



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA



CIHEAM
ZARAGOZA

MÁSTER UNIVERSITARIO EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España

**Estudio de la respuesta temprana del sistema inmune de lubina
(*Dicentrarchus labrax* L.) y células E-11 ante inmunoestimulantes y
*Nodavirus***

Realizado por:
Antonio Gómez Mercader

**TESIS PRESENTADA Y PÚBLICAMENTE DEFENDIDA PARA LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO OFICIAL DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN
CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria a 01 de julio del 2022

Agradecimientos

En este trabajo me gustaría expresar mi agradecimiento a:

A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y al Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM) por hacer posible el Máster Oficial en Cultivos Marinos y la gran calidad del equipo docente e investigador.

A Jimena, por toda su dedicación, excelencia como tutora, y por lo que he aprendido de ella, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Angie por su excelente labor como técnica de laboratorio y toda la ayuda prestada en la realización del trabajo.

A mi cotutor Félix y todos los compañeros de laboratorio: Andrés, Christian, Luis, Andrea, Carmen y todos los demás, por todo lo que me han enseñado y el apoyo prestado.

A Mireia, Vanessa y Fernando, del Banco Español de Algas y a Leandro de la facultad de medicina de la ULPGC, por prestarnos material para la realización del experimento.

A mis padres y mi hermano, por haber confiado y apostado por mí, y así hacer posible que haya cursado este Máster.

Y a Ángela, por el incalculable valor de su apoyo, ayuda y ánimos día tras día, que han hecho posible alcanzar mis metas.

Lista de contenidos

Lista de contenidos	I
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen	XI
Resumen gráfico	XII
Abstract.....	XIII
Graphical abstract	XIV
1. Introducción	1
1.1. Importancia de la acuicultura.....	1
1.2. Dificultades en la acuicultura actual	3
1.2.1. Enfermedades infecciosas.....	4
1.3. Sistema inmune de los peces teleósteos.....	7
1.3.1. Órganos linfoides.....	7
1.3.2. Sistema inmune innato o inespecífico	8
1.3.3. Conexiones entre el sistema inmune innato y adaptativo.....	16
1.3.4. Sistema inmune adaptativo o específico.....	19
1.4. Prevención de enfermedades en peces	20
1.4.1. Inmunoestimulantes.....	22
2. Objetivos	26

2.1.	Objetivo general.....	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3.	Material y métodos.....	27
3.1.	Obtención de la bacteria	27
3.2.	Identificación de la bacteria.....	27
3.2.1.	Identificación de la bacteria mediante pruebas bioquímicas.....	27
3.2.2.	Identificación de la bacteria mediante qPCR	29
3.3.	Extracción de LPS	30
3.4.	Cultivo y mantenimiento de células E-11	32
3.5.	Replicación y titulación viral.....	32
3.5.1.	Replicación viral.....	32
3.5.2.	Titulación viral	33
3.6.	Diseño experimental	34
3.6.1.	Evaluación <i>in vivo</i> de los LPS y poly (I:C) como inmunoestimulantes para modular la respuesta inmune en lubina.....	34
3.6.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C).....	36
3.6.3.	Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con <i>Nodavirus</i>	37
3.7.	Procesamiento de las muestras	37
3.7.1.	Evaluación de la expresión génica mediante qPCR	38
3.8.	Análisis estadístico	40

4.	Resultados	41
4.1.	Identificación de la bacteria.....	41
4.1.1.	Identificación de la bacteria mediante pruebas bioquímicas.....	41
4.1.2.	Identificación de la bacteria mediante qPCR	42
4.2.	Extracción de LPS	43
4.2.1.	Electroforesis en SDS-PAGE	43
4.2.2.	Electroforesis en gel de agarosa	44
4.3.	Evaluación <i>in vivo</i> de los LPS y poly (I:C) como inmunoestimulantes para modular la respuesta inmune en lubina.....	46
4.4.	Evaluación <i>in vitro</i> de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C)	52
4.5.	Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con <i>Nodavirus</i>	56
5.	Discusión.....	61
5.1.	Evaluación <i>in vivo</i> de los LPS y poly (I:C) como inmunoestimulantes para modular la respuesta inmune en lubina.....	61
5.1.1.	Respuesta antiviral.....	61
5.1.2.	Citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias	62
5.2.	Evaluación <i>in vitro</i> de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C)	64
5.2.1.	Respuesta antiviral.....	64
5.2.2.	Citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias	64

5.3. Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con <i>Nodavirus</i>	65
6. Conclusiones	67
7. Bibliografía.....	68

Lista de figuras

- Figura 1.** Efecto citopático en células E-11 tras la infección con *Nodavirus*. Se puede observar la separación del tapiz celular (A) y la vacuolización de las células (B)..... 34
- Figura 2.** Esquema del ensayo experimental con lubina. 36
- Figura 3.** Identificación de *V. alginolyticus* mediante tinción de Gram, mostrando bacilos gramnegativos (A), prueba de la peroxidasa con formación de burbujas (B) y prueba de la oxidasa con un viraje de la tira reactiva a color azul (C)..... 42
- Figura 4.** Identificación de *V. alginolyticus* mediante sembrado en Hugh Leifson, donde se aprecian los medios antes de ser sembrados (izquierda) y tras el crecimiento de la bacteria (derecha) (A) y mediante siembra en un medio sin sal, donde no se produjo crecimiento bacteriano (B). 42
- Figura 5.** Resultado de la qPCR para la detección de *V. alginolyticus*. 43
- Figura 6.** Perfil electroforético de marcador Precision Plus Protein™ WesternCTM Standars (carriles 1 y 4), *V.alginolyticus* sonificado como control positivo (carril 2) y muestra de LPS (carril 3) en gel SDS-PAGE. 44
- Figura 7.** Perfil electroforético de *V. alginolyticus* calentado a 99 °C como control positivo (carril 1) y muestras de LPS (carriles 2 a 8) en gel de agarosa. 45
- Figura 8.** Perfil electroforético de marcador de peso molecular (carril 1), control negativo (carril 2), y muestras de ADN obtenidas a partir de bacterias sin identificar obtenidas del cultivo de órganos de peces enfermos (carriles 3 a 7) en gel de agarosa (A) y pez fallecido a causa de la enfermedad, con hemorragias en boca, branquias y aletas (B)..... 47
- Figura 9.** Expresión de los genes Mx (A) e IRF-3 (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$ 48

Figura 10. Expresión de los genes IL-1 β (A) e TNF- α (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$	50
Figura 11. Expresión del gen IL-10 para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$	51
Figura 12. Expresión de los genes IL-1 β (A) y TNF- α (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de células E-11. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$	53
Figura 13. Expresión de los genes IRF-3 (A) e IL-10 (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de células E-11. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$	55
Figura 14. Título viral (TCID ₅₀ /ml) cuantificado en células E-11 infectadas con RGNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/ μ l).....	57
Figura 15. Título viral (TCID ₅₀ /ml) cuantificado en células E-11 infectadas con SJNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/ μ l).	58
Figura 16. Título viral (TCID ₅₀ /ml) cuantificado en células E-11 infectadas con TPNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/ μ l).....	59
Figura 17. Título viral (TCID ₅₀ /ml) cuantificado en células E-11 infectadas con BFNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/ μ l).	60

Lista de tablas

Tabla 1. Algunos de los inmunoestimulantes probados en acuicultura. Fuente: Barman <i>et al.</i> , 2013.	22
Tabla 2. Cebadores utilizados en la qPCR.....	30
Tabla 3. Cebadores empleados para evaluar la expresión de genes mediante qPCR.	39

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AMP: Péptidos antimicrobianos

ARN: Ácido ribonucleico

BFNNV: Barfin flounder nervous necrosis virus

BHI: Brain heart infusion

CLR: Receptores lecitina tipo C

CRP: Proteína C-reactiva

CTL: Linfocitos T citotóxicos

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino

GIALT: Tejido linfoide asociado a las branquias

HSP: Heat Shock Protein

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

LPS: Lipopolisacárido

MAC: Complejo de ataque de membrana

MALT: Tejido linfoide asociado a las mucosas

MDP: Muramil dipéptido

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMCs: Centros melanomacrofágicos

NALT: Tejido linfoide asociado a la nasofaringe

NCC: Células citotóxicas no específicas

NK: Linfocitos T “natural killer”

NLR: Nod like receptor

NNV: Necrosis nerviosa viral

NOD: Receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos NLR

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Poly (I:C): Ácido polinosínico:policitídílico

