



# *Resultados*

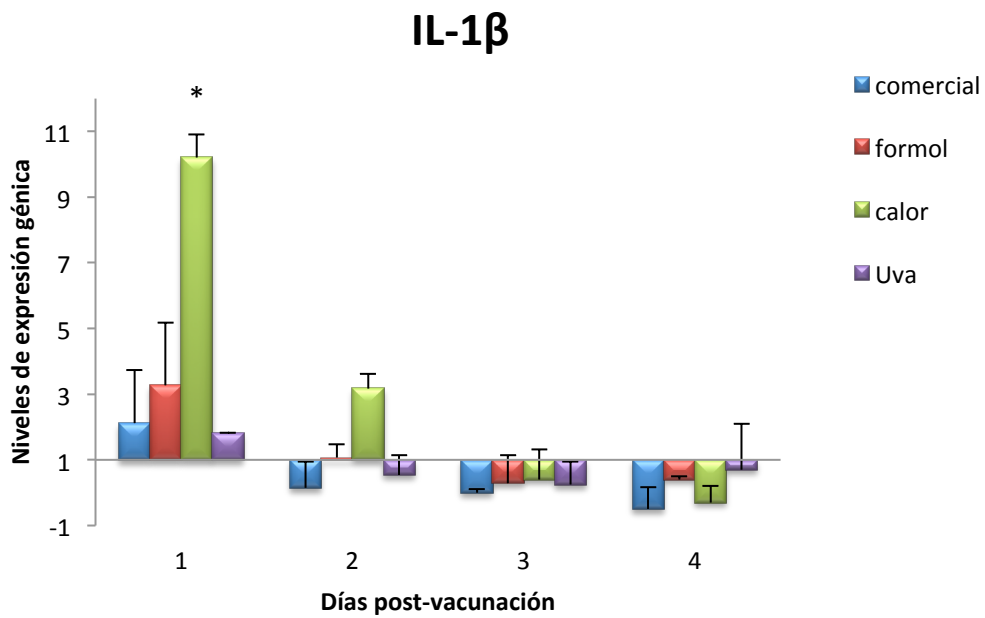


---

## 4.1. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS Y MX EN RESPUESTA A VACUNACIÓN FRENTE *PHDP*

### 4.1.1. Expresión del gen IL-1 $\beta$

En la Figura 13 se puede observar la cinética de expresión del gen IL-1 $\beta$  en los peces inmunizados con las diferentes vacunas. La IL-1 $\beta$  tiene su máxima expresión el primer día post-vacunación, y de entre todos los grupos de peces el único que presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo fueron los peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor (con valores de hasta diez veces el control negativo). Al segundo día, los grupos de peces inmunizados con las vacunas inactivadas con calor y formol expresan los niveles de IL-1 $\beta$  por encima de los valores basales aunque sin diferencias estadísticamente significativas. El resto de los días todos los grupos presentan *down-regulation* sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos.

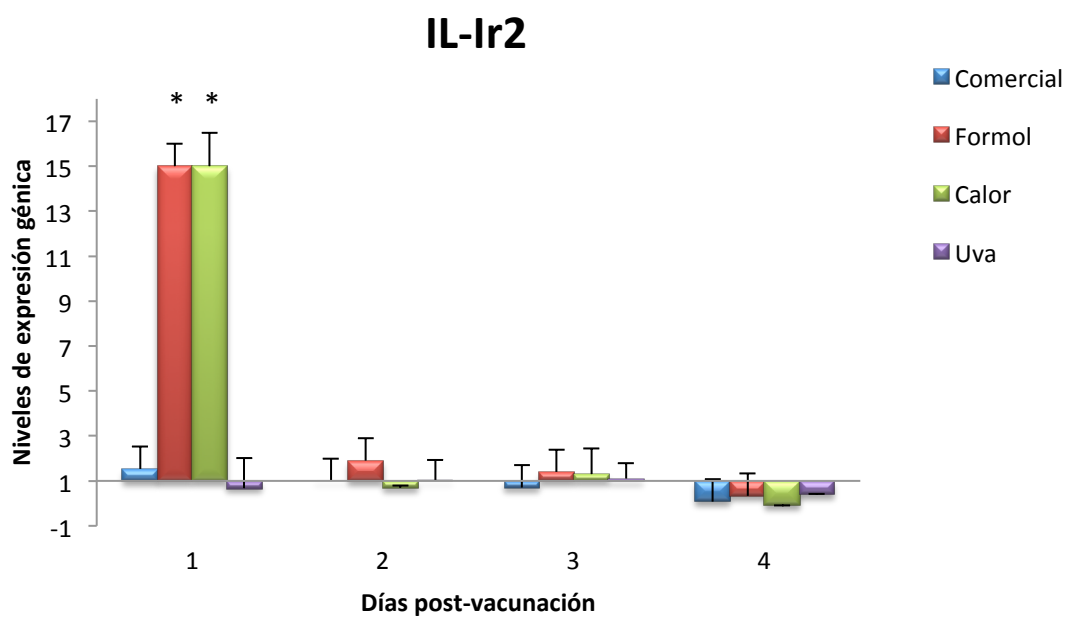


**Figura 13.** Expresión génica de IL-1 $\beta$  en los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. El asterisco encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros grupos.

#### **4.1.2. Expresión del gen IL-1r2**

En la Figura 14 se puede observar la cinética de expresión del gen IL-1r2 en los peces inmunizados con las diferentes vacunas. IL-1r2 al igual que IL-1 $\beta$  también se expresa mayoritariamente el primer día post-vacunación. Podemos ver una correlación entre la cinética de expresión de este receptor y la interleuquina IL-1 $\beta$ , aunque en este caso también hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control negativo y el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol, además del grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor.

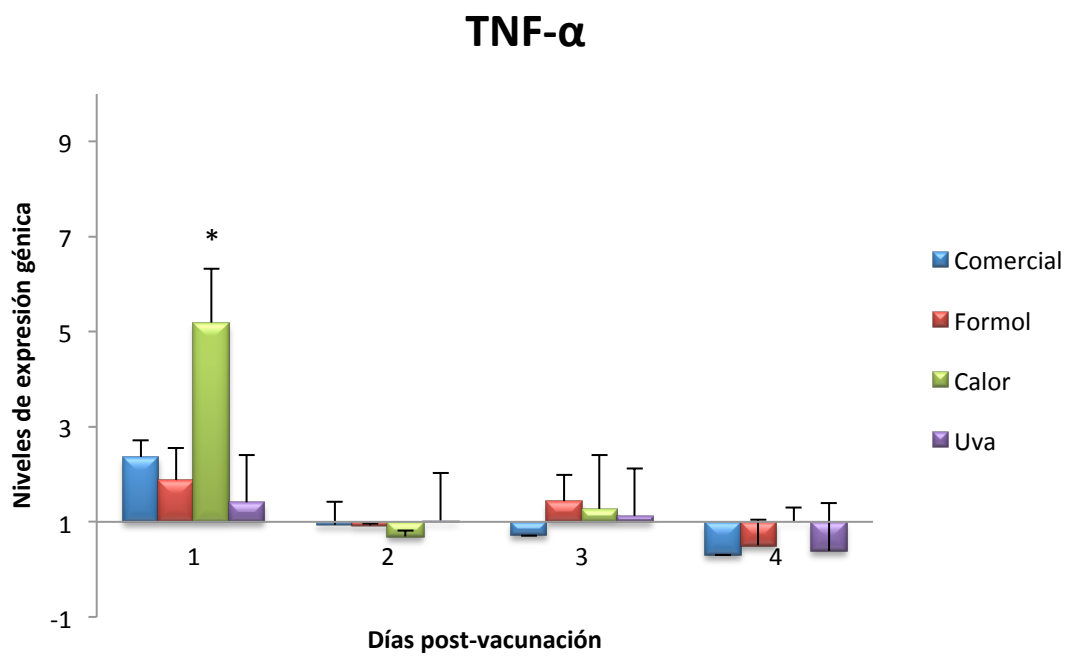
Los niveles de expresión génica de este receptor alcanzan valores 15 veces más altos que el control negativo en los grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol y vacuna inactivada con calor al día uno. El resto de los días los niveles de expresión no son significativamente diferentes entre grupos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 14.** Expresión génica de IL-Ir2 en los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. Los asteriscos encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros grupos.

#### **4.1.3. Expresión del gen TNF- $\alpha$**

En la Figura 15 se puede observar la cinética de expresión del gen TNF- $\alpha$  en los peces inmunizados con las diferentes vacunas. El TNF- $\alpha$  tiene una cinética parecida a los otros genes estudiados. También en este caso la mayor expresión se encuentra el primer día post-vacunación. Encontramos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor y el resto de los tratamientos. El nivel de expresión alcanzado en este grupo son cinco veces más altos que el control negativo.



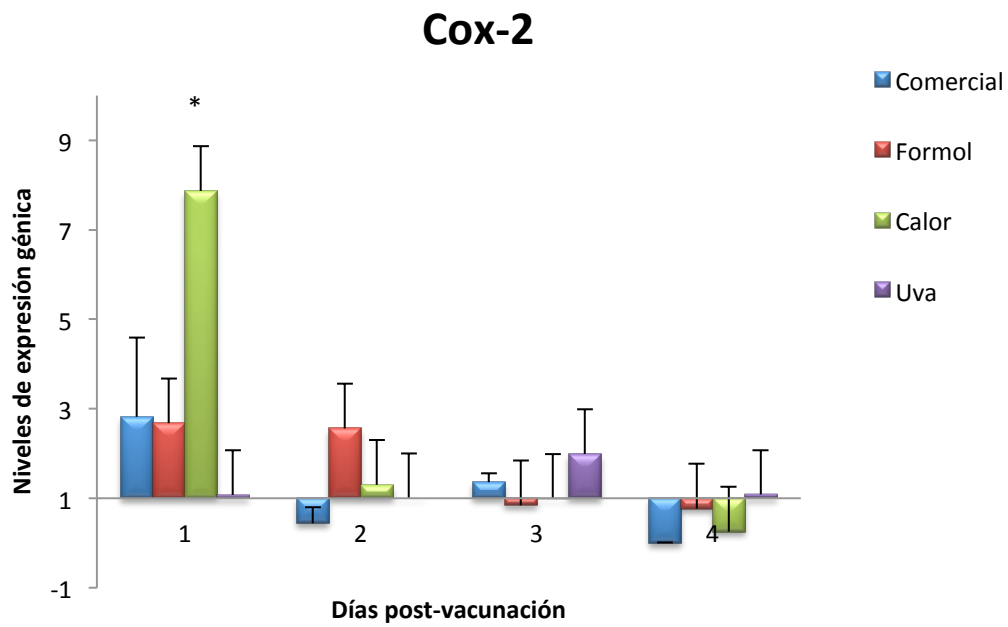
**Figura 15.** Expresión génica de TNF- $\alpha$  en los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. El asterisco encima de las barras indica diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros grupos.



---

#### 4.1.4. Expresión del gen Cox-2

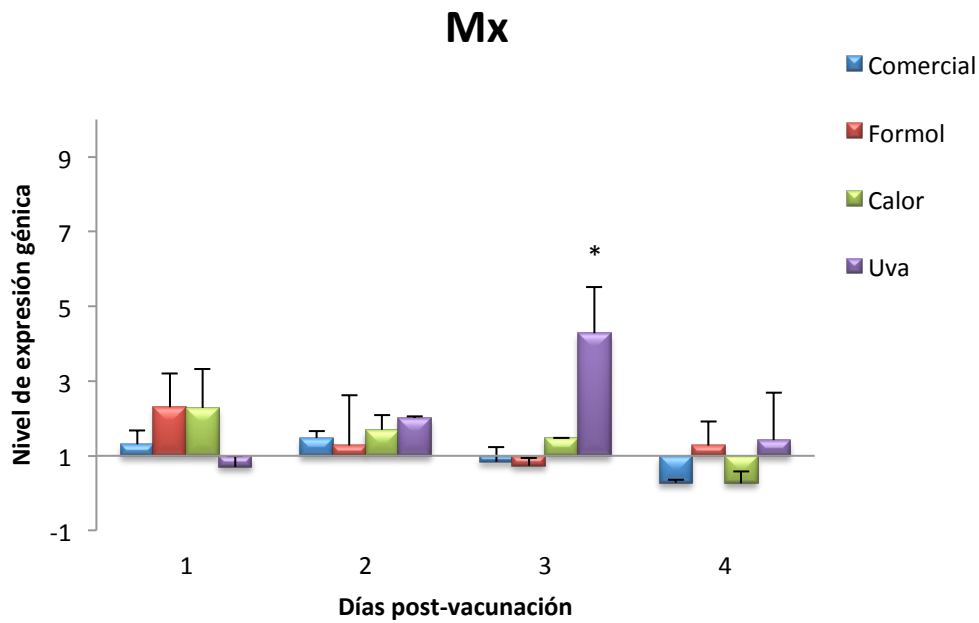
En la Figura 16 se puede observar la cinética de expresión del gen Cox-2 en los peces inmunizados con las diferentes vacunas. En el caso de la expresión de Cox-2 el único día en el que encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control negativo es el día uno en el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor. Los valores de expresión génica en este grupo son de ocho veces superiores a los valores observados en el grupo control negativo. Aunque no haya diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), los peces inmunizados con la vacuna comercial (control positivo) e inactivada con formol presentan los niveles más altos de expresión 24 horas después de la vacunación por baño (casi tres veces los valores del grupo control negativo). En el caso de los peces inmunizados con la vacuna inactivada por radiación UVA los valores más altos se presentan el tercer día. Al cuarto día podemos observar *down-regulation* en todos los grupos de peces menos en el los peces inmunizados con la vacuna inactivada con radiación UVA.



