hora de realizar los diferentes experimentos, la cepa *V. fluvialis* L21 fue probada en leucocitos de dorada y en lubina. En cambio, la cepa *E. gallinarum* L1 pudo probarse en leucocitos de dorada, lubina, corvina y bocinegro. Teniendo en cuenta que la correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo* han sido descritos en estudios previos (Villamil y cols., 2002; Salinas y cols., 2006), en este trabajo se estudió por primera vez *in vitro* el efecto inmunomodulador de estas dos cepas sobre los leucocitos de diferentes especies de peces de interés para la acuicultura. De este modo pudimos comparar cómo respondieron a la misma cepa probiótica leucocitos de diferentes especies de peces, y si la viabilidad de esta cepa influye en la repuesta inmune de los peces.

Con respecto a la cepa *V. fluvialis* L21, en general, pudimos observar que se produce una respuesta tanto en los leucocitos de dorada y de lubina, y que esta respuesta fue dosis dependiente en la mayoría de los casos. Nuestros resultados son comparables con los que obtuvieron Salinas y cols. (2006) en los leucocitos de dorada. Estos autores estudiaron la explosión respiratoria, el contenido en peroxidasa y la actividad citotóxica de los leucocitos de dorada que fueron estimulados con 4 cepas probióticas inactivadas por calor, observando también un efecto dosis-dependiente.

En nuestro trabajo observamos también un efecto dosis dependiente más marcado con los leucocitos de dorada, coincidiendo con los resultados obtenidos por Salinas y cols. (2006), siendo este efecto menos marcado con los leucocitos de lubina. La dosis de  $10^8$  ufc/ml de la cepa *V. fluvialis* L21 inactivada por luz ultravioleta produce la mayor respuesta, tanto con los leucocitos de dorada como los de lubina. Mientras que en la lubina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni entre las dosis, en la dorada sí las encontramos con la dosis de  $10^6$  ufc/ml.

Una respuesta muy parecida en la explosión respiratoria se obtuvo con los leucocitos de dorada, lubina y bocinegro, tras la incubación con la cepa *E. gallinarum* L1. Esta respuesta fue dosis dependiente tal y como describen Salinas y cols. (2006) y Román y cols. (2012), a excepción de los leucocitos de corvina, donde no hubo estimulación de la explosión respiratoria. Al igual que ocurría con la cepa *V. fluvialis* L21, la dosis de  $10^8$  ufc/ml de la cepa *E. gallinarum* L1 inactivada por luz ultravioleta produjo la respuesta más elevada con los leucocitos de dorada, lubina y bocinegro.

Con respecto al contenido en peroxidasa, los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21 mostraron los niveles más altos de estimulación sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, pero sí entre las distintas dosis utilizadas. A diferencia que en la lubina, y coincidiendo con los resultados obtenidos por Salinas y cols. (2006), el contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada no mostró una respuesta dosis dependiente tan marcada como en la lubina.

En cuanto a la incubación con *E. gallinarum* L1, los leucocitos de bocinegro presentaron los niveles más elevados en el contenido de peroxidasa, y sin diferencias

estadísticamente significativas al comparar las dosis ni los tratamientos. En esta experiencia, la explosión respiratoria y el contenido en peroxidasa de los leucocitos de dorada y bocinegro fueron muy similares. Ambas especies pertenecen a la Familia *Sparidae*, y esto refuerza nuestra hipótesis de que especies cercanas filogenéticamente pueden responder de manera similar a la misma cepa probiótica.

La actividad fagocítica es uno de los primeros mecanismos que se ponen en marcha en la respuesta inmune innata de los peces, y juega un papel muy importante contra la entrada de bacterias patógenas al organismo. Está bien documentado que los probióticos son capaces de estimular la actividad fagocítica, como así demostraron Son y cols. (2010) en el mero (*Epinephelus coioides*), tras ser alimentados durante 60 días con cepas probióticas pertenecientes al Género *Bacillus*. Díaz-Rosales y cols. (2006) observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad fagocítica de los leucocitos de dorada que fueron alimentadas con cepas probióticas inactivadas con calor. Por el contrario, *Lactococcus lactis* no produjo ningún efecto en la actividad fagocítica de los leucocitos de rodaballo (Villamil y cols., 2002). Salinas y cols. (2006) estudiaron la actividad fagocítica de cuatro cepas inactivadas con calor, por microscopía electrónica, observando la internalización de las bacterias dentro de los leucocitos. En nuestro experimento se utilizó el mismo método que Román y cols. (2012).

En cuanto a la actividad fagocítica de los leucocitos de dorada y lubina, que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21, observamos diferencias estadísticamente significativas para cada especie entre los leucocitos que fueron incubados con la cepa inactivada por luz ultravioleta, con respecto a los demás tratamientos, obteniendo los valores más elevados con los leucocitos de lubina. Considerando datos de actividad

fagocítica de otros autores tanto de la dorada (Montero y cols., 2008) como en la lubina (Torrecillas y cols., 2007) podemos considerar que *V. fluvialis* L21 tiene buena capacidad para estimular la actividad fagocítica de los leucocitos de estas dos especies.

Con respecto a la cepa *E. gallinarum* L1, los leucocitos de dorada que fueron incubados con la cepa viva, mostraron los valores más elevados de actividad fagocítica, y sólo estimularon esta actividad en esta especie, ya que las demás especies no mostraron valores significativos, y en especies como en la corvina no hay datos disponibles aún para comparar.

En general podemos considerar que, tanto la cepa *V. fluvialis* L21 como *E. gallinarum* L1, producen respuestas en los leucocitos de dorada, lubina, bocinegro y corvina. Estas respuestas suelen ser similares en el caso de las especies que pertenecen a la misma familia, como ocurre con el caso de los leucocitos de bocinegro y dorada cuando son estimulados con la cepa *E. gallinarum* L1.

Por lo general, las diferencias que existen en los diferentes efectos de una cepa probiótica en diferentes especies de peces podrían deberse a muchos factores, entre los que nosotros destacamos, su cercanía taxonómica, diferencias en el ambiente de los peces y, como consecuencia, diferencias en la microbiota intestinal, así como diferencias en las dietas.

## **V.2.-Efecto de la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 sobre los leucocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en la expresión de citoquinas**

### **V.2.1.-Introducción**

La lubina (*Dicentrarchus labrax*) es una de las especies más cultivadas (FAO, 2008) en las zonas del sur de Europa. Las condiciones de cultivo intensivas favorecen en muchas ocasiones la aparición de enfermedades infecciosas (Mohanty y Sahoo, 2010) y, por tanto, son muchas las estrategias que se proponen para la prevención y control de enfermedades en el sector acuícola. Los probióticos se presentan como una alternativa para el control de enfermedades en este sector (Gatesoupe, 1999; Panigrahi y cols., 2004; Balcázar y cols., 2006; Díaz-Rosales y cols., 2009, García de la Banda y cols., 2010; Sharifuzzaman y Austin, 2010). Entre los mecanismos de acción de los probióticos, la modulación sobre el sistema inmune de los hospedadores es uno de los mecanismos más estudiados por los investigadores (Sharifuzzaman y cols., 2011). Las citoquinas (glicoproteínas) son producidas por las células del sistema inmune, generalmente por la inducción de parásitos, bacterias y virus (Salazar-Mather y Hokeness, 2006). En la literatura se describe que un gran número de probióticos pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y citoquinas anti-inflamatorias tales como interleuquina-10 (IL-10), así como el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) (Von der Weid T, 2001; Christensen y cols., 2002; Niers y cols., 2005). *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis* son capaces de regular la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TGF- $\beta$  los leucocitos de riñón de la trucha arcoiris (Panigrahi y cols., 2007).

Kim y Austin (2006) demostraron el efecto *in vitro* de dos cepas probióticas como son *Carnobacterium maltaromaticum* y *Carnobacterium divergens* sobre la dinámica de expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , y TGF- $\beta$  en los leucocitos de riñón anterior de la trucha arcoiris. Por otro lado, Pichiatti y cols. (2009) no observaron efecto sobre la transcripción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), ni del TGF- $\beta$  e IL-10, en larvas de lubinas que fueron alimentadas con *Lactobacillus delbrueckii* a través de nauplios de artemia. *Vagococcus fluvialis* L21 es un coco gram positivo aislado de intestino de lenguado perteneciente a la familia de las bacterias ácido lácticas que se propuso como probiótico para peces marinos, de acuerdo a sus características, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sorroza y cols., 2012). Román y cols. (2012) estudiaron *in vitro* el efecto inmunomodulador de la cepa *V. fluvialis* L21, tras ser administrada tanto viva como inactivada, sobre los leucocitos de riñón anterior de dorada y de lubina.

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta inmune (IL- 1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , Casp-3, la COX-2, Mx) en los leucocitos de riñón anterior de lubina tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada.

### **V.2.2.-Diseño experimental**

Para el estudio de la dinámica de expresión que la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada, (Esquema III) produce en los leucocitos de riñón anterior de lubina, se utilizaron 36 ejemplares de lubina con un peso medio de 100 g procedentes del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Los peces fueron mantenidos en tanques de 1000 l de capacidad con circuito de agua abierto, aireación constante y fotoperíodo natural de 12 horas. Y fueron alimentados diariamente con una dieta comercial de Skretting



(Burgos, España). Se sacrificaron con una sobredosis de anestésico (2-Fenoxietanol) y, posteriormente, se trasladaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Se utilizaron 12 lubinas para la extracción de los leucocitos de riñón anterior, siguiendo la metodología de Secombes (1990), utilizando un gradiente de Ficoll. Cada una de las extracciones se realizó por triplicado. Una vez realizada la extracción de los leucocitos de riñón anterior observamos la viabilidad de las células con la tinción de Tripán Blue, y ajustamos a una concentración de  $10^7$  cels/ml con la cámara de Neubauer.

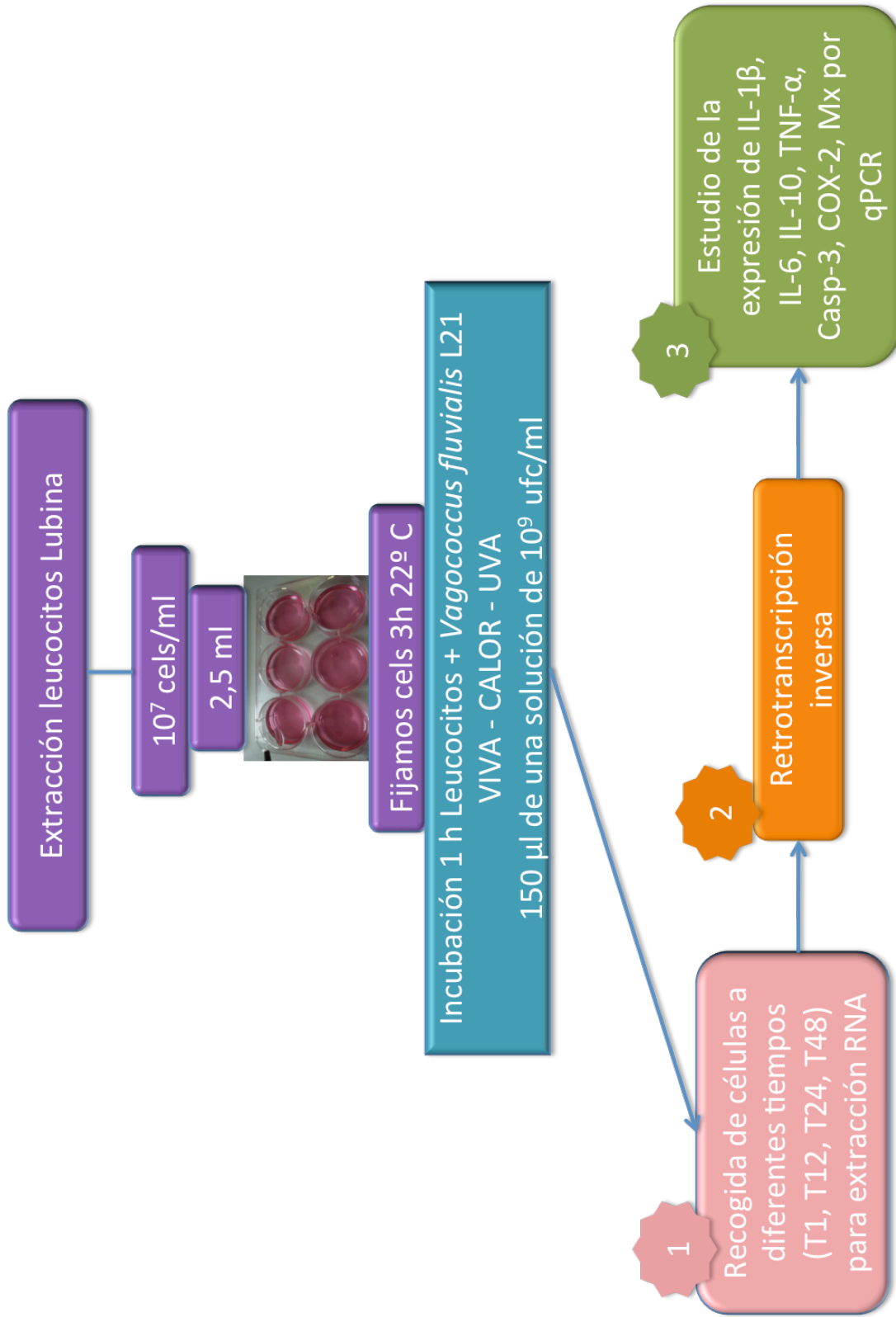
Para el estudio de la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune a lo largo del tiempo, se añadieron 2,5 ml de una solución de  $10^7$  cels/ml y se dejaron fijar en placas de poliestireno de 6 pocillos. Después de tres horas de incubación a  $22^{\circ}$  C se eliminaron las células no adherentes y sustituimos con medio L-15 suplementado con antibiótico y con 2% de suero fetal bovino. Las placas se dejaron en la estufa a  $22^{\circ}$ C hasta su utilización al día siguiente.

En ese momento se realizaron dos lavados con medio L-15 y HBSS para eliminar los restos de antibiótico, quedando un volumen final de 1,5 ml de L-15 suplementado con 2% de suero fetal bovino sin antibiótico. La cepa *Vagococcus fluvialis* L21, tanto viva como inactivada por calor y luz ultravioleta, se ajustó en PBS a  $10^9$  ufc/ml; 150  $\mu$ l de cada suspensión bacteriana se añadió a los pocillos donde previamente se habían fijado los leucocitos. Después de 1 hora de incubación se hicieron dos lavados con PBS, y se cambió el medio por medio L-15 suplementado con suero. Como control negativo se utilizaron los leucocitos que sólo habían estado incubados con medio L-15 y con 150  $\mu$ l de PBS. Las células se recogieron a diferentes tiempos: tras 1 hora de incubación (T1), a

las 12 horas (T12), a las 24 horas (T24) y a las 48 horas (T48) post-inoculación con la cepa *Vagococcus fluvialis* L21, tanto viva como inactivada (Esquema III). Una vez recogidas las células se realizó la extracción del ARN, y la posterior RT-PCR para el estudio de la expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , Casp-3, la COX-2, Mx).

Para el estudio estadístico en este experimento, los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y se realizó también un *Test de Tukey*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Igualmente que en la punto anterior, todos los protocolos utilizados en el desarrollo de esta experiencia están detallados en el apartado IV "Material y métodos".



**Esquema III: Resumen de la experiencia III**

### **V.2.3.-Resultados**

En esta experiencia se estudiaron las cinéticas de expresión de las principales citoquinas involucradas en la respuesta inmune así como la expresión del gen Mx y la Caspasa-3 (Casp-3) en los leucocitos de lubina, tras la incubación durante 1 h con la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada por calor y por luz UV.

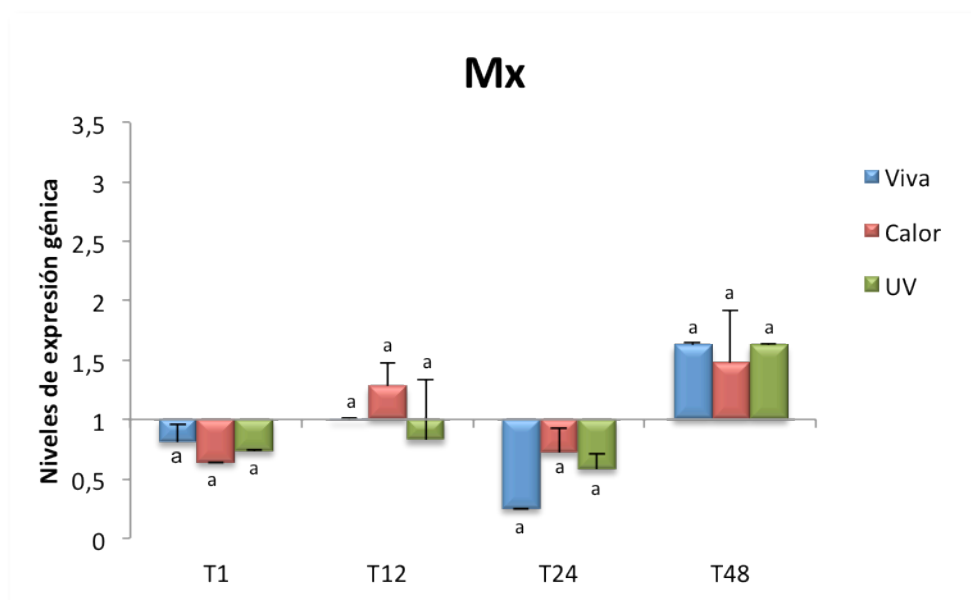
#### **V.2.3.1.-Expresión del gen Mx**

En la Tabla XI y Figura XV se puede observar la cinética de expresión del gen Mx en los leucocitos de lubina tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L21 a lo largo del tiempo. El gen Mx se expresa a las doce horas (T12) en los leucocitos incubados con la cepa viva e inactivada por calor. A diferencia de los demás tiempos, a las 48 horas el gen Mx se expresa en los leucocitos que fueron estimulados, tanto con la cepa viva como inactivada, de *V. fluvialis* L21. Para el resto de los tiempos los leucocitos de lubina no expresan el gen Mx, observándose una sub-expresión con respecto al control, 1 hora después de la incubación con la cepa probiótica (T1), así como para los leucocitos incubados con la cepa de *V. fluvialis* inactivada con luz UV a las 12 horas. Del mismo modo, tampoco observamos valores de expresión a las 24 horas con los leucocitos que fueron incubados con *V. fluvialis* L21. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los tiempos para este gen Mx.