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

qPCR: PCR en tiempo real

RGNNV: Red grouper nervous necrosis virus

SALT: Tejido linfoide asociado a la piel

SJNNV: Stripped Jack nervous necrosis virus

TLR: Toll like receptor

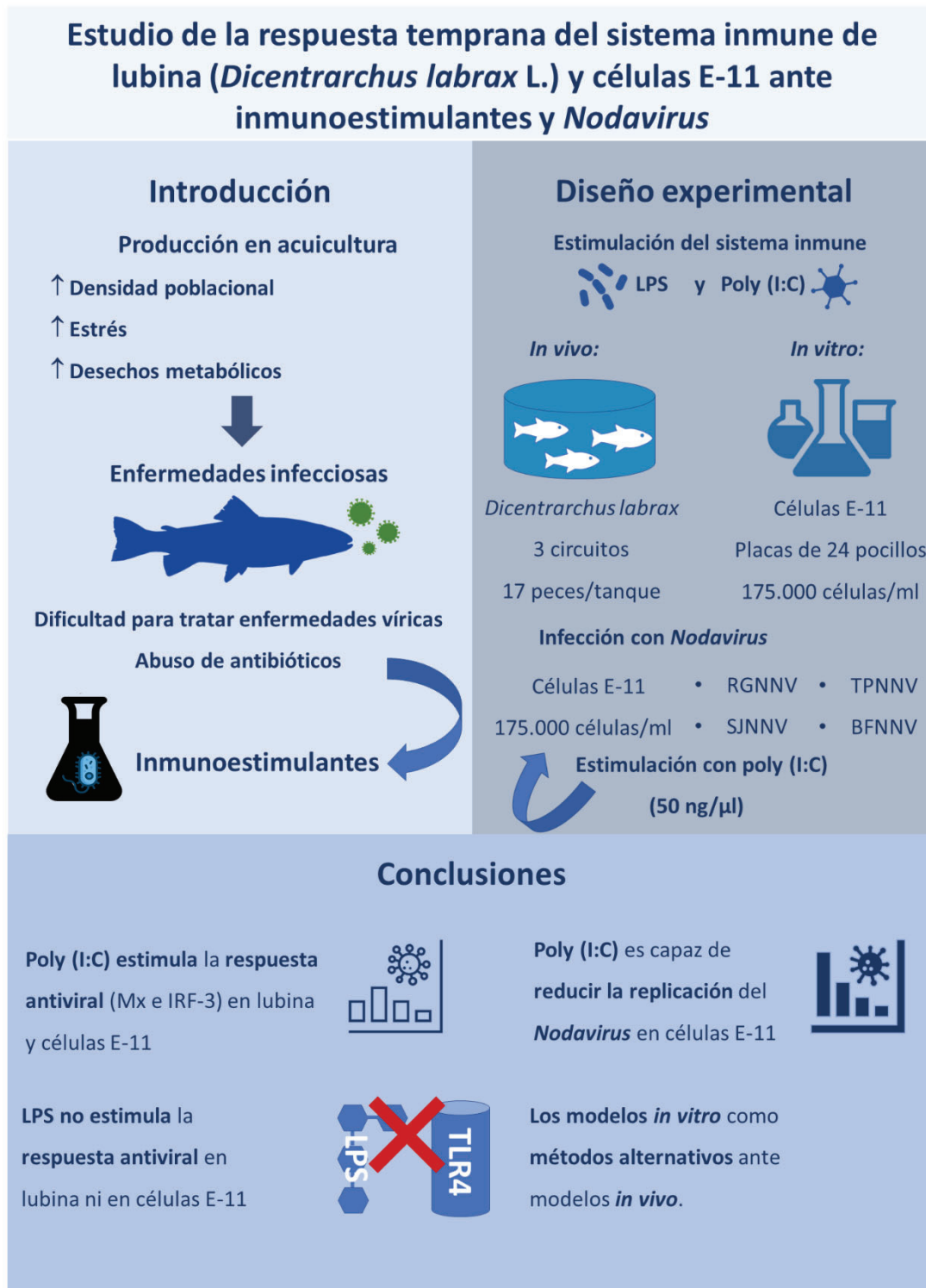
TPNNV: Tiger puffer nervous necrosis virus

VER: Enfermedad de la Encefalopatía y Retinopatía Vírica

Resumen

La acuicultura es el sector de producción de alimentos que más se ha desarrollado en las últimas décadas, sin embargo, en los últimos años, las enfermedades infecciosas se han convertido en un factor limitante para el progreso de la acuicultura. Debido a la proliferación y diseminación de las enfermedades, así como la imposibilidad de tratar algunas enfermedades y a problemas ambientales emergentes, se requieren alternativas sostenibles. Los inmunoestimulantes se muestran como una medida preventiva prometedora para minimizar los daños por enfermedades infecciosas. En este estudio, se evalúan los LPS de *Vibrio alginolyticus* y poly (I:C) como inmunoestimulantes de la lubina y las células E-11 como agentes preventivos de la Encefalopatía y Retinopatía Vírica (VER). Los resultados muestran que poly (I:C) estimula la respuesta antiviral tanto en lubina como en las células E-11, siendo además, capaz de reducir la replicación del virus en las células E-11. Los LPS, en cambio son incapaces de producir una respuesta inmune antiviral en la lubina y células E-11, probablemente debido a la ausencia de una vía de activación del sistema inmune. Además, dados los resultados del experimento con células E-11, se sugiere que los modelos de experimentos *in vitro* podrían ser una alternativa adecuada para sustituir los experimentos *in vivo*.

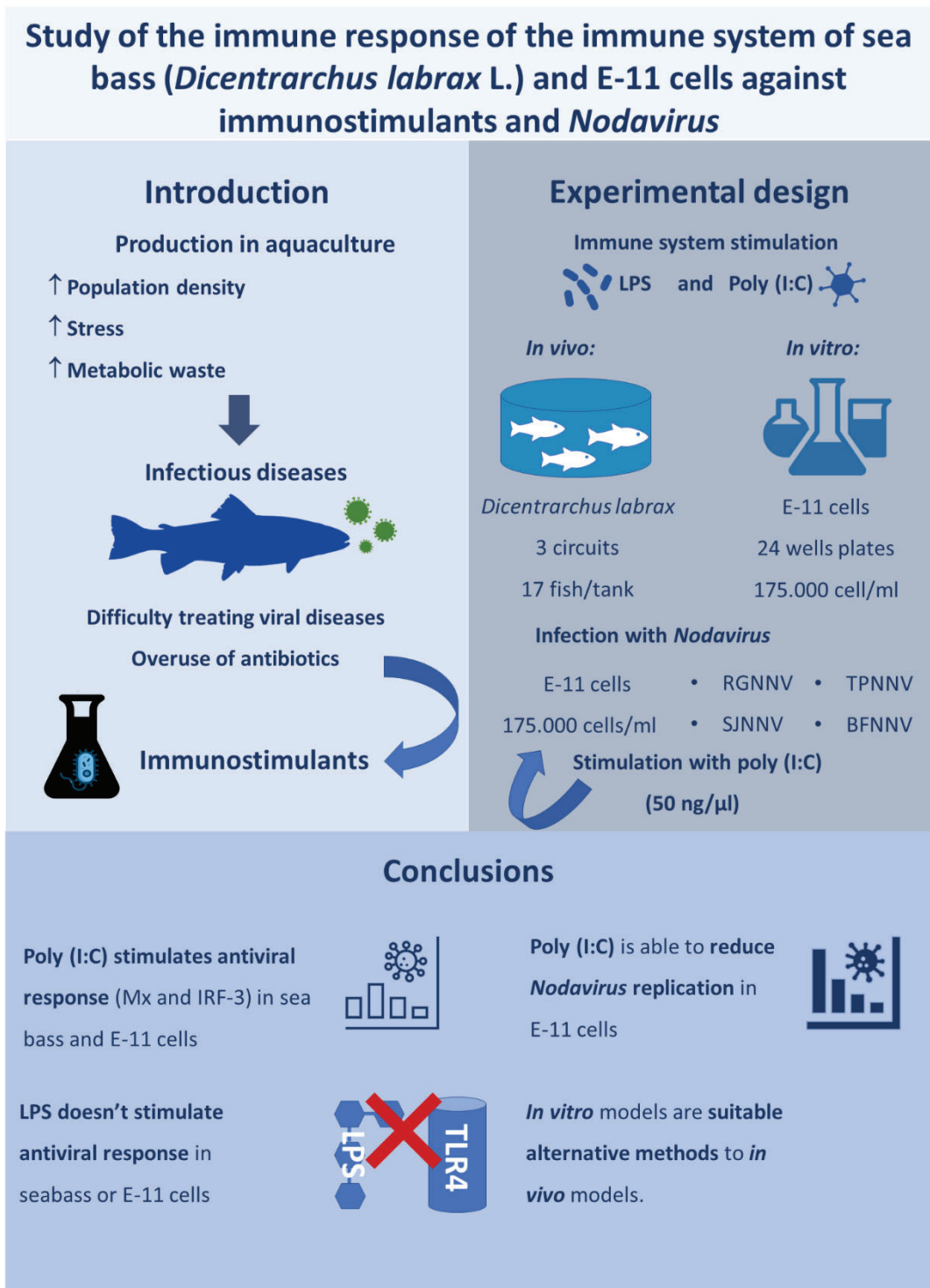
Resumen gráfico



Abstract

Aquaculture is the food production sector that had developed the most in recent decades, however, in last years, infectious diseases have become a limiting factor for the progress of aquaculture. Due to the appearance and spread of diseases, as well as the inability to treat some diseases and emerging environmental problems, sustainable alternatives are required. Immunostimulants are shown as a promising preventive measure to minimize the damage produced by infectious diseases. In this study, LPS from *Vibrio alginolyticus* and poly (I:C) are evaluated as immunostimulants of sea bass and E-11 cells as preventive agents of Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER). The results showed that poly (I:C) stimulates the antiviral response both in sea bass and in E-11 cells, and is also capable of reducing viral replication in E-11 cells. LPS, on the other hand, are unable to produce an antiviral immune response in sea bass and E-11 cells, probably due to the absence of an immune system activation pathway. In addition, given the results of the experiment with E-11 cells, it is suggested that *in vitro* experiment models could be a suitable alternative to replace *in vivo* experiments.

Graphical abstract



1. Introducción

1.1. Importancia de la acuicultura

Los alimentos de origen acuático suponen una esencial fuente de proteínas y micronutrientes importantes para la salud y economía humana. La acuicultura es una actividad que ha ganado una gran importancia en las últimas décadas, siendo el sector de producción de alimentos con el crecimiento más elevado actualmente, con una gran cantidad de avances tecnológicos y de sistemas de cultivo novedosos, que han permitido a la acuicultura consolidarse en numerosas partes del mundo (FAO 2020; El-Saadony *et al.* 2021).

Un desafío al que habremos de enfrentarnos en los próximos años, es la producción de alimento para abastecer a la población humana, en rápido crecimiento demográfico, a la vez que se reduce el impacto ambiental de la producción (Robinson y Pozzi, 2011).

Especialmente en algunas regiones, la acuicultura cobra especial importancia, siendo necesarias mejoras en la seguridad alimentaria y reducción de gastos de producción, en particular en países en desarrollo. Además, el rápido crecimiento de la población humana aumenta la necesidad de la obtención de fuentes de proteína de bajo costo, sumado al descenso de las capturas por parte de la industria pesquera, especialmente en masas de agua continentales, aumenta la necesidad de la obtención de fuentes de proteína de bajo costo, creando así la urgencia de desarrollar y perfeccionar las técnicas de acuicultura (El-Saadony *et al.* 2021).