**Figura 16.** Expresión génica de Cox-2 en los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. El asterisco encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros grupos.

#### 4.1.5. Expresión del gen Mx

Como se puede observar en la Figura 17, la expresión del gen Mx en los peces vacunados no presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto al control negativo en los primeros dos días post-vacunación, aunque los grupos vacunados con la vacuna inactivada con formol y la vacuna inactivada con calor el primer día alcanzan valores de expresión génica dobles respecto al control negativo. El tercer día encontramos un pico de expresión del gen Mx en los peces inmunizados con la vacuna inactivada con radiación UVA que alcanza cinco veces el valor de expresión observado en el grupo control negativo y es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Al cuarto día los valores vuelven a ser basales. En el caso de los peces vacunados con la vacuna inactivada por calor y comercial la expresión en ese día se encuentra por debajo de la basal (*down-regulation*).

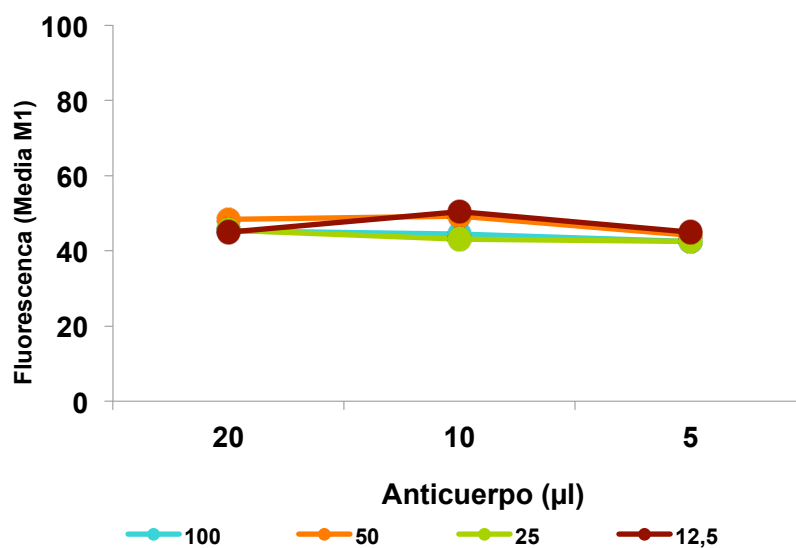


**Figura 17.** Expresión génica de Mx en los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control negativo. El asterisco encima de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con los otros grupos.

## 4.2. ESTUDIO DE LAS CÉLULAS IGM POSITIVAS EN RESPUESTA A VACUNACIÓN FRENTE *PHDP*

### 4.2.1. Resultados de la estandarización de los protocolos

En la Figura 18 podemos observar los resultados de los ensayos de conjugación del anticuerpo.



**Figura 18.** Fluorescencia media emitida a diferentes cantidades de anticuerpo

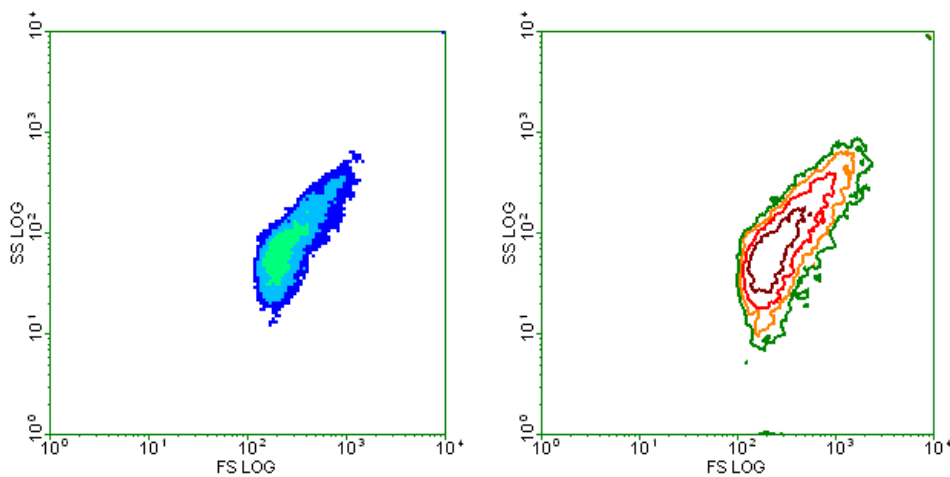
## Resultados

---

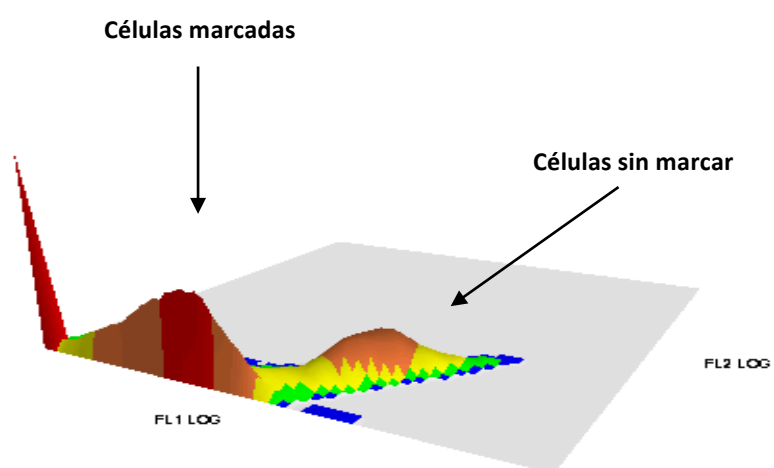
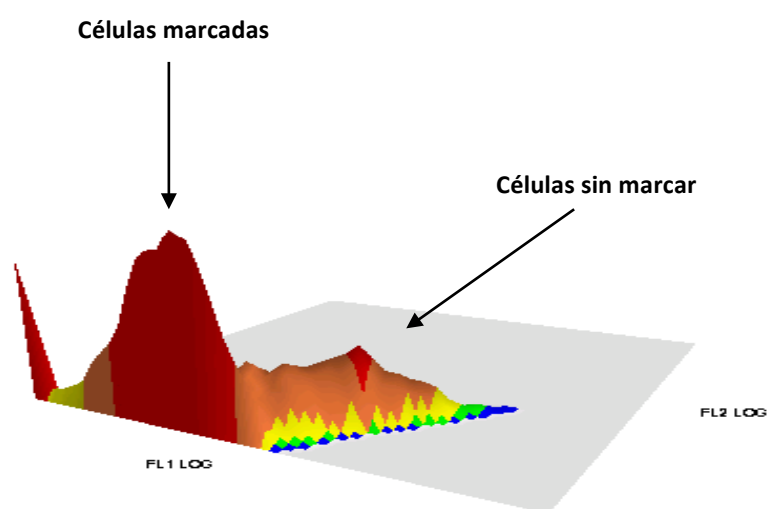
Hemos decidido trabajar con el menor volumen de células (12,5  $\mu$ l) conjugadas con la menor cantidad de Ac capaz de emitir fluorescencia (5  $\mu$ l).

En la Figura 19 se pueden ver los histogramas de densidad o “Dot Plot” de las células extraídas del bazo y branquias de dorada.

En la Figura 20 se pueden observar dos ejemplos de histogramas en 3D



**Figura 19.** Linfocitos de dorada al citómetro de flujo después del protocolo de extracción.



**Figura 20.** Ejemplos de histogramas en 3D, arriba histograma de peces vacunados, abajo histograma del grupo control

#### **4.2.2. Resultados de la experiencia definitiva para el estudio de las células**

##### **IgM positivas**

En las Figuras 21, 22, 23 y 24 podemos observar la producción de células IgM positivas en branquias y bazo después de la primera (Figuras 21 y 22) y segunda vacunación (Figuras 23 y 24) en doradas de 5 gramos vacunadas frente *Phdp*.

Como podemos ver en la Figura 21 el incremento de las células IgM positivas en las branquias después de la primera vacunación se mantiene prácticamente nulo hasta el onceavo día. A partir de este día podemos observar un incremento de alrededor el 10 % de células IgM positivas en los grupos de peces inmunizados con la vacuna comercial, calor y UVA, mientras que en el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol empieza a incrementarse a partir del día catorceavo. Los grupos de peces inmunizados con la vacuna comercial y la vacuna inactivada con formol tienen su máximo incremento al día dieciochoavo (más del 20 % de células IgM positivas respecto al control), mientras que los grupos vacuna inactivada con radiación UVA y vacuna inactivada con calor tienen su máximo incremento al día catorceavo. La expresión sigue disminuyendo hasta el día veintitrés en todos los grupos. En el caso del grupo inmunizado con la vacuna inactivada con radiación UVA al día veintitrés el número de células IgM positivas todavía se mantiene bastante elevado.



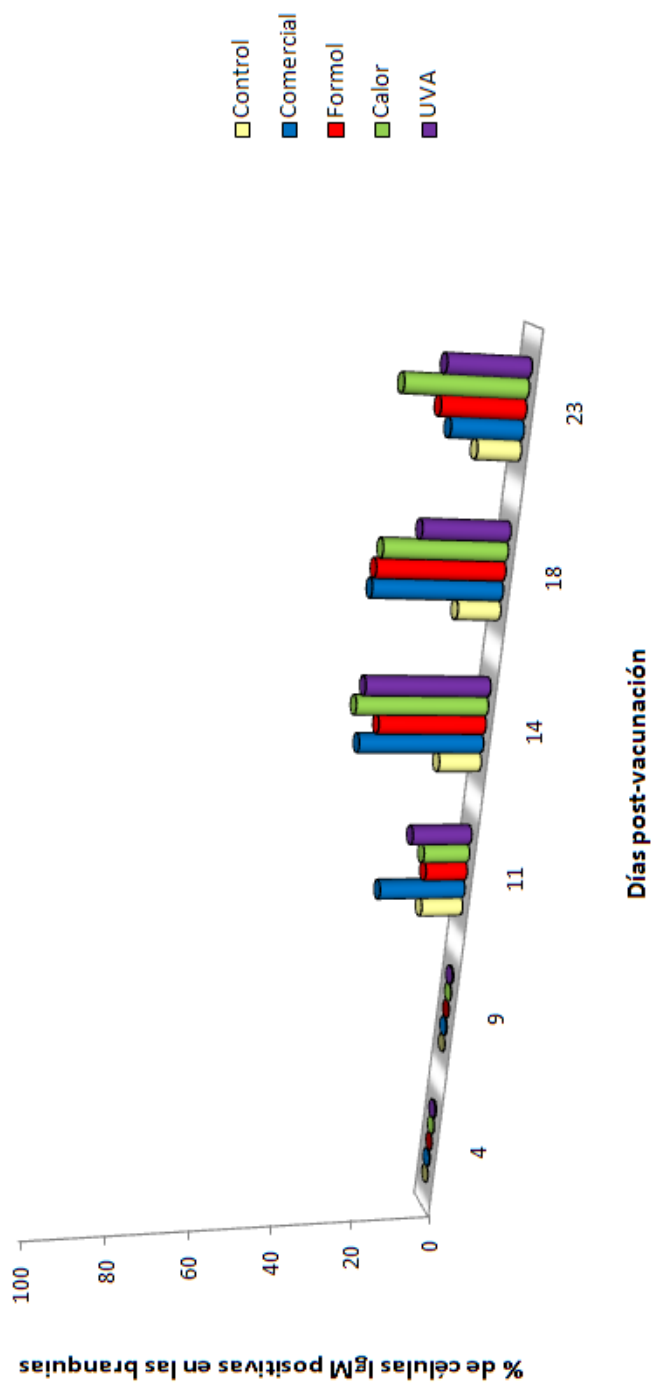
En el caso del bazo (Figura 22) la producción media de células IgM positivas es inferior a la producción en las branquias. Por el contrario, la producción de anticuerpos empieza antes y a partir del cuarto día se nota un incremento en el número de células IgM positivas en los grupos de peces inmunizados con la vacuna comercial, vacuna inactivada con calor y vacuna inactivada con radiación UVA. Los grupos inmunizados con la vacuna inactivada con calor y con la vacuna inactivada con radiación UVA presentan una cinética parecida con los valores más altos de células IgM positivas respecto al control al día dieciochoavo. Al día veintitrés el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor y la vacuna inactivada con formol presentaron un número de células IgM positivas parecido al control. Después de la revacunación o *booster* la producción de células IgM positivas es mucho más elevada y rápida con respecto a la primera vacunación. En este caso podemos observar (Figura 23) cómo ya a partir del cuarto día tenemos incrementos de producción de más del 20 % sobre el control en el grupo de peces inmunizados con la vacuna UVA seguido por el grupo de peces inmunizados con la vacuna comercial (20 %) y la vacuna inactivada con calor (10 %). El grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol empieza a incrementar el número de células IgM positivas a partir del día nueve para alcanzar su máximo a los días catorce y veintitrés. La cinética de producción de IgM es diferente entre grupos; por ejemplo el grupo de peces inmunizados con la vacuna comercial presenta dos picos, uno al día nueve y otro al día veintitrés. El