**Tabla XI:** Valores de niveles de expresión del gen Mx a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	0,80 ± 0,15	0,99 ± 0,02	0,24 ± 0,01	1,62 ± 0,02
Calor	0,63 ± 0,01	1,28 ± 0,20	0,71 ± 0,21	1,47 ± 0,44
UV	0,73 ± 0,01	0,82 ± 0,51	0,57 ± 0,13	1,62 ± 0,01

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 y T48



**Figura XV:** Expresión génica de Mx en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

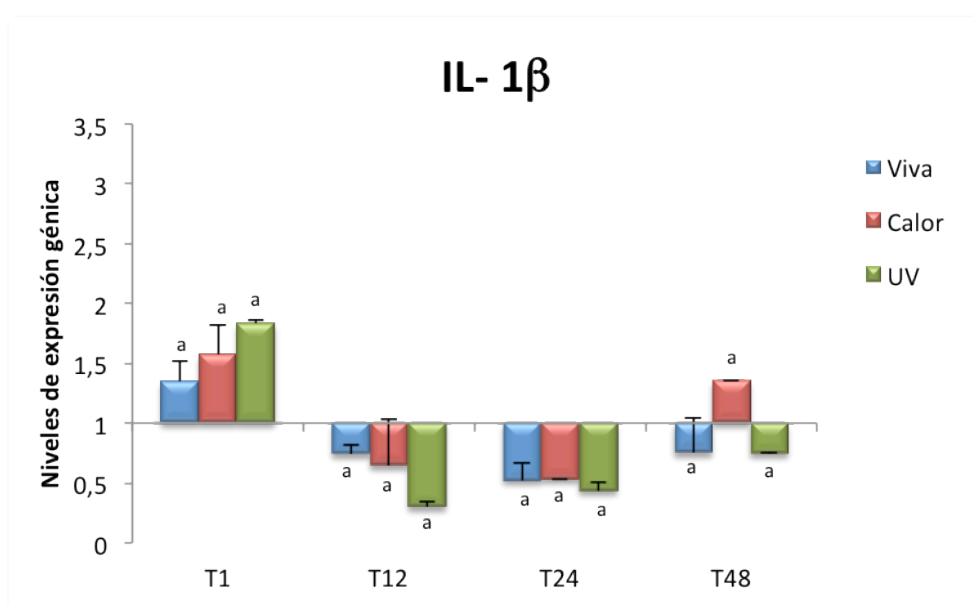
### V.2.3.2.-Expresión del gen IL-1 $\beta$

En la Tabla XII y Figura XVI se puede observar la cinética de expresión del gen IL-1 $\beta$  en los leucocitos de lubina tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L-21 a lo largo del tiempo. La IL-1 $\beta$  tiene su máxima expresión tras 1 h de incubación con la cepa *V. fluvialis* L-21 para los tres tratamientos utilizados, correspondiéndose el valor más alto de expresión al obtenido con los leucocitos incubados con la cepa inactivada por luz ultravioleta. En el resto de los tiempos estudiados, los leucocitos de lubina no expresan el gen IL-1 $\beta$ , existiendo sub-expresión con respecto al control, excepto a las 48 horas post-inoculación para los leucocitos incubados con la cepa inactivada por calor, pero no mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con los demás tratamientos. y no existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para ninguno de los tres tratamientos en este tiempo. Al igual que en el caso anterior no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los puntos de muestreo para el gen IL-1 $\beta$ .

**Tabla XII:** Valores de niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$  a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	1,34 $\pm$ 0,17	0,79 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,15	0,74 $\pm$ 0,03
Calor	1,57 $\pm$ 0,24	0,64 $\pm$ 0,39	0,53 $\pm$ 0,01	1,35 $\pm$ 0,01
UV	1,83 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,01

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 y T48



**Figura XVI:** Expresión génica de IL-1 $\beta$  en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

### V.2.3.3.-Expresión del gen TNF- $\alpha$

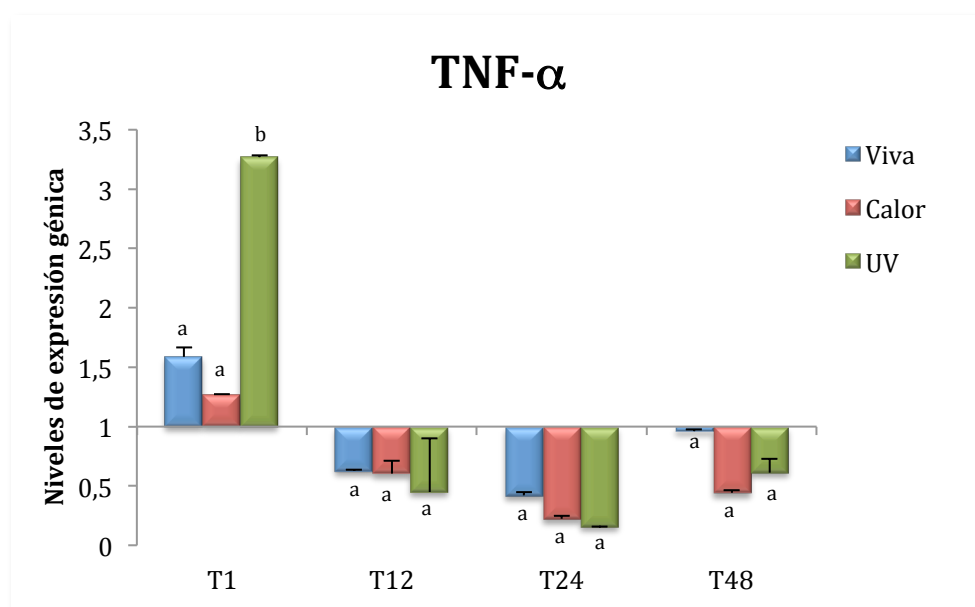
En la Tabla XIII y Figura XVII se puede observar la cinética de expresión del gen TNF- $\alpha$  en los leucocitos de lubina tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L-21 a lo largo de tiempo. Al igual que ocurrió con la expresión del gen IL-1 $\beta$ , la expresión de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  se manifiesta en los leucocitos de lubina 1 hora después de la incubación con la cepa de *V. fluvialis* L21. Existe una estimulación con respecto al control en los tres tratamiento en este punto (T1). En el resto de los tiempos muestreados el gen TNF- $\alpha$  no se expresó en los leucocitos de lubina, observando sub-expresión en todos los tratamientos. Únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la expresión de los leucocitos incubados con la cepa inactiva con luz UV con respecto a los otros dos tratamientos en el T1.



**Tabla XIII:** Valores de niveles de expresión del gen TNF- $\alpha$  a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21. Datos representados en la Figura XVII.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	1,58 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,01
Calor	1,26 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02
UV	3,26 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,45	0,15 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,11

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 y T48



**Figura XVII:** Expresión génica de TNF- $\alpha$  en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

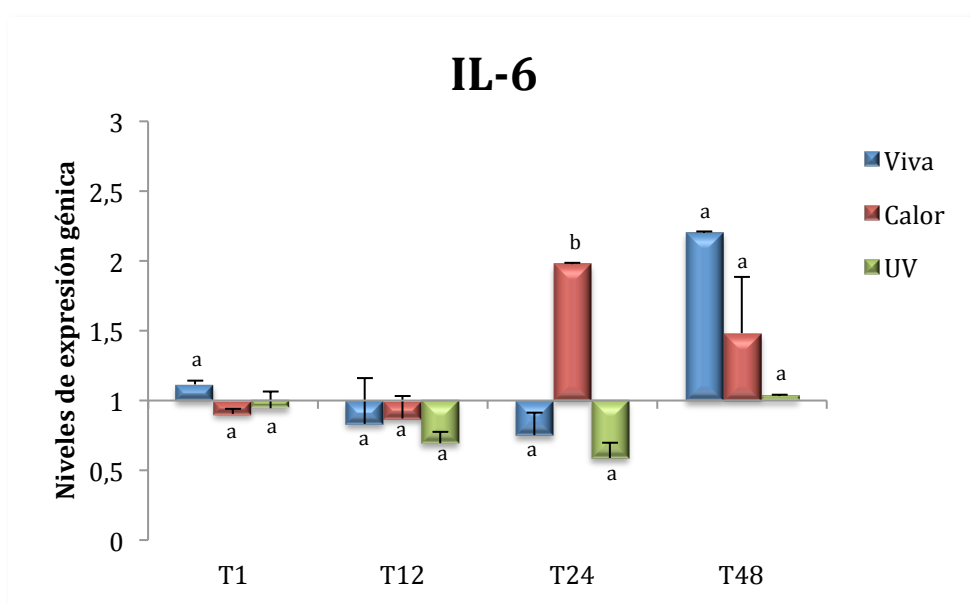
#### **V.2.3.4.-Expresión del gen IL-6**

En la Tabla XIV y Figura XVIII se puede observar la cinética de expresión del gen IL-6 en los leucocitos de lubina tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L-21 a lo largo de tiempo. A diferencia de lo que ocurre en la expresión del gen TNF- $\alpha$ , la citoquina pro-inflamatoria se expresa en los leucocitos de lubina a las 24 horas tras la incubación con la cepa probiótica inactivada con calor. A las 48 horas observamos que para los tres tratamientos hay estimulación del gen IL-6 con respecto al control, observando que el mayor valor de estimulación lo encontramos en los leucocitos que fueron incubados con la cepa viva de *V. fluvialis* L-21. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los leucocitos que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21 inactivada por calor con respecto a los otros dos tratamiento en el T24.

**Tabla XIV:** Valores de niveles de expresión del gen IL-6 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	1,15 ± 0,02	0,83 ± 0,33	0,75 ± 0,16	2,20 ± 0,01
Calor	0,90 ± 0,04	0,87 ± 0,16	1,91 ± 0,01	1,48 ± 0,40
UV	0,94 ± 0,12	0,69 ± 0,08	0,58 ± 0,11	1,03 ± 0,01

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 y T48



**Figura XVIII:** Expresión génica de IL-6 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

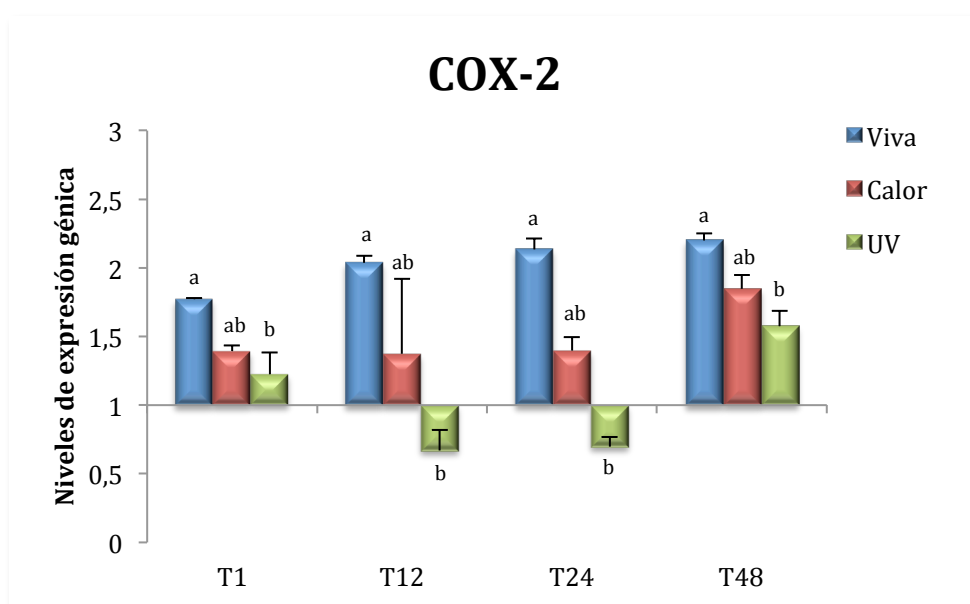
### **V.2.3.5.- Expresión del gen COX-2**

La Tabla XV y Figura XIX muestran los niveles de expresión génica para la COX-2 tras la estimulación con la cepa probiótica *V. fluvialis* L21 viva como inactivada. A diferencia de los genes anteriormente estudiados, el gen COX-2 se expresa en todos los tiempos y con todos los tratamientos excepto para los leucocitos incubados con cepa la inactivada con luz UV, a las 12 y a las 24 horas tras la incubación. En todos los tiempos la máxima expresión aparece en los leucocitos que fueron incubados con la cepa viva de *V. fluvialis* L21, y existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a los otros tratamientos en cada uno de los tiempos estudiados.

**Tabla XV:** Valores de niveles de expresión del gen COX-2 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	1,77 ± 0,01	2,03 ± 0,05	2,13 ± 0,08	2,19 ± 0,05
Calor	1,34 ± 0,04	1,37 ± 0,55	1,39 ± 0,10	1,84 ± 0,10
UV	1,22 ± 0,16	1,22 ± 0,15	0,69 ± 0,07	1,57 ± 0,11

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 y T48



**Figura XIX:** Expresión génica de COX-2 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

### **V.2.3.6.-Expresión del gen IL-10**

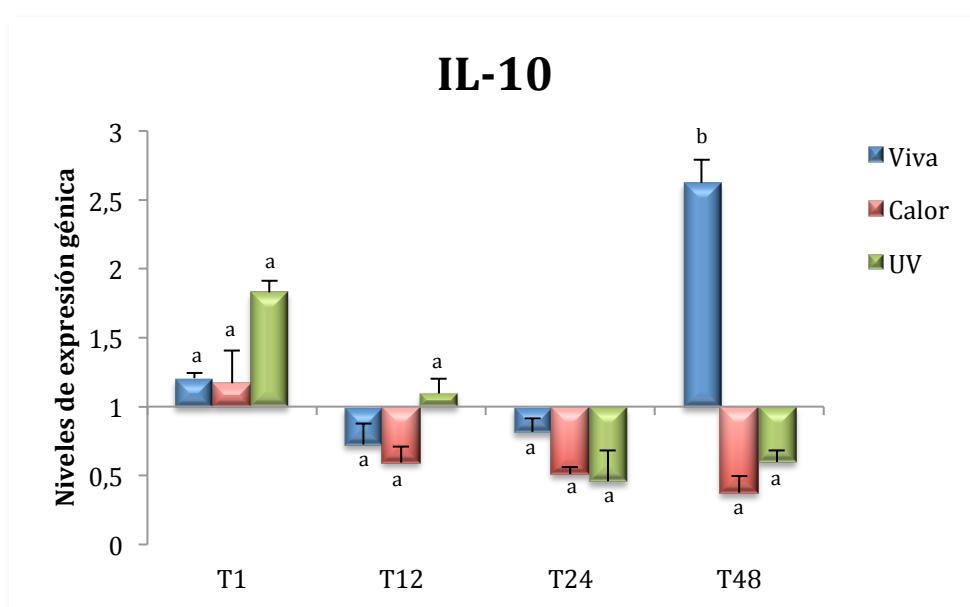
La Tabla XVI y Figura XX muestran la dinámica de expresión a lo largo del tiempo del gen IL-10 tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada.

Tras 1 hora de estimulación los leucocitos de lubina expresaron el gen L-10 en los tres tratamientos estudiados, siendo el valor más elevado el correspondiente a los leucocitos incubados con la cepa inactivada por luz UV, observándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a los otros tratamientos. Posteriormente, se produce una importante reducción del estímulo para todos los tratamientos realizados para, finalmente, producirse de nuevo un pico de expresión en los leucocitos incubados con la cepa probiótica viva, a las 48 horas, que muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla XVI:** Valores de niveles de expresión del gen IL-10 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	1,20 ± 0,15	0,72 ± 0,02	0,82 ± 0,01	2,26 ± 0,02
Calor	1,16 ± 0,01	0,59 ± 0,20	0,51 ± 0,21	0,37 ± 0,44
UV	1,82 ± 0,01	1,09 ± 0,51	0,46 ± 0,13	0,59 ± 0,01

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 Y T48



**Figura XX:** Expresión génica de IL-10 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

### V.2.3.7.-Expresión del gen Casp-3

La Tabla XVII y Figura XXI muestran la dinámica de expresión a lo largo del tiempo del gen Casp-3 tras la incubación con la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada.

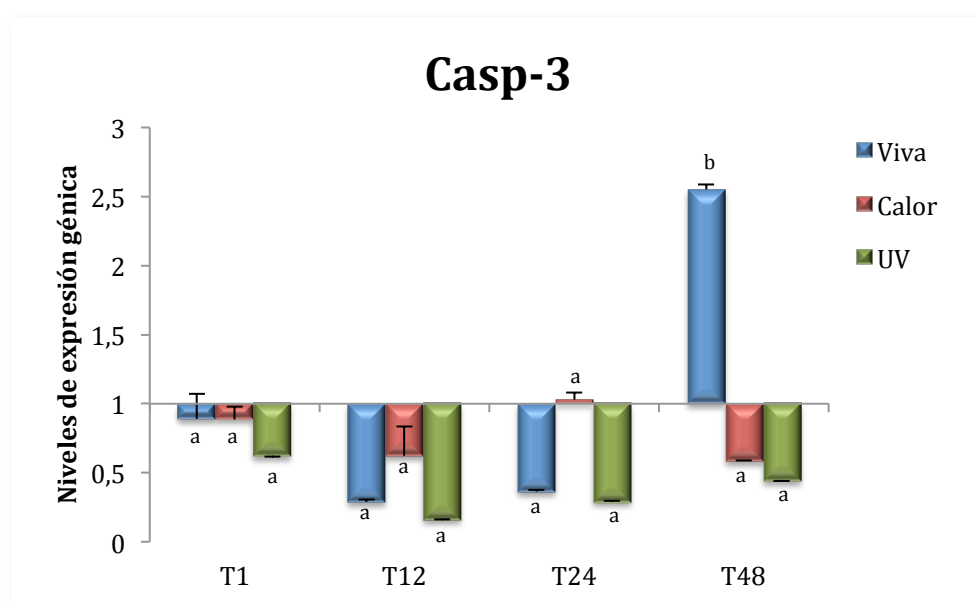
Podemos observar que sólo se produce un pico de expresión con los leucocitos que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21 a las 48 horas, no observando en ningún otro tiempo ni tratamiento expresión alguna para este gen. El pico citado mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros tratamientos realizados.



**Tabla XVII:** Valores de niveles de expresión del gen Casp-3 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa *V. fluvialis* L21.

Tratamientos	T1 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$
Viva	0,89 ± 0,18	0,29 ± 0,02	0,36 ± 0,01	2,52 ± 0,03
Calor	0,88 ± 0,09	0,62 ± 0,21	1,02 ± 0,05	0,58 ± 0,01
UV	0,61 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,43 ± 0,01

(\*) Niveles de expresión génica a diferentes tiempos T1, T12, T24 Y T48



**Figura XXI:** Expresión génica de Casp-3 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

#### V.2.4-Discusión

Existen numerosos trabajos donde se estudia, tanto *in vitro* como *in vivo*, los efectos beneficiosos de los probióticos sobre los hospedadores (Irianto y Austin, 2002a; Panigrahi y cols., 2004; Brunt y Austin, 2005; Balcázar y cols., 2006; Díaz-Rosales y cols., 2006; Balcázar y cols., 2007a; Nayak y cols., 2007; Kim y Austin, 2006; Choi y Yoon, 2008). Aunque el mecanismo de acción por el cual los probióticos ejercen su efecto sobre los hospedadores no se conoce con certeza, diferentes estudios en animales terrestres y en humanos ayudan a comprender mejor el tipo y grado de respuesta que los probióticos inducen en los hospedadores (Mishra y cols., 2008). En este experimento se estudió la expresión de siete genes importantes y representativos de la respuesta inmune innata inducida por el estímulo de la cepa *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada. De esta forma, se analizó la expresión de los genes IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , Casp-3, la COX-2 y Mx en los leucocitos de riñón anterior de la lubina. Román y cols. (2012) demostraron que la cepa *V. fluvialis* L 21, tanto viva como inactivada, era capaz de estimular *in vitro* a los leucocitos de riñón anterior de dorada y lubina, obteniendo en esta última especie los mejores valores de actividad fagocítica, explosión respiratoria y contenido en peroxidasa. Este resultado sugiere que la cepa *V. fluvialis* L21 podría ser un potente y eficaz inmunomodulador para esta especie.