Un gran número de estudios sugieren que, para solventar la creciente necesidad de proteína por parte de la población de manera sostenible, será necesario un aumento en la consumición de pescado y marisco, que se espera será provisto en gran parte por la acuicultura, la cual se espera que crezca un 62% hasta 2030 (Kobayashi *et al.* 2015; Froehlich *et al.* 2018).

La producción acuícola se encuentra en continuo auge, produciendo 120 millones de toneladas en 2019, con un valor de 274.376 millones de dólares, alcanzándose un récord de cantidad de producción y beneficios hasta la fecha. La contribución de la acuicultura

a la producción global de alimento de origen acuático alcanzó el 46% en 2018, comparado con el 25,7% que era en el año 2000. Excluyendo a China, el principal país productor, la producción de acuicultura respecto a la producción global fue del 29,7% en 2018, respecto al 12,7% en el año 2000. El cultivo de especies marinas en 2019 estuvo constituido predominantemente por peces (85,3 millones de toneladas), siendo un 71,07% de la producción total, que fueron cultivados en medio marino (23,2 millones de toneladas), salobre (9,8 millones de toneladas) y dulceacuícola (52,2 millones de toneladas) (FAO 2020).

Actualmente más de 100 millones de personas viven de la acuicultura, de las cuales la mayoría, y al contrario que los sistemas de producción de alimentos terrestres, se encuentran en países en vías de desarrollo. En dichos países se realiza aproximadamente el 95% de la producción global de acuicultura, aumentando hasta un 6,13% su producción cada año (FAO, 2019). En estos lugares se hace todavía más patente la necesidad de reducir el impacto ambiental y mejorar la seguridad alimentaria (Robinson y Pozzi, 2011; El-Saadony *et al.* 2021).

La Unión Europea es el principal importador y exportador de productos acuáticos del mundo, siendo el principal mercado de alimento tanto de origen pesquero como de acuicultura. El consumo per cápita de alimentos de origen acuático fue de aproximadamente 24,35 kg en 2017, con un consumo total de hasta 12,8 millones de toneladas. Globalmente el consumo per cápita tiende a aumentar cada año junto con la producción acuícola, no obstante, y al contrario de la tendencia global, la producción interna de la Unión Europea cada vez es menor, lo que obliga a aumentar la importación de productos frente a la producción local (APROMAR, 2020).

En el ámbito de la Unión Europea, España se posiciona como el mayor productor acuícola, con 342.867 toneladas en 2019, con un valor de hasta 501 millones de euros. Las principales especies producidas fueron mejillones (261.513 toneladas), lubina (27.335 toneladas), trucha arcoíris (18.995 toneladas) y dorada (13.521 toneladas) (APROMAR, 2020; Iglesias, 2020). En cuanto a la lubina (*Dicentrarchus labrax*), se trata de uno de los peces óseos más cultivados en el Mediterráneo y áreas adyacentes, donde lo cultivan hasta 19 países. Los valores de producción alcanzaron las 212.977

toneladas en 2019, con un crecimiento de 8,3% frente al anterior año, sin embargo, y debido a la situación sociosanitaria actual, se espera un acusado descenso en la producción (APROMAR, 2020; FAO, 2020).

1.2. Dificultades en la acuicultura actual

En la actualidad, la acuicultura ha evolucionado hacia una mayor especificidad y especialización de las producciones. Las mejoras tecnológicas y metodológicas han permitido aumentar el rendimiento de las instalaciones, produciéndose una intensificación. Si bien la intensificación de la acuicultura tiene grandes ventajas, como obtener un mayor beneficio económico o aprovechar de manera más eficiente el espacio, plantea nuevos retos, exponiendo a los organismos cultivados a una gran cantidad de factores estresantes como la alta densidad de individuos, transportes, pesticidas, desechos metabólicos, etc. (Toni *et al.*, 2017; Boyd *et al.*, 2020).

De cara a la imagen pública, debido a que se trata del sector de producción de alimentos con el crecimiento más rápido de la actualidad, además de haber superado a la pesca en cuanto a producción de biomasa, la acuicultura se encuentra en el punto de mira de la sociedad en cuanto a sostenibilidad e impacto en el medio ambiente (Boyd *et al.*, 2020).

El auge de la acuicultura ha traído consigo la aparición o reaparición de una gran cantidad de enfermedades infecciosas. Debido a que la acuicultura usualmente requiere de instalaciones de producción a gran escala, las altas densidades de animales proporcionan las condiciones ideales para la proliferación y diseminación de enfermedades infecciosas, causando elevadas pérdidas económicas (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). Además, el aumento de la temperatura de los océanos aumenta todavía más la frecuencia con la que surgen nuevas enfermedades (Barange *et al.* 2018). En la acuicultura, las bacterias son la causa más habitual de enfermedades, sin embargo, los virus, hongos y parásitos también tienen una repercusión importante en las instalaciones acuícolas. Los virus suponen la mayor amenaza, debido a la susceptibilidad de los animales acuáticos de infectarse a edades tempranas, así como la dificultad o imposibilidad de tratarlos, existiendo una gran limitación en cuanto a tratamientos preventivos o paliativos para su control (Kibenge, 2016).

Los antibióticos se utilizan normalmente como agentes terapéuticos, aunque en algunos países, usualmente los menos desarrollados, también se emplean como agentes profilácticos en las actividades acuícolas, siendo insuficiente su regulación en un gran número de países. Su uso indiscriminado tiene un impacto considerable en el medio ambiente, además de provocar la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, que aumentan en gran medida la gravedad y mortalidad de las infecciones (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). En algunos de los principales países productores de acuicultura, y especialmente en aquellos en vías de desarrollo, se produce en ocasiones, un uso excesivo de los antibióticos. En China por ejemplo, se utilizaron 162.000 toneladas de antibióticos en 2013, de los cuales el 52 % fueron utilizados en animales, utilizándose 83.200 toneladas de antibióticos únicamente en producciones animales, siendo una cifra muy elevada en comparación con otros países como EEUU (14.618 toneladas). Este uso de antibióticos ha producido la diseminación de residuos y aparición de bacterias resistentes a antibióticos en el medio (Zhang *et al.*, 2015).

Se requiere investigar más acerca de otras opciones al uso de antibióticos, como pueden ser los alimentos funcionales (Dawood *et al.*, 2018), probióticos y productos bacterianos (Hai, 2015; Dawood *et al.*, 2018), virus bacteriófagos, etc. Sería recomendable prohibir por completo el uso de antibióticos como factor de crecimiento o tratamiento profiláctico, además del uso de antibióticos que se emplean en la medicina humana (Chen *et al.*, 2020).

La vacunación es una estrategia que supone una medida de prevención alternativa al uso de antibióticos contra las enfermedades infecciosas, sin embargo, su eficacia está limitada debido a que los peces juveniles a los que se la aplica, todavía no son inmunocompetentes. Además, la vacunación no es viable para crustáceos y moluscos, debido a que no tienen la capacidad de desarrollar inmunidad a largo plazo (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

1.2.1. Enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas se producen cada vez más con las condiciones que ocurren en las producciones de la acuicultura actual, afectando negativamente a la

producción, rentabilidad y sostenibilidad de las producciones (Ina-Salwany *et al.*, 2016).

Principalmente, se tratan de enfermedades de origen bacteriano, siendo la Vibriosis, una de las patologías bacterianas cada vez más frecuentes en acuicultura. Vibriosis es un nombre general para un grupo de condiciones clínicas, que varían en gravedad, asociadas a las bacterias del género *Vibrio* y *Photobacterium*, que son bacilos anaerobios facultativos, oxidasa positivos, gramnegativos y que usualmente requieren sal para crecer (Janda *et al.*, 2015).

Las especies de *Vibrio* que afectan con mayor medida a las producciones acuícolas son *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* y *V. campbellii*. Las condiciones de temperaturas mayores de 15 °C, junto al estrés, proporcionan las condiciones ideales para que se desarrollen infecciones naturales por *Vibrio* en la acuicultura (Cheng *et al.*, 2009; Nor-Amalina *et al.*, 2017).

Las enfermedades víricas son menos comunes, pero más graves y difíciles de erradicar. Entre las especies de virus dañinas en acuicultura, se encuentra el virus de la necrosis nerviosa viral (VNN o NNV) o *Nodavirus*, agente causal de la encefalopatía y retinopatía viral (VER). Causa serias pérdidas económicas y mortalidades entre una gran cantidad de especies de peces, principalmente marinas, en todo el mundo (Munday *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2016; Buonocore *et al.*, 2019; Bandín y Souto, 2020).

El NNV se encuentra clasificado en la familia Nodaviridae, dentro del género *Nodavirus*. Se trata de un virus icosaédrico (T=3) no envuelto de tamaño pequeño (25–30 nm), cuyo genoma está compuesto por dos segmentos de RNA monocatenario positivo, el RNA1 (3 kb de longitud), que se responsable de la RNA polimerasa y del RNA3 subgenómico, y el RNA2 (1,4 kb de longitud) que codifica la proteína precursora de la cápside (Moreno *et al.*, 2018; Buonocore *et al.*, 2019). El RNA3 subgenómico, que no está incluido en los viriones, codifica dos proteínas virales no estructurales (B1 y B2) (Bandín y Souto, 2020).

En peces, considerando la región variable T4 del RNA2, se han identificado cuatro genotipos de *Nodavirus*: striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), tiger puffer

nervous necrosis virus (TPNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) y red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) (Buonocore *et al.*, 2019). Cada genotipo tiene un rango de temperatura y salinidad determinado y característico en el que es capaz de infectar y producir la enfermedad (Toffan *et al.*, 2016).