## *Resultados*

---

grupo inmunizado con la vacuna inactivada con formol presenta solo un pico al día veintitrés, el grupo inmunizado con la vacuna inactivada con calor alcanza su máxima producción al día once para luego tener *down-regulation* al día catorce y regresar a valores basales los días dieciocho y veintitrés. La vacuna inactivada con radiación UVA presenta la mayor producción de células IgM positivas con un pico temprano al día cuatro, otro al día catorce y otro al día veintitrés.

En el caso de la producción de células IgM positivas en el bazo (Figura 24), la cinética es parecida a la que se obtuvo después de una sola vacunación aunque con porcentajes más elevados de células positivas. Aquí tenemos que el grupo inmunizado con la vacuna inactivada por radiación UVA alcanza el pico al día catorce para luego descender. El grupo inmunizado con la vacuna inactivada con formol tiene una cinética muy parecida al grupo inmunizado con la vacuna comercial, con la única diferencia que al día dieciocho presenta *down-regulation* y regresa a valores basales al día veintitrés. El grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor tiene su pico al día cuatro, se mantiene constante hasta el día nueve, para luego descender hasta el día dieciocho y veintitrés.



**Figura 21.** Incremento de la producción de células IgM positivas en las branquias de peces vacunados una vez.

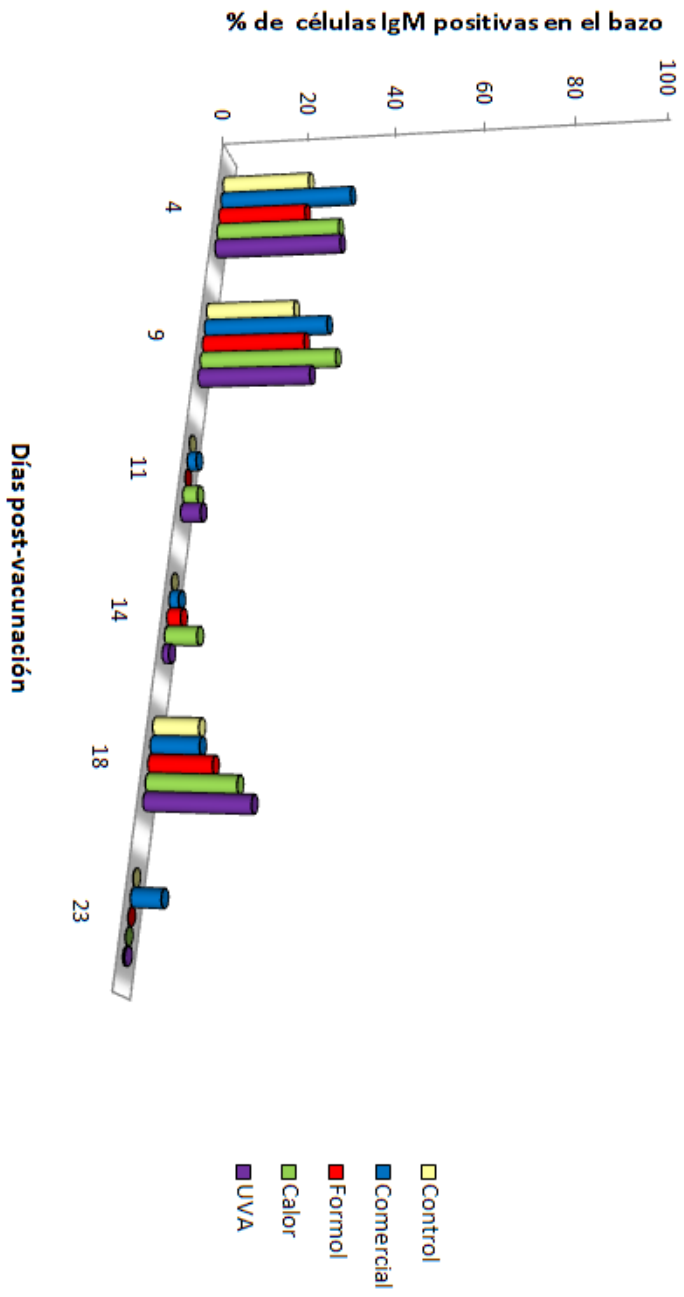
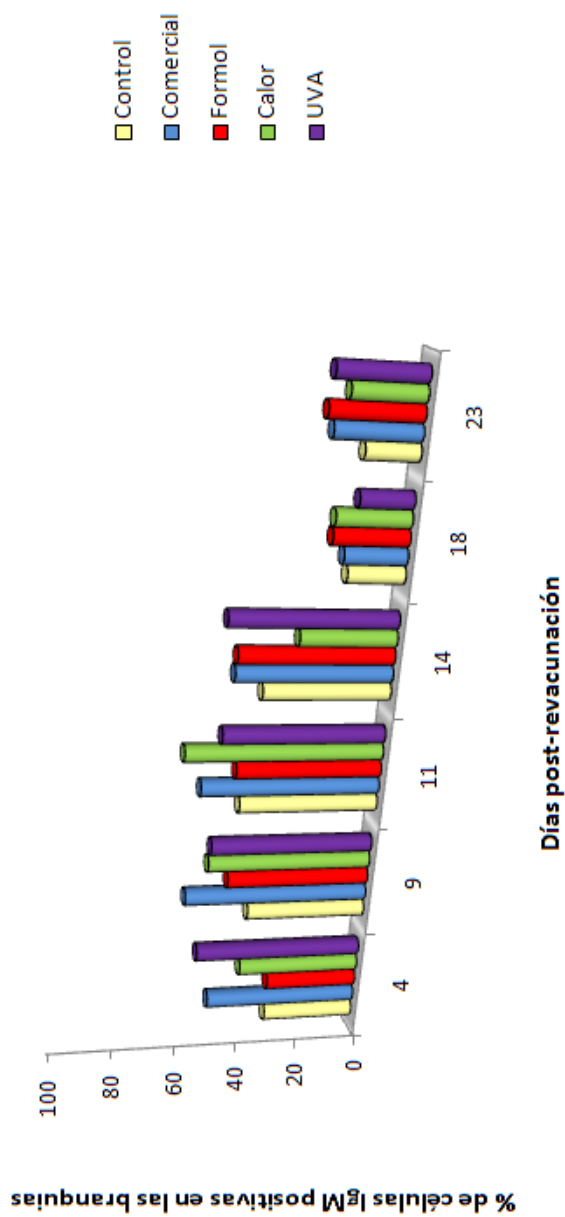
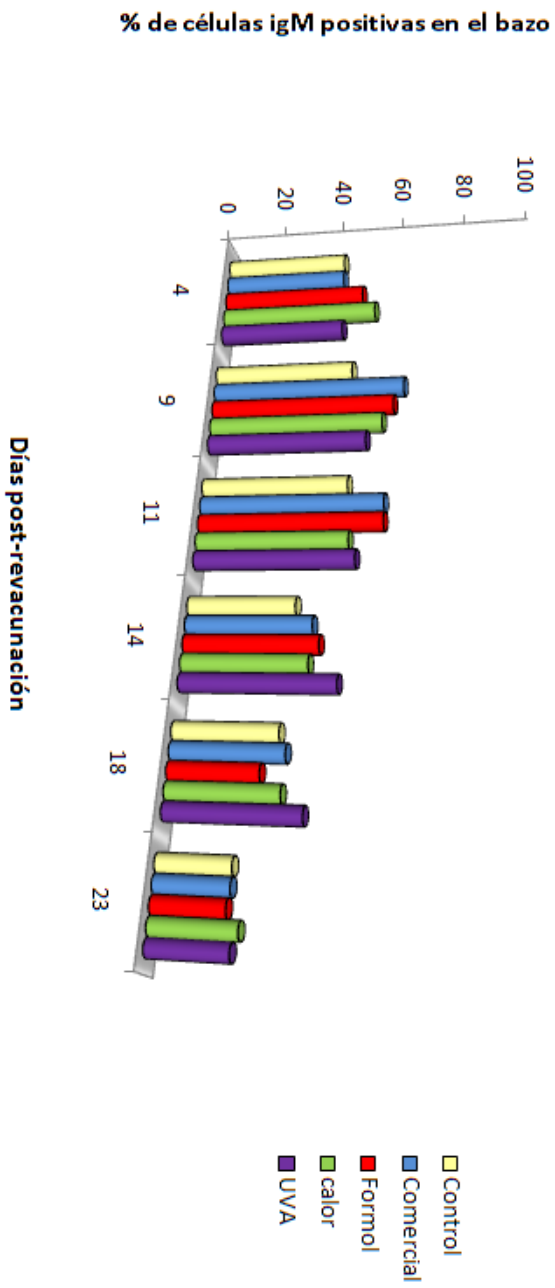


Figura 22. Incremento de la producción de células IgM positivas en el bazo de peces vacunados una vez.



**Figura 23.** Incremento de la producción de células IgM positivas respecto al control en las branquias de peces vacunados dos veces (*booster*).



**Figura 24.** Incremento de la producción de células IgM positivas respecto al control en el bazo de peces vacunados dos veces (*booster*).



# *Discusión*





## **5. DISCUSIÓN**

El desarrollo de técnicas que permiten estudiar el sistema inmune y la respuesta inmunitaria han ido evolucionando según avanzaba el conocimiento del mismo. Las aportaciones de otros campos, como la biotecnología y la biología molecular, han sido decisivas en estos avances. El progreso en las técnicas de biología molecular, tales como la identificación de proteínas o la detección de genes de interés inmunológico, han permitido diseñar y obtener diferentes tipos de vacunas convencionales o de nueva generación. En Sanidad Animal el desarrollo de vacunas es un proceso largo y complejo, que desde el inicio del mismo hasta la comercialización del producto pueden pasar de cinco a seis años (Sánchez-Vizcaíno, Manual de Inmunología Veterinaria, 2007). Las características que según Sánchez-Vizcaíno debe cumplir una vacuna para ser considerada “ideal” son:

- ✓ Permitir su fácil administración
- ✓ Ser termoestable (no depender de la cadena de frío para su conservación)
- ✓ Inducir una rápida y duradera inmunidad frente al mayor número de agentes infecciosos posibles
- ✓ No verse afectada por los anticuerpos maternos
- ✓ Conferir protección sin generar portadores
- ✓ Permitir diferenciar los animales vacunados de los infectados

## *Discusión*

---

Estos parámetros se adecuan muy bien al sistema inmune de mamíferos, pero en el caso de los peces el sistema inmune es muy distinto y hay que hacer algunas consideraciones. La vacunación en acuicultura empezó en 1942 y por lo tanto puede considerarse todavía en sus albores. Por otra parte, las industrias y casas farmacéuticas que se han interesado y han invertido dinero en la elaboración, estudio y fármaco-vigilancia de estos productos, son muy pocas y, además, han centrado su atención sobre los salmónidos, es decir, especies de alto valor comercial.