Se han descrito las dinámicas de expresión de citoquinas inducidas por cepas probióticas incluyendo a *Lactobacillus* en diversas líneas celulares como macrófagos de mamíferos y células intestinales humanas (Caco-2; Ht-29) (Miettinen y cols., 1996; 1999; Morita y cols., 2002; Lammers y cols., 2002). Pero, hasta ahora, solo Kim y Austin (2006) han estudiado *in vitro* los patrones de respuesta de citoquinas inducidas por

cepas probióticas en células de peces. En este trabajo se estudió por primera vez el efecto de *V. fluvialis* L21 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Así, se estudiaron citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y la COX-2 producidas generalmente en la primera etapa de la respuesta inmune (Tizard, 1995; Secombes y cols., 2001). Después de 1 hora de incubación, tanto con la cepa viva como inactivada de *V. fluvialis* L21, hubo expresión de los genes IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los leucocitos de riñón anterior, lo que sugiere que la cepa *V. fluvialis* L21 puede inducir una respuesta inflamatoria temprana en la lubina.

Estos resultados son similares a los obtenidos *in vitro* por Kim y Austin (2006) en los leucocitos de riñón anterior de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), después de un co-cultivo con cepas probióticas vivas. Del mismo modo, Panigrahi y cols. (2007), demostraron que algunas cepas probióticas tienen la capacidad de estimular la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo a IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Igualmente, varios estudios realizados en células epiteliales de mamíferos demuestran que cepas no patógenas de *Escherichia coli* y cepas pertenecientes al Género *Lactobacillus* inducen la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  (Pereyra y Lemonnier, 1993; Blum y Schiffrin, 2002 ). Está demostrado que el TNF- $\alpha$  es un potente activador de macrófagos (Zou y cols., 1999). La expresión del gen TNF- $\alpha$  en los leucocitos que fueron incubados con la cepa inactivada por luz UV en el T1 mostró diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos en el mismo tiempo. Este resultado puede relacionarse con los resultados obtenidos por Román y cols. (2012), que observaron *in vitro* una mayor actividad fagocítica en los leucocitos estimulados con la cepa *V. fluvialis* L21, inactivada por luz UV.

Por otro lado, COX-2 se considera un importante mediador durante la inflamación. En nuestro caso, este gen se sobre-expresó en la mayoría de los puntos de muestreo, tanto con las cepas vivas como inactivadas, a diferencia de lo que obtuvieron Picchietti y cols. (2009), que encontraron valores significativamente más bajos en la expresión del gen COX-2, IL-10 e IL-1 $\beta$  en leucocitos de riñón anterior de larvas de lubina alimentadas con *Lactobacillus delbrueckii*. Una sobre-expresión de COX-2 se relaciona *in vivo* con enfermedades crónicas (Nurmi y cols., 2005) pero, *in vitro*, no se había demostrado hasta el momento en peces. Por otro lado, Sepulcre y cols. (2007) encontraron que IL-6 *in vivo* se expresa en las primeras horas después de la infección de la lubina con *Vibrio anguillarum*, mientras que en nuestro estudio *in vitro*, se encontró que el pico de expresión de IL-6 se presenta después de 48 horas de incubación.

En los mamíferos están bien descritos los efectos que las citoquinas reguladoras ejercen sobre las citoquinas pro-inflamatorias (Conti y cols., 2003). Nuestros resultados son similares a los encontrados por Chettri y cols. (2001) en la trucha arcoiris (*O. mykiss*), donde se observa la regulación entre IL-6 e IL-10. Todas estas citoquinas, excepto la IL 10, se cree que contribuyen a los mecanismos de defensa del hospedador en respuesta a la colonización e invasión. De hecho, una de las funciones principales de IL-10 parece estar relacionada con la regulación de la respuesta inflamatoria, para evitar que esta respuesta sea excesiva (Raida y Buchmann, 2008). En nuestro caso, la IL-10 mostró los niveles de expresión más altos a las 48 horas después de la incubación con la cepa probiótica viva. Nuestros datos apoyan la hipótesis propuesta por Raida y Buchmann (2008), ya que en nuestro trabajo los leucocitos de lubina que fueron incubados con la cepa probiótica viva no sólo expresaron la IL-10 a las 48 horas, que es

capaz de reducir la inflamación, sino que también expresaron el gen de la Casp-3, que es responsable del cierre de la respuesta inflamatoria.

Nagata (1997) considera que la apoptosis juega un papel no sólo durante la homeostasis, sino también en la regulación de la respuesta del hospedador durante una infección bacteriana, vírica o parasitaria. En cuanto a los procesos de apoptosis en células de peces, la información es escasa, y sólo hace unos años se han empezado a secuenciar los genes de las caspasas. (do Vale y cols., 2005; Reis y cols., 2007,). Algunas bacterias candidatas utilizadas como probióticos tienen efecto antiviral (Balcázar y cols., 2006). Aunque el mecanismo exacto por el cual estas bacterias ejercen esa acción antiviral se desconoce. También se ha demostrado que las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* mostraron actividad antiviral contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Kamei y cols., 1988). El IFN es uno de los mecanismos antivirales más conocidos, y las proteínas Mx son los efectores moleculares de este gen (Caipang y cols., 2009).

Acosta y cols. (2004) demostraron que la bacterina de *Listonella anguillarum* (hoy *Vibrio anguillarum*), era capaz de estimular la expresión del gen Mx en el salmón Atlántico (*Salmo salar*). Del mismo modo, Bravo y cols. (2011) mostraron que el LPS de *Vibrio alginolyticus* estimula la respuesta Mx en la dorada. Nygaard y cols. (2000) observaron en el salmón Atlántico que la expresión máxima del Mx aparecía a las 48 horas después de estimular con POLY I:C. En este caso, es la primera vez que se estudia la estimulación del gen Mx producida por una bacteria Gram positiva. A pesar de que se produjo una ligera expresión del gen Mx en nuestra experiencia, no hubo diferencias

estadísticamente significativas, por lo que sugerimos que otros componentes de la pared bacteriana podrían estar implicados en la expresión de este gen.

### **V.3.-Efecto inmunomodulador de los productos extracelulares (ECPs) de *Vagococcus fluvialis* L21 sobre leucocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax*).**

#### **V.3.1-Introducción**

Como bien se ha documentado en capítulos anteriores, las enfermedades infecciosas suponen uno de los factores más limitantes para el buen desarrollo de la producción acuícola. Entre otras estrategias de control, los probióticos se consideran una herramienta alternativa para el control de enfermedades y consecuentemente la disminución en el uso de antibióticos (Austin y cols., 1995; Gram y cols., 1999; Spanggaard y cols., 2001; Pan y cols., 2008). Hoy en día, no sólo se utilizan cepas bacterianas vivas para su uso como probióticos, sino también inactivadas, que ejercen un efecto beneficioso en los hospedadores, tanto *in vitro* como *in vivo* (Díaz-Rosales y cols., 2006; Kim y Austin, 2006; Román y cols., 2012). Además, investigaciones recientes demuestran que componentes purificados de las cepas bacterianas beneficiosas pueden tener efecto sobre la salud de los hospedadores. Abbass y cols. (2010) demostraron que las proteínas de la pared celular (CWP), las proteínas de membrana externa (OMP) y los lipopolisacáridos (LPS) de las cepas probióticas *Aeromonas sobria* GC2 y *Bacillus subtilis* JB-1 confieren protección en salmónidos frente a *Yersinia ruckeri*, el agente causal de la enfermedad de la boca roja. Por otro lado, la suplementación probiótica se ha comenzado a utilizar como adyuvante para aumentar la capacidad inmunógena de vacunas en humanos y animales (Zhang y cols., 2008; Soh y cols., 2010).

Con la finalidad de entender mejor el mecanismo de acción de la cepa *Vagococcus fluvialis* L21 identificada y caracterizada por Sorroza y cols. (2012), y teniendo en cuenta que esta cepa de *Vagococcus fluvialis* L21 tiene clara actividad inmunomoduladora *in*

*vitro* como así demostraron Román y cols. (2012), así como la capacidad de inducir la producción de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune (Román y cols., 2013), el objetivo de este trabajo fue determinar, *in vitro*, el efecto de los productos extracelulares (ECPs) de *Vagococcus fluvialis* L21 sobre la dinámica de expresión a lo largo del tiempo de genes implicados en la respuesta inmune en los leucocitos de lubina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , Casp-3, la COX-2, Mx).

### **V.3.2-Diseño experimental**

Para el estudio de la dinámica de expresión de las citoquinas relacionadas con la respuesta inmune inducida por los ECPs de *V. fluvialis* L21 sobre los leucocitos de riñón anterior de lubina (Esquema IV), se utilizaron 36 lubinas con un peso medio de 150 g procedentes del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Al igual que en el capítulo anterior, los peces fueron mantenidos en tanques de 1000 l de capacidad con circuito de agua abierto, aireación constante y fotoperíodo natural de 12 horas. Los peces fueron alimentados diariamente con una dieta comercial de Skretting (Burgos, España). Tras su período de alimentación y una vez comprobado su buen estado de salud, todos los peces fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico (2-Fenoxietanol), y posteriormente se trasladaron al laboratorio de enfermedades infecciosas e ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Se utilizaron 12 lubinas para la extracción de los leucocitos de riñón anterior siguiendo la metodología de Secombes (1990), utilizando un gradiente de Ficoll. Cada una de las extracciones se realizó por triplicado. Realizada la extracción de los leucocitos



de riñón anterior observamos la viabilidad de las células con la tinción de Tripan Blue y ajustamos a una concentración de  $10^7$  cels/ml con la cámara de Neubauer.

Para el estudio de la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune a lo largo del tiempo, se añadieron 2,5 ml de una solución de  $10^7$  cels/ml y se dejaron fijar en placas de poliestireno de 6 pocillos. Después de tres horas de fijación de los leucocitos a  $22^{\circ}\text{C}$  se eliminaron las células no adherentes y sustituimos con medio L-15 suplementado con antibiótico y con 2% de suero fetal bovino. Las placas se dejaron incubar en la estufa a  $22^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización al día siguiente.

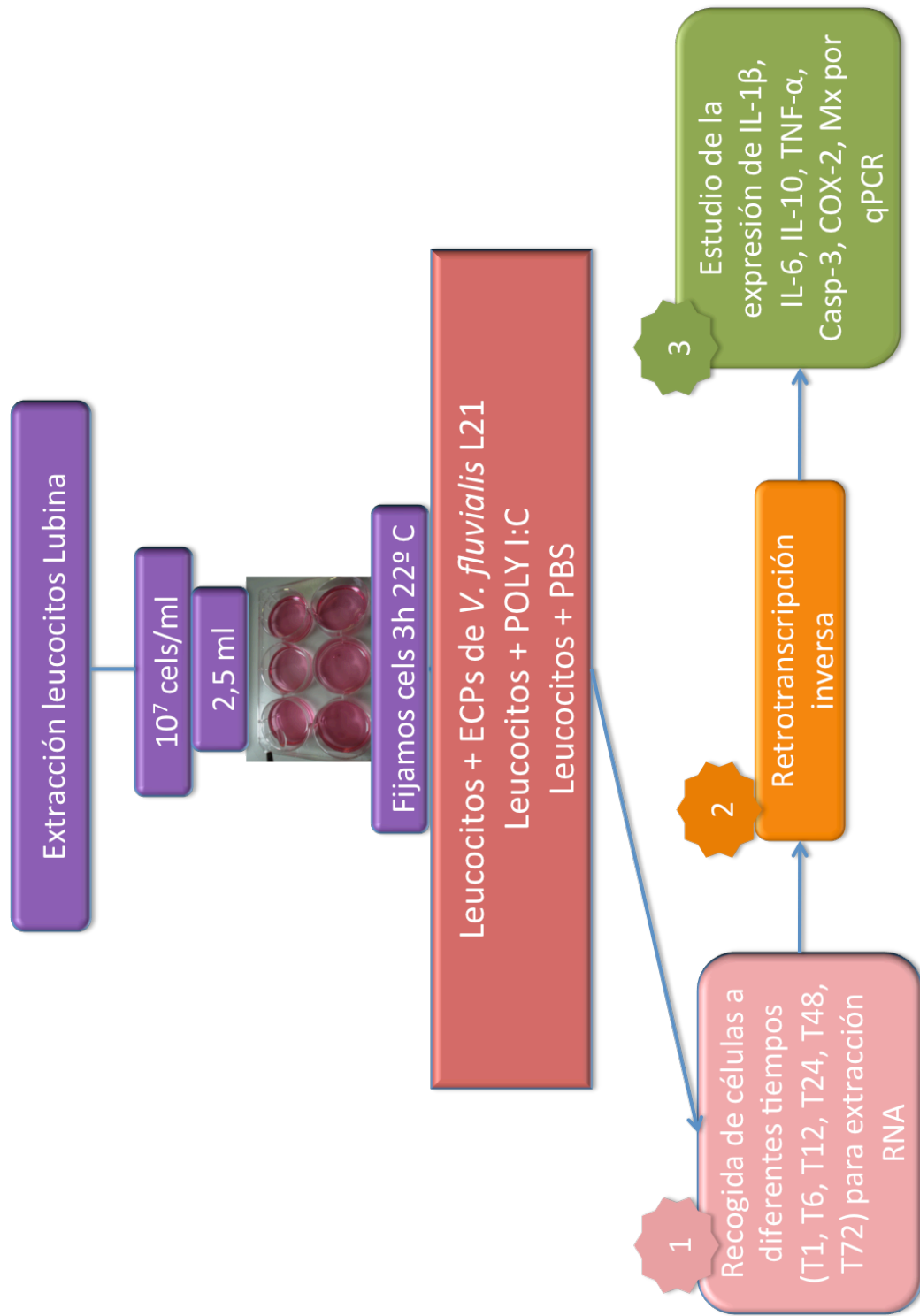
En ese momento los leucocitos fueron incubados con 1 ml de solución de los ECPs de *V. fluvialis* L21 que se extrajeron siguiendo la metodología descrita por Barbey y cols. (2009) con modificaciones. Dicha solución de ECPs se preparó a una concentración de 0,025 mg/ml en L15 y se incubó con los leucocitos de lubina durante 1'5 h. Otro triplicado de pocillos con leucocitos fueron incubados con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ácido poliinosínico-policitidinico (POLY I:C) y como control negativo, utilizamos un triplicado de pocillos con leucocitos que fueron incubados con PBS. Transcurrida esa primera 1,5h de estimulación -que coincide con el primer punto de muestreo (T1,5)- tanto la solución de ECPs como el POLY I:C fueron eliminados de los pocillos y se sustituyó con medio L-15 suplementado con SFB al 2% y antibiótico.

En definitiva, las células se recogieron a diferentes tiempos para la extracción de ARN y la realización posterior de la RT-PCR, tras 1'5 h de incubación (T1,5), a las 6 horas (T6), a las 12 horas ( T12), a las 24 horas (T24), a las 48 horas (T48) y a las 72 horas (T72) post-incubación con cada una de las soluciones antes descritas. (Esquema IV).

- **Análisis estadístico**

Para el estudio estadístico de los datos de expresión génica se utilizó el software SPSS versión 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) y se realizó también un test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Igualmente que en la punto anterior, todos los protocolos utilizados en el desarrollo de esta experiencia están detallados en el apartado IV “Material y métodos”.

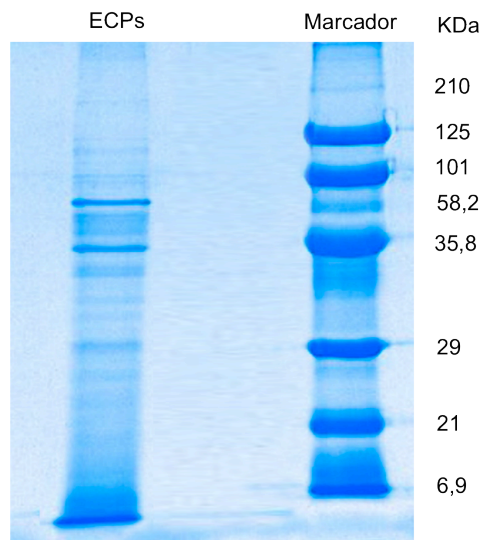


**Esquema IV:** Resumen de la experiencia IV

### V.3.3-Resultados

En esta experiencia se evaluó el efecto de los ECPs de *V. fluvialis* L21 sobre la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune así como la expresión del gen Mx y la Caspasa-3 (Casp-3).

La Figura XXII muestra los resultados obtenidos en el gel de acrilamida al 12,5 % en los que aparecen las diferentes bandas proteicas de los ECPs de *V. fluvialis* L21. En dicho gel podemos observar que sobretodo hay dos bandas mas marcadas con pesos moleculares comprendidos entre 58,2-35,8 KDa.



**Figura XXII:** Gel de acrilamida al 12,5 %. Bandas proteicas de los ECPs de *Vagococcus fluvialis* L21 en relación al marcador de peso molecular (Broad Range, Biorad 161-0313).

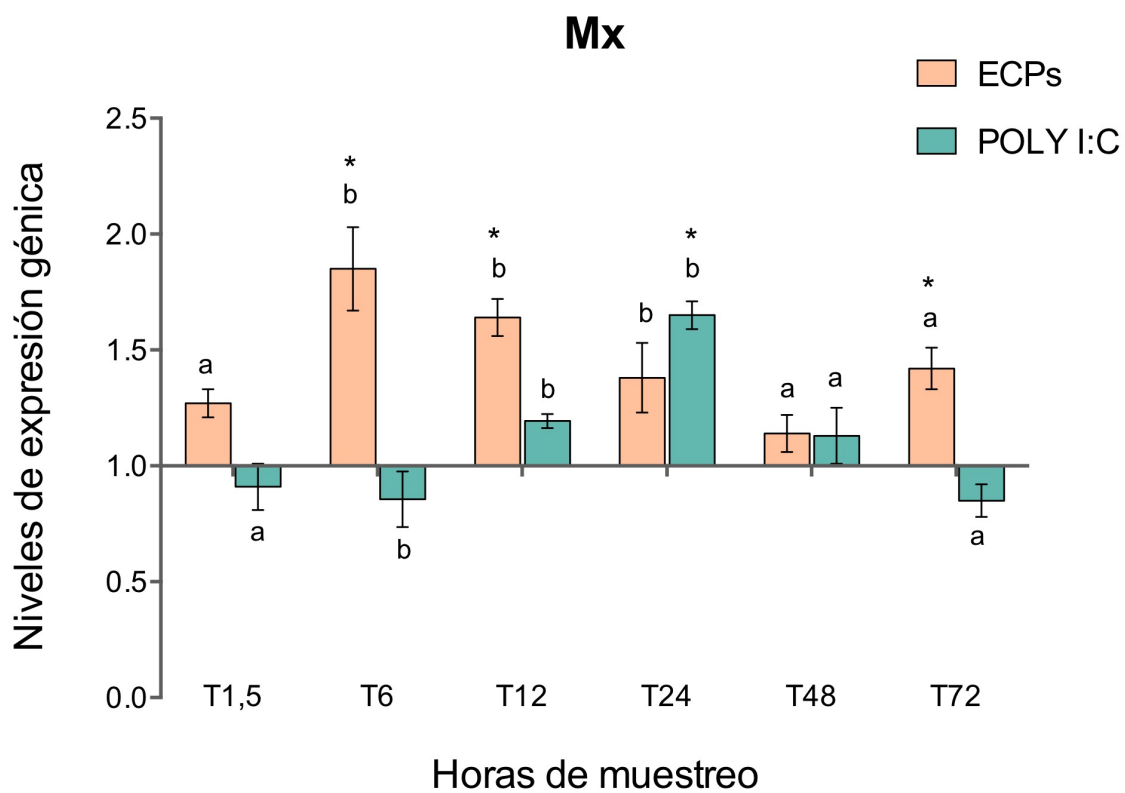
### V.3.3.1-Expresión del gen Mx

La Tabla XVIII y la Figura XXIII muestran la expresión del gen Mx en los leucocitos de lubina con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. En general, observamos que en casi todos los tiempos de muestreo existe una sobreexpresión del gen Mx para los dos productos estudiados con respecto al control., a excepción de los leucocitos que fueron estimulados con POLY I:C a los tiempos T1,5, T6 y T72. La expresión de Mx fue mayor en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs de *V. fluvialis* para todos los tiempos, excepto en el T24, coincidiendo con un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en los leucocitos que fueron estimulados con POLY I:C. Igualmente hubieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos en los tiempos T6, T12 y T72. La gráfica refleja claramente que la curva de expresión ocurre mucho antes cuando los leucocitos fueron estimulados con los ECPs que con el POLY I:C.