El *Nodavirus* afecta principalmente al sistema nervioso central, la médula espinal y la retina. La sintomatología está relacionada con el daño que produce la enfermedad en el sistema nervioso, y consiste principalmente en anomalías en el movimiento, espasmos, letargia, cambios en la pigmentación, hiperinflación de la vejiga natatoria y falta de apetito (Buonocore *et al.*, 2019; Bandín y Souto, 2020). En la lubina, la patología tiene altas tasas de mortalidad, especialmente en larvas y juveniles (Bandín y Souto, 2020).

En lubina, se ha reportado la transmisión del virus de manera vertical y horizontal, además de interespecífica. También son reservorios naturales de la enfermedad otros organismos que no la padecen, como crustáceos o bivalvos (Bandín y Souto, 2020).

Las infecciones agudas por *Nodavirus* usualmente se tornan en enfermedades persistentes debido a la capacidad del virus de evadir el sistema inmune. Una de las principales estrategias de evasión del virus, es la habilidad de la proteína B2 para antagonizar el ARN interferente del hospedador (Costa y Thompson, 2016).

Una vez han sido introducidas en las instalaciones de acuicultura, las enfermedades víricas son difíciles de controlar. En el caso del *Nodavirus*, su control es todavía más complejo debido a la elevada estabilidad del virus en el medio (Frerichs *et al.*, 1999). Las medidas de control del virus han cambiado a lo largo de los años, centrándose actualmente en el manejo prudente, bioseguridad e higiene. El virus puede ser inactivado por tratamientos químicos, como desinfectantes (hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, iodina, ozono...) y por tratamientos físicos (calor, luz ultravioleta) (Bandín y Souto, 2020).

Dado que el *Nodavirus* tiene transmisión horizontal y vertical, es de vital importancia la prevención de la transmisión por parte de los individuos reproductores. Para ello, se realizan selecciones de reproductores libres del patógeno mediante el análisis PCR o ELISA de los fluidos gonadales, huevos y sangre (Bandín y Souto, 2020).

1.3. Sistema inmune de los peces teleósteos

El sistema inmune de los peces es similar al de otros vertebrados, sin embargo, existen algunas diferencias importantes respecto a los demás grupos de animales. Se compone de un gran número de elementos que incluyen tejidos, células y moléculas, que se relacionan entre sí con el fin de proteger el hospedador. A diferencia de otros vertebrados, durante su fase embrionaria los peces son organismos de vida libre, por lo que necesitan que el sistema inmune se desarrolle en estadios muy tempranos de la embriogénesis (Kordon *et al.*, 2018).

El sistema inmune se puede subdividir en el sistema innato o inespecífico y el sistema adaptativo o específico. Los peces dependen en mayor medida del sistema inmune innato, más que otros grupos de vertebrados, estando el sistema inmune específico menos desarrollado. En la respuesta inmune, actúan distintos componentes, como son las barreras físicas, la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular. La respuesta se encuentra mediada en gran parte por los órganos linfoides (Uribe *et al.*, 2011).

1.3.1. Órganos linfoides

Los principales órganos linfoides en teleósteos son el timo, el riñón anterior y el bazo.

El timo es un órgano homogéneo compuesto por una fina capa de tejido linfoide dividida en dos lóbulos, su estructura se podría estimar como una agregación de macrófagos, que promueven la proliferación de linfocitos T siendo esta la función principal del órgano. En el timo también pueden encontrarse células mieloides, granulocitos eosinófilos y corpúsculos de Hassal. El desarrollo del timo difiere entre las distintas especies de peces, y está afectado por el crecimiento y la temperatura (Ellis, 2001; Bowden *et al.* 2005; Pearse, 2006).

El riñón anterior es un órgano exclusivo de los peces teleósteos, que actúa como órgano análogo a la glándula adrenal o suprarrenal de los mamíferos. Carece de estructura clara, no pudiéndose distinguir médula y corteza como en su órgano homólogo en mamíferos, en su lugar, se encuentran células interrenales productoras de cortisol y

células cromafines productoras de catecolamina, ambas envueltas por tejido hematopoyético productor de anticuerpos y citoquinas. Las células más abundantes en el riñón anterior son los macrófagos, que se agregan formando estructuras llamadas centros melanomacrofágicos (MMCs), y células linfoides en todos los estadios de desarrollo, principalmente linfocitos B. En el órgano también se encuentran folículos tiroideos, que producen hormonas tiroideas, posiblemente existiendo una relación bilateral entre el sistema endocrino y el inmune en peces (Press *et al.* 1994; Geven y Klaren, 2017).

El bazo está compuesto principalmente por sinusoides esplénicos, MMCs y tejido linfoide. Los sinusoides esplénicos son capilares de pared gruesa que resultan de la división de las arteriolas esplénicas y, en la mayoría de especies, se encuentran alrededor del tejido linfoide y centros de MMCs. Tiene una importante función de fagocitosis de antígenos por parte de los macrófagos que se encuentran en el órgano. Los antígenos, ya sea en forma de anticuerpos o subproductos metabólicos, permanecen prolongados periodos de tiempo en el órgano, lo que tiene una función importante en la memoria inmune (Ferguson, 1989).

1.3.2. Sistema inmune innato o inespecífico

En los peces, la respuesta inmune innata se considera un componente totalmente esencial en la defensa del organismo frente a patógenos, principalmente debido a su naturaleza poiquilotérmica, baja proliferación y memoria de linfocitos o las limitaciones entre su sistema inmune específico y en el repertorio de anticuerpos. Además, a diferencia de otros vertebrados más complejos, los peces son organismos de vida libre ya desde su fase embrionaria, por lo que dependen de su sistema inmune innato o inespecífico para su supervivencia. Además de ser su mecanismo de defensa fundamental, la inmunidad inespecífica en peces cumple un papel esencial en la regulación de la homeostasis y función gonadal (Valero *et al.* 2018; Mokhtar y Abdelhafez, 2021).

Una gran cantidad de factores internos y externos afectan al sistema inmune de los peces, y pueden determinar e inducir cambios en la respuesta inmune innata de forma positiva o negativa. Por ejemplo, los cambios bruscos en la temperatura, estrés

prolongado o altas densidades poblacionales pueden causar un efecto adverso o supresor en la respuesta inmune, mientras que las dietas funcionales o los inmunostimulantes pueden promoverla (Uribe *et al.* 2011).

El sistema inmune innato provoca la “señal de peligro” que provoca el contexto biológico para que se produzca posteriormente la respuesta inmune adaptativa, por lo que no es necesaria una exposición previa a un patógeno para su puesta en marcha (Whyte, 2007).

1.3.2.1. Barreras físicas

Los peces están continuamente expuestos a un ambiente en el que abundan los microorganismos, entrando en contacto con cualquier barrera epitelial del organismo. Además, en comparación con los organismos terrestres, los organismos acuáticos han de lidiar con mayores cargas bacterianas, que se encuentran en contacto continuo con las barreras físicas del sistema inmune (Salinas, 2015).

Las escamas, piel y mucus son la principal superficie de intercambio entre el pez y el medio, y actúan como primera barrera frente a infecciones. Una gran cantidad de compuestos con actividades bioestáticas y biocidas se encuentran en la piel y mucus de los peces teleósteos (sistema complemento, proteínas C-reactivas, proteasas, lecitinas, lisozimas, hemolisinas, aglutininas, enzimas proteolíticas, AMPs, anticuerpos, inmunoglobulinas...), teniendo un importante papel evitando la entrada de patógenos (Ingram, 1980; Palaksha *et al.*, 2008; Ángeles Esteban, 2012).

La epidermis es capaz de reaccionar frente a diferentes amenazas, teniendo la posibilidad de engrosarse mediante hiperplasia de las células, siendo su integridad esencial para el balance osmótico y la prevención de la entrada al organismo de agentes foráneos. También se encuentran presentes diversas células del sistema inmune, como linfocitos, macrófagos o granulocitos eosinófilos (Mokhtar y Abdelhafez, 2021).

La mucosa de los peces se divide en dos compartimientos efectores, el epitelio y la lámina propia, separados por la membrana basal permeable, que permite el paso de leucocitos de un compartimiento al otro (Bjørngen y Koppang, 2022). Los principales

tejidos de la mucosa son los tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), tejido linfoide asociado al intestino (GALT), tejido linfoide asociado a la piel (SALT), tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT) y el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT) (Salinas, 2015).

Cuando se produce una señal de peligro en cualquier mucosa, inmediatamente comienza la respuesta inmune innata, crucial para el desempeño de la posterior respuesta inmune adaptativa. En las barreras de la mucosa, los linfocitos B y T forman una red dinámica que induce y regula la secreción de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos en el ambiente de la mucosa. Los linfocitos B y T, así como los anticuerpos producidos, están altamente especializados en los tejidos linfoides asociados a la mucosa (Salinas *et al.*, 2011).

Las células del sistema inmune de la mucosa evitan la respuesta inmune frente a antígenos no patógenos como restos de comida o microbiota. El sistema inmune de la mucosa, es tolerante frente a dichos antígenos para mantener una correcta homeostasis (Kim *et al.*, 2012; Salinas, 2015).

1.3.2.2. Receptores de membrana

El sistema inmune innato de los peces tiene una función esencial en la respuesta del sistema inmune adquirido y el mantenimiento de la homeostasis mediante el sistema de receptores de membrana o celulares. Dichos receptores proteicos, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR), reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como pueden ser los polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), ADN bacteriano, ARN viral, moléculas que no se encuentren de forma habitual en la superficie de los organismos multicelulares o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), como pueden ser moléculas intracelulares secretadas al medio extracelular por células dañadas, como ADN o ARN genómico, proteínas S100 o “Heat Shock Proteins” (HSP) (Uribe *et al.* 2011; Land, 2015).

Dentro de los PRR, en peces se encuentran los tipos de receptores “Toll like receptor” (TLR), “Nod like receptor” (NLR), receptores lecitina tipo C (CLR) y receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos NLR (NOD). Los receptores se diferencian

principalmente en la localización en la célula y en la selectividad de los PAMPs, siendo los TLR, CLR y NOD receptores extracelulares transmembrana y los NLR receptores intracelulares citoplasmáticos (Uribe *et al.*, 2011; Sahoo, 2020).