El sistema inmune de los peces se sitúa en la escalera evolutiva en un punto intermedio entre los insectos y los vertebrados superiores, siendo la componente inmunitaria innata la más importante. Por ello, la memoria inmunitaria de estos animales es más débil comparada con la de los mamíferos y es más complicado crear una vacuna eficaz que confiera inmunidad de larga duración. Con respecto a la inmunidad vertical, ha sido demostrada en algunas especies de peces, entre ellas la dorada, pero no en todas las especies. En el trabajo de Hanify cols. (2004) reproductores de dorada vacunadas frente a *Phdp* fueron capaces de transferir la inmunidad a las larvas, pudiendo detectar anticuerpos específicos hasta el día 14 después del desove, y además se observó transferencia de inmunidad no específica. Este hallazgo es de fundamental importancia y muy a tener en cuenta en el diseño de un plan de vacunación frente a *Phdp* en dorada.

Hechas todas estas consideraciones, hay que añadir otros parámetros a tener en cuenta que según algunos autores (Adams y Thompson, 2006) son primordiales a la hora de diseñar una vacuna para acuicultura: el factor económico y la seguridad desde el punto de vista sanitario. Con respecto al punto de vista económico, la vacuna ha de ser rentable para el empresario piscicultor y el programa de vacunación no puede ser más caro que el tratamiento de la enfermedad.

La vacuna ideal tiene que conferir una inmunidad de larga duración bajo las condiciones de cultivo intensivo de las granjas comerciales. También hay que tener en cuenta todos los serotipos y variantes del patógeno frente al que se quiere vacunar, la edad/talla de los peces, la vía de administración y el tipo de vacuna (bacterina, vacuna viva, vacuna recombinante, etc.). La mayoría de las vacunas comerciales para peces hoy en día son bacterinas, ya que son las más fáciles de producir y las más seguras desde el punto de vista sanitario. Normalmente si la vacuna inactivada no funciona en un primer ensayo, entonces se intentan desarrollar vacunas vivas atenuadas. En los últimos 30 años muchas vacunas frente a *Phdp* han sido diseñadas y testadas a nivel experimental, y en los años 80 algunos resultados positivos fueron obtenidos en Japón para inmunizar seriolas frente a esta enfermedad (Fukuda y Kusuda, 1981), pero los resultados obtenidos no fueron reproducibles. En Europa, casi 20 años más tarde, se obtuvieron unos excelentes resultados por el grupo de Arijo y cols. (2005) que diseñaron una

## *Discusión*

---

bacterina enriquecida con productos extracelulares de *Phdp* que confirió una alta protección (Porcentaje Relativo de Supervivencia o RPS=75%) a los lenguados vacunados con una talla de hasta 2 gramos.

En nuestro caso hemos diseñado tres nuevas vacunas inactivadas frente a *Phdp* y las hemos suministrado por baño a doradas de 5 gramos. Al mismo tiempo hemos desarrollado un nuevo método para el recuento de las células IgM positivas de dorada y hemos analizado el efecto de las tres vacunas sobre la expresión de la proteína Mx y de moléculas pro-inflamatorias de dorada.

La vacunación por baño directo es una técnica muy común en acuicultura debido a la posibilidad de vacunar grandes masas de peces con escasa mano de obra. Su eficacia ha sido demostrada en varias especies y frente a distintos patógenos. La vacunación por baño es considerada una de las vías más naturales de exposición al patógeno (Aoki y cols., 2005). Este tipo de exposición probablemente active mecanismos localizados en la superficie del cuerpo del animal que corresponden a la inmunidad mucosal. Aunque la vacunación intraperitoneal presenta como ventaja una administración uniforme de antígeno, tiene el gran inconveniente de ser una vía de penetración altamente antinatural ya que elude importantes barreras de defensa del animal tanto innatas como adquiridas (Nordmo, 1997).

---

### **5.1. Estudio de la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias y Mx en respuesta a la vacunación frente a *Phdp***

Las citoquinas son mediadores celulares del sistema inmune. La IL-1 $\beta$  es un miembro de la familia de las interleuquinas IL-1 que juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, maduración y proliferación de muchos tipos de células inmunes (Dinarello, 1997). En nuestro trabajo hemos podido comprobar que la vacunación por baño con las diferentes bacterinas analizadas frente a *Phdp* es capaz de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  a las 24 horas. Este resultado está en conformidad con lo encontrado por otros autores, y así, Fast y cols. (2007) vacunando por vía intraperitoneal dos especies de salmón diferentes (*O. gorbuscha* y *O. keta*) frente a *Aeromonas salmonicida* observaron estimulación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , y Pelegrin y cols. (2001), inoculando doradas por vía intraperitoneal con una cepa no virulenta de *V. anguillarum* encontraron estimulación en la expresión de IL-1 $\beta$ .

Existen dos tipos de receptores de la IL-1 $\beta$ , el IL-1r1 y el IL-1r2. El primer receptor interviene mediando los efectos de IL-1 $\beta$ , mientras que el segundo actúa inhibiendo su actividad. La IL-1r2 ha sido clonada en dorada y su expresión ha sido estudiada por diferentes autores (López-Castejón y cols., 2007). Se ha comprobado que la expresión de este receptor aumenta drásticamente en el riñón anterior de doradas inoculadas por vía IP con una dosis sub-letal de *V.*

## *Discusión*

---

*anguillarum* (López-Castejón y cols., 2007). En nuestro trabajo también hemos encontrado un notable aumento de expresión de este receptor a las 24 horas post-vacunación en los peces inmunizados con las vacunas inactivadas con calor y con formol. Este resultado nos podría sugerir que la IL-1r2 está inhibiendo la actividad de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  que, efectivamente, no se expresa en los peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol y solo se expresa a las 24 horas en los peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor.

El TNF- $\alpha$  es una citoquina con potente acción proinflamatoria secretada por varias células inmunes a lo largo de una infección o de un daño tisular. El homólogo del TNF- $\alpha$  humano ha sido clonado en dorada y muchas otras especies de peces. En el trabajo de Raida y Buchmann (2007) juveniles de trucha arcoíris fueron vacunadas frente a *Y. ruckeri* por baño corto (dilución 1:10 de la vacuna durante 10 minutos), y la expresión de TNF- $\alpha$  fue analizada en el bazo hasta tres días post-vacunación, observando que la vacunación era capaz de estimular la expresión de varias citoquinas proinflamatorias, entre ellas el TNF- $\alpha$ . Los mismos autores también analizaron la expresión de citoquinas en respuesta a la vacunación por vía IP y a diferentes temperaturas y obtuvieron como resultado que la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , son estimuladas principalmente 4 horas después de la inoculación IP y sobre todo a temperaturas más altas (25 °C). En trucha arcoíris, Harun y cols. (2011) analizaron la expresión génica de citoquinas en peces vacunados con una bacterina inactivada con formol frente a *Y. ruckeri*. Los peces fueron vacunados

por vía IP y la expresión génica de varias citoquinas, entre ellas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , se analizaron en bazo y agallas después de la infección experimental con el patógeno. Los resultados muestran que hay una estimulación de ambas citoquinas con un pico de expresión en branquias el tercer día. Dichos resultados sugieren que las citoquinas producidas en el curso de una vacunación tanto por baño como por vía IP pueden regular *in vivo* la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

Por lo que se refiere a la molécula proinflamatoria COX-2, hasta la fecha los únicos estudios sobre estimulación de este gen en dorada han sido efectuados *in vitro* por Sepulcre y cols. (2007). En este trabajo los granulocitos y macrófagos de dorada fueron estimulados con diferentes sustancias simuladoras de patógenos (PAMPs), obteniendo estimulación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y COX-2 *in vitro*. En nuestro trabajo la vacunación por baño produce una estimulación de este gen a las 24 horas únicamente en los peces inmunizados con la vacuna inactivada con calor (las otras vacunas no presentan diferencias significativas con el control). Buonocore y cols. (2005) vacunaron lubinas por vía IP con una bacterina frente a *V. anguillarum* y midieron la expresión de COX-2 durante dos semanas post vacunación. Antes de la vacunación no había expresión de COX-2 en riñón anterior, pero posteriormente a la vacunación se empezó a expresar este gen confirmando que la vacunación desencadena un proceso inflamatorio en el pez. Scapigliati y cols. (2010) infectaron lubinas por vía IP con el virus causante de la encefalopatía y retinopatía viral. Después de la infección evaluaron la expresión

## *Discusión*

---

génica de algunas moléculas pro-inflamatorias y observaron una estimulación de COX-2 e IL-1 $\beta$  a las 24 horas post-inoculación.

Con respecto al Mx, otros autores han estudiado la expresión de este gen en respuesta a la vacunación, y así, Acosta y cols. (2004 a) inocularon por vía intramuscular trucha arcoíris y salmón Atlántico con una vacuna de ADN frente al virus de la septicemia hemorrágica y observaron una estimulación del gen Mx. Estos autores compararon la expresión de Mx a diferentes temperaturas (10 y 14 °C) y observaron un pico de expresión el día 2 a 14 °C. El mismo grupo (Acosta y cols., 2004 b) inocularon por vía intraperitoneal salmón Atlántico con una bacterina preparada con el patógeno marino *V. anguillarum* y observaron también una estimulación del gen Mx al día 3. En nuestro trabajo ninguna vacuna, exceptuando la vacuna inactivada con radiación UVA presentó diferencias significativas con respecto al control en cuanto a expresión del gen Mx. En nuestro estudio el grupo de peces inmunizados con la vacuna inactivada con radiación UVA presentó un pico de expresión de Mx al día 3 post-vacunación. Sin embargo, en el trabajo de Acosta y cols. (2004 a) el gen Mx ya se expresa a partir del día 2. Esta diferencia con los resultados de Acosta y cols. puede ser debida a varios factores, como por ejemplo la vía de administración de la vacuna, siendo la vacunación por baño una vía menos traumática que la inyección intramuscular. Además, el tipo de formulación (bacterina vs vacuna ADN) influye en la estimulación del gen. Sin embargo, nuestros resultados están en concordancia con



lo descrito por Acosta y cols. (2004 b) y Bravo y cols. (2011), donde doradas inoculadas con LPS y ADN de *V. alginolyticus* presentaron la expresión de Mx más alta al tercer día post-inoculación, así como con el estudio de Scapigliati y cols. (2010), donde inocularon lubinas con el virus de la encefalopatía y retinopatía viral y el Mx alcanzó su máxima expresión a los tres días post-inoculación. En el trabajo de Caipang y cols. (2008), platija japonesa fue inmunoestimulada por vía intramuscular con un plásmido recombinante que contenía IRF-1 (factores reguladores de Interferón, familia IRFs) y se analizó la expresión de Mx post-inoculación, observándose estimulación en la expresión de Mx en la fase temprana, y más concretamente, en los primeros siete días post-estimulación. Nuestros resultados muestran que la vía de inactivación de la vacuna influye en la expresión del gen Mx, siendo la inactivación con radiación UVA la única eficaz en estimular la expresión de dicho gen en la fase temprana.

La capacidad de *Phdp* de invadir diferentes líneas celulares de peces ha sido ampliamente demostrada (Magariños y cols., 1996; Yoshida y cols, 1997; López-Dóriga y cols, 2000). Por otra parte, Acosta y cols. (2009) demostraron la capacidad de la cepa 94/99 de *Phdp* de invadir una línea celular de origen fibroblástico de dorada (SAF-1) y de sobrevivir en su interior hasta siete días después de la internalización. En el trabajo de López-Dóriga y cols. (2000) se demostró que la cepa MT1415 de *Phdp* inactivada con radiación UVA podía ser internalizada por células. Estos autores observaron un porcentaje de células con

## Discusión

---

bacteria en su interior del 44,8 % en la *Phdp* inactivada con radiación UVA, comparada con el 52,2 % del control (*Phdp* sin inactivar) y tan solo el 9,3 % de células con bacteria internalizada en el caso de *Phdp* inactivada con calor (80 °C durante 10 minutos). Este hallazgo es muy importante a la hora de interpretar nuestros resultados ya que nos podría indicar que la cepa de *Phdp* 94/99 inactivada con radiación UVA haya sido internalizada por las células de los peces vacunados estimulando así el gen Mx.

Hasta la fecha muchos trabajos han sido realizados sobre la expresión génica de citoquinas en respuesta a la vacunación. Algunos autores comparan la expresión génica en respuesta a diferentes vías de vacunación, como por ejemplo IP vs baño (Rayda y Buchmann, 2007), diferentes temperaturas, diferentes especies (Acosta y cols., 2004) o diferentes tejidos (Harun y cols., 2011), pero ninguno de estos trabajos ha comparado la expresión génica en respuesta a las diferentes vías de inactivación de la vacuna. En nuestro estudio hemos podido comprobar que sí existen diferencias según qué forma de inactivar la vacuna elijamos. En concreto, la vacuna inactivada con calor ha presentado diferencias estadísticamente significativas con las otras vacunas respecto a la estimulación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1r2 y COX-2. Este resultado nos indica que algo en nuestra vacuna inactivada con choque térmico (80 °C durante 10 minutos) está estimulando el sistema inmune de la dorada de una forma mayor que las otras vacunas.