**Tabla XVIII:** Valores de los niveles de expresión del gen Mx a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina .

Productos	T1,5 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$	T6 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$	T12 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$	T24 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$	T48 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$	T72 <sup>(*)</sup> $\bar{X} \pm s$
ECPs	1,27 ± 0,06	1,85 ± 0,18	1,64 ± 0,08	1,38 ± 0,15	1,14 ± 0,08	1,42 ± 0,09
Poly I:C	0,91 ± 0,10	0,85 ± 0,12	1,19 ± 0,03	1,65 ± 0,06	1,13 ± 0,12	0,85 ± 0,07

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXIII:** Expresión génica de Mx en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).

### V.3.3.2-Expresión del gen IL-1 $\beta$

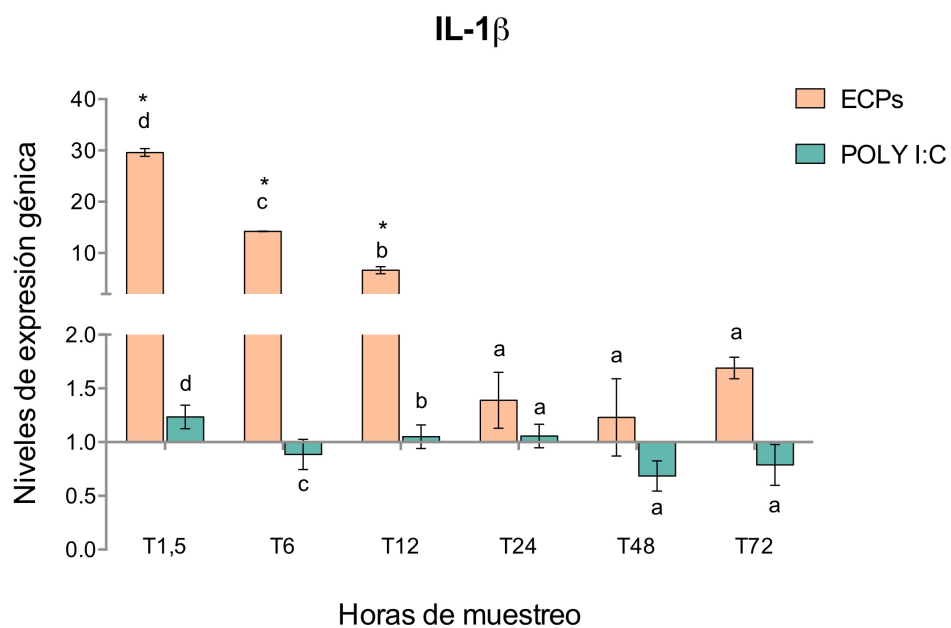
La Tabla XIX y la Figura XXIV muestran la expresión del gen IL-1 $\beta$  en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. La expresión de IL-1 $\beta$  fue mayor en los leucocitos estimulados con los ECPs que en los que fueron estimulados con POLY I:C. Los leucocitos de lubina que fueron estimulados con POLY I:C no expresaron IL-1 $\beta$  tras los siguientes tiempos de incubación: T6, T48 y T72 observando sub-expresión con respecto al control en estos tiempos.

Un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a los demás tiempos se obtuvo en los leucocitos que fueron incubados con los ECPs de *V. fluvialis* en el T1,5. Los niveles elevados de expresión se mantienen durante las primeras 12 horas post-incubación hasta descender en los tiempos T24, T48 y con un ligero ascenso en el T72. En la gráfica podemos apreciar el intenso estímulo que significa la presencia de los ECPs con respecto al POLY I:C para la expresión de este gen. En los tres últimos puntos de muestreo no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los leucocitos que fueron estimulados con ECPs y POLY I:C a diferencia de los que ocurre en los tiempos T1,5, T6 y T12 en los que sí las encontramos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla XIX: Valores de los niveles de expresión del gen IL-1 $\beta$  a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina .**

Productos	T1,5(*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	29,61 $\pm$ 0,77	14,21 $\pm$ 0,04	6,67 $\pm$ 0,69	1,39 $\pm$ 0,26	1,23 $\pm$ 0,36	1,69 $\pm$ 0,10
Poly I:C	1,23 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,11	1,05 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,19

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXIV: Expresión génica de IL-1 $\beta$  en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).**



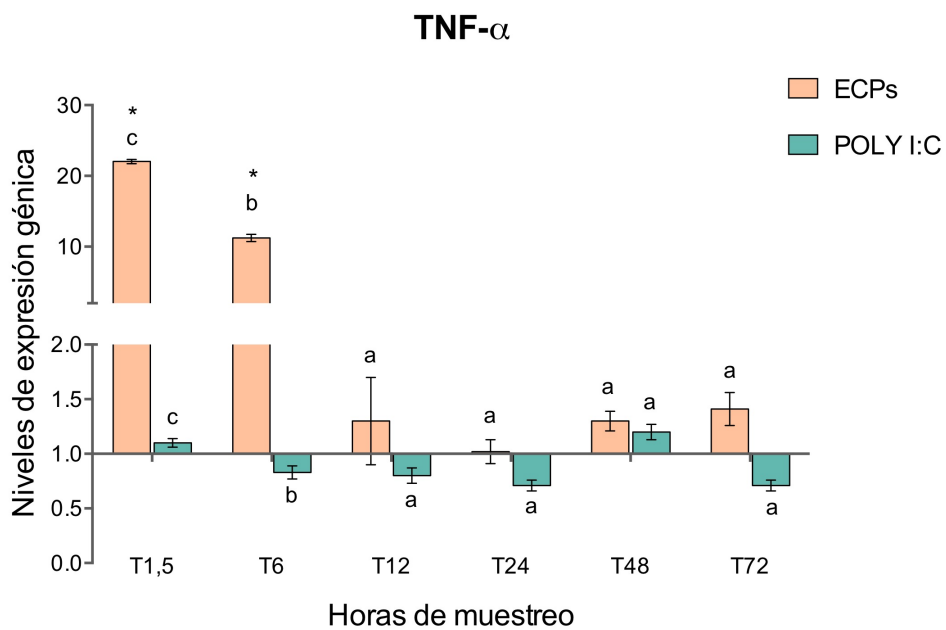
### V.3.3.3-Expresión del gen TNF- $\alpha$

La Tabla XX y la Figura XXV muestran la expresión del gen TNF- $\alpha$  en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. Podemos apreciar que la gráfica es muy similar a la obtenida en la expresión del gen IL-1 $\beta$ , y así, tras 1,5 h de incubación con los ECPs de *V. fluvialis*, obtuvimos un pico estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a los demás tiempos y productos. Este pico de expresión va disminuyendo prácticamente hasta valores basales en el T24, y pasado este momento se obtuvo un ligero ascenso en la expresión del gen en los tiempos T48 y T72. Los leucocitos que fueron estimulados con POLY I:C únicamente mostraron sobreexpresión del gen TNF- $\alpha$  con respecto al control en los tiempos T1,5 y T48. A partir del tiempo T12 no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni entre los tiempos ni entre ambos productos utilizados para estimular los leucocitos.

**Tabla XX:** Valores de los niveles de expresión del gen TNF- $\alpha$  a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.

Productos	T1,5(*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	22,11 $\pm$ 0,30	10,77 $\pm$ 0,52	1,58 $\pm$ 0,40	0,94 $\pm$ 0,11	1,21 $\pm$ 0,09	1,42 $\pm$ 0,15
Poly I:C	1,09 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,05	1,20 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,05

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXV:** Expresión génica de TNF- $\alpha$  en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).

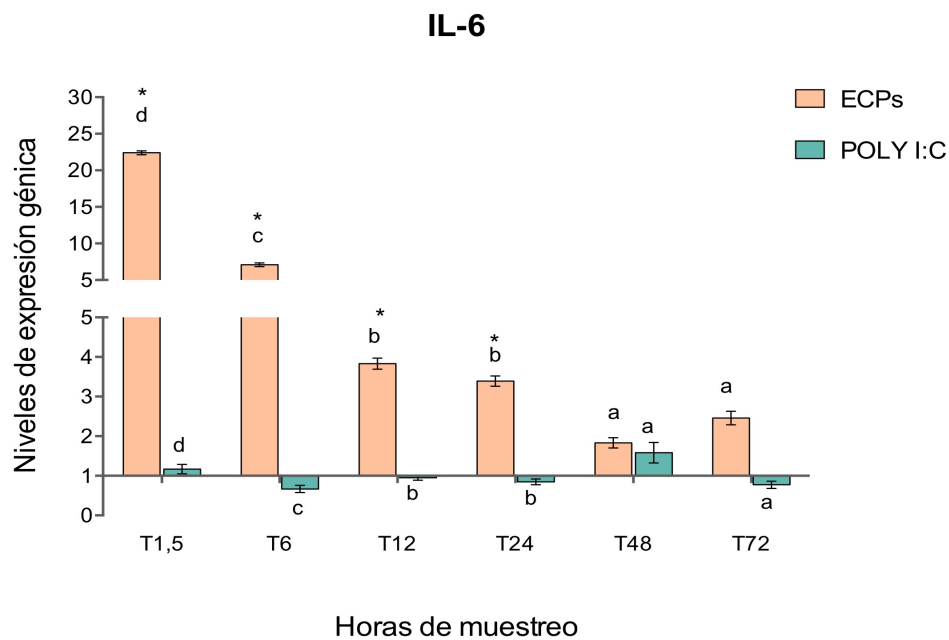
#### V.3.3.4-Expresión del gen IL-6

La Tabla XXI y la Figura XXVI muestran la expresión del gen IL-6 en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. También en este caso, la gráfica y el nivel de expresión del gen fueron muy similares a las encontradas para la expresión de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a los demás apareció en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs de *V. fluvialis* L21 tras 1,5 h de estimulación, y posteriormente los valores van disminuyendo a lo largo del tiempo hasta obtener el menor valor en el T48 produciéndose un ligero ascenso en el T72. En estos dos tiempos no hubo diferencias significativas con respecto a los productos utilizados, a diferencia del resto de los tiempos evaluados (T1,5-T6-T12 -T48) en el que sí las hubo. En todos los tiempos evaluados la expresión del gen IL-6 fue mayor en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs.

**Tabla XXI:** Valores de los niveles de expresión del gen IL-6 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.

Productos	T1,5 (*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	22,40 ± 0,26	7,09 ± 0,25	3,83 ± 0,14	3,39 ± 0,13	1,83 ± 0,13	2,46 ± 0,17
Poly I:C	1,16 ± 0,12	0,66 ± 0,09	0,94 ± 0,06	0,84 ± 0,07	1,58 ± 0,26	0,77 ± 0,09

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXVI:** Expresión génica de IL-6 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).

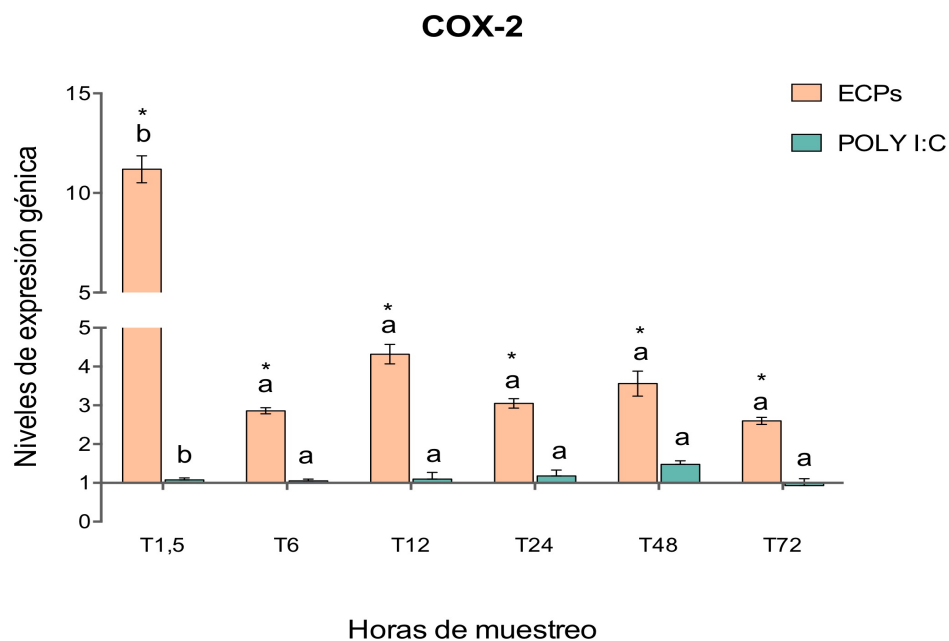
### V.3.3.5-Expresión del gen COX-2

La Tabla XXII y la Figura XXVII muestran la expresión del gen COX-2 en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. Al igual que en casos anteriores, después de la estimulación durante 1,5 h con los ECPs de *V. fluvialis*, un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a los demás apareció en los leucocitos en el T1,5. Para cada uno de los tiempos restantes hubo diferencias entre los dos productos utilizados, siendo en todos los casos la expresión mayor en los leucocitos estimulados con los ECPs.

**Tabla XXII:** Valores de los niveles de expresión del gen COX-2 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina .

Productos	T1,5 (*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	11,19 ± 0,68	2,86 ± 0,08	4,32 ± 0,25	3,05 ± 0,12	3,56 ± 0,32	2,60 ± 0,09
Poly I:C	1,08 ± 0,05	1,04 ± 0,05	1,09 ± 0,17	1,18 ± 0,15	1,48 ± 0,09	0,93 ± 0,18

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXVII:** Expresión génica de COX-2 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).

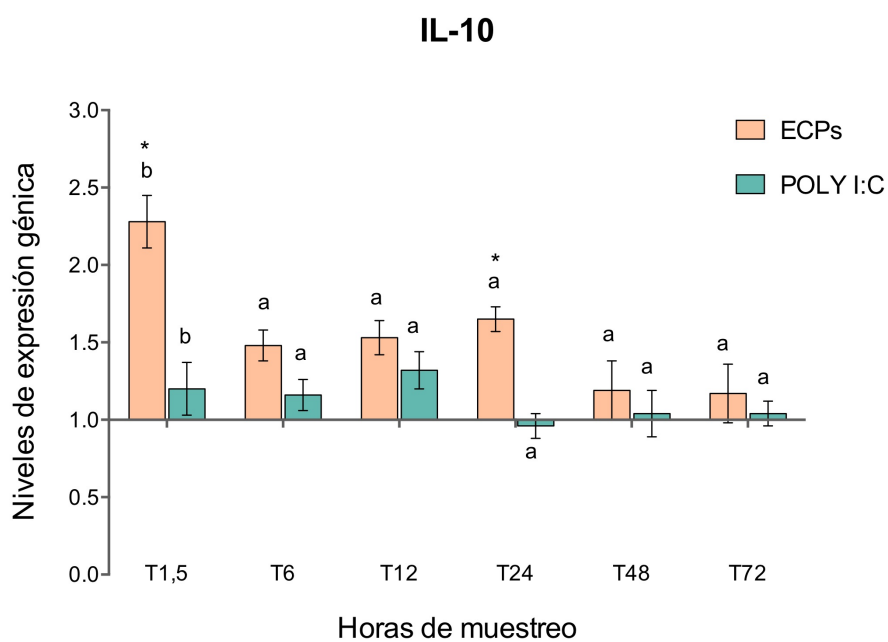
### V.3.3.6-Expresión del gen IL-10

La Tabla XXIII y la Figura XXVIII muestran la expresión del gen IL-10 en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. Después de la estimulación durante 1,5 h con los ECPs de *V. fluvialis*, un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a los demás tiempos de expresión apareció en los leucocitos en el T1,5. Estadísticamente a partir del T6 en adelante no hubo diferencias significativas con respecto a los tiempos ni a los productos, excepto en el T24 donde las encontramos ( $p < 0,05$ ) entre los dos productos utilizados. Igualmente que en casos anteriores, la expresión de IL-10 fue mayor en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs de *V. fluvialis*.

**Tabla XXIII: Valores de los niveles de expresión del gen IL-10 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina .**

Productos	T1,5 (*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	2,28 ± 0,17	1,48 ± 0,10	1,53 ± 0,11	1,65 ± 0,08	1,19 ± 0,19	1,17 ± 0,08
Poly I:C	1,19 ± 0,17	1,15 ± 0,10	1,31 ± 0,12	0,96 ± 0,08	1,03 ± 0,15	1,03 ± 0,08

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXVIII: Expresión génica de IL-10 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control(a: Tiempos; (\*) Productos).**



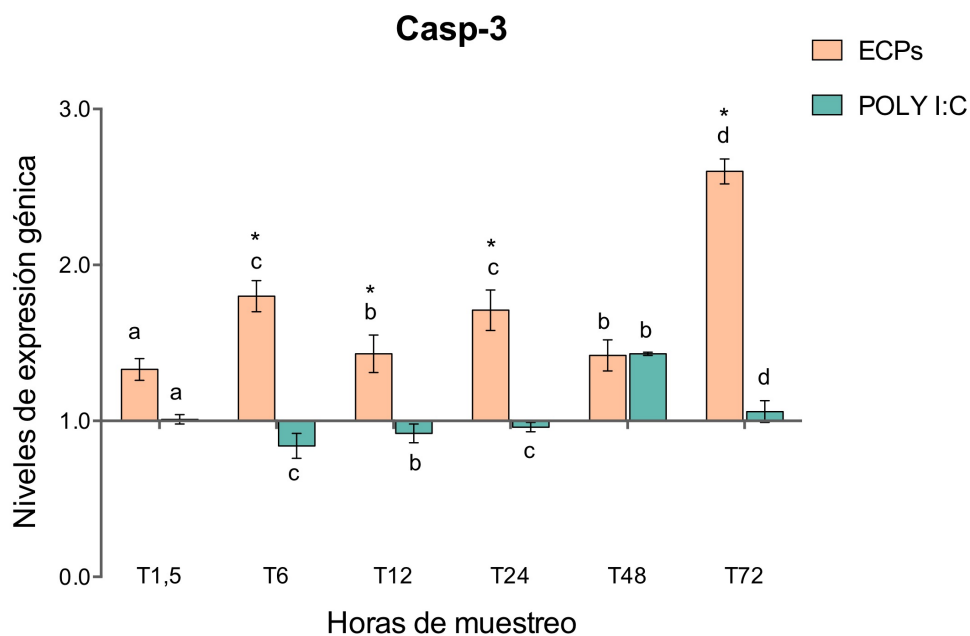
### V.3.3.7-Expresión del gen Casp-3

La Tabla XXIV y la Figura XXIX muestran la expresión del gen Casp-3 en los leucocitos de lubina tras la incubación con los ECPs de *V. fluvialis* y con el POLY I:C. Como puede apreciarse, la gráfica es absolutamente distinta para la expresión de este gen, que con el resto de los genes investigados en esta experiencia. Un pico estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) apareció en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs de *V. fluvialis* al T72. En los tiempos T6, T12 y T24 no hubo expresión de Casp-3 en los leucocitos que fueron estimulados con POLY I:C. En estos puntos hubieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar los valores de expresión de este gen encontrados con los productos utilizados. Estas diferencias significativas no se apreciaron ni en los tiempos T1,5 ni en el T48.