Al reconocer los PAMPs o DAMPs, los PRR inician cascadas de señalización celulares que desembocan en la activación de la transcripción de los factores NF- κ , que dan lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas e interferones (Li *et al.*, 2017).

En los peces teleósteos, se han encontrado hasta 18 TLRs distintos, compartiendo con los mamíferos los receptores TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR8, y TLR9, a excepción del receptor TLR4, que únicamente se ha descrito en el pez cebra (*Danio rerio*) y en un número muy limitado de especies más (Takano *et al.*, 2011; Uribe *et al.*, 2011; Sahoo, 2020).

1.3.2.3. Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que interconecta el sistema inmune innato y adquirido, mediante el cual los patógenos y cuerpos extraños son procesados por células especializadas (neutrófilos, macrófagos, monocitos, eosinófilos o linfocitos B1) que presentan dichos antígenos a las células T, iniciando de esta manera la respuesta inmune adquirida, y siendo esencial en el desarrollo de esta y de procesos tan importantes como la producción de anticuerpos. Durante la fagocitosis, también se producen especies reactivas de oxígeno y consecuentemente radicales libres, que dan lugar a la formación de fuertes compuestos bactericidas capaces de combatir microorganismos (Biller y Takahashi, 2018; Kordon *et al.*, 2018).

El proceso de fagocitosis es especialmente importante en los peces, debido a que, a causa de su naturaleza poiquiloterma, la temperatura influye fuertemente en el funcionamiento de la mayoría de los procesos del sistema inmune, siendo la fagocitosis una de las pocas excepciones que no ve modificada su actividad por las condiciones ambientales de temperatura (Magnadóttir *et al.*, 2005).

1.3.2.4. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son moléculas de bajo peso molecular (aproximadamente entre 1 y 5 kD) que poseen actividad inhibitoria frente a un amplio espectro de organismos patógenos, como bacterias, virus u hongos, teniendo una función importante en la defensa del hospedador en peces. Además, en peces, los AMPs actúan en un rango de temperatura más amplio que en el de otros vertebrados (Zasloff, 2002; Chinchar, 2004).

La eliminación de las bacterias por parte de los AMPs se realiza mediante despolarización de membrana con la formación de poros en la membrana, que producen la liberación de los contenidos intracelulares, inducción de hidrolasas, alteraciones de las funciones de la membrana o daño específico a estructuras intracelulares esenciales (Lichtenstein, 1991; Oren y Shai, 1998).

Los AMPs también tienen un importante papel en la respuesta antiviral. En peces, se obtienen respuestas frente a los virus muy distintas dependiendo del AMP y la especie del virus, por lo que se cree que existe cierto grado de especificidad de los mismos (Chinchar, 2004).

1.3.2.5. Citoquinas y quimiocinas

En peces, las citoquinas proinflamatorias más comunes en vertebrados como son IL-1 β , TNF- α y IL-6 están presentes, además de aquellas relacionadas con la respuesta inmune adaptativa, como son IL-2, IFN- γ , IL-4—13, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22 y TGF- β 1 (entre otras) con múltiples parálogos (Zou y Secombes, 2016).

La IL-1 β ha sido detectada en un gran número de especies de peces teleósteos, está involucrada en la regulación de la inmunidad a través de la estimulación de los linfocitos T, además de tener un papel en la proliferación y apoptosis celular. La función de esta citoquina en peces es homóloga en los mamíferos (Mathew *et al.*, 2002; Zou y Secombes, 2016).

TNF- α es una de las principales citoquinas de expresión temprana ante una infección en los peces, teniendo una función clave en la regulación de la inflamación. La función de

la citoquina es similar a IL-1 β , coincidiendo en algunos casos. Produce la activación de macrófagos y fagocitos, además de estimular la expresión de otros genes inmunes como IL-1 β , IL-8, IL-17C, TNF- α y COX-2 también involucrados en la respuesta frente a la infección. Además de su papel en la fase aguda de la infección, también se relaciona con la patogenia de muchas enfermedades crónicas en peces (Hong *et al.*, 2013; Zou y Secombes, 2016).

La IL-10 es una citoquina de función antiinflamatoria, que suprime la respuesta inmune. Generalmente actúa como supresora o amortiguadora de la respuesta inmune inflamatoria, estimula la producción de linfocitos T de memoria, diferenciación de linfocitos B y secreción de IgM. Además, también inhibe la expresión de genes involucrados en el MHC (Zou y Secombes, 2016).

Los IFN de tipo 1 inducen la expresión de los mecanismos de defensa antiviral, estimulan la apoptosis y tiene un efecto regulador en la respuesta inflamatoria. También preceden y estimulan la producción otras citoquinas como Mx, ISG15 e IRFs (Zou y Secombes, 2016).

Los IFN de tipo 2 tienen una importante función en las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas, incluyendo la activación de macrófagos, inducción de la respuesta antiviral y estimulación de la apoptosis. El IFN- γ activa la respuesta fagocítica y estimula la presentación de antígenos. Además, aumenta la expresión de las citoquinas Th1, Mx, GBP1 o ISG15, además de muchas otras. Tiene una función importante en la modulación de la respuesta mediante los linfocitos T (Sun *et al.*, 2011; Zou y Secombes, 2016).

1.3.2.6. Transferrina

La transferrina es un componente esencial de algunos de los fluidos corporales de los peces, con una amplia variedad de funciones, siendo un componente importante del sistema inmune, pero también actuando en el transporte y metabolismo de los iones de hierro o en la regulación de la proliferación, diferenciación y respiración celular (Fletcher y Huehns, 1968; Johnson y Wessling-Resnick, 2012).

La transferrina reduce el hierro drásticamente en el plasma en el momento en el que se produce una infección bacteriana, reduciendo la capacidad de las bacterias de formar biofilms, inhibiendo bacterias que sobreviven a las defensas iniciales e impide que los patógenos que necesitan el hierro para replicarse lo hagan. Además, la transferrina activa como una de las principales moléculas activadoras de los macrófagos (Stafford y Belosevic; 2003; Ganz, 2009).

1.3.2.7. Inhibidores de la proteasa

Los inhibidores de la proteasa son compuestos producidos por el organismo que interfieren con las enzimas que degradan las proteínas. Una de sus funciones, por ejemplo, es la inhibición de la replicación viral impidiendo la actividad proteolítica que permite formar los precursores proteicos necesarios para la replicación viral. Se pueden encontrar diversos inhibidores de la proteasa en el suero y otros fluidos de los peces. Estas moléculas están relacionadas con la respuesta inmune de fase aguda y la defensa contra patógenos que secretan enzimas proteolíticas (Magnadóttir *et al.*, 2005; Singh y Benjakul, 2018).

1.3.2.8. Lectinas

Las lectinas comprenden una amplia variedad de proteínas y glicoproteínas, que forman parte del sistema inmune humoral. Para el hospedador, las lectinas asociadas a membranas son esenciales para reconocer moléculas que permiten el establecimiento de relaciones mutualistas con la microbiota o para iniciar la respuesta inmune innata y adaptativa en defensa de organismos patógenos. Intervienen en la inmovilización, aglutinación, opsonización y eliminación mediada por el sistema complemento de potenciales patógenos. Además de ello, tienen otras funciones, actuando de reguladores, manteniendo la homeostasis de las respuesta inmune adaptativa, modular la diferenciación de células durante el desarrollo embrionario o activación de las células dendríticas, linfocitos B y T (Rabinovich, y Toscano, 2009; Vasta *et al.*, 2011).

En teleósteos se encuentran un amplio rango de lectinas e isoformas distintas, algunas descubiertas únicamente en peces, y otras compartidas con otros organismos invertebrados y vertebrados (Vasta *et al.*, 2011).

Las lectinas de tipo C, están caracterizadas por su requerimiento de Ca^{2+} , especificidad y formación de estructuras quiméricas. Dentro de este grupo, se encuentran las colectinas, selectinas, receptores endocíticos, receptores manosa de los macrófagos o lecticanos, algunos de ellos relacionados directa o indirectamente con la respuesta inmune, siendo las colectinas especialmente importantes para la respuesta inmune innata frente a virus y bacterias (Vasta y Ahmed, 2008; Vasta *et al.*, 2011).

Las galectinas son lectinas de tipo S, que contienen dominios de reconocimiento a β -galactósidos. Actúan como mediadoras en interacciones entre células durante procesos de apoptosis, aunque hoy en día, todavía no se conocen la totalidad de sus funciones en peces (Vasta y Ahmed, 2008).

Las lectinas de tipo F o ficolinas, tienen como ligandos principales GlnNAc y GalNAc y se localizan en la membrana celular o en el medio extracelular. Actúan en el reconocimiento de patógenos y aglutinación de bacterias, aumentando durante la fase aguda de la respuesta inmune. Además, las ficolinas aisladas son capaces de actuar en la respuesta inmune en condiciones de temperatura muy baja (Tasumi *et al.*, 2002; Vasta *et al.*, 2011; Dara *et al.*, 2021).

Otros grupos de lectinas también detectados en peces teleósteos son las lectinas de unión a ramnosa, las lectinas de unión a manosa, lectinas de tipo X y pentraxinas. Dentro del grupo de las pentraxinas, se encuentra la proteína C-reactiva (CRP) de extrema importancia en la fase aguda. La CRP se une a la fosfocolina, cationes divalentes, carbohidratos y sus estructuras asociadas. Aumenta sus niveles de forma notoria durante los procesos inflamatorios en respuesta a ciertas citoquinas. Es capaz de distinguir entre microbiota y organismos patógenos, opsoniza bacterias y activa el sistema complemento (Bottazzi *et al.*, 2009; Vasta *et al.*, 2011).