En general, la inactivación mediante el calor y el formol de las bacterias enteras obtenidas de cultivos da lugar a vacunas muy reactógenas ya que el producto no es sometido a ningún tipo de purificación. Además de esto, también hay que añadir que el choque térmico y el formol no solo matan a la bacteria sino que la degradan por completo dejando expuestos muchos epítomos con actividad antigénica. El efecto inmunogéno de estas vacunas suele ser tan fuerte que a veces puede llegar a ser tóxico y, en medicina humana, se han dado casos de limitación de su uso debido a los efectos secundarios.

En nuestro ensayo hemos podido observar cómo la vacuna inactivada con calor estimula la expresión temprana de las moléculas proinflamatorias estudiadas. Este resultado puede ser debido a que las fracciones celulares resultante de la inactivación con calor estimulan las células inmunitarias del pez a producir moléculas proinflamatorias. El hecho de que este mismo resultado no se produjo con la vacuna inactivada con formol puede ser debido a que la estimulación con formol sea más tardía y por lo tanto no hemos podido observarla en la fase temprana.

Fukuda y Kusuda (1981) describieron la eficacia de una vacuna inactivada con formol frente a *Phdp* en seriola, pero los resultados no fueron reproducibles y, años más tarde, Kusuda y Hamaguchi (1988) afirmaron que la vacuna frente al patógeno *Phdp* inactivada con formol no era efectiva para inmunizar seriolas.

## Discusión

---

Magariños y cols. (1994), por otra parte, elaboraron dos vacunas frente a *Phdp* en dorada, una vacuna inactivada con formol y otra vacuna inactivada con formol suplementada con productos extracelulares (ECPs) de *Phdp* inactivados con calor. Las doradas fueron vacunadas por inmersión directa y el porcentaje de mortalidad después de la infección fue del 35 % en los peces inmunizados con la vacuna inactivada con formol y del 25 % en los peces inmunizados con la vacuna suplementada con ECPs inactivados con calor (40 % mortalidad en el control).

Por otro lado la inactivación con radiación UVA no altera la estructura celular de la bacteria y, en *Phdp*, se ha comprobado que el patógeno mantiene su forma e incluso su capacidad de ser internalizada por parte de líneas celulares *in vivo* (López-Doriga y cols., 2000). El hecho de que nuestra vacuna inactivada con radiación UVA no haya estimulado la expresión de moléculas proinflamatorias puede ser debido a que la bacteria haya sido internalizada por las células del pez o no haya sido reconocida como extraña y por lo tanto haya conseguido evadir la respuesta inmune. Sin embargo las células, tanto macrófagos como células epiteliales-fibroblástica, que han internalizado la bacteria pueden expresar Mx.

Hasta la fecha la técnica de “ensayo error” ha sido la principal estrategia en el diseño experimental de vacunas en acuicultura, y este enfoque empírico parece que se va a seguir utilizando por lo menos a corto plazo (Sommerset y cols., 2005). El desarrollo de vacunas frente a enfermedades emergentes en acuicultura,

o para nuevas especies que se empiezan a domesticar, es limitado al conocimiento del sistema inmune de la especie, de la patogénesis de la enfermedad y del patógeno. No obstante, la técnica de “ensayo error” es normalmente menos cara en acuicultura que en otras áreas de la medicina veterinaria. Una vacuna ideal en acuicultura debería proteger a la larva mediante inmunidad vertical y poder ser administrada por baño en la fase temprana confiriendo una inmunidad duradera y eficaz. En el caso de *Phdp* ha sido demostrado que existe inmunidad vertical en dorada (Hanif y cols., 2004), y en nuestro estudio, hemos demostrado que la vacunación por baño a los 5 gramos es una vía eficaz para incrementar la producción de IgM. En la actualidad las pautas de vacunación frente a *Phdp* para dorada no están muy claras. Algunas casas comerciales productoras de vacunas ni siquiera indican cuándo es aconsejable revacunar. En la praxis los granjeros suelen revacunar las doradas un mes después de la primera dosis o en algunos casos, hasta dos meses después. Creemos que se puede mejorar la protección frente *Phdp* incluyendo en el plan de vacunación una revacunación a efectuar en el momento en que la producción de IgM alcanza su pico máximo. De esta manera se evita que los animales queden desprotegidos en algún momento y puedan enfermar. Hasta la fecha, ningún estudio ha sido realizado sobre la producción de células IgM positivas en dorada después de la vacunación por baño. En este estudio hemos podido comprobar que los niveles más altos de IgM se encuentran entre la segunda (vacuna inactivada con radiación UVA) y tercera semana después

## *Discusión*

---

de la primera vacunación en las branquias de los peces inmunizados con las vacunas inactivadas con calor, con formol y en la vacuna comercial. Por ello aconsejamos que la revacunación se efectúe en estos días y no se espere a que los niveles descendan (revacunación tardía). De esta manera, revacunando entre el día 14 y 18 después de recibir la primera dosis, se podrían obtener doradas de 20 gramos que ya hayan recibido dos dosis de vacuna y podrían recibir una tercera dosis por vía oral. A partir de este tamaño ya la dorada suele ser menos sensible a la enfermedad (Toranzo y cols., 2005).

Otra posibilidad sería formular una vacuna inactivada que incluya células de *Phdp* inactivada por dos vías; por una parte células inactivadas con radiación UVA, que conservan su forma y la capacidad de ser internalizadas, y además estimulan el gen Mx, y por otra parte células de *Phdp* inactivadas con calor que estimulan la expresión génica de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-1r2, TNF- $\alpha$  y COX-2.

### **5.2. Estudio sobre la producción de células IgM positivas en respuesta a la vacunación frente a *Phdp***

En este estudio hemos vacunado alevines de dorada de 5 gramos de peso inicial por baño corto de 60 segundos para averiguar si esta vía de vacunación es capaz de aumentar la producción de células IgM positivas en los peces. Los resultados han sido positivos y hemos observado un incremento en la producción

de células IgM positivas en los peces vacunados con respecto al control. La aparición de células IgM positivas ha sido más elevada en las branquias que en el bazo de los peces vacunados, confirmando el papel que juega este órgano en la inmunidad, corroborando los resultados encontrados por otros autores (Dos Santos y cols., 2001). El incremento en la producción de células IgM positivas se observó de forma bastante rápida en las branquias (día 11 post-vacunación) de los peces vacunados, sobre todo después de la revacunación (día 4 post-vacunación). Aunque no pudimos hacer un análisis estadístico debido a que hicimos *pool* de peces, la tendencia general en la producción de células IgM positivas es de un incremento elevado de estas células en los peces vacunados con respecto al control, y en algunos puntos alrededor del 20 % de los leucocitos extraídos eran células IgM positivas. La cinética de producción de células IgM positivas nos demuestra que el incremento en el número de estas células depende de la vía de inactivación de la vacuna, ya que algunas vacunas son más efectivas que otras en estimular el sistema inmune.

En detalle, la vacuna inactivada con radiación UVA muestra buenos niveles de células IgM positivas en las branquias y bazo de los peces vacunados y prácticamente nunca presenta disminución de estas células respecto al control. La vacuna inactivada con calor también da buenos resultados con niveles de IgM altos sobre todo en las branquias, si bien presenta inhibición en algunos puntos. La vacuna inactivada con formol y la vacuna comercial tienen una cinética

## *Discusión*

---

parecida aunque en algunos puntos la vacuna comercial da mejores resultados. En general, podemos afirmar que todas las vacunas que hemos utilizado han estimulado el sistema inmune de las doradas con un incremento notable en la producción de células IgM positivas.

Para el recuento de las células IgM positivas de dorada hemos puesto a punto un protocolo de citometría de flujo. La citometría de flujo es un método muy sensible y directo que permite un análisis celular multiparamétrico tanto cualitativo como cuantitativo, y hasta la fecha no se había realizado ningún estudio sobre células IgM positivas de dorada con citometría de flujo. Existen varios métodos para marcar células de peces con anticuerpos (inmunofenotipaje), entre las que podemos destacar la técnica Panning y ELISA (incluyendo ELISPOT), los inmunobeads y la citometría de flujo (CF). Respecto a la CF, el método más usado es el marcaje con anticuerpo primario seguido por marcaje con anticuerpo secundario teñido con fluorocromo. El fluorocromo más usado es el isotiocianato de fluoresceína o FITC, que excita a una longitud de onda de 488 nm y produce fluorescencia verde. Nuestro trabajo es el primero que pone a punto esta técnica y la utiliza para cuantificar las células IgM positivas de doradas después de vacunación por baño.

En nuestro ensayo, la vacunación por baño produjo un incremento de la producción de células IgM positivas tanto en branquias como en bazo de los peces inmunizados. Estos resultados han de considerarse fiables ya que para el marcaje



de las células IgM positivas hemos utilizado un anticuerpo monoclonal específico frente a IgM de dorada (Aquamab®). La cinética de respuesta de los peces inmunizados con las diferentes vacunas no fue homogénea, ya que algunas vacunas produjeron un pico de células IgM positivas antes que otras. Nakanishi y Ototake (1981) postularon que las branquias y la piel son el sitio de mayor captación de antígeno en los peces después de la vacunación por baño y que solo una pequeña cantidad de antígeno es transportada al riñón y al bazo. Esto podría explicar la menor producción de células IgM positivas en el bazo de los peces inmunizados. Los mismos autores encontraron que la cantidad de antígeno captado está relacionada con la duración (en términos de tiempo) del baño. Sin embargo, en nuestro ensayo decidimos vacunar por baño corto con el fin de reducir al máximo el estrés. En el trabajo de Raida y cols. (2011) las truchas arcoíris vacunadas por baño también mostraron un incremento en la producción de IgM medidas con la técnica ELISA. La CF es una técnica fiable que permite analizar célula por célula y distinguir entre las diferentes poblaciones celulares. Otros autores han utilizado la CF para estudiar la respuesta inmune inespecífica de dorada frente a bacterias como *V. anguillarum* (Esteban y cols., 1998), levaduras (Cuesta y cols., 2007) o para analizar las funciones linfocitarias en algunas especies de peces como carpa (Koumans-van Diepen y cols., 1994), salmón Atlántico (Pettersen y cols., 2000), ostra plana europea (Renault y cols., 2001),

## *Discusión*

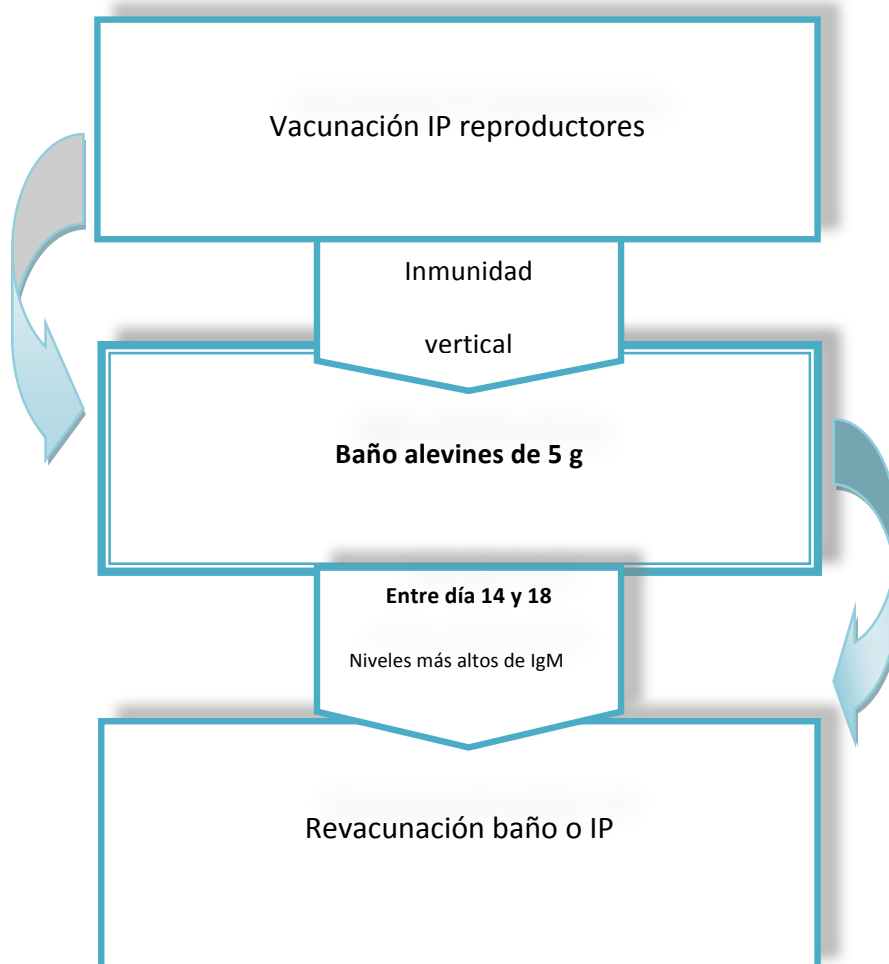
---

ostra (Goedken y cols., 2004), perca dorada y perca plateada (Hardford y cols., 2006).