**Tabla XXIV: Valores de los niveles de expresión del gen Casp-3 a lo largo del tiempo en los leucocitos de lubina.**

Productos	T1,5 (*) $\bar{X} \pm s$	T6 (*) $\bar{X} \pm s$	T12 (*) $\bar{X} \pm s$	T24 (*) $\bar{X} \pm s$	T48 (*) $\bar{X} \pm s$	T72 (*) $\bar{X} \pm s$
ECPs	1,33 ± 0,07	1,80 ± 0,10	1,43 ± 0,12	1,71 ± 0,13	1,42 ± 0,10	2,60 ± 0,08
Poly I:C	1,09 ± 0,03	0,84 ± 0,08	0,92 ± 0,06	0,96 ± 0,03	1,43 ± 0,01	1,06 ± 0,07

(\*) Diferentes productos con los que se incubaron los leucocitos de lubina y sus respectivos tiempos de muestreo (T1,5 (1,5 horas); T6 (6 horas); T12 (12 horas); T24 (24 horas); T48 (48 horas); T72 (72 horas))



**Figura XXIX: Expresión génica de Casp-3 en los leucocitos de lubina. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control. (a: Tiempos; (\*) Productos).**

### V.3.4-Discusión

Aunque el uso de cepas probióticas sea una herramienta esencial en la práctica acuícola, en algunas ocasiones existen ciertos riesgos causados por el uso de cepas probióticas vivas ya que su administración de estas cepas puede interferir con los ecosistemas (Díaz-Rosales y cols., 2006; Salinas y cols., 2006). Por otro lado, existe alguna preocupación en la comunidad científica por el posible desarrollo de virulencia por parte de algunas cepas probióticas para peces, debido a la transferencia horizontal de genes entre otras causas (Murray y Peeler, 2005). Aunque hasta el momento no ha habido ninguna notificación, ni referencia al respecto, algunos géneros bacterianos usados como probióticos en peces son patógenos para humanos y peces como algunas cepas pertenecientes al Género *Aeromonas* (Iriano y Austin, 2002a) y *Vibrio* (Austin y cols., 1995). Las especies del Género *Vagococcus* han sido aisladas de diferentes fuentes como aguas residuales, heces de animales domésticos como cerdos, pollos, mamíferos acuáticos como focas, marsopas y nutrias, así como a partir de muestras clínicas de humanos (Hoyles y cols., 2000; Lawson y cols., 2007). En nuestro caso la de cepa de *V. fluvialis* L21 fue aislada de intestino de lenguado y está bien documentado, su efecto protector en la lubina frente a una infección experimental con *Vibrio anguillarum* con un porcentaje relativo de supervivencia del 40% (Sorroza y cols., 2012). Es cierto que algunas especies del Género *Vagococcus* como *Vagococcus salmoninarum* pueden provocar muertes esporádicas en peces, pero nosotros consideramos que la cepa de *V. fluvialis* L21, tanto por sus características *in vitro* como *in vivo* demostradas en nuestro laboratorio, puede ser una cepa candidata a ser considerada como probiótico para la acuicultura marina.

En un intento por ampliar el conocimiento actual sobre el mecanismo de acción de esta cepa, en este trabajo hemos querido evaluar *in vitro* el efecto inmunomodulador de los ECPs de la cepa probiótica de *V. fluvialis* L21 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Se estudiaron citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y la COX-2 producidas generalmente en la primera etapa de la respuesta inmune (Tizard, 1995; Secombes y cols., 2001). También incluimos el estudio de la Caspasa-3, la IL-10 y el gen Mx.

Se conoce desde hace tiempo que los componentes celulares pueden activar el sistema inmune de muchos animales, incluido los peces (Sharifuzzaman y cols., 2011). Es el caso de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de bacterias Gram-negativas que, a pequeñas dosis, pueden tener propiedades inmunomoduladoras e inducir la activación de los linfocitos T y B, estimular la actividad complemento así como la aumentar la expresión de citoquinas como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (ILiev y cols., 2007; Nayak y cols., 2008; Nya y Austin, 2010), o también estimular la producción del gen Mx (Acosta y cols., 2004; Bravo y cols., 2011). Por otro lado, las proteínas de la membrana externa (OMPs) de bacterias Gram-negativas pueden estimular la respuesta inmune de los peces, tanto a nivel humoral como a nivel celular. Así lo demostraron Boesen y cols. (1997) con los antígenos de *V. anguillarum* serogrupo 01 que inducían la respuesta inmune en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) o el aumento de la respuesta inmune en dorada tras la inoculación de antígenos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Arijo y cols., 2004).

Está demostrado el efecto inmunomodulador que los productos extracelulares (ECPs) de ciertas cepas bacterianas ejercen sobre los hospedadores (Evenberg y cols.,

1988; Gudmundsdóttir y Magnadóttir, 1997). A pesar de que la mayoría de los trabajos realizados para estudiar el efecto protector, tanto de las proteínas de la pared celular, de las proteínas totales o de los productos extracelulares de ciertas cepas bacterianas se realizan *in vivo*, en este trabajo obtuvimos *in vitro* un potente efecto inmunomodulador por parte de los ECPs de *V. fluvialis* L21 sobre los leucocitos de lubina. Aún desconociendo actualmente la composición de los ECPs de *V. fluvialis* L21, podemos aseverar que éstos tienen una alta capacidad de estimular la respuesta inmune inespecífica de los leucocitos de lubina. En general, pudimos observar que los ECPs de *V. fluvialis* L21 inducen una fuerte respuesta pro-inflamatoria, ya que se obtuvieron niveles de expresión muy elevados sobre todo de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y la COX-2 durante las primeras horas post-incubación con los ECPs. Siendo esta dinámica de expresión fue muy parecida entre IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Estos resultados difieren en cierta medida a los obtenidos *in vivo* por Lund y cols. (2003) con los ECPs de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en Salmon atlántico en los que no obtuvieron protección frente a la forunculosis. Sin embargo, nuestros están en concordancia con los que obtuvieron resultados Evenberg y cols. (1988) cuando vacunaron frente a *A. salmonicida* en carpa (*Cyprinus carpio*) con ECPs, pues sí encontraron.

La patogenicidad de algunos microorganismos radica, en algunas ocasiones, en los productos extracelulares que liberan al medio (Klesius y Sealey, 1996). En nuestro caso, y aún sabiendo que la cepa *V. fluvialis* L21 es inocua para la lubina, en este trabajo se demostró que tampoco sus ECPs eran nocivos para los leucocitos de lubina, ya que tras 1,5 h de incubación con éstos los leucocitos mostraron valores muy bajos de expresión de Casp-3, solo apareciendo un pico de expresión estadísticamente significativo ( $p <$

0,05) a las 72 horas post-incubación pudiendo, indicar un posible agotamiento celular tras la fuerte respuesta que se produce durante las primeras horas post-incubación.

A pesar de que está demostrado que los LPS de diferentes bacterias son capaces de estimular el gen Mx entre otros genes, los ECPs de *V. fluvialis* L21 estimularon la expresión del gen Mx a las 6 horas post-incubación con los leucocitos de riñón anterior de lubina, produciendo un pico mayor que el que el POLY I:C produjo a las 24 horas en los mismos leucocitos. De este modo, podemos considerar que algún componente de los ECPs de *V. fluvialis* L21 es capaz de activar el sistema IFN de los leucocitos de lubina.

Por otro lado, en los leucocitos que fueron estimulados con POLY I:C apenas expresaron genes relacionados con la respuesta inmune. Estos resultados discrepan en buena medida con los obtenidos por Chettri y cols. (2011), que estudiaron la respuesta de los leucocitos de trucha arcoiris que fueron estimulados con diferentes compuestos que hacen referencia al patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) en los que el POLY I:C estimuló la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y de IFN- $\gamma$ . En este estudio Chettri y cols. (2011) demostraron que la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) responde de manera distinta a los PAMPs, sugiriendo que éstos activan rutas en cascada diferentes, que a su vez derivan en la activación de diferentes células inmunes efectoras. En nuestro caso aunque este estudio no se ha realizado en leucocitos de lubina, pero podemos considerar que en nuestro caso los leucocitos de esta especie responden de diferente manera en función de la viabilidad de la cepa probiótica, como así demostraron Román y cols. (2013) con *V. fluvialis* L21, así como a los ECPs de *V. fluvialis* L21, reforzando así la hipótesis propuesta por Chettri y cols. (2011).

En numerosos trabajos se han obtenido efectos beneficiosos tras la inoculación con diferentes ECPs de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, de tal manera que muchos investigadores hacen hincapié en introducir estos productos como adyuvantes para vacunas (Collado y cols., 2000; Zorrilla y cols., 2003; LaFrentz y cols., 2004).

En general, teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos con la cepa *V. fluvialis* L21 en los que se demuestra el efecto protector de la cepa frente a una infección experimental en lubina frente a *V. anguillarum* (Sorroza y cols., 2012) así como la estimulación de la respuesta inmune celular inespecífica (Román y cols. 2012) y el efecto sobre la expresión génica (Román y cols., 2013), podemos considerar que los ECPs de *V. fluvialis* L21 tienen un gran poder estimulante de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune e incluso podrían ser útiles como adyuvantes de vacunas para la acuicultura.

## **VI.-DISCUSIÓN GENERAL**

La acuicultura es una de las actividades productivas de mayor crecimiento en las últimas 3 décadas. La gran demanda de productos marinos suscitada, entre otras causas, por el incesante incremento de la población mundial, así como por el gran aporte proteico que estos productos ofrecen, conlleva inevitablemente a una intensificación en las producciones, por tanto, la práctica acuícola se convierte en muchas ocasiones en una actividad intensiva. Esta intensificación en los cultivos provoca graves daños en el medio ambiente debido sobretodo a vertidos orgánicos que provocan el agotamiento del oxígeno de los estanques dando lugar a metabolitos tóxicos (hidrógeno, metano, amoniaco y nitritos), originando a menudo altas mortalidades. Por otra parte, en la acuicultura intensiva los peces están sometidos a situaciones de estrés que junto a condiciones higiénico-sanitarias inadecuadas provocan la aparición de enfermedades infectocontagiosas causando disminución en la productividad y consecuentemente grandes pérdidas económicas en el sector.

En las últimas décadas, a parte de las vacunaciones, se han utilizado para la prevención y control de enfermedades en animales, aditivos químicos y antibióticos. Éstos últimos ocasionando importantes riesgos para la salud pública debido principalmente a la persistencia y aparición de cepas bacterianas resistentes (Nomoto, 2005; FAO, 2006; Tendencia y de la Peña, 2010). Por tanto, los probióticos se presentan como una alternativa eficaz para el control de enfermedades (Kesacordi-Watson, 2010; Nayak, 2010). Consecuentemente, los probióticos se han convertido en una parte integral de la actividad acuícola, mejorando los índices de crecimiento y la resistencia a



enfermedades (Mishra y cols., 2001; Das y cols., 2008; Sahu y cols. 2008; Mehrim, 2009; Nayak, 2010).

El uso de los probióticos en acuicultura se implementa después de analizar qué microorganismos provenientes del tracto intestinal o de otros tejidos de peces sanos, o del medio ambiente, presentan efecto antagónico frente a diferentes agentes patógenos de los peces (Hejelm y cols., 2004; Makridis y cols., 2005), presentándose este mecanismo como una herramienta muy prometedora para su uso.

Existen numerosos estudios sobre el uso de cepas probióticas en el medio marino, y han sido evaluadas en diferentes especies de peces, moluscos, crustáceos, equinodermos y en alimento vivo como artemia, algas y rotíferos (Verschuere y cols., 2000; Irianto y Austin, 2002; Kesarcodi-Watson y cols. 2008; Picchietti y cols, 2009; Sorroza y cols., 2012; Román y cols., 2013).

Un gran número de cepas probióticas se utilizan en la práctica en acuicultura, y a pesar de que muchas de éstas difieren claramente en sus mecanismos de acción, se ha demostrado que algunos de tales mecanismos son comunes a la mayoría de las cepas probióticas, independientemente del efecto que produzcan en los hospedadores (Nayak, 2010). Los probióticos confieren efecto protector frente a patógenos, ya sea por competencia por los sitios de adhesión (Vine y cols., 2004; Chabrillon y cols., 2005), mediante la producción de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico), peróxido de hidrógeno y otros compuestos como bacteriocinas, lisozimas y sideróforos (Gibson y cols., 1987; Silva y cols., 1987; Sugita y cols., 1998; Yan y cols. 2002; El-Dakar y cols., 2007), así como por su capacidad para modular la respuesta inmune del hospedador (Balcázar y cols. 2007).

En nuestro estudio hemos trabajado inicialmente con dos cepas consideradas como probióticas para la acuicultura tanto por sus características *in vitro* como *in vivo*, que fueron probadas previamente en nuestro laboratorio (Sorroza y cols., 2012 y 2013). Las dos cepas, pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas se corresponden con *Vagococcus fluvialis* L21 aislada de intestino de lenguado (*Solea solea*) y *Enterococcus gallinarum* L1 aislada de intestino de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y corvina (*Argyrosomus regius*). Como ya se indicó en el Apartado V de este manuscrito, en los trabajos previos de Sorroza y cols. (2012 y 2013) se comprobó para estas dos cepas *in vitro* el antagonismo frente a *V. anguillarum* y otros patógenos, la producción de sustancias antibacterianas, resistencia a la bilis y pH ácidos, adhesión y crecimiento en el mucus intestinal; y también se verificó *in vivo* su inocuidad, y el efecto protector frente a una infección por *V. anguillarum* en la lubina, obteniendo un porcentaje relativo de supervivencia (PRS) de 42,3% para *V. fluvialis* L21 y del 20% para *E. gallinarum* L1. Hay que tener en cuenta que, a pesar de que estas dos cepas no están descritas como parte de la microbiota intestinal de peces marinos, los géneros bacterianos a los que pertenecen están ampliamente distribuidos en la naturaleza formando parte del tracto gastrointestinal de humanos y animales terrestres (Barbosa y cols., 2010).

Considerando que en los últimos años las investigaciones se han centrado en el estudio de los efectos que los probióticos ejercen sobre el sistema inmune de los hospedadores (Irianto y Austin, 2003; Panigrahi y cols., 2005; Díaz-Rosales y cols., 2009; Sharifuzzaman y cols. 2011; Cerezuela y cols., 2013) y a su vez, tomando en consideración los buenos resultados obtenidos en trabajos anteriores para estas dos cepas (Sorroza y cols., 2012; Sorroza y cols., 2013), en este trabajo estudiamos por

primera vez el efecto que estas cepas probióticas ejercen sobre el sistema inmune inespecífico de especies de interés acuícola para la acuicultura, pues de ello depende el mayor conocimiento del efecto de ambas cepas como probióticas, permitiendo así sumar valor de su utilización en la práctica empresarial.

Como ya se presentó en el Apartado V (Experiencia 1) de este manuscrito tanto *V. fluvialis* L21 como *E. gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas, tienen la capacidad de estimular *in vitro* a los leucocitos de riñón anterior de estas especies. A pesar de que las cepas objeto de estudio pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas y tienen mecanismos de acción muy parecidos, no tuvieron los mismos efectos en todas las especies objeto de estudio. Generalmente para las dos cepas observamos un efecto dosis-dependiente, siendo la dosis de  $10^8$  ufc/ml la que produce los efectos más estimulantes. Las cepas inactivadas con calor y luz UV mostraron efectos sobre los leucocitos, considerando así que estas cepas al inactivarse por estos métodos expresan receptores en su membrana cuyo efecto inmunomodulador puede ser comparable al de las cepas probióticas vivas. En este sentido estas cepas inactivadas con calor o luz UV, mantienen un efecto probiótico en dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y bocinegro (*Pagrus pagrus*), siendo a su vez respetuosas con el medio ambiente.

La primera línea de defensa contra la infección en los peces, así como en otras especies, es el sistema inmune innato; este incluye barreras físicas y sobre todo una variedad de leucocitos (monocitos/macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas) y diversas sustancias humorales. Los macrófagos son los primeros en iniciar la respuesta inmune innata, además de su función como células presentadoras de

antígenos, son los principales fagocitos de los peces y liberan las citoquinas pro-inflamatorias (Dalmo y cols., 1997). Las dos cepas probióticas objeto de nuestro estudio estimulan la actividad fagocítica en la dorada, lubina, corvina y bocinegro, obteniendo el máximo valor con la cepa viva de *V. fluvialis* L21 en lubina. Teniendo en cuenta los resultados del efecto protector *in vivo* obtenidos por Sorroza y cols. 2012 con la cepa *V. fluvialis* L21, y que la dosis que mejor funcionaba *in vitro* era  $10^8$  ufc/ml, nos centramos en las investigaciones posteriores, en el efecto de la cepa *V. fluvialis* L21 así como de sus productos extracelulares (ECPs) en la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune (Apartado V: Experiencias 2 y 3).

Pudimos observar que tanto la cepa *V. fluvialis* L21 como sus ECPs favorecen la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmune. En nuestro caso, los leucocitos de lubina que fueron estimulados *in vitro*, tanto con la cepa *V. fluvialis* L21 viva e inactivada así como sus ECPs, expresaron citoquinas relacionadas con la respuesta inmune. Y predominó fundamentalmente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como son la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la COX-2. Con estos estudios pudimos relacionar la acción directa que las citoquinas ejercen con las células efectoras. Como es el caso del pico de TNF- $\alpha$  que expresaron los leucocitos que fueron estimulados con la cepa *V. fluvialis* L21 inactivada con luz UV (Apartado V: Experiencia 2), que se corresponde con los valores máximos de actividad fagocítica tras ser incubados con la misma cepa igualmente inactivada por luz UV (Apartado V: Experiencia 1).

A pesar de que la cepa *V. fluvialis* L21 inactivada sobre todo por luz UV estimula la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata, en nuestro caso

podimos comprobar cómo los ECPs obtenidos de la citada cepa producen una respuesta pro-inflamatoria mucho más elevada que la que produce la cepa viva o inactivada.