1.3.2.9. Lisozima

Las lisozimas, también conocidas como muramidazas, son unas moléculas de elevada importancia para el sistema inmune innato en peces, especialmente importantes en la mediación de la defensa antimicrobiana. Son enzimas mucolíticas de origen

leucocitario, principalmente producidas por macrófagos, aunque también por monocitos y neutrófilos (Saurabh y Sahoo, 2008; Song *et al.*, 2021).

La acción antimicrobiana de la lisozima se produce debido a la capacidad de la enzima de hidrolizar los enlaces β (1–4) entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina de las paredes celulares de peptidoglicano de las bacterias grampositivas. Las bacterias gramnegativas no son dañadas directamente por la enzima. Cuando la pared externa de las bacterias gramnegativas es dañada por la acción del sistema complemento y otras enzimas, dejando expuesta la pared de peptidoglicano interior, es cuando la lisozima se vuelve efectiva (Saurabh y Sahoo, 2008).

La lisozima también estimula la acción bactericida de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares mediante opsonización. Además, ataca otras estructuras con ácido murámico, teniendo un efecto limitado en la quitina, que es el componente mayoritario de las paredes celulares de los hongos y exoesqueletos de algunos invertebrados. También degrada a los virus actuando sobre los polisacáridos virales (Lee-Huang *et al.*, 1999; Saurabh y Sahoo, 2008; Song *et al.*, 2021).

En peces teleósteos, se pueden encontrar las lisozimas de tipo c y g. Las lisozimas de tipo c, tienen funciones inmune y digestivas, y se encuentran en peces principalmente en el hígado, estómago y tejidos del sistema inmune, como el bazo o riñones anteriores y posterior. La lisozima de tipo g se encuentra en una gran variedad de tejidos del pez, como son el bazo, riñón anterior, piel, corazón, intestino, sangre, cerebro, branquias... (Ye *et al.*, 2010; Sha *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2021).

1.3.3. Conexiones entre el sistema inmune innato y adaptativo

1.3.3.1. Linfocitos

En peces teleósteos, los linfocitos constituyen el grupo más abundante de leucocitos, siendo un 70-90% del total. Son los leucocitos de menor tamaño, de entre 5-8 μm hasta 12 μm , tienen una forma redondeada y con un núcleo que ocupa prácticamente la totalidad del citoplasma. Los linfocitos se distribuyen ampliamente por el organismo,

siendo frecuentes en los espacios intercelulares de la epidermis de la boca o narinas y en los vasos sanguíneos (Mokhtar y Abdelhafez, 2021).

Los linfocitos B (CD20) son esenciales en la respuesta inmune humoral. Se producen en su mayoría en el riñón anterior, y su principal función es la producción de anticuerpos contra antígenos. En peces, los linfocitos B brindan protección desde el estadio embrionario, siendo capaces de producir IgM desde antes del final del periodo de incubación (Zapata *et al.*, 2006; Mokhtar y Abdelhafez, 2021).

En peces, se distinguen diferentes subpoblaciones de linfocitos T, diferenciándose diferentes genes (TCR) como son CD3, CD8 y CD4, además de los genes del MHC I y MHC II (Fischer *et al.*, 2006).

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) poseen el marcador CD8, y responden ante el complejo péptido/MHC I. Cumplen las funciones junto a los NCC de eliminar células infectadas por virus, bacterias o parásitos intracelulares (Wang *et al.*, 2018).

1.3.3.2. Citotoxicidad celular

En los mamíferos, la respuesta inmune celular no específica se lleva a cabo mediante los linfocitos T “Natural killer” (NK), sin embargo, en peces, se lleva a cabo mediante las células citotóxicas no específicas (NCC), que son de pequeño tamaño, sin gránulos, usualmente encontradas en los tejidos linfoides como el riñón anterior, aunque siendo escasas en sangre. El rango de actuación es amplio, e incluye parásitos y otros agentes externos, células tumorales, células alteradas por virus, además de los objetivos típicos en mamíferos (Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Shen *et al.*, 2002).

Como homólogas de las células NK, también liberan citoquinas proinflamatorias tras entrar en contacto con productos bacterianos. Las NCC participan en la respuesta inmune inespecífica junto con las otras células como los fagocitos frente a infecciones por organismos oportunistas, patógenos, parásitos, condiciones climatológicas adversas y la vigilancia inmunológica frente a tumores (Evans y Jaso-Friedmann, 1992).

1.3.3.3. Complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un conjunto genes de alto polimorfismo alélico, que interactúan con los linfocitos T, haciendo posible el reconocimiento de antígenos y el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. En peces teleósteos se encuentra el MHC de tipo I y II. El elevado polimorfismo alélico del MHC, permite aumentar la protección contra patógenos que de otra manera podrían evadir más fácilmente la presentación de antígenos del MHC. Los MHC de tipo I y II presentan antígenos peptídicos para que los receptores de los linfocitos T (TCR) de las células T CD8⁺ citotóxicas y CD4⁺ *helper* los reconozcan y reaccionen frente a ellos (Secombes *et al.*, 2005; Yamaguchi y Dijkstra, 2019).

El MHC de tipo I está relacionado comúnmente con procesos inmunológicos antivirales y anticancerígenos. En peces, su expresión se produce principalmente en el epitelio y los tejidos linfoides, siendo regulada por los procesos de inmunoestimulación. Al tratarse de animales ectotermos, la expresión del MHC de tipo I es dependiente de la temperatura (Yamaguchi y Dijkstra, 2019).

El MHC de tipo II está envuelto en el reconocimiento de patógenos en el medio extracelular, que desencadena la respuesta inmune mediante la activación de los linfocitos CD4⁺, sin embargo, en peces todavía no se ha caracterizado la estructura y funciones exactas de la presentación de antígenos peptídicos (Yamaguchi y Dijkstra, 2019).

1.3.3.4. Sistema complemento

El sistema complemento es un complejo de más de 35 proteínas plasmáticas, que se activan mediante distintas cascadas bioquímicas con objetivo de combatir organismos patógenos. Se considera uno de los componentes más importantes del sistema inmune, siendo esencial en el sistema inmune innato y en la posterior respuesta adaptativa. El sistema complemento se puede activar mediante tres vías: alternativa, lecitina y clásica (Gasque, 2004; Boshra y Sunyer, 2006).

La vía clásica se inicia de forma anticuerpo-dependiente mediante la interacción del complejo C1 con la IgG, o bien independientemente de los mismos, cuando diversos antígenos como pueden ser restos de apoptosis celular, proteína C reactiva o bacterias

gramnegativas reaccionan con el complejo C1 (Kishore y Reid, 2000; Gasque, 2004; Acosta *et al.*, 2006).

La vía alternativa está regulada por el factor H, properdina y el factor acelerador de la desintegración, y se provoca mediante la escisión del complejo C3 mediante antígenos como paredes celulares, LPS o anticuerpos (Dempsey *et al.*, 1996).

La activación mediante la vía de la lecitina, cuando la lecitina se une a la pared bacteriana mediante grupos de fructosa, manosa o N-acetilglucosamina (Gasque, 2004).

Tras la activación de la cascada en cualquiera de las tres vías de activación, se provoca finalmente la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) que se forma en la superficie de las células patógenas y provoca la lisis celular de estas (Gasque, 2004; Boshra y Sunyer, 2006).

1.3.4. Sistema inmune adaptativo o específico

La respuesta inmune adaptativa comprende un complejo entramado de células especializadas, proteínas, genes y señales bioquímicas, que permite al organismo responder de forma específica a un antígeno, mediante anticuerpos, células efectoras y otros componentes del sistema inmune de alta especificidad y afinidad (Uribe *et al.* 2011).

La respuesta inmune adaptativa se compone de la respuesta humoral y celular. La respuesta humoral está mediada por los anticuerpos (Ig), que pueden reconocer antígenos de microorganismos patógenos, neutralizar su capacidad de infección y ayudar en su eliminación. La respuesta inmune celular, está regulada por los linfocitos T, que son capaces de eliminar patógenos localizados intracelularmente, promoviendo la destrucción de células infectadas (Díaz-Rosales *et al.*, 2019).

1.3.4.1. Anticuerpos

En peces teleósteos podemos encontrar tres clases de anticuerpos, IgM que se encuentra en todas las especies de vertebrados, IgD, también encontrada ampliamente en una gran

cantidad de vertebrados, e IgT, específica de peces. Están ausentes las formas IgG, IgA e IgE (Fillatreau *et al.*, 2013).

Las inmunoglobulinas predominantes en peces teleósteos son los tetrámeros de IgM, de ocho fragmentos de unión a antígenos. Algunas especies también presentan formas monoméricas de IgM en el suero. IgM se expresa en la superficie de los linfocitos B o es secretada (Fillatreau *et al.*, 2013).

La IgT es especialmente importante en la protección de la mucosa de los peces, siendo el ratio IgT/IgM 60 más alto en mucosa que en suero. También tiene especial relevancia en la neutralización de patógenos en el lumen. En trucha arcoíris, la IgT se encuentra en forma de monómero en suero y tetrámero en mucus (Zhang *et al.*, 2011; Fillatreau *et al.*, 2013).

1.3.4.2. Memoria inmunológica

Los peces teleósteos desarrollan una respuesta de memoria tras la exposición a antígenos. Se necesitan dos exposiciones antes de que se produzca la respuesta frente a un antígeno T-dependiente, mientras que sólo una para antígenos T-independientes (Uribe *et al.* 2011). Tras la exposición a un antígeno, se produce la diferenciación de las células B con la ayuda de las células T “helper” en las células B de memoria. Sin embargo, en peces teleósteos, la memoria inmunológica es deficiente en comparación con otros grupos de vertebrados (Secombes *et al.*, 2005; Magnadóttir, 2006)

Actualmente se cree que las células NK pueden adquirir memoria tras su primer encuentro con un patógeno, mostrando una respuesta más rápida y pronunciada después de una segunda exposición con el mismo patógeno. Las células NK parecen tener funciones propias del sistema inmune adaptativo, como la especificidad y la memoria (O’Sullivan *et al.*, 2015).