En base a lo expuesto, creemos que es necesario seguir investigando la producción de células IgM positivas en doradas después de la vacunación, sobre todo para conocer cuál es el exacto momento para revacunar a los peces. Vistos nuestros resultados sugerimos que la citometría de flujo es un método fiable y rápido que puede ser utilizado como técnica complementaria o sustitutiva para medir células IgM positivas de dorada.

El tamaño y especie del pez, la estación del año y el estado sanitario de la granja serán importantes para determinar qué vía de revacunación (*booster*) utilizar. Está claro que la vacunación IP no es la vía a elegir cuando la temperatura del agua está aumentando y el pez está más sujeto a estrés (Le Breton, 2009). En este caso es mejor elegir una revacunación por baño para no estresar demasiado a los animales. Según Toranzo y cols. (2009) como prospectivas futuras en acuicultura es importante estandarizar un calendario de vacunación para cada especie de importancia económica. Por otro lado no se puede considerar la vacunación como “el remedio para todos los males”, ya que las vacunas son solo una parte de un correcto sistema de manejo sanitario de la granja.

En la Figura 25 se puede observar un ejemplo de calendario de vacunación frente a *Phdp* que proponemos para la dorada.



**Figura 25.** Calendario de vacunación propuesto frente a *Phdp*



A photograph of a laboratory bench covered with a metal grid. On the grid, there are many petri dishes, each containing a different bacterial culture. The cultures show various growth patterns, including dense, uniform layers and more sparse, irregular growths. The background is slightly blurred, showing more of the laboratory environment. The overall color scheme is a muted, olive-green tint.

# *Conclusiones*



## 6. CONCLUSIONES:

1. La inactivación con calor de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regula *in vivo* la expresión de moléculas proinflamatorias en las doradas inmunizadas por baño corto.
2. La inactivación con formol de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regula *in vivo* la expresión de IL-1r2 en las doradas inmunizadas por baño corto.
3. La inactivación con radiación UVA de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regula *in vivo* la expresión de Mx en las doradas inmunizadas por baño corto.
4. La citometría de flujo se ha mostrado como un método efectivo y rápido para detectar células IgM positivas en el bazo y branquias de doradas vacunadas por inmersión directa frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
5. Las branquias presentan una mayor producción de células IgM positivas en las doradas vacunadas por inmersión directa frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con respecto al bazo.

## Conclusiones

---

6. Se sugiere revacunar las doradas inmunizadas por inmersión directa frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* entre el día 14 y 18 post-vacunación, es decir cuando los niveles de IgM alcanzan su máxima producción.



## 6. CONCLUSIONS:

1. Inactivation by heat-shock of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regulates *in vivo* expression of pro-inflammatory molecules in sea bream immunized by short bath.
2. Inactivation by formalin of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regulates *in vivo* expression of IL-1r2 in sea bream immunized by short bath.
3. Inactivation by UV-light of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* regulates *in vivo* expression of Mx gene in sea bream immunized by short bath.
4. Flow cytometry is a rapid and effective method for measuring IgM positive cells in the spleen and gills of sea bream vaccinated by direct immersion against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
5. The gills present a higher production of IgM positive cells in sea bream vaccinated against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by direct immersion compared with spleen.

## *Conclusiones*

---

6. It is suggested to booster sea bream against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by direct immersion between day 14 and 18 post-vaccination, that is to say when IgM levels reach their maximum production.



*Bibliografía*



## 7. Bibliografía

### A

- Ⓒ **Acosta F., Lockhart K., Gahlawat S.K., Real F., Ellis A.E.**  
Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA.  
Fish & Shellfish Immunology 17 (2004), 255-63.
- Ⓒ **Acosta F., Petrie A., Lockhart K., Lorenzen N., Ellis A.E.**  
Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS–DNA vaccination.  
Fish & Shellfish Immunology 18 (2005), 81-89.
- Ⓒ **Acosta F., Vivas J., Padilla D., Vega J., Bravo J., Grasso V., Real F.**  
Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.  
Journal of Fish Disease 32 (2009), 535-41.
- Ⓒ **Adams A., Thompson K.D.**  
Biotechnology offers revolution to fish health management.  
Trends in Biotechnology 24 (2006), 201-5.
- Ⓒ **Afonso A., Gomes S., da Silva J., Marques F., Henrique M.**  
Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis.  
Fish & Shellfish Immunology 19 (2005), 1-16.
- Ⓒ **Andreoni F., Boiani R., Serafini G., Amagliani G., Dominici S., Riccioni G., Zaccone R., Mancuso M., Scapigliati G., Magnani M.**  
Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate  
Vaccine 31 (2013), 820-26.
- Ⓒ **APROMAR (2009)**  
<http://www.apromar.es/Informes/informe%202009/Informe-APROMAR-2009.pdf>

## Bibliografía

---

- Ⓒ **Arijo S., Rico R., Chabrillon M., Diaz-Rosales P., Martinez-Manzanares E., Balebona M.C., Magariños B., Toranzo A.E., Moriño M.A.**  
Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.  
Journal of Fish Diseases 28 (2005), 33–38.

## B

- Ⓒ **Bakopoulos V., Volpatti D., Gusmani L., Galeotti M., Adams A., Dimitriadis G.J.**  
Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures.  
Journal of Fish Diseases 26 (2003), 77–90.
- Ⓒ **Bakopoulos, V., Adams A., Richards R.H.**  
Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy.  
Journal of Fish Diseases 18 (1995), 1-7.
- Ⓒ **Bakopoulos V., Peric, Z., Rodger, H., Adams A., Richards R.H.**  
First report of fish pasteurellosis from Malta.  
Journal Aquatic Animal Health 9 (1997), 26-33.
- Ⓒ **Baptista T., Romalde J.L., Toranzo A.E.**  
First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*).  
Bulletin European Association Fish Pathology 16 (1996), 92-95.
- Ⓒ **Baudin Laurencin F., Pepin J.F., Raymond J.C.**  
First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts.  
In Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathology, p. 17. 1991
- Ⓒ **Boiani R., Andreoni F., Serafini G., Bianconi I., Pierleoni R., Dominici S., Gorini F., Magnani M.**  
Expression and characterization of the periplasmic cobalamin-binding protein of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.  
Journal of Fish Diseases 32 (2009), 745-53.
- Ⓒ **Bravo J., Acosta F., Padilla D., Grasso V., 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 & Shellfish Immunology 31 (2011), 170-2.

- © **Buonocore F., Mazzini M., Forlenza M., Randelli E., Secombes C.J., Zou J., Scapigliati G.**  
Expression in *Escherchia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Interleukin 1 $\beta$ , a possible immunoadjuvant in Aquaculture.  
Marine Biotechnology 6 (2004), 53–59.
- © **Buonocore F., Randelli E., Casani D., Mazzini M., Cappuccio I., Secombes C.J., Scapigliati G.**  
cDNA cloning and expression analysis of a cyclooxygenase-2 from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after vaccination.  
Aquaculture 245 (2005), 301– 10.

## C

- © **Caipang C.M.A., 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: Molecular & Integrative Physiology 3 (2009), 440-6.
- © **Candan A., Kucuker M.A., Karatas S.**  
Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey.  
Bulletin European Association Fish Pathology 16 (1996), 150-53.
- © **Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertoja G., Bovo G.**  
Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts.  
In Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathology, p. 26. 1991.
- © **Cinchar V.G., Logue O., Antao A., Chinchar G.D.**  
Channel catfish reovirus (CRV) inhibits replication of channel catfish herpesvirus (CCV) by two distinct mechanisms: viral interference and induction of an anti-viral factor.  
Diseases of Aquatic Organisms 19 (1998), 77-85
- © **Cuesta A., Rodríguez A., Salinas I., Meseguer J., Esteban M.A.**  
Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead sea bream after intraperitoneal injection of whole yeast cells.  
Fish & Shellfish Immunology 22 (2007), 242-51.

## Bibliografía

---

- Ⓢ **Cuesta A., Tafalla C.**  
Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
Vaccine 27 (2009), 280–89.
- Ⓢ **Cutter D.L., Kreger A.S.**  
Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*.  
Infectious Immunology 58 (1990), 266-8.

## D

- Ⓢ **Dinarelo C.A.**  
The IL-1 family and inflammatory diseases.  
Clinical and Experimental Rheumatology 20 (2002), 1–13.
- Ⓢ **Dos Santos N.M., Taverne-Thiele J.J., Barnes A.C., Ellis A.E., Rombout J.H.W.M.**  
The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study.  
Fish & Shellfish Immunology 11 (2001), 65-74.
- Ⓢ **Duff D.C.B.**  
The oral immunisation of trout against *Bacterium salmonicida*.  
Journal of Immunology (1942), 44-87.

## E

- Ⓢ **Ellis A.E.**  
Optimizing factors for fish vaccination.  
Fish Vaccination Ellis A.E. (Ed) Academic Press, New York, USA (1988), 32-46.
- Ⓢ **Ellis A.E.**  
Health and disease in Atlantic salmon farming.  
Stead, S.M., Laird, L.M. (Eds.), Handbook of Salmon Farming. Springer Praxis, Chichester, 373–401. 2002.
- Ⓢ **Esteban M.A., Mulero V., Muñoz J., Mesenguer J.**  
Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy.  
Cell and tissue Research 293 (1998), 133-41.



## F

- ④ **Faliex E., Da Silva C., Simon G., Sasal P.**  
Dynamic expression of immune response genes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, experimentally infected with the monogenean *Diplectanum aequans*.  
Fish & Shellfish Immunology 24 (2008), 759-67.
- ④ **FAO**  
El estado mundial de la Pesca y Acuicultura  
<http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>
- ④ **Fast M.D., Johnson S.C., Jones S.R.M.**  
Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1b-1, TNFa-1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles.  
Fish & Shellfish Immunology 22 (2007), 403-07.
- ④ **Finkel M.S., Oddis C.V., Jacob T.D., Watkins S.C., Hattler B.G., Simmons R.L**  
Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide.  
Science 257 (1992), 387-89.
- ④ **Fredriksen B.N., Sævareid K., McAuley L., Lane M.E., Bøgwald J., Dalmo R.A.**  
Early immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after immunization with PLGA nanoparticles loaded with a model antigen and  $\beta$ -glucan.  
Vaccine 29 (2011), 8338– 49.
- ④ **Fukuda Y., Kusuda R.**  
Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration.  
Bulletin of Japanese Society for Science in Fisheries 47 (1981), 147-150.
- ④ **Fuller R.**  
Probiotics.  
Ray Fuller (Eds) The Scientific Basis. Chapman & Hall. London. 327. 1992

## G

- Ⓢ **Galeotti M., Beron D., Beraldo P.**  
Introduction to fish Pasteurellosis.  
European Association of Fish Pathologists. Workshop Recent Finding On The Development of New Vaccines Against Fish Pasteurellosis. Udine, Italy. November 23, 2002.
  
- Ⓢ **Ghezzi P., Saccardo B., Villa P., Rossi V., Bianchi M., Dinarello C.A.**  
Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin.  
*Infection and Immunity* 54 (1986), 837-40
  
- Ⓢ **Goedken M., De Guise S.**  
Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms.  
*Fish & Shellfish Immunology* 16 (2004), 539-52.
  
- Ⓢ **Gravell M., Malsberger R.G.**  
A permanent cell line from the Fathead minnow (*Pimephales promelas*).  
*Annals of the New York Academy of Science* 126 (1965), 555-65.
  
- Ⓢ **Gravningen K., Sakai M., Mishiba T., Fujimoto T.**  
The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study.  
*Fish & Shellfish Immunology* 24 (2008), 523-529.
  
- Ⓢ **Grosser T., Yusuff S., Cheskis E., Pack M.A., FitzGerald G.A.**  
Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish.  
*Proceeding of the National Academy of Science U S A.* 11 (2002), 8418-23.
  