Si bien la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como son la IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que induce la cepa de *V. fluvialis* L21, utilizada tanto viva como inactivada, se mantienen durante la primera hora después de la incubación con dicha cepa, la expresión génica que los ECPs ejercen sobre los leucocitos de lubina es mucho más elevada y más prolongada en el tiempo, pudiéndose encontrar valores elevados de citoquinas pro-inflamatorias hasta 24 horas después de la incubación, como es el caso de la IL-1 $\beta$  y IL-6. Podríamos considerar, por tanto, a los ECPs de *V. fluvialis* L21 como potentes inmunomoduladores para la lubina, teniendo en cuenta que en un futuro éstos podrían ser utilizados como coadyuvantes para vacunas en especies acuícolas.

Salinas y cols. (2006) comprobaron que suele existir una relación directa en la mayoría de las ocasiones entre pruebas realizadas *in vitro* con las realizadas *in vivo* y, aunque en los objetivos de este trabajo no se incluyó evaluar la respuesta inmune *in vivo*, sabemos que *V. fluvialis* L21 ejerce un buen efecto protector de la lubina durante una infección experimental frente a *V. anguillarum* (Sorroza y cols. 2012), pudiéndose deber dicho efecto, entre otras causas, a la estimulación del sistema inmune *in vivo* que la cepa *V. fluvialis* L21 ejerce sobre la lubina, cuando dicha cepa es administrada durante un periodo de tiempo previo con la dieta. Posiblemente, al igual que ocurre *in vitro*, tanto la cepa *V. fluvialis* L21 como sus ECPs estimularían *in vivo* la respuesta inmune inespecífica, lo que desencadenaría una fuerte respuesta pro-inflamatoria por parte del hospedador, como por ejemplo la fuerte expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , ambos considerados factores fundamentales del sistema inmune para la lucha contra las infecciones

## **VII.-CONCLUSIONES**

**PRIMERA.-** Tanto para la actividad fagocítica, explosión respiratoria como contenido en peroxidasa, de forma general entre las especies de peces utilizadas en este trabajo, la lubina fue la que mejor respondió a las acciones inmunomoduladoras de *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1 sobre los leucocitos de riñón anterior.

**SEGUNDA.-** Los ECPs de *Vagococcus fluvialis* L21 inducen una respuesta en los leucocitos de lubina de mayor intensidad y duración, que cuando se utiliza dicha cepa tanto viva como inactivada.

**TERCERA.-** Los ECPs de *Vagococcus fluvialis* L21 inducen una fuerte respuesta pro-inflamatoria en los leucocitos de lubina, presentando un índice de estimulación muy superior al POLY I:C, lo cual sugiere su utilización en la protección antivírica en esta especie.

**CUARTA:** Se ha demostrado por primera vez que *Enterococcus gallinarum* L1 y *Vagococcus fluvialis* L21, utilizadas tanto vivas como inactivadas, han demostrado su efecto inmunomodulador *in vitro* en especies relevantes para la acuicultura marina.



## **VIII.-RESUMEN**

La acuicultura es una de las industrias de mayor crecimiento en el sector de la alimentación, aumentando en las últimas décadas el consumo de productos procedentes de la acuicultura. El rápido crecimiento de esta actividad, se ha visto afectado por la aparición de enfermedades en los peces, principalmente bacterianas, originando grandes mortalidades y pérdidas en el sector. Las restricciones en el uso de antibióticos y quimioterápicos así como la ineficacia de algunas vacunas, convierten a los probióticos en una alternativa eficaz, y a la vez respetuosa con el medio ambiente para la prevención y control de enfermedades en acuicultura.

Entre los múltiples mecanismos de acción de los probióticos, la modulación de las respuesta inmune es uno de los más estudiados. En el presente trabajo nos hemos planteado estudiar *in vitro* el efecto inmunomodulador de dos cepas consideradas como probióticas para la acuicultura. Para ello, estudiamos inicialmente el efecto inmunomodulador *in vitro* de las cepas *Vagococcus fluvialis* L21 y *Enterococcus gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas por calor y luz ultravioleta, en diferentes especies de interés acuícola para la acuicultura: Dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*) y bocinegro (*Pagrus pagrus*) Posteriormente, estudiamos el efecto sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune como son (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, COX-2, Casp-3 y Mx), que tanto por la cepa *V. fluvialis* L21 viva como sus productos extracelulares (ECPs) ejercen sobre los leucocitos de lubina.

Los resultados sugieren que las cepas *V. fluvialis* L21 y *E. gallinarum* L1, tanto vivas como inactivadas, tienen la capacidad de estimular *in vitro* la actividad fagocítica, el



contenido en peroxidasa y la explosión respiratoria de los leucocitos de diferentes especies de interés acuícola. Por otro lado, *V. fluvialis* L21, tanto viva como inactivada, y sus ECPs estimulan la expresión de citoquinas proinflamatorias en la lubina, siendo esta expresión mayor en los leucocitos que fueron estimulados con los ECPs de *V. fluvialis* L21, por lo que se puede considerar tanto a *V. fluvialis* L21 como sus ECPs potentes inmunomoduladores para esta especie.

## **IX.-SUMMARY**

Aquaculture is one of the faster growing industries in the food sector. In recent decades the consumption of aquaculture products has increased. The rapid growth of this activity has been affected by the occurrence of fish diseases, mainly bacterial, causing high mortality and losses in this sector. Restrictions on the use of antibiotics and chemotherapy and the ineffectiveness of some vaccines, makes probiotics an effective alternative, friendly with the environment, for the control of diseases in aquaculture.

Among multiple mechanisms of action of probiotics, the modulation of the immune response is one of the most studied. In this study, the *in vitro* immunomodulatory effect of two strains considered as probiotic for aquaculture has been developed. We initially studied the *in vitro* immunomodulatory effect of the strain *Vagococcus fluvialis* L21 and *Enterococcus gallinarum* L1, both alive and inactivated by heat-shock and by ultraviolet light, in different species of cultured fish: Sea Bream (*Sparus aurata*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), meagre (*Argyrosomus regius*) and red porgy (*Pagrus pagrus*). Later, the effect on the immune related- genes expression such as (IL -1 , TNF- , IL-6 , IL-10, COX-2, Casp -3 and Mx ) of the strain *V. fluvialis* L21 and their extracellular products ( ECPs ) on sea bass leukocytes was also studied.

The results suggest that the strains *V. fluvialis* L 21 and *E. gallinarum* L1, both alive and inactivated, possess the ability to stimulate *in vitro* the phagocytic activity, the peroxidase content and the respiratory burst of leukocytes in different species of interest in aquaculture. Moreover, *V. fluvialis* L21, alive and inactivated and their ECPs, stimulate proinflammatory cytokine expression in sea bass and this expression was

higher in leukocytes were stimulated with ECPs of *V. fluvialis* L21, therefore, both being considered as potent immunomodulators for this specie.

## **X.-BIBLIOGRAFÍA**

- Abbass A, Sharifuzzaman SM y Austin B.** Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2010;33:31-7.
- Abraham TJ, Mondal S y Babu CS.** Effect of commercial aquaculture probiotic and fish gut antagonistic bacterial flora on the growth and disease resistance of ornamental fishes *Carassius auratus* and *Xiphophorus helleri*. *Journal of Fisheries Aquatic Science* 2008;25(1):27-30.
- Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J. y Real, F.** Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish and Shellfish Immunology* 2006;20:709-717.
- Acosta F, Lockhart K, Gahlawat SK, Real F y Ellis AE.** Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish and Shellfish Immunology* 2004;17:255-263.
- Aguirre G.** Aplicación de probióticos en la Acuicultura. Tesis Doctoral UANL, Monterrey, Nuevo León, 1993. pp 97.
- Akinbowale OL, Peng H y Barton MD.** Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal Applied Microbiol* 2006; 100:1103-1113.
- Al-Dohail MA, Hashim R y Aliyu-Paiko M.** Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research* 2009;40:1642-1652.
- Al-Harbi A y Uddin N.** Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 2005;250:566-572.

- Alexander JB e Ingram GA.** Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 1992;2:249-279.
- Aly SM, Ahmed YAG, Ghareeb AAA y Mohamed MF.** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to Challenge infections. *Fish and Shellfish Immunology* 2008;25:128-136.
- Anderson ES.** Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *British Medical Journal* 1968;3:333-9.
- Andlid T, Vázquez-Juárez R y Gustafsson L.** Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microbial Ecology* 1995;30:321-334.
- Antony S, y Philip R.** Bioremediation in Shrimp Culture Systems. *NAGA, WorldFish Center Quarterly* 2006;29:3-4.
- Aranishi F.** Purification and characterization of alpha (1)-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum. *Marine Biotechnology* 1999;1:33-43.
- Arijo S, Balebona C, Martinez-Manzanares E y Moriñigo MA.** Immune response of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) to antigens from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 2004;16:65-70.
- Askarian F, Kousha A, Salma W y Ringø E.** The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition* 2011;17(5):488-497.
- Apromar (2012).** Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. Informe anual sobre la Acuicultura en España 2012.
- Austin B, Stuckey L, Robertson P, Efendi I y Griffith D.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 1995; 18:93-96.

- Avendaño-Herrera R, Núñez S, Barja JL y Torzano AE.** Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from fish farms. *Aquaculture International* 2008; 16:1-11.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Múzquiz JL.** Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal Molecular Microbiology Biotechnology* 2009;17(3):153-157.
- Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O y Múzquiz JL.** *In vitro* adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 2007a;122:373-380.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zazuela I, Vandrell D, Girones O y Muzquiz JL.** Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2007b;51:185-93.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC y Marquez I.** Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition* 2007c; 97:522-527.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D y Muzquiz JL.** The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 2006;114:173-186.
- Barbey C, Budin-Verneuil A, Cauchard S, Hartke A, Laugier C y Pichereau V.** Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Veterinary Microbiology* 2009;135:334-345.
- Barbosa J, Gibbs P y Teixeira P.** Virulence factors among isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 2010;21:651-656.

- Bayne CJ y Gerwick L.** The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:725-743.
- Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M y Yano T.** Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:205-217.
- Benedetti S, Randelli E, Buonocore F, Zou J, Secombes CJ y Scapigliati G.** Evolution of cytokine responses: IL-1 $\beta$  directly affects intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism. *Cytokine* 2006;34(1-2):9-16.
- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C y Secombes CJ.** Evolution of interleukin-1 $\beta$ . *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2002;13:483-502.
- Bjorn B, Hormbaek T, Jacobsen T, Barkholt V y Granly A.** *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packet meats, culture, isolation, bacteriocin, identification, and meat application experiments. *International Journal Food Microbiology* 2003; 83(2):171-184.
- Blanch AR, Alsina M, Simón M y Jofre J.** Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Journal Applied of Microbioloy* 1997;82:729-34.
- Blazer VS.** Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *Journal of Aquatic Animal Health* 1991;3:77-86.
- Blum S y Schiffrin EJ.** Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotics? In: Tannock, G.W. (Ed.), *Probiotics and Probiotics: Where are WeGoing?* Academic Press, Wymondham, 2002;311–330.
- Boesen HT, Larsen MH, Larsen LH y Ellis AE.** *In vitro* interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup O2a. *Fish and Shellfish Immunology* 2001;11:415-431.

- Boesen HT, Pedersen K, Koch C y Larsen JL.** Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Fish and Shellfish Immunology* 1997;7:543-553.
- Bowden TJ, Bricknell I y Ellis AE.** Fish Vaccination, an overview. *Industry Report IntraFish* 2003; 5-20.
- <http://intrafish.no/global/industryreports/article65256.ece>
- Bravo J, Acosta F, Padilla d, Grasso V y Real F.** Mx expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in response to poly I: C, bacterial LPS and chromosomal DNA: Preliminary study. *Fish and Shellfish Immunology* 2011;31:170-172.
- Broughton EI y Walker DG.** Prevalence of antibiotic-resistant Salmonella in fish in Guangdong, China. *Foodborne Pathogens and Disease* 2009;6:519-521.
- Bruno M y Montville T.** Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environment Microbiology* 1993;59:3003–3010.
- Brunt J, Newaj-Fyzul A y Austin B.** The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disiases* 2007;30:573-9.
- Brunt J y Austin B.** Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2005; 28:693-701.
- Buonocore F, Randelli E, Casani D, Mazzini M, Cappuccio I, Secombes CJ y Scapigliati G.** cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination. *Aquaculture* 2005;245;301–310.
- Bullock GL y McLaughlin JA.** Advances in knowledge concerning bacteria pathogenic to foshes (1954-1968). En: Symposium on diseases of fishes and shellfishes. Snieszko, SF (Ed). American Fisheries Society, Washington. USA. 1970. Pp:231-242.



- Burr G, Gatlin D y Ricke S.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in Finnish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 2005;36:425-435.
- Burrus V, Marrero J y Waldor MK.** The current ICE age: Biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 2006;55:173-83.
- Cabello FC.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 2006;8:1137-1144.
- Cahill MM.** Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology* 1990;19:21-41.
- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T.** Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A* 2009;152:440-446.
- Campos CA, Rodríguez O, Calo-Mata P, Prado M y Barros Velázquez J.** Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International* 2006;39:356-364.
- Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F.** The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *European Journal of Biochemistry* 1991;202:3-14.
- Cerezuela R, Guardiola F, González P, Meseguer J y Esteban MA.** Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata*, L). *Fish and Shellfish Immunology* 2013;33:342-439.
- Chabrillon M, Rico RM, Balebona MC y Morinigo M.** Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 2005;28:229-237.

- Chang C y Liu W.** An evaluation of two probiotics bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing Edwardsiellosis in cultured European eel (*Anguilla anguilla* L). *Journal of Fish Diseases* 2002;25:311-315.
- Chen C y Chen S.** Water quality management with *Bacillus* spp. in the high density culture of red-parrot fish *Cichlasoma citrinellum* 9 C synspilum. *Nature Ambient Journal Aquaculture* 2001;63:66-73.
- Chettri JK, Raida MK, Holten-Andersen L, Kania PW y Buchman K.** PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leucocytes on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*. 2011;35:476-482.
- Chikindas M, García-Garcera M, Driesessen A, Ledebøer A, Nissen-Mejer V, Abee T, Konings W y Venema G.** Pediocin PA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Applied Environmental Microbiology* 1993;59:3577-3584.
- Chistiakov DA, Hellemas B y Volckaert FAM.** Review on immunology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;117:1-16.
- Chiu-Hsia Chiu, Chih-Hsin Cheng, Wen-Ren Gua, Yuan-Kuang Guu y Winton Cheng.** Dietary administration of the probiotics, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 2010;29:1053-1059.
- Choi SH y Yoon TJ.** Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) by dietary heat-inactivated potential probiotics. *Immune Network* 2008;8(3):67-74.
- Christensen HR, Frokiaer H y Pestka JJ.** Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2002;168:171-178.

- Coconier MH, Bernet MF, Chauviere G y Servin AL.** Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 1993;11:235-242.
- Collado R, Fouz B, Sanjuán E y Amaro C.** Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. *Disease of Aquatic Organism* 2000;43:91-101.
- Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Gioacchino MD, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R y Theoharides TC.** IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunology Letters* 2003;86:123-129.
- Corr SC, Hill C y Gahan CGM.** Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research* 2009;56:1-15.
- Czarniecki CW.** The role of tumor necrosis factor in viral disease. *Antiviral Research* 1993;22(4):223-258.
- Dabrowski K y Cieroszko A.** Proteinase inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. *Journal of Fish Biology* 1994;45: 801-809.
- Dalmo RA, Ingebrigten K y Bogwald J.** Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular references to reticuloendothelial sistema (RES). *Journal of Fish Diseases* 1997;20:241-273.
- Das A, Saha D y Pal J.** Antimicrobial resistance and *in vitro* gene transfer in bacteria isolated from the ulcers of EUS-affected fish in India. *Letters in Applied Microbiology* 2009; 49:497-502.
- Das S, Ward LR, Burke C.** Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;81:419-429.

- Datta N.** Transferable antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1971;64:533-4.
- De Kinkelin P, Dorson M y Hattenberger-Naudouy A.** Interferon-synthesis in trout and carp after viral infection. *Development and Comparative Immunology* 1982;2: 167-174.
- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P y Fleury, Y.** Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs* 2010;8(4):1153-1177.
- Díaz-Rosales P, Arijo S, Chabrilón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua ST, Martínez-Manzanares E, Balebona MC y Moriñigo MA.** Effect of two closely probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 2009; 293: 16-21.
- Díaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A, Cuesta A, Chabrilón M y Balebona MC.** Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 2006;20:482-92.
- Dimitroglou A, Merrifield D, Carnevali O, Picchiatti S, Avella M, Daniels C, Guroy D y Davies, S.** Microbial manipulations to improve fish health and production: A Mediterranean perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 2011; 30:1-16.
- Dinarello CA.** Interleukin-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 1997;8:253-265.
- Dinarello CA.** The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *The FASEB Journal* 1994;8:1314-1325.
- Do Vale A, Silva, MT, dos Santos NM, Nascimento DS, Reis-Rodrigues P, Costa-Ramos C, Ellis AE y Azevedo JE.** AIP56, a novel plasmid encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity

against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology* 2005; 58:1025–1038.

**Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant P, Aeschlimann JM y Schiffrin EJ.** Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *Journal of Dairy Science* 1999;82:863-869.

**Dorson M, Barde A y de Kinkelin.** Egtved virus induced rainbow trout serum interferon: some physicochemical properties. *Annual Microbiology* 1975;126:485-489.

**Dung TT, Haesebrouck F, Tuan NA, Sorgeloos P, Baele M y Decostere A.** Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictulari* isolates from natural outbreaks of \_ bacillary necrosis of Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam. *Microbiology Drug Resistance* 2008, 14:311-316.

**Duwat P, Cesselin B, Sourice S y Gruss A.** Lactococcus lactis, a bacterial model for stress response and survival. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 55, 83-86.

**El-Dakar AY, Shalaby SM y Saoud IP.** Assessing the use of dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition* 2007;13:407-412.

**Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Porter M y Gadd D.** The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 2002; 61:493-531.

**Ellis AE.** Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25(8-9):827-839.

**Ellis AE.** Optimizing factors for fish vaccination. En: Fish Vaccination. Ellis, A.E, Ed. Academix Press, New York. USA; 1988. p.32-46.

**Elward K y Gasque P.** “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Molecular Immunology* 2003;40(2-4):85-94.

- Engelsma MY, Huising MO, Van Muiswinkel WB, Flik G, Kwang J, Savelkoul HFJ y Verburg-van Kemenade BML.** Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002; 87:467-479.
- Evenberg D, De Graaff P, Lugtenberg B y Van Muiswinkel WB.** Vaccine-induced protective immunity against *Aeromonas salmonicida* tested in experimental carp erythrodermatitis. *Journal of Fish Diseases* 1988;11:337-50.
- Ewart KV, Williams J, Richards RC, Gallant JW, Melville K y Douglas SE.** The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed in vitro to *Aeromonas salmonicida* cultures in broth and in fish. *Development and Comparative Immunology* 2008;32:380-390.
- FAO.** Estado mundial de la acuicultura. 2012  
<http://www.fao.org/docrep/o16/i2727s/i2727s.pdf>
- FAO.** La acuicultura: única forma de hacer frente al futuro déficit de pescado. Reunión de la FAO para la contribución de la acuicultura al desarrollo sostenible. Roma 2008. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000701/index>
- FAO.** State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper 2006.  
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>
- FAO/OIE/WHO,** "Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance," Report of a Joint. *Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture And Antimicrobial Resistance*, 2006.
- FAO 2002.** Antibiotic residues in aquaculture products. The state of World Fisheries and Aquaculture 2002. *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*; 2002;74-83.
- Fearon DT.** Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 1997; 388: 324-334.
- Fearon DT y Locksley RM.** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50-54.