1.4. Prevención de enfermedades en peces

En las producciones acuícolas, especialmente en aquellas con un mayor grado de intensificación, se expone a los animales a un gran número de factores estresantes, desde el estadio larvario hasta que se alcanza el peso comercial final. Cuando los peces

se ven afectados por factores estresantes se produce la interrupción de la homeostasis, produciendo el proceso de aclimatación o alostasis.

Cuando un pez se encuentra en periodo de alostasis durante un periodo más o menos prolongado de tiempo, comienzan a deteriorarse otras estructuras y procesos, como el crecimiento, desarrollo, resistencia a las enfermedades, las primeras defensas epiteliales (piel, intestino o branquias) y el sistema inmune, que finalmente, pueden desembocar en la muerte del pez (Segner *et al.*, 2012). El estrés en acuicultura puede ser reducido mediante el manejo prudente, sin embargo, nunca podrá ser eliminado por completo, perjudicando procesos como el crecimiento y desarrollo sexual, o haciendo que aumente la susceptibilidad de los animales a contraer enfermedades (Abdel-Latif *et al.* 2020; Ciji y Akhtar, 2021).

En algunos de los principales países productores de acuicultura, y especialmente en países en vías de desarrollo, se produce en ocasiones, un uso excesivo de los antibióticos. En China por ejemplo, se utilizaron 162.000 toneladas de antibióticos en 2013, de los cuales el 52 % fueron utilizados en animales, utilizándose 83.200 toneladas de antibióticos únicamente en producciones animales, siendo una cifra muy elevada en comparación con otros países como EEUU (14.618 toneladas). Este uso de antibióticos ha producido la diseminación de residuos y de bacterias resistentes a antibióticos en el medio (Zhang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021).

El aumento de distintos factores durante las últimas décadas como la frecuencia de enfermedades infecciosas, así como la aparición de nuevas, el abuso del uso de antibióticos o el calentamiento global, hace necesario la elaboración de estrategias por parte de los productores para prevenir y controlar enfermedades (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018; Ciji y Akhtar, 2021).

La prevención de enfermedades en acuicultura se enfrenta a limitaciones, como son la poca efectividad de las vacunas en estadios tempranos de desarrollo, aparición de bacterias resistentes a antibióticos, dificultad en el ensayo experimental de productos y sustancias, limitaciones a la hora de comercializar animales con ciertos tratamientos o el bajo número de productos disponibles (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

1.4.1. Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes en acuicultura son un conjunto de compuestos naturales o sintéticos, cuya función principal es la de activar y modular el sistema inmune de los animales cultivados, produciendo una respuesta inespecífica del sistema inmune, dando lugar a la respuesta inmune humoral y celular no específica. La promoción de la respuesta inespecífica da lugar a un estado inmune que permite un incremento de la posterior defensa adaptativa que se desencadena, y, de esta forma, mejorar la resistencia frente a enfermedades en peces (Barman *et al.*, 2013).

El tratamiento con inmunoestimulantes permite prevenir o controlar un amplio espectro de enfermedades, sin necesidad de recurrir a antibióticos o tratamientos químicos en los sistemas de acuicultura, reduciendo notablemente el impacto ecológico de las actividades de producción. Actualmente, la aplicación de tratamientos con inmunoestimulantes (**Tabla 1**) combinados con vacunas, se muestra como uno de los métodos más prometedores para el control de enfermedades en acuicultura (Barman *et al.*, 2013; Wangkahart *et al.*, 2019).

Tabla 1. Algunos de los inmunoestimulantes probados en acuicultura. Fuente: Jeney, 2017; Farooqi y Qureshi, 2018.

Compuestos sintéticos	Levamisol, FK-565 (derivado de <i>Streptomyces olvaceogriseus</i>), compuestos de amonio cuaternario.
Compuestos biológicos	
Extractos de plantas	Aloe vera, polisacáridos de <i>Astragalus sp.</i> , astaxantina, isoflavonas de soja, extracto de semillas de <i>Trigonella foenum</i>
Derivados bacterianos	MDP (Muramil dipéptido de <i>Mycobacterium spp.</i>), LPS, adyuvante completo de Freund (FCA), EF203 (producto fermentado de huevo), peptidoglucanos, vacunas con bacterias inactivadas, cimosano,

	dextranos
Derivados de la levadura	β -1, 3 glucano, β -1, 6 glucano
Factores nutricionales	Vitaminas A, B, C y E, ácidos grasos omega 3
Hormonas	Hormona del crecimiento, prolactina, triyodotironina
Citoquinas	Interferon e interleucinas
Polisacáridos	Quitosano, quitina, letinano, esquizofilano, oligosacáridos
Extractos de animales	Extractos de tunicados, abalón, calamar luciérnaga, glicirricina saponina.
Otros	Lactoferrina, proteína de soja, espirulina

En peces concretamente, se ha demostrado que los inmunoestimulantes son capaces de diversas funciones como pueden ser incrementar la supervivencia frente a infecciones bacterianas, antiparasitarias, antivíricas, incremento del crecimiento, incremento de la producción de anticuerpos tras la vacunación, incremento de los niveles y actividad de los lisozimas, modulación y migración de los macrófagos, incremento de la actividad fagocítica, producción de radicales libres o aumento de la producción de citoquinas, entre otras funciones (Ragap *et al.*, 2012; Barman *et al.*, 2013; Bravo *et al.*, 2013).

1.4.1.1. Probióticos

Los probióticos son bacterias vivas, con funciones beneficiosas, que se introducen en el tracto gastrointestinal mediante el alimento, mejorando el balance de la microbiota interna y produciendo un beneficio para la salud del hospedador (Azad *et al.*, 2019).

Algunas de las funciones de los probióticos en acuicultura son las de incrementar la tasa de crecimiento, la resistencia a enfermedades, activar el sistema inmune, mejorar los

mecanismos funcionales de los peces, aumento de la durabilidad de la microbiota intestinal, antioxidantes, mejora de parámetros hematológicos o mejora de la calidad del agua (Wang *et al.*, 2008; El-Saadony *et al.*, 2021).

Una vez en el tracto gastrointestinal, los probióticos tienen un efecto positivo sobre la inmunidad del hospedador. Liberan bacteriocinas, sideróforos, lisozimas y otros compuestos antibióticos, participando junto al hospedador en la defensa frente a enfermedades (Hoseinifar *et al.*, 2018).

Además de inhibir el crecimiento y proliferación de bacterias, los probióticos modulan los parámetros inmunes inespecíficos del hospedador, ya que poseen estructuras con patrones que pueden ser reconocidos por los PRRs, como peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos, proteína A, exopolisacáridos o flagelina, que al interactuar con los receptores resulta en una cascada de señalización que promueve la producción de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas que activan el sistema inmune del hospedador, aumentando las cantidades de monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK o linfocitos entre otras células. Promueven la actividad fagocítica y afectan positivamente a la actividad humoral (Kumar *et al.*, 2006; Amenyogbe *et al.*, 2020).

1.4.1.2. Prebióticos

Los prebióticos son moléculas no digeribles, que tienen un efecto sobre la microbiota intestinal y la inmunidad del hospedador. Los subproductos generados por la microbiota intestinal al fermentar los prebióticos tienen un efecto positivo en la inmunidad del hospedador, aunque el sistema inmune también puede ser estimulado de forma directa por los prebióticos (Delgado *et al.*, 2011).

La modulación del sistema inmune por parte de los prebióticos sucede de dos maneras, por estimulación directa debido al reconocimiento de los prebióticos por los PRRs o mediante el aumento del crecimiento de la microbiota comensal. Estimulan la inmunidad activando moléculas señalizadoras promotoras del sistema inmune, aumentan la actividad y número de leucocitos, aumentan la actividad fagocítica y del lisozima, activan el sistema complemento por la vía alternativa e inducen la liberación

Estudio de la respuesta temprana del sistema inmune de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y células E-11 ante inmunoestimulantes y *Nodavirus*

de citoquinas y otras moléculas estimuladoras, entre muchas otras funciones (Seong *et al.*, 2014).

1.4.1.3. Simbióticos

Los compuestos que conllevan una utilización simultánea de prebióticos y probióticos se denominan simbióticos, que pueden tener efectos sinérgicos. Actualmente, no existe una gran cantidad de información disponible acerca de los simbióticos, aunque se ha observado que su aplicación es capaz de tener efectos positivos sobre el crecimiento, aumento de la digestibilidad y utilización de los nutrientes y la activación del sistema inmune (Dehaghani *et al.*, 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Valorar la mejor respuesta temprana del sistema inmune dependiendo del inmunoestimulante (LPS y poly I:C) inoculado en la lubina y células E-11, para dotarlas de una mayor resistencia frente a enfermedades infecciosas.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar diversos inmunoestimulantes (LPS y poly I:C) para modular la respuesta inmune de la lubina frente al VER.
- Comprobar *in vitro* la respuesta temprana del sistema inmune en células E-11 ante inmunoestimulantes (LPS y poly I:C).
- Determinar la inmunosusceptibilidad en células E-11 inducida con un inmunoestimulante frente a una infección por *Nodavirus*.
- Comprobar la posibilidad de utilizar un método alternativo al experimento *in vivo* por un modelo *in vitro* cuando se trata de una infección por *Nodavirus*.

3. Material y métodos

3.1. Obtención de la bacteria

En el presente trabajo se utilizó la bacteria *V. alginolyticus* para la obtención de los LPS empleados en el estudio. Se empleó el *V. alginolyticus* cepa 521 de la colección del Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA) en las instalaciones del Servicio de Acuicultura y Biotecnología de Alta Especialización (SABE), en el Parque Científico Tecnológico Marino (PCTM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), en Taliarte, municipio de Telde, ubicado en la isla de Gran Canaria.

Se cultivó la bacteria utilizando agar de infusión de cerebro-corazón (BHI, del inglés Brain Heart Infusion) (Pronadisa, Laboratorios Conda S.A.), un medio de cultivo sólido (BHIA) o líquido (BHIB) y general, apto para el crecimiento de un gran número de especies de microorganismos. Debido a que *V. alginolyticus* es natural de medios marinos, se añadió cloruro de sodio (NaCl) al 1% a los medios de cultivo.