- Ⓢ **Gudding R., Lillehaug A., Evensen, O.**  
Recent developments in fish vaccinology.  
*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72 (1999), 203-212

## H

- Ⓢ **Hanif A., Bakopoulos V., Dimitriadis G.J.**  
Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae.  
*Fish & Shellfish Immunology* 17 (2004), 411-35.

- © **Hanif A., Bakopoulos V., Leonardos I., Dimitriadis G.J.**  
The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters.  
Fish & Shellfish Immunology 19 (2005), 345-61.
- © **Hardford A.J., O'Halloran K., Wright P.F.A.**  
Flow cytometry analysis and optimization for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish.  
Fish & Shellfish Immunology 20 (2006), 562-573
- © **Harun N.O., Wang T., Secombes C.J.**  
Gene expression profiling in naïve and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish.  
Vaccine 26 (2011), 4388-99.
- © **Haugland Ø., Torgersen J., Syed M., Evensen Ø.**  
Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination.  
Vaccine 23 (2005), 5488-99.
- © **Heppell J., Davis H.L.**  
Application of DNA vaccine technology to aquaculture.  
Advance Drug Delivery Reviews 43 (2000), 29-43.
- © **Horne M.T.**  
Technical aspects of the administration of vaccines.  
Developments in Biological Standartisation 90 (1997), 79-89.
- © **Http**  
<http://www.nmt.us/products/afs/afs.shtml>  
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca043.htm>  
[http://www.vi.cl/foro/topic/5698-capitulos-de-inmunologa-apuntes/page\\_\\_st\\_\\_100](http://www.vi.cl/foro/topic/5698-capitulos-de-inmunologa-apuntes/page__st__100)

## I

- © **Isaacs A., Lindenmann J.**  
Virus Interference I. The interferon  
Proceeding of the Royal society of London 147 (1957), 258-267.

## J

- Ⓢ **Janssen W.A., Surgalla M.J.**  
Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus amaericanus*).  
Journal of Bacteriology 96 (1968), 1606-10.
- Ⓢ **Jensen V., Robertsen B.**  
Cloning of a Mx cDNA from Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression after treatment of halibut with double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus.  
Journal of Interferon Cytoquine Research 20 (2000), 701-10.
- Ⓢ **Jensen I., Albuquerque A., Sommer A.I., Robertsen B.**  
Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon.  
Fish & Shellfish Immunology 13 (2002), 311-26.

## K

- Ⓢ **Koumans-van Diepen J.C.E., van de Lisdonk M.H.M., Taverne-Thiele A.J.**  
Characterisation of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.).  
Developmental & Comparative Immunology 18 (1994), 45-46
- Ⓢ **Kubota S., Kimura M., Egusa S.**  
Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-I: Symptomatology and histopathology.  
Gyob Kenk 4 (1970), 103-110.
- Ⓢ **Kusuda R., Kamaguchi M.**  
The efficacy of attenuated live bacteria of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail.  
Bulletin of European Association of Fish pathology 8 (1988), 50-52.

## L

- Ⓢ **Larsen R., Røkenes T.P., Robertsen B.**  
Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein.  
Journal of Virology 78 (2004), 7938-44.

- ④ **Le Breton A.D.**  
Vaccines in Mediterranean aquaculture: Practice and needs.  
Options Méditerranéennes 86 (2009), 147-54.  
The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture.
  
- ④ **Lee J.Y., Hirono I., Aoki T.**  
Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*.  
Developmental & Comparative Immunology 24 (2000), 407-15.
  
- ④ **Lewis D.H., Grumbles L.C., McConnell S., Flowers A.I.**  
*Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay  
Journal of Fish Diseases 6 (1970), 160-2.
  
- ④ **Liang Y., Kong C., Luo Y., Shen S., Zhang Y.**  
Molecular cloning, functional characterization and phylogenetic analysis of B-cell activating factor in zebrafish (*Danio rerio*).  
Fish & Shellfish Immunology 29 (2010), 233–40.
  
- ④ **Liu P.C., Chuang W.H., Lee K.K.**  
Purification of a toxic metalloprotease produced by the pathogenic *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cobia (*Rachycentron canadum*). Journal of Bioscience 66 (2011), 287-95.
  
- ④ **López-Castejón G., Sepulcre M.P., Roca F.J., Castellana B., Planas J.V., Meseguer J., 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 44 (2007), 2772-80.
  
- ④ **López-Dóriga M.V., Barnes A.C., dos Santos N.M., Ellis A.E.**  
Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum.  
Microbiology 46 (2000), 21-30.

## M

- Ⓢ **Magariños B., Santos N., Romalde J., Rivas J., Barja J.L., Toranzo A.E.**  
Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*.  
Journal of General Microbiology 138 (1992), 2491-98.
- Ⓢ **Magariños B., Romalde J.L., Noya M., Barja J.L., Toranzo A.E.**  
Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*.  
Federation of European Microbiological Society Letters journal. 138 (1996), 29-34.
- Ⓢ **McBeath A.J., Snow M., Secombes C.J., Ellis A.E., Collet B.**  
Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus.  
Fish & Shellfish Immunology 22 (2007), 230-41.
- Ⓢ **Mitchell H.**  
Choosing a furunculosis vaccine: points to consider.  
Bulletin of Aquaculture Association of Canada 95 (1995), 30–37.
- Ⓢ **Morrison R.N., Zou J., Secombes C.J., Scapigliati G., Adams M.B., Nowak B.F.**  
Molecular cloning and expression analysis of tumour necrosis factor-alpha in amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).  
Fish & Shellfish Immunology 23 (2007), 1015–31.
- Ⓢ **Muroga K., Sugiyama T., Ueki N.**  
Pasteurellosis in cultured black sea bream *Mylio macrocephalus*  
Journal of Faculty Fish Animal Husbandry. Hiroshima University 16 (1977), 17-21.

## N

- Ⓢ **Nascimento P.J., Pereira M.I., Reis M., do Vale A., Zou J., Silva M.T.**  
Molecular cloning and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha).  
Fish & Shellfish Immunology 23 (2007), 701–10.
- Ⓢ **Nakanishi T., Kiryu I., Ototake M.**  
Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument.  
Vaccine 20 (2002), 3764–69.

- © **Nakanishi T., Ototake M.,**  
Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination.  
Developments in Biological Standartisation 90 (1997), 59-68.
  
- © **Nicolas J.L., Gauthier G., Orsini L., Corre S.**  
Use of 16S rRNA sequences for taxonomy and detection of pathogenic bacteria.  
6<sup>th</sup> International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. Montpellier,  
France 1994.
  
- © **Nitzan S., Shwartsburd B., Heller E.D.**  
The effect of growth medium salinity of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*  
on the immune response of hybrid bass (*Morone saxatilis*, *M. chrysops*).  
Fish & Shellfish Immunology 16 (2004), 107–11.
  
- © **Nordmo R.**  
Strengths and weaknesses of different challenge methods.  
Developments in Biological Standartisation 90 (1997), 303-9.

## O

- © **O'Farrell C., Vaghefi N., Cantonnet M., Buteau B., Boudinot P., Benmansour A.**  
Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major  
contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus  
infection.  
Journal of Virology 76 (2002), 8040-9.
  
- © **Ordas M.C., Costa M.M., Roca F.J., Lopez-Castejon G., Mulero V., Meseguer J.**  
Turbot TNF alpha gene: molecular characterization and biological activity of the  
recombinant protein.  
Molecular Immunology 44 (2007), 389-400.
  
- © **Osorio C., Romalde J., Barja J., Toranzo A.E.**  
Presence of phospholipase-D (dly) gene coding for damselysin production is not a  
pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.  
Microbial Pathogenesis 28 (2000), 119–26.

## P

- Ⓢ **Paolini A., Ridolfi V., Zezza D., Cocchietto M., Musa M., Pavone A., Conte A., Giorgetti G.**  
Vaccination trials of sea bass (*Dichentrachus labrax*) against pasteurelosis using oral, intraperitoneal and immersion methods.  
*Veterinaria Italiana* 41 (2005), 137-44.
  
- Ⓢ **Pelegrin P., García-Castillo J., Mulero V., Mesenguer J.** Interleukin  
-1 $\beta$  isolated from a marine fish reveals ups-regulated expression in macrophages  
following activation with lipopolysaccharide and lymphokine. *Cytoquine* 16  
(2001), 67-72.
  
- Ⓢ **Pettersen E.F., Bjercknes R., Wergeland H.I.**  
Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney  
leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow  
cytometry.  
*Fish & Shellfish Immunology* 10 (2000), 695–710
  
- Ⓢ **Plant K.P., La Patra S.E.**  
Advances in fish vaccine delivery.  
*Developmental & Comparative Immunology* 35 (2011), 1256-62.
  
- Ⓢ **Pleguezuelos O., Zou J., Cunningham C., Secombes C.J.**  
Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1beta gene in  
rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
*Immunogenetics* 51(2000), 1002-11.
  
- Ⓢ **Pridgeon J.W., Klesius P.H.**  
Development of a novobiocin-resistant *Edwardsiella ictaluri* as a novel vaccine in  
channel catfish (*Ictalurus punctatus*).  
*Vaccine* 29 (2011), 5631-7.

## R

- Ⓢ **Raida M.K., Buchmann K.**  
Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout  
following *Yersinia ruckeri* vaccination.  
*Diseases of Aquatic Organisms* 77 (2007), 41-52.
  
- Ⓢ **Raida M.K., Buchmann K.**  
Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against  
*Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression.  
*Vaccine* 26 (2008), 1050-62.



- Ⓒ **Real F., Oros J., Acosta F., Acosta B., Santana P., Deniz S.**  
Pasteurellosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria, Spain  
Bulletin of European Association of Fish Pathologists 17 (1997), 153-57.
- Ⓒ **Renault T., Xue Q.G., Chilmonczyk S.**  
Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes.  
Fish & Shellfish Immunology 11 (2001), 269-74.
- Ⓒ **Roberts S.B., Langenau D.M., Goetz F.W.**  
Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary.  
Molecular and Cellular Endocrinology 160 (2000), 89-97.
- Ⓒ **Roberts R.J.**  
Fish pathology. *Billiere-Tindall*, Londres 1978
- Ⓒ **Robertsen B., Trobridge G., Leong J.**  
Molecular cloning of the double-stranded RNA inducible Mx gene of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).  
Developmental & Comparative Immunology 21 (1997), 397-412.
- Ⓒ **Robertsen B.**  
The interferon system of teleost fish.  
Fish & Shellfish Immunology 20 (2006), 172-91.
- Ⓒ **Roca F. J., Mulero I., López-Muñoz A., Sepulcre M.P., Renshaw S.A., Meseguer J., Mulero V.**  
Evolutions of the inflammatory response in vertebrates: Fish TNF- $\alpha$  is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes.  
The journal of Immunology 181 (2008), 5071-81.
- Ⓒ **Romalde J.L.**  
*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen.  
International Microbiology 5 (2002), 3-9.
- Ⓒ **Rombout J.H., Abelli L., Picchietti S., Scapigliati, G., Kiron V.**  
Teleost intestinal immunology.  
Fish & Shellfish Immunology 31 (2011), 616-26.

## S

- Ⓢ **Sanchez-Vizcaíno J.M.**  
Vacunas y Sueroterapia en “Manual de Inmunología Veterinaria”. Capítulo 25 (2007), 514-35.
- Ⓢ **Sanchez-Vizcaíno J.M.**  
Curso de introducción a la inmunología porcina. Segunda edición.  
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca043.htm>
- Ⓢ **Scapigliati G., Buonocore F., Bird S., Zou J., Pelegrin P., Falasca C., Prugnoli D., Secombes C.J.**  
Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1beta.  
Fish & Shellfish Immunology 11 (2001), 711-26.
- Ⓢ **Scapigliati G., Buonocore F., Randelli E., Casani D., Meloni S., Zarletti G., Tiberi M., Pietretti D., Boschi I., Manchado M., Martin-Antonio B., Jimenez-Cantizán R., Bovo G., Borghesan F., Lorenzen N., Einer-Jensen K., Adams S., Thompson K., Alonso C., Bejar J., Cano I., Borrego J.J., Alvarez M.C.**  
Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus.  
Fish & Shellfish Immunology 28 (2010), 303-11.
- Ⓢ **Secombes C.J., Fletcher T.C.**  
The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.  
Annual Review of Fish Disease 2 (1992), 53-71.
- Ⓢ **Sepulcre M.P., López-Castejón G., Meseguer J., Mulero V.**  
The activation of gilthead sea bream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish.  
Molecular Immunology 44 (2007), 2009–16.
- Ⓢ **Siripornadulsil S., Dabrowski K., Sayre R.**  
Microalgal vaccines.  
Advances in Experimental Medicine and Biology 616 (2007), 122–28.
- Ⓢ **Saeij J.P., Stet R.J., de Vries B.J., van Muiswinkel W.B., Wiegertjes G.F.**  
Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance?  
Developmental & Comparative Immunology 27 (2003), 29–41.
- Ⓢ **Salinas I., Zhang Y., Sunyer O.**  
Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish.  
Developmental & Comparative Immunology 35 (2011), 1346–65.