- Fergusson HW.** General pathology of fish. En: Ferguson HW Ed. Systemic pathology of fish. Anext and atlas of normal tissues and their responses in disease, Second Edition Scotian Press: London 2006;14-19.
- Fernández AB, Ruiz I y de Blas I.** El sistema inmune de los peces teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *Revista AquaTIC* 2002 nº17 [serial online], URL: <http://revistaaquativ.com/aquatic/art.asp?t=h&c=154>
- Fuller R.** A review: Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 1989; 66:365-378.
- Fuller.** Probiotics. En: Ray Fuller (Eds) *The Scientific Basis. Chapman and Hall.* London. 1992:327.
- Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A y Takahashi Y.** Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69: 5336-5342.
- Fredrickson A y Stephanopolous G.** 1981. Microbial competition. *Science* 1981;213: 972-979.
- Fricke WF, Welch TJ, Mc Dermott PF, Mammel MK, Le Clerc JE y White DG.** Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *Journal of Bacteriology* 2009;191:4750-7.
- Gatesoupe FJ.** Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 2007; 267: 20-30.
- Gatesoupe FJ.** The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999; 180:147-165.
- Gatesoupe FJ, Zambonino-Infante J, Cahu C y Quazuguel P.** Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 1997; 158, 117-127.
- Gaixa DE.** Über das verhalten einiger pathogener mikroorganismen in meerwasser. *Zeitschrift fur Hygiene und Infektionskrankheiten* 1889; 6:162-225

- García de la Banda I, Lobo C, León-Rubio JM, Tapia-Paniagua S, Balebon MC, Moriño MA, Moreno-Ventas X, Lucas LM, Linares F, Arce F, Arijó S.** Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 2010; 306:281-288.
- García-Castillo J, Chaves-Pozo E, Olivares P, Pelegrin P, Meseguer J y Mulero V.** The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004;61(11):1331-1340.
- García-Castillo J, Pelegrin P, Mulero V, Meseguer J.** Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 2002;54(3): 200-207.
- Ghosh S, Sinha A y Sahu C.** Isolation of putative probionts from the intestines of Indian major carps. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 2007;59:127-132.
- Gibson LF.** Bacteriocin activity and probiotic activity of *Aeromonas media*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 1999;85:243S-248S.
- Gill H, Rutherford K y Cross M.** Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology* 2001;21:264-271.
- Gildberg A y Mikkelsen H.** Effect of supplementing the diet to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 1998;167:103-113.
- Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E y Ringo E.** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiology* 1997;352:279-285.
- Gómez GD y Balcázar JL.** A review on the interactions between gut microbiota and the innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52:145-54.



- Gordon L, Cloeckaert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-Albert A y Ganière JP.** Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62: 65-71.
- Goldfeld AE y Tsai EY.** TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease. *Experimental Parasitology* 1996;84(2):300-303.
- Goldin BR y Gorbach SL.** Probiotics for humans. En: Fuller R, editor. Probiotics. London: Chapman and Hall; 1992:355-376.
- Gómez-Gil B, Rogue A, Velasco-Blanco G** Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 2002;211:43-48.
- Gómez-Gil B, Roque A y Turnbull JF.** The use and selection of probiotic for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000;191(1-3):259-270.
- Gomez-Gil B y Roque A.** Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. En: Flegel TW, Eds. Advances in shrimp biotechnology. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology; 1998.
- Gournier-Chateau N, Larpent JP, Castellanos I y Larpent JL.** Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 1994:192.
- Graham S y Secombes CJ.** Do fish lymphocytes secrete interferón-gamma?. *Journal of Fish Biology* 1990;36:563-573.
- Gram L, Melchiorson J, Spangaard B, Huber I y Nielsen TF.** Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 1999;65:969-973.
- Gudmundsdóttir BK y Magnadóttir B.** Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes*. *Fish and Shellfish Immunology* 1997;7:55-69.

- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ y Blum S.** Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;47:79-87.
- Haller O, Frese M y Kochs G.** Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Revue Scientifique et Technique de LaOffice International des Epizooties* 1998;17:220-230.
- Hansen Gh y Olafsen JA.** Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 1999; 38:1-26.
- Harikrishnan R, Balasundaram C y Heo M.** Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish and Shellfish Immunology* 2010;29(5):868-874.
- He F, Hirotsugu M, Kubota A, Ouwehand AC, Hosoda M y Hiramatsu M.** Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. *Microbiology and Immunology* 2005;49(11):993-997.
- Hellio C, Pons AM, Beaupoil C, Bourgougnon N y Le Gal Y.** Antibacterail, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2002;20:214-219.
- Heppell J y Davis HL.** Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advances in Drug Delivery Review* 2000;43:29-43.
- Hine PM** The granulocytes of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 1992;2:79-98.
- Hjelm M, Bergh Ø, Riaza A, Nielsen J, Melchiorsen J, Jensen S, Duncan H, Ahrens P, Birbeck H, Gram L.** Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology* 2004;27:360-371
- Hjelmeland K.** Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comparative biochemistry and Physiology B* 1983;76:365-372.

- Holmstrom C, Egan S, Franks A, McCloy S y Kjelleberg S.** Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; 41:47-58.
- Hood SK y Zottola EA.** Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science* 1988; 53:1514e6.
- Hoyles, L., Lawson, P., Foster, G., Falsen, E., Ohlen, M., Grainger, J., Collins, M. 2000.** *Vagococcus fessus* sp. nov. Isolated from seal and harbour porpoise. International. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000;50: 1151-1154.
- Huising MO, Stet RJ, Savelkoul HF y Verburg-van Kemenade BM.** The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* 2004;28(5):395-413.
- Iliev DB, Castellana B, Mackenzie S, Planas JV y Goetz FW.** Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Immunology* 2007;44:1803-1807.
- Irianto A y Austin B.** Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2003;26(1):59-62.
- Irianto A y Austin B.** Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2002a; 25:333-342.
- Irianto A y Austin B.** Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 2002b; 11:633-642.
- Ishida Y, Ahmed AM, Mahfouz NB, Kimura T, El-Khodery SA, Moawad AA y Shimamoto T.** Molecular analysis of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *The Journal of Veterinary medical science* 2010; 72:727-734.

- Isolauri E, Kirjavainen OV, Salminen S.** Probiotics a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 2002;50: 54-59.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, y Salminen S.** Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001;73:444-450.
- Jöborn A, Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL y Kjelleberg S.** Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* spp. strain Kl. *Journal of Fish Diseases* 1997; 20:383-392.
- Kaiser P, Rothwell L, Avery S y Balu S.** Evolution of the interleukins. *Developmental and Comparative Immunology* 2004;28:375-394.
- Kamei Y, Yoshimizu M, Ezura Y y Kimura T.** Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbial immunology* 1988;32: 76-73.
- Kato I, Tanaka K y Yokokura T.** Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. *International Journal of Immunopharmacology* 1999;21:121-131.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ y Gibson L.** Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 2008; 274:1-14.
- Karunasagar I, Pai R, Malahti GR, Karunasagar I.** Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 1994, 128:203-209.
- Kennedy SB, Tucker JW, Neidig CL, Vermer GK, Cooper VR y Jarrell JL.** Bacterial Management Strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimspinis*). *Bulletin of Marine Science* 1998;62:573-588.

- Kim DH y Austin B.** Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Journal Applied Microbiology* 2008; 47: 141-147.
- Kim DH y Austin B.** Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;114:297-304.
- Kishi A, Uno K, Matsubara Y, Okuda C y Kishida T.** Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp *coagulans* on interferon alpha producing capacity in humans. *The Journal of American College of Nutrition* 1996;15:408-412.
- Klenhamer T.** Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology* 1993; 12:39-86.
- Klesius PH y Sealey WM.** Chemotactic and chemokinetic responses of channel catfish macrophages to exoantigen from *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1996; 8:314-318.
- Klewicki R y Klewicka E.** Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. *Biotechnology Letters* 2004;26:317-320.
- Koussounadis AI, Ritchie DW, Kemp GJ y Secombes CJ.** Analysis of fish IL-1 $\beta$  and derived peptide sequences indicates conserved structures with species-specific IL-1 receptor binding: implications for pharmacological design. *Current Pharmaceutical Design* 2004;10:3857-3871.
- Krovacek K, Faris A, Ahne W y Mansson I.** Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus coated glass slides. *FEMS Microbiology Letter* 1987; 42:85-89.
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R y Nayak SK.** Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24:168-172.

- Kurath G.** Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique (Technical Office of Epizootics)* 2008; 27:175–196.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR y Cain KD.** Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Disease of Aquatic Organism* 2004; 59:17-26.
- Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M.** Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *The American Journal of Gastroenterology* 2002; 97:1182–1186.
- Lau JF y Horvath CM.** Mechanisms of type 1 interferon cell signaling and STAT mediated transcriptional responses. *Mount Sinai Journal of Medicine* 2002;69:156-168.
- Lawson P, Falsen E, Cotta M, Terence R.** *Vagococcus elongates* sp. isolated from a swine-maure storage pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007;57:751-754.
- Lee D, Ramos A, Macomber L y Shapleigh J.** Taxis response of various denitrifying bacteria to nitrate and nitrite. *Applied of Environmental Microbiology* 2002; 68: 2140- 2147.
- Lee JY, Hirono I y Aoki T.** Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Development and Comparative Immunology* 2000;24:407-415.
- Leong JC, Trobridge GD, Kim CHY, Johnson M y Simon B.** Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunology Review* 1998;166: 349-363.
- Lewin CS.** Mechanisms of resistance development in aquatic microorganisms in Chemothe-Rapy in Aquaculture: From Theory To Reality, C. Michel and D. Alderman, Eds. Office International des Epizooties, Paris, France, 1992. pp.288–301.

- Lewis W, Morris D.** Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of American Fish Society* 1986; 155, 183-195.
- Liu CH, Chiu CH, Wang SW, Winton C.** Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coiodes*. *Fish and Shellfish Immunology* 2012; 33:699-706.
- Liu ZG.** Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Research* 2005;15:24-27.
- Liu PC, Lee KK y Chen SN.** Susceptibility of different isolates of *Vibrio harveyi* to antibiotics. *Microbios* 1997, 91:175-180.
- Livak KJ y Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method). *Methods* 2001; 25:402-408.
- López-Castejon G, Sepulcre MP, Roca FJ, Castellana B, Planas JV, Meseguer J y Mulero V.** The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata*) is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Molecular Immunology* 2007;44:2772-2780.
- Lund V, Arne AJ, Coucheron D, Modalsli K y Syvertsen C.** The Aermomnas salmonicida A-layer protein is an important protective antigen in oil-adjuvanted vaccines. *Fish and Shellfish Immunology* 2003;15(4):367-372.
- Mcintosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM y Clark SE.** Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61: 1221-1228.
- Magnadóttir B.** Innate immunity of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 2006; 23:137-151.

- Mainwaring G y Rowley A.** Studies on granulocytic heterogeneity in elasmobranchs. En: Manning MJ y Ttner MF. Editors. *Fish Immunology*. Academic press London. 1985;57-69.
- Mäkelä PH, Lederberg J y Lederberg EM.** Patterns of sexual recombination in enteric bacteria. *Genetics* 1962; 47: 1427-39.
- Makridis P, Martins S, Vercauteren T, Van Driessche K, Decamp O, Dinis M.** Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 40:274-277.
- Matzinger P.** An innate sense of danger. *Immunology* 1998;10:399-415.
- Mazel D.** Integrins: agents of bacterial evolution. *Nature Review Microbiology* 2006; 4: 608-620.
- Medina M, Izquierdo E y Ennahar S, Sanz Y.** Differential immunomodulator properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clinical and Experimental Immunology* 2007;150:531-538.
- Mehrim AI.** Effect of dietary supplementation of Biogen (Commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2009;4:261-273.
- Miettinen M, Vuopio-Varkila J y Varkila K.** Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and Immunity* 1996;64:5403-5415.
- Minelli EB y Benini A.** Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008;20:180-193.
- Miranda CD, Kehrenberg C, Ulep C, Schwarz S y Roberts MC.** Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2003; 47:883-888



- Mishra VK, Mohammad G, Jha A.** Immunomodulation and anticancer potentials of yogurt probiotic. *EXCLI Journal* 2008;7:177-84.
- Mishra S, Mohanty S, Pattnaik P, Ayyappan S.** Probiotics: possible application in aquaculture. *Fish Chemistry* 2001; 21:31-37.
- Mohanty BR, Sahoo PK.** Immune response and expresión profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 2010;28:613-621.
- Mombelli B y Gismondo MR.** The use of probiotics in medicinal practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 16:531-536.
- Montero D, Grasso V, Izquierdo MS, Ganga R, Real F, Tort L, Caballero MJ y Acosta F.** Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology* 2008;24:147-155.
- Montes Aj y Pugh Dg.** The use of probiotics in food-animal practice. *Veterinary Medicine* 1993; 88:282-288.
- Montville TJ y ChenY.** Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied of Microbiology Biotechnology* 1998; 50:511-519.
- Morelli L.** *In vitro* selection of probiotic Lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues in Intestinal Microbiology* 2000;1:59-67.
- Moriarty Djw..** Diseases control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. En: Microbial biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. C.R. Bell, M Brylinsky and P. Johnson- Green Eds. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 1999
- Moriarty DJW.** Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. *InfoFish International* 1996;96:29-33.

- Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H y Hosoda M.** Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2002;66:1963e6.
- Motta SA y Brandelli A.** Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. Strain P34. *World Journal Microbiology Biotechnology* 2008; 24:641-646.
- Murray AG, Peeler EJ.** A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Prevrntive Veterinay Medicine* 2005;67:223-235.
- Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cellullar* 1997;88:355–365.
- Nagashima Y, Sendo A, Shimakura K, Shiomi K, Kobayashi T, Kimura B y Fuijii T.** Antibacterial facors in skin mucus of rabbitfishes. *Journal of Fish Biology* 2001;58:1761-1765.
- Naidu AS, Bidlac, WR y Clemens RA.** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1999; 38:13-126.
- Namba A, Mano N y Hirose H.** Phylogenetic abalysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *Journal in Applied Microbiology* 2007; 102:1307-1317.
- Nascimento DS, Pereira PJB, Reis MIR, do Vale A, Zou J, Silva MT, Secombes CJ y dos Santos NMS.** Molecular cloning and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). *Fish and Shellfish Immunology* 2007;23(3):701-710.
- Nayak SK.** Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 2010; 29:2-14.
- Nayak SK, Swain P, Nanda PK, Dash S, Shukla S y Meher PK.** Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology* 2008; 24:394-399.

- Nayak SK, Swain P y Mukherjee SC.** Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham). *Fish and Shellfish Immunology* 2007; 23:892-896.
- Niers LEM, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NOP y Knol EF.** Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down regulate T helper type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Allergy* 2005; 35:1481-1489.
- Nikoskelainen S, Ouwehand A, Bylund G, Salminen S y Lilius, E.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology* 2003;15,443-452.
- Nikoskelainen S, Ouwehand A, Salminen S y Bylund G.** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 2001a; 198:229-236.
- Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G y Ouwehand A.** Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for the prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 2001b; 67(6):2430-2435.
- Nogami K, Hamasaki K, Maeda M y Hirayama K.** Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiology* 1997; 358:291-295
- Nogami K y Maeda M.** Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science* 1992; 49:2373-2376.
- Nomoto K.** Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;10:583-592.

- Norman A, Hansen LG y Sørensen SJ.** Conjugative plasmids: vessels of the comunal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal SocietyB* 2009;364:2275-2289.
- Noya M y Lamas J.** Response of eosinophilic granule cells of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Teleostei) to bacteria and bacterial products. *Cell Tissue Review* 1996;287:223-230.
- Nurmi JT, Puolakkainen PA y Rautonen NE.** Bifidobacterium lactis sp. 420 upregulates cyclooxygenase (Cox)-1 and down-regulates Cox-2 gene expresión in a Caco-2 cell culture model. *Nutrition and Cancer* 2005;51:83-92.
- Nya EJ y Austin B.** Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 2010;108:686-694.
- Olafsen JA y Hansen GH.** Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *Journal of Fish Biology* 1992;40:141-156.
- Olsson JC, Westerdahl A, Conway PL y Kjelleberg S.** Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 1992;58:551-556.
- Onarheim AM, Wiik R, Burghardt J y Stackebrandt E.** Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold seawater; description of *Vibrio ilipiscarius* sp. *Systematic Applied Microbiology* 1994; 17:370-379.
- Ordás MC, Costa MM, Roca FJ, Lopez-Castej NG, Mulero V, Meseguer J, Figueras A y Novoa B.** Turbot TNFalpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology* 2007;44(4):389-400.
- Ortuño J, Cuesta A, Rodriguez A, Esteban MA y Meseguer J.** Oral administration of yeast *Saccharomyces cereviceae* enhances the cellular innate immune response

of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002; 85:41-50.

**Osorio CR, Marrero J, Wozniak RAF, Lemos ML, Burrus V y Waldor MK.** Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *Journal of Bacteriology* 2008; 190: 3353-61.

**Ouwehand AC, Salminen S.** The health effects of cultures milk products viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal* 1998; 8:749-758.

**Pan X, Wu T, Song Z, Tang H, Zhao Z.** Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyricum* CB2. *Journal of Fish Diseases* 2008;31:679-86.

**Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T y Sugita H.** Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Development and Comparative Immunology* 2007; 31:372-382.

**Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S y Sugita H.** The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2005; 243:241-254.

**Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, Puangkaew J, Satoh S, Sugita H.** Immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004;102:379-388.

**Palic D, Ostoji J, Andreasen C y Roth J.** Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology* 2007;31:805-816

- Peddie S, Zou J y Secombes CJ.** Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. *Veterinary Immunopathology* 2002;86:101-113.
- Pereyra BS y Lemonnier D.** Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods. *Nutrition Reserch* 1993;13:1127-1140.
- Picchietti S, Fausto AM, Randelli E, Carnevalli O, Taddei AR, Buonocore F, Scapigliati G y Abelli L.** Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L). *Fish and Shellfish Immunology* 2009; 26:378-376.
- Pieters N, Brunt J, Austin B y Lyndon AR.** Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105:723-32.
- Pinto RD, Nascimento DS, Reis MI, do Vale A y Dos Santos NM.** Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-10. *Molecular Immunology* 2007;44:2066-2075.
- Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M y Endo M.** Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;113:339-347.
- Pembroke JT y Piterina AV.** A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements. *FEMS Microbiol Letters* 2006;264:80-88.
- Penagos G, Borato P y Iregui C.** Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica de Colombia* 2009;14:3-24.

- Pérez T, Balcázar JL, Peix A, Valverde A, Velázquez E, de Blas I y Ruiz-Zarzuola I.** *Lactococcus lactis* subsp. *truttae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 2010;61(8):1894-1898.
- Plumb JA.** Overview of Warmwater fish diseases. *Journal of Applied Aquaculture* 1999; 9:1-10
- Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Mammeri H, Liard A, y Nordmann P.** Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents Chemother* 2005;49:3523-25.
- Pond MJ, Stone DM y Alderman DJ.** Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2006;261:194-203.
- Priault G, Fliss I y Pecquet S.** Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003;10:787-792.
- Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, Okamoto N, Satoh S, Takeuchi T y Watanabe T.** Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish and Shellfish Immunology* 2004; 16:25-39.
- Quade MJ y Roth JA.** A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997;58:239-248.
- Rauch G, Kalbe M y Reusch TB.** One day is enough: rapid and specific host-parasite interactions in a stickleback-trematode system. *Biology Letters* 2006;2(3):382-384.
- Raida MK y Buchmann K.** Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*.

*Fish and Shellfish Immunol* 2008;25:533-41.

**Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK.** Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:658-672.

**Reis MIR, Nascimento DS, do Vale A, Silva MT y dos Santos NMS .** Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. *Molecular Immunology* 2007;44:774-783.

**Reglamento (CE) N°1353/2007** de la comisión de 20 de noviembre de 2007 que modifica, en lo referente a la monensina, la lasalocida y la tilvalosina, el anexo I del **Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo** por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

**Reyes- Becerril M, Salinas I, Custa A, Meseguer J, Tovar-Ramirez D, Ascensio-Valle F y Esteban MA.** Oral delivery of live yeast *Debaromyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish and Shellfish Immunology* 2008; 25:731-739.

**Ringo E, Løvmo L, Kristiansen M, Bakken I, Salinas I, Myklebust R, Olsen R y Mayhew, T.** Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research* 2010;41:451-467.

**Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M y Smith P.** Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66:3883-3890.

**Robertsen B.** The interferon system of teleost fish . *Fish and Shellfish Immunology* 2006; 20:172-191.



- Robertsen B, Trobridge, G y Leong J.** Molecular cloning of the double-stranded RNA inducible Mx genes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 1997;21:397-412.
- Robertsen B, Rorstad G, Engstad, RE y Raa, J.** Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* 1990;13:391-400.
- Roca FJ, Cayuela ML, Secombes CJ, Meseguer J y Mulero V.** Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Molecular Immunology* 2007;44:472-478.
- Román L, Real F, Padilla D, El Aamri F, Déniz S, Grasso V y Acosta F.** Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish and Shellfish Immunology* 2013;35:1329-1322.
- Román L, Real F, Sorroza L, Padilla D, Acosta B, Grasso V, Bravo J y Acosta F.** The *in vitro* effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology* 2012; 33:1071-1075
- Rombour JHWM, Taverne N van de Kamp M y Taverne-Thiele AJ.** Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* 1993;17:309-317.
- Rosenfeld WD y Zobell CE.** Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology* 1947; 54:393-398.
- Rutherford-Markwick KJ y Gill HS.** Probiotics and immunomodulation. En: Hughes DA, Darlington LG, Bendich A, Eds. Diet and human immune function. Totowa, NJ: Humana Press; 2004:327-344.
- Sadler AJ y Williams BRG.** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:559-568.

- Sáenz de Rodrigáñez MA, Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Smidt H, Arijo S, León-Rubio J, Alarcón F, Balebona M, Moriñigo M, Cara J y Moyano, F.** Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition* 2009;15:177-185.
- Salazar-Mather TP y Hokeness KL.** Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2006;303:29-46.
- Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchiatti S, Roque A y Furones D.** Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 2008;25:114-23.
- Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, Meseguer J, Chabrilón M y Moriñigo MA.** Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 111:279-86.
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MA y Meseguer J.** Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on Gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology* 2005;19:67-77.
- Sahu KM, Swarnakumar NS, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L.** Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology* 2008; 48:299-308.
- Sakai M.** Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999; 172:63-92.
- Sakai M, Yoshida T, Astuta S y Kobayashi M.** Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *Journal of Fish Diseases* 1995; 18:187-190.

- Salminen S, Gueimonde M y Isolauri E.** Probiotics that modify disease risk. *Journal of Nutrition* 2005;135:1294-1298.
- Salminen S, Isolauri E y Salminen E.** Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains for future challenge. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 70:347-358.
- Samuel CE.** Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Review* 2001;14:7798-809.
- Scapigliati G, Costantini S, Colonna G, Facchiano A, Buonocore F, Boss. P, Cunningham C, Holland JW y Secombes CJ.** Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Developmental and Comparative Immunology* 2004;28:429-441.
- Savan R y Sakai M.** Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genome and Proteome* 2006;1:89-101.
- Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, Cunningham C y Zou J.** Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:713-723.
- Secombes CJ, hardie LJ y Daniels G.** Cytokines in fish: an update. *Fish and Shellfish Immunology* 1996;6:291-304.
- Secombes CJ.** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB, Ed. *Techniques in fish immunology*. FairHaven, NJ: SOS Publications; 1990:137-154.
- Sepulcre PM, Sarropoulou E, Kotoulas, Meseguer J y Mulero V.** *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Molecular Immunology* 2007; 44:3751-3757.
- Shao ZJ.** Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspective and future possibilities. *Advances in Drug Delivery Review* 2001;50:229-243.

- Sharifuzzaman SM, Abbass A, Tinsley JW, Austin B.** Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 2011;30:30347-353.
- Sharifuzzaman SM y Austin B.** Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish and Shellfish Immunology* 2010;29:212-216.
- Sharifuzzaman SM y Austin B.** Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* 2009;27:440-445.
- Shima T, Fukushima K, Setoyama H, Maoka A, Matsumoto S y Hara T.** Differential effects of two probiotic strains with different bacteriological properties on intestinal gene expression, with special reference to indigenous bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2008;52:69-77.
- Silva M, Jacobus NV, Deneke C y Gorbach SL.** Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1987;8:1231-1243
- Skjermo J y Vadstein O.** Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 1999;177:333-343.
- Smith P y Christofilogiannis P.** Application of normalised resistance interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture* 2007;272:223-230.
- Smith P y Davey S.** Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* 1993;16:521-524.
- Smith HW.** Antibiotic-resistant bacteria in animals: the dangers to human health. *British Veterinary Journal* 1974;130:110-119.

- Soh SE, Ong DQR, Gerez I, Zhang X, Chollate P, Shek LP-C.** Effect of probiotic supplementation in the first 6 months of life on specific antibody responses to infant Hepatitis B vaccination. *Vaccine* 2010;28:2577-2579.
- Sommerset I, Skern R, Biering E, Bleie H, Fiksdal I, Grove S y Nerland A.** Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* 2005;18:13-29.
- Son VM, Changa CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Cheng W.** Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology* 2009;26:691-8.
- Song Z, Wu T, Cai L, Zhang L y Zheng X.** Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang University Science B* 2006;7:596-602.
- Sorroza L, Real F, Acosta F, Acosta B, Déniz S, Román, El Aamri F y Padilla D.** A probiotic potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* infection. *Fish Pathology* 2013;48:9-12.
- Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Román L, Grasso V, Vega F y Real F.** Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology* 2012;155:369-373.
- Sørum H.** Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. En: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Edited by Aerestrup F. ASM Press;2006;213-238.
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick EB, Pipper CB y Martinussen T.** The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 2001;3:755-765.

- Spanggaard B, Huber I, Nielsen T, Appel Kf y Gram L.** The microflora of rainbow trout intestines: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 2000;182:1-15.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH y Schreiber RD.** How cells respond to interferons?. *Annals Reviews in Biochemical* 1998;67:227-264.
- Steinshamn S, Bemelmans MH, van Tits LJ, Bergh K, Buurman WA y Waage A.** TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *The Journal of Immunology* 1996;157(5):2155-2159.
- Subramaniam S, Stansberg C y Cunningham C.** The interleukin 1 receptor family. *Developmental and Comparative Immunology* 2004;28:415-428.
- Sugita H, Hirose Y, Matsuo N y Deguchi Y.** Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 1998;165(3-4):269-280.
- Sugita H, Matsou N, Shibuya K y Deguchi Y.** The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora os freshwater fish. *Aquaculture* 1991;92:267-276.
- Sullivan DJO.** Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 1981;49:1751-1760.
- Summers AO.** Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Animal Biotechnology* 2006;17:125-135.
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, Figueras A y Novoa B.** Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish and Shellfish Immunology* 2004;16:11-24.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Kim SM, Park S y Yoshikawa T.** Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisher Sciencitic* 2006; 72:755-66.

- Tapia-Paniagua S, Chabrilón M, Díaz-Rosales P, De la Banda I, Lobo C, Balebona, MC y Moriño, MA.** Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiology Ecology* 2010;60(2):310-319.
- Tarazona JV y Muñoz MJ.** Water quality in salmonid culture. *Reviews in Fisheries Science* 1995; 3: 109-139.
- Ten Brink B, Minekus M, Bol J y Huis-Veld J.** Production of antibacterial compounds by Lactobacilli. *FEMS Microbiololy Review* 1987; 46-64.
- Tendencia E y de la Peña LD.** Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 2001; 195:193-204.
- Teo JWP, Suwanto A y Laa Poh C.** Novel  $\beta$ -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; 44:1309-1314.
- Thyssen A y Ollevier F.** *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. *Aquaculture* 2001;200:259-269.
- Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombout FM y Beynen AC.** Monostrain, multistrain and multispecies probiotics and comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 2004;96:219-233.
- Tizard IR.** Immunology: an introduction. 4th ed. London: *Saunders College Publishing*; 1995.
- Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Robaina L, Real F, Sweetman J, Tort L, Izquierdo MS.** Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology* 2007;23:969-981.
- Tovar D, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Gatesoupe FJ y Vazquez-Juarez R.** Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 2004; 234:415-427.

- Trobridge GD, Chiou PP y Leong JC.** Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mc3 cDNAs and characterization of trout Mx protein in salmon cells. *Journal of Virology* 1997;71: 5304-5311.
- Trobridge GD y Leong JAC.** Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal of Interfeon Cytokine Research* 1995;15:691-702.
- Vallejo M, Marguet E y Etchechoury V.** Características de  $\alpha$ -acetolactato sintetasa y producción de diacetilo por *Enterococcus faecium* ETw7 y *Enterococcus faecalis* ETw23. *Revista Perú de Biología* 2008;15(1):97-100.
- Van der Marel M, Schroers V, Neuhaus H y Steinhagen D.** Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 2008;31(5):321-30.
- Van Elsas J y Bailey MJ.** The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; 42:187-197.
- Vázquez J, González M y Murado M.** Effect of lactic acid bacteria cultures on pathogens microbiota from fish. *Aquaculture* 2005;245:149-161.
- Vendrell D, Balcázar J, Calvo A, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O y Múzquiz J.** 2009. Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 2009;71(2);331-333.
- Verschuere L, Rombaur G, Sorgeloos P y Verstraete W.** Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000a; 64: 655-671.
- Verschuere L, Heang H, Criel G, Sorgeloos P y Verstraete W.** Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 2000b;66(3):1139-1146.
- Vilcek J y Lee TH.** Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266:7313-7316.



- Villamil L, Tafalla C, Figueras A y Novoa B.** Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9:1318-1323.
- Vine NG, Leukes WD y Kaiser H.** Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 2006; 40:404-427.
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T.** Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases* 2004;27:319-326.
- Vollstad D, Bogwald J, Gaserod O y Dalmo RA.** Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor*, Olafsen) fry. *Fish and Shellfish Immunol* 2006;20:548-561.
- Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ.** Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4<sup>+</sup> T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor b and interleukin-10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001;8:695-701.
- Wang YB, Tian ZQ, Yao JT y Li WF.** Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture* 2008;277:203-207.
- Wang Y y Han J.** The role of probiotic cell wall hydrophobicity in bioremediation aquaculture. *Aquaculture* 2007; 269:349-354.
- Wang T, Holland JW, Bols N y Secombes CJ.** Cloning and expression of the first nonmammalian interleukin-11 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEBS Journal* 2005;272:1136-1147.
- Wang, Zhiguo, Han, Xuemei.** How to adjust water quality by using microorganism. *Ningxia Journal Agriculture Forestry Science Technology* 2004; 6:60.
- Watanabe T.** Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Microbiology Review* 1963; 27: 87-115.

- Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso M-L y Rasko DA.** Multiple antimicrobial resistance in plague: An emerging public health risk. *Plos one* 2007;300-309.
- Wozniack RA y Waldor MK.** Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements. Enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Review Microbiology* 2010;8:552-563.
- Wride MA y Sanders E3J.** Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anatomy and Embriology* 1995;191: 1-10.
- Yan I, Boyd KG y Burgess JG.** Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Marine Biotechnology* 2002;4:356-366.
- Yap WH, Tay A, Brenner S, Venkatesh B.** Molecular cloning of the pufferfish (Takifugu rubripes) Mx gens and functional characterization of its promoter. *Immunogenetics* 2003;10:705-713.
- Zapata AG y Cooper EL 1990.** The immune system: Comparative histopathology. Cell Biology International Reports. J Wiley and sons Eds. 1990;15: 267-267.
- Zhang W, Azevedo MSP, Wen K, Gonzalez A, Saif LJ, Li G.** Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine* 2008;26:3655-3661.
- Zhao ZJ.** Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities. *Advances in Drug Delivery Reviews* 2001;50:229-243.
- Zhou X, Tian Z, Wang Y y Li W.** Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology Biochemistry* 2010;36(3):501-509.
- Zorrilla I, Arijo S, Chabrillon M, Diaz P, Martinez-Manzanares E y Balebona MC.** *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup),

and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products.  
*Journal of Fish Disease* 2003;26:103-108.

**Zou J, Bird S, Truckle J, Bols N, Horne M y Secombes CJ.** Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEBS Journal* 2004;271:1913-1923.

**Zou J, Neumann NF, Holland JW, Belosevic M, Cunningham C, Secombes CJ y Rowley AF.** Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochemical Journal* 1999;340:153-159.

## ANEXO I

### Medios de cultivo y soluciones empleadas

#### **Medios de cultivo:**

##### ➤ **Caldo infusión Cerebro Corazón (BHIB)**

Composición (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	7,5 g
Infusión de corazón de res	10 g
Dextrosa	2 g
Peptona de gelatina	10 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5 g
Cloruro sódico (NaCl)	5 g

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C

Preparación:

Suspender 37 g en 1 l de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Dejar enfriar hasta 45°C y conservar en la nevera.

##### ➤ **Agar infusión Cerebro Corazón (BHIA)**

Composición (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	7,5 g
Infusión de corazón de res	10 g
Dextrosa	2 g
Peptona de gelatina	10 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5 g
Cloruro sódico (NaCl)	5 g
Agar	15g

pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C

**Preparación:**

Suspender 52 g en 1 l de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas de petri estériles con 20 ml en cada una.

**Soluciones:**➤ **Tampón Fosfato Salino**

Composición (por litro)

Dihidrogenofosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (1,4 mM)	0,24 g
Cloruro potásico (KCl) (2,7 mM)	0,2 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (0,01 M)	1,44 g
Cloruro sódico (NaCl) (0,137 M)	8 g

**Preparación:**

Mezclar todos los ingredientes en 1 l de agua destilada, agitar bien hasta que estén todos disueltos. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos.

➤ **Agua DEPC**

Composición (por 100ml)

Dietilpirocarbonato (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	0,1 ml
--	--------

**Preparación:**

Mezclar el ingrediente en 100 ml de agua destilada, agitar toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos.

## ANEXO II

### Dirección de laboratorios y casas comerciales

<b>Beckman</b>	Beckman Coulter España. Costa Rica 72, 6G. Madrid
<b>Biogen</b>	Biogen, Científica. Castelar 15, 28028 Madrid
<b>Biorad</b>	Bio-rad Laboratories, S.A., Alcobendas, Madrid, España.
<b>Chiesi</b>	Chiesi España S.A. Torre Realis, Plaça D'Europa 41-43. Planta 10, 08908, Barcelona
<b>Eppendorf</b>	Eppendorf, Ibérica, S.L.U. Avda Tenerife, 2 Edificio 1, Planta 3 29703 San Sebastián de los Reyes, Madrid
<b>Gibco</b>	Gibco, Gaithersburg, MD, USA
<b>Lonza</b>	Lonza. Príncipe Vergara 55, 5ºB, 28006 Madrid
<b>Millipore</b>	Millipore Iberia S.A.U. Avd Burgos, 114, 28050 Madrid
<b>Panreac Química, S.A.</b>	Panreac Quimica S.A.U., Polígono Pla de la Bruguera, Castellar del Vallès, Barcelona, España.
<b>Pronadisa</b>	Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, España.
<b>Sigma</b>	Sigma-Aldrich Química, S.A., Tres Cantos, Madrid,
<b>Skretting</b>	Skretting España S.A., Cojóbar, Burgos, España.
<b>Thermo</b>	Thermo Scientific Roskilde, Dinamarca.
<b>VWR</b>	VWR International Eurolab S.L. C/ De la Tecnología, 5-17 Llinars Park 08450 Llinars del Vallés, Barcelona

## AGRADECIMIENTOS

*Ahora llega uno de los puntos más importantes de este manuscrito, puesto que es el momento de dar las gracias a todas las personas que me han ayudado y han contribuido en la realización de este trabajo.*

*En primer lugar agradecer a mi Director de Tesis, el Catedrático Fernando Real Valcárcel la posibilidad de formar parte del grupo de investigación, y de haberme brindado su apoyo durante estos años para poder realizar este trabajo.*

*Agradecer al Dr. Félix Acosta Arbelo, por su dedicación en el día a día, por aconsejarme, por enseñarme y por estar ahí siempre, gracias por dirigirme este trabajo.*

*A mi otra directora, la Dra. Begoña Acosta Hernández por el apoyo recibido durante estos años.*

*Agradecer al Dr. Daniel Padilla su ayuda, sus ánimos, sus consejos y el haberme iniciado en este maravilloso pero a la vez duro mundo de la investigación.*

*No puedo olvidarme de mis compañeras y amigas, la Dra. Lita Sorroza y la Dra. Valentina Grasso, gracias por estar ahí. Así como que tampoco puedo olvidarme de mis amigas y todavía compañeras de laboratorio, la Dra. Jimena Bravo, Fatima y Judit, por todos los momentos que hemos pasado en estos años de aprendizaje, de lucha, de risas, y como no... de cantes!*

*Agradecer a todos los demás compañeros del IUSA con los también he compartido el día a día y que me han ayudado durante estos años. A Silvia Torrecillas por sus buenos consejos y por las buenas risas que nos hechamos! A Daniel Montero por facilitarme los peces para las experiencias.*

*A Carmen, Natalia, Juan, Tibi, M<sup>a</sup> José, Eva, Marisol, Juan Manuel, Tacho, Mercedes, Rafa, Ana, M<sup>a</sup> Jesús, Davinia, Orestes, Carlos, Lidia, a las chicas de parásitos.... Y así podría llenar muchas y muchas hojas... Gracias!*

*No me puedo olvidar de todos mis amigos que también forman parte de mi "familia" Canaria y siempre me hacen sentir como en casa.*

*Y ahora viene el momento en el que a una se le pone el nudo en la garganta... No hay palabras que puedan describirlo; son mis pilares, te lo dan todo, luchan, te enseñan, te educan, te quieren. Gracias a mis padres, Carlos y Nati por haberme enseñado tantas y tantas cosas y por hacer que cada día sea mejor persona, Os quiero!!*

*A mi hermano Carlos y a Mónica que siempre están cuando se les necesita! Gracias!*

*A mi padrino el Dr. José Fuentes, por sus sabios consejos tanto en lo personal como en lo profesional.*

*Y como no... agradecer a mi amigo, a mi compañero, a mi amor...el apoyo, la energía, los ánimos durante todos estos años. Sami, eres lo más bonito de mi vida ! Gracias!!!!*

*En general, Gracias a todo el mundo que ha puesto su granito de arena para que hoy pueda estar presentando este trabajo. Gracias de todo corazón!!!*

*Lorena Román*