- © **Savan R., Sakai M.**  
Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L.): genomic and expression analysis.  
Fish & Shellfish Immunology 17 (2004), 87–94.
- © **Schlotfeldt H.J., Ahne W., Vestergard-Jorgensen P.E.**  
Occurrence of viral haemorrhagic septicemia in turbot (*Scophthalmus maximus*). A natural outbreak  
Bulletin European Association Fish Pathology 11 (1991), 105–07.
- © **Sharpe C.S.**  
Physiological stress responses to automated and hand vaccine injection procedures in yearling coho salmon.  
North American Journal of Aquaculture 69 (2007), 180–84.
- © **Silva M.T., dos Santos N.M.S., do Vale A.**  
AIP56: A Novel Bacterial Apoptogenic Toxin.  
Toxins 2 (2010), 905-18.
- © **Sniezko S.F., Bullock G.L., Hollis E., Boone J.G.**  
*Pasteurella* spp. From an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas.  
Journal of Bacteriology 88 (1964), 1814-15.
- © **Sommerset I., Krössy B., Biering E., Frost P.**  
Vaccines for fish in Aquaculture  
Expert Review Vaccine 4 (2005), 89-101.

## T

- © **Tafalla C., Aranguren R., Secombes C.J., Figueras A., Novoa B.**  
Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA.  
Fish & Shellfish Immunology 16 (2004), 11-24.
- © **Toranzo A.E., Barreiro S., Casal J. F., Figueras A., Magariños B., Barja J.**  
Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain.  
Aquaculture 99 (1991), 1-15.
- © **Toranzo A.E., Magariños B., Romalde J.L.**  
A review of the main bacterial fish diseases in marine systems.  
Aquaculture 246 (2005), 37-61.

## Bibliografía

---

- Ⓢ **Toranzo A.E., Romalde J.L., Margariños B., Barja J.L.**  
Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial disease.  
Options Méditerranéennes 86 (2009), 155-76. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture.
- Ⓢ **Trobridge G.D., Chiou P.P., Leong J.A.**  
Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells.  
Journal of Virology 71 (1997), 5304-11.
- Ⓢ **Trobridge G.D., Leong J.A.**  
Characterization of a rainbow trout Mx gene.  
J Interferon Cytokine Res. 15 (1995), 691-702.

## U

- Ⓢ **Ueki N., Kayano Y., Muroga K.**  
*Pasteurella piscicida* in juvenile red grouper.  
Fish Pathology 25 (1990), 43-44.

## V

- Ⓢ **Vivas J., Riano J., Carracedo B., Razquin B., López-Fierro P., Naharro G., Villena A.**  
The auxotrophic *aroA* mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
Fish & Shellfish Immunology 16 (2004), 193-206.

## W

- Ⓢ **Wang N., Yang Z., Zang M., Liu Y., Lu C.**  
Identification of Omp38 by immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas hydrophila* in Chinese breams. Fish & Shellfish Immunology 34 (2013), 74-81.
- Ⓢ **Wiens G.D., Glenney G.W.**  
Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies.  
Developmental & Comparative Immunology 12 (2011), 1324-35.

- © **Wolfe U., Martin, S., Emde, M., Schempp, C.**  
Dermatology in the Darwin anniversary. Part 2: evolution of the skin associated immune system.  
Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 7 (2009), 862–69.

## X

- © **Xiao J., Zhou Z.C., Chen C., Huo W.L., Yin Z.X., Weng S.P.**  
Tumor necrosis factor-alpha gene from mandarin fish, *Siniperca chuatsi*: molecular cloning, cytotoxicity analysis and expression profile.  
Molecular Immunology 44 (2007), 3615–22.
- © **Xiao J., Chen T., Wang Q., Liu Q., Wang X., Lv Y., Wu H., Zhang Y**  
Search for live attenuated vaccine candidate against edwardsiellosis by mutating virulence-related genes of fish pathogen *Edwardsiella tarda*.  
Letters in Applied Microbiology 53 (2011), 430-7.
- © **Xie F.J., Zhang Z.P., Lin P., Wang S.H., Zou Z.H., Wang Y.L.**  
Cloning and infection response of tumour-necrosis factor alpha in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson).  
Journal of Fish Biology 5 (2008), 1149-60.

## Y

- © **Yang T., Forrest S.J., Stine N., Endo Y., Pasumarthy A., Castrop H., Aller S., Forrest Jr. J.N., Schnermann J., Briggs J.**  
Cyclooxygenase cloning in dogfish shark, *Squalus acanthias*, and its role in rectal gland C1 secretion.  
American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology 283 (2002), 631-37.
- © **Yap W.H., Tay A., Brenner S., Venkatesh B.**  
Molecular cloning of the pufferfish (*Takifugu rubripes*) Mx gene and functional characterization of its promoter.  
Immunogenetics 10 (2003), 705-13.
- © **Yasunaga N., Hatai K., Tsukahara J.**  
*Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream.  
Fish Pathology 18 (1983), 107-10.
- © **Yoshida T., Inglis V., Misawa N., Kruger R., Sakai M.**  
*In vitro* adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells.  
Journal of Fish Disease 20 (1997), 77-80.

- © **Yu L.P., Hu Y.H., Sun B.G., Sun L.**  
C312M: an attenuated *Vibrio anguillarum* strain that induces immunoprotection as an oral and immersion vaccine.  
Diseases of Aquatic Organisms 102 (2012), 33-42.

## Z

- © **Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez-De Frias C., Cortes A.**  
Ontogeny of the immune system of fish.  
Fish & Shellfish Immunology 20 (2006), 126-36.
- © **Zarza C.**  
Enfermedades emergentes en la piscicultura marina española.  
Skretting informa. Primavera 2007  
[http://www.skretting.es/Internet/SkrettingSpain/webInternet.nsf/wprid/85AD4A8A80404486C125746E0045F310/\\$file/EspPri072231.pdf](http://www.skretting.es/Internet/SkrettingSpain/webInternet.nsf/wprid/85AD4A8A80404486C125746E0045F310/$file/EspPri072231.pdf)
- © **Zhang Y., Salinas I., Sunyer O.**  
Recent findings on the structure and function of teleost IgT.  
Fish & Shellfish Immunology 31 (2011), 627-34.
- © **Zorrilla I., Balebona M.C., Moriñigo M.A., Sarasquete C., Borrego J.J.**  
Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from sole *Solea senegalensis*.  
Journal of Fish Diseases 22 (1999), 1-6.
- © **Zou J., Neumann N.F., Holland J.W., Belosevic M., Cunningham C., Secombes C.J., Rowley A.F.**  
Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation.  
Biochemical Journal 15 (1999), 153-9.
- © **Zou J., Wang T., Hirono I., Aoki T., Inagawa H., Honda T.**  
Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*  
Developmental and Comparative Immunology 26 (2002), 161-72.



*Agradecimientos*





## **AGRADECIMIENTOS**

Es preciso para mí agradecer a todas las personas que han estado a mi lado durante estos años de realización de la tesis, con vosotros he reído, he sufrido y tal vez me haya convertido, dentro de lo posible, en mejor persona.

En primer lugar agradecer al profesor Félix Acosta Arbelo, mi tutor de tesis por su apoyo, guía y confianza a lo largo de la ejecución de este trabajo.

Un agradecimiento especial también al Director Daniel Padilla por sus exhaustivas correcciones y al catedrático Fernando Real Valcárcel por darme la oportunidad de trabajar en este grupo.

A mis compañeras de laboratorio que han hecho el día a día más ameno, a todas las quiero y las aprecio un montón, Lorena, Fati, Lita, Judit y Jimena gracias por brindarme vuestra ayuda siempre. Ojalá puedan seguir trabajando en investigación aportando sus conocimientos, os deseo lo mejor.

A Patri, un agradecimiento muy especial por tener tanta paciencia conmigo y enseñarme los secretos del citómetro de flujo, ayudarme con el artículo y estar siempre disponible a la hora de dar un buen consejo.

A la gente del laboratorio Fish Immunology Vaccinology (FIV) del IBMC de Oporto va un agradecimiento muy muy grande. Aunque por causas ajenas el experimento realizado en el IBMC no entra en esta tesis no puedo dejar de mencionarlos. Gracias a Nuno Dos Santos por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y gracias sobre todo a Ana do Vale, gran mujer y profesional que estimo muchísimo. A las becarias y amigas Daniela, Marisa, Marta, Carolina, Leonor, Raquel y Ruth...” as minhas meninas”... MUITO OBRIGADA!

A mi familia, toda, a los que están y a los que ya no. Vosotros sois los que más han notado mi ausencia, que han sufrido y se han alegrado conmigo, Grazie a tutti (en especial MAMMA e PAPÁ y mi hermanito VALERIO). Vi voglio bene!

A mis hermanas italianas Aura, Manu y Roberta y a mi “familia canaria” que me ha acompañado en estos últimos cinco/seis años (¡imposible nombrar a todos!) en especial a los amigos y amigas que me han animado siempre a que terminara la tesis, Lisandro, Manolo, Vito, Rafa, Olga, Fefy y Montse. Os quiero mucho.

Un “gracias” especial a Sergio por ayudarme con las revisión, gráficas, portada de la tesis...y miles de cosas más.

En fin.... ¡Gracias a todos!



*Anexos*



*ANEXO I*

# MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS



## **PBS, Tampón fosfato salino**

Composición (por litro):

|  |        |
|--|--------|
| Ⓢ Dihidrogenofosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) | 0,24 g |
| Ⓢ Cloruro potásico (KCl)                                   | 0,2 g  |
| Ⓢ Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,01M     | 1,44 g |
| Ⓢ Cloruro sódico (NaCl) 0,137M                             | 8 g    |

*Preparación:*

*Mezclar todos los ingredientes en 1 l de agua destilada, agitar bien hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave (121 °C durante 30 min).*

## **Agua DEPC**

Composición (por 100 ml):

|   |        |
|---|--------|
| Ⓢ Dietilpirocarbonato, DEPC ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) | 0,1 ml |
|---|--------|

*Preparación:*

*Mezclar el DEPC en 100 ml de agua destilada, mantener en agitación toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Esterilizar a 121 °C durante 30 min.*

## **BHIB, Caldo Infusión Cerebro Corazón**

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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 2,5 g |
| Ⓢ Cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ )               | 5 g   |

pH final:  $7,4 \pm 0,2$

*Preparación:*

*Suspender 37 g del medio de cultivo 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.*

## BHIA, Agar Infusión Cerebro Corazón

Composición (por litro):

|  |       |
|--|-------|
| Ⓢ Infusión de cerebro de ternera                 | 7,5 g |
| Ⓢ Infusión de corazón de res                     | 7,5 g |
| Ⓢ Dextrosa                                       | 2 g   |
| Ⓢ Mezcla de peptonas                             | 10 g  |
| Ⓢ Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) | 2,5 g |
| Ⓢ Cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ )               | 5 g   |
| Ⓢ Agar   | 15 g  |

pH final a  $7,4 \pm 0,2$

*Preparación:*

*Suspender 52 g en 1 litro 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 15 ml en cada una.*



## Agar sangre

Composición por litro:

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| Ⓢ Infusión de músculo de corazón  | 2 g  |
| Ⓢ Extracto de levadura            | 5 g  |
| Ⓢ Cloruro de sodio                | 5 g  |
| Ⓢ Agar bacteriológico             | 15 g |
| Ⓢ Digerido pancreático de caseína | 13 g |

pH final a  $7,3 \pm 0,2$

### *Preparación:*

*Suspender 40 g del medio de cultivo en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C. Dejar enfriar hasta 45°C, añadir un 5% de sangre de oveja desfibrinada, y distribuir en placas de Petri estériles con 15 ml en cada una.*



## *Anexo II*

### **Laboratorios y casas comerciales nombradas en este trabajo**

-  **Bio-Rad** Bio-rad Laboratorios S.A., Alcobendas, Madrid, España
  
-  **BioMérieux** BioMérieux, Madrid, España
  
-  **Eppendorf** Netherler-Hinz, Hamburgo, Alemania
  
-  **Invitrogen** Invitrogen S.A., El Prat de Llobregat, Barcelona, España
  
-  **Sigma** Sigma-Aldrich Química, S.A., Tres Cantos, Madrid, España
  
-  **Skretting** Skretting España S. A., Cojóbar, Burgos, España