Para confirmar la obtención de un cultivo puro, se identificó la bacteria centrándose en los aspectos fenotípicos mediante pruebas bioquímicas y enfocándose en los aspectos genotípicos por medio de la PCR cuantitativa (qPCR).

3.2. Identificación de la bacteria

3.2.1. Identificación de la bacteria mediante pruebas bioquímicas

Para poder caracterizar la bacteria objeto de estudio se realizaron una serie de análisis bioquímicos, como son las pruebas de Gram, movilidad, prueba de oxidasa, catalasa, oxidación-reducción, requerimiento de sal o degradación de aminoácidos.

Con objetivo de determinar la naturaleza de la pared celular de la bacteria, se realizó la tinción de Gram, que distingue entre bacterias grampositivas, con pared de peptidoglicano gruesa, sin membrana externa y sin antígeno O, y bacterias gramnegativas, con pared de peptidoglicano fina, con membrana externa y antígeno O. Inicialmente se colocó una gota de PBS en un portaobjetos, en el que se resuspendió una colonia bacteriana y se dejó secar, para comenzar con la tinción. Se cubrió el portaobjetos con cristal violeta durante 1 minuto, tras lo que se lavó con agua y se

aplicó el mordiente (Lugol) durante 1 minuto. Se lavó con agua, para después aplicar el decolorante (alcohol 70°) durante 15 segundos y lavar. Finalmente, se añadió safranina durante 15 segundos, se lavó, y se dejó secar la preparación. Una vez seca, el portaobjetos se observó al microscopio en el objetivo de 100x con ayuda de aceite de inmersión. Las bacterias grampositivas se muestran de color violáceo o azulado, mientras que las gramnegativas poseen un tono rosado o rojizo.

Para determinar la movilidad de la bacteria, se diluyó una colonia en una gota de PBS en un portaobjetos, colocando un cubreobjetos encima. Se observó la preparación al microscopio en el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

Para comprobar si el microorganismo era capaz de usar la enzima de la oxidasa y por tanto utilizar el oxígeno en el transporte de electrones y si se trata de organismos aerobios, se procedió a realizar la prueba de la oxidasa mediante tiras reactivas (PanReac AppliChem, USA). Para ello, se colocó una colonia bacteriana en el extremo inferior de la tira reactiva, que vira a azul en caso de poseer la enzima mencionada.

Para conocer si la bacteria era capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, se realizó la prueba de la catalasa, para la cual fue necesario colocar una gota de agua oxigenada (Kern Pharma, Barcelona, España) en un portaobjetos, en la que se resuspendió una colonia bacteriana. Un resultado positivo se indica mediante la aparición de burbujas en el agua oxigenada.

Con el fin de distinguir entre bacterias capaces de metabolizar la glucosa por vía aerobia o anaerobia, se sembró la bacteria mediante picadura en tubos con medio semisólido de Hugh-Leifson, sin sellar para la prueba aerobia y otro que fue sellado con parafina líquida para generar un medio anaerobio. Los resultados se consideran positivos para cada prueba en caso de que el medio virase a un tono amarillento.

Con objetivo de establecer si la bacteria requiere NaCl o no para crecer, se sembró en un medio de agar sin NaCl y se observó a diario para determinar si existía crecimiento bacteriano.

Al fin de comprobar la capacidad de la bacteria para metabolizar los aminoácidos arginina, lisina y ornitina, se prepararon distintos medios, cada uno suplementado con los aminoácidos mencionados, y se sembró la bacteria durante 24 h.

3.2.2. Identificación de la bacteria mediante qPCR

Previamente a la realización de la técnica de qPCR, se procedió a extraer el ADN de la bacteria, mediante el kit comercial “E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit” de Omega Bio-tek, Inc., empleando el protocolo comercial del producto. Inicialmente se centrifugó la bacteria a 3500 ×g durante 10 minutos, tras lo que se desechó el sobrenadante y resuspendió la bacteria en 200 µl de PBS. Después, se añadió 25 µl de OB Protease Solution y se homogenizó la muestra en el Vortex. Tras ello, se añadieron 4 µl de RNasa A (100 mg/ml) y se dejó incubar la muestra durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 220 µl de BL Buffer, se homogenizó con Vortex y se incubó la muestra durante 10 minutos a 70 °C. Después, se añadieron 220 µl de etanol 100%, y se transfirió la muestra entera a una columna (DNA Mini Column) insertada en un microtubo de 2 ml, tras lo que se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante, y se añadieron 700 µl de DNA Wash Buffer diluido con etanol 100% con objetivo de lavar el ADN, se centrifugó a velocidad máxima durante 30 segundos, se descartó el filtrado, y repitió el lavado de ADN. Se centrifugó la columna vacía en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se realizó la elución del ADN, para lo que se añadieron 100 µl de Elution Buffer calentado previamente a 70 °C. Se atemperó durante 2 minutos y centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se realizó una segunda centrifugación y elución, y se guardó el ADN obtenido a -20 °C.

Una vez obtenido y purificado el ADN bacteriano, se procedió a realizar la técnica de la qPCR, que amplifica y cuantifica de forma simultánea el ADN. Mediante la qPCR, se separan las hebras de ADN, para permitir la unión de los cebadores o “primers” en ambos sentidos (“forward” y “reverse”) de los extremos de la cadena de ADN, 5’ y 3’. Tras la unión, la enzima Taq polimerasa comienza la replicación exponencial (amplificación) del ADN, que es cuantificada mediante la detección de un fluoróforo previamente añadido, que es detectado por los sensores de fluorescencia del termociclador tras cada ciclo de amplificación.

La qPCR se realizó utilizando iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), junto a los primers “gyrB forward” y “gyrB reverse”, que están diseñados para amplificar la subunidad B del gen de la ADN girasa del *V. alginolyticus*. Para cada muestra que se analizó, se preparó una mezcla de 25 µl, que contenía, 12,5 µl de SYBR Green, 0,5 µl de cebador “gyrB forward” y 0,5 µl de cebador “gyrB reverse” (**Tabla 2**), 2 µl del ADN a amplificar y 9,5 µl de agua ultrapura estéril. En caso del control negativo, el volumen de ADN fue sustituido por agua ultrapura estéril. Los procesos de amplificación y cuantificación fueron llevados a cabo por un sistema de detección CFX96TM mediante PCR en tiempo real (Bio-Rad), utilizando un programa diseñado específicamente para la detección del *V. alginolyticus* que consistió en 1 minuto a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C, 1 minuto a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. La amplificación y detección fue llevada a cabo en el instrumento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la qPCR.

<i>gyrB forward</i>	5' – ATT GAG AAC CCG ACA GAA GCG AAG – 3'	
		AF007288
<i>gyrB reverse</i>	5' – CCT AAT GCG GTG ATC AGT GTT ACT – 3'	

Finalmente, los resultados obtenidos de la qPCR fueron exportados e interpretados para confirmar la cepa bacteriana.

3.3. Extracción de LPS

Uno de los inmunoestimulantes utilizados en el presente experimento fueron los LPS ubicados en la pared bacteriana de la bacteria *V. alginolyticus*, tal y como fueron utilizados previamente por Bravo *et al.* (2011). Para realizar la extracción, se utilizó una modificación del método de Rezania *et al.* (2011), basado en la extracción con agua-fenol de Westphal y Jann (1965).

Se sembró la cepa bacteriana en BHI líquido suplementado al 1% de NaCl, dejando crecer la bacteria durante 24 horas, en agitación suave a 26 °C. Tras ello, se centrifugó

la suspensión bacteriana a $8.000 \times g$ durante 30 minutos. Los precipitados se lavaron dos veces con PBS suplementado con CaCl_2 0,15 mM y MgCl_2 0,5 Mm, para después ser resuspendidos en 10 ml de PBS y sonicados, inmersos en hielo para evitar que suba la temperatura durante la sonicación, durante 10 minutos.

Con objetivo de eliminar las proteínas y ácidos nucleicos no deseados, se procedió a realizar un tratamiento con Proteinasa K, DNasa y RNasa. Primeramente, se añadió Proteinasa K (Omega Bio-tek, Inc.) a la muestra, a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, y se incubó a 65°C durante 1 hora. Posteriormente, se añadió a la mezcla RNasa (Omega Bio-tek) a una concentración de (400 $\mu\text{l/ml}$) y DNasa I (Takara Bio) a una concentración de (8 U/ μl) en presencia de MgSO_4 20 % 1 $\mu\text{l/ml}$ y cloroformo 4 $\mu\text{l/ml}$. La mezcla se dejó incubando a 37°C durante toda la noche.

Para el siguiente paso, se añadió el mismo volumen que la muestra de fenol 90% a $65-70^\circ\text{C}$ y se agitó vigorosamente durante 15 minutos a una temperatura de $65-70^\circ\text{C}$, después se enfrió la suspensión en hielo. Posteriormente se repartió el volumen total de la muestra entre tubos de propileno de 1,5 ml, y se centrifugaron a $8.500 \times g$ por 15 minutos, tras ello, se transfirieron los sobrenadantes a tubos de centrifuga de 50 ml. Las fases de fenol restantes de los tubos de propileno de 1,5 ml, fueron extraídas de nuevo añadiendo 300 μl de agua destilada estéril. Se añadió acetato de sodio a 0,5 M de concentración a cada tubo con sobrenadante, y se añadió etanol 95 % a un volumen 10 veces mayor. La suspensión se dejó precipitando a -20°C durante 24 horas.

Posteriormente, se centrifugaron los tubos a $2.000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril, se colocaron en una tripa de diálisis, en agitación suave durante 48 horas y a 4°C , para eliminar por completo las trazas restantes que pudieran quedar de fenol, así como otros residuos.

Para finalizar la extracción los LPS se liofilizaron durante 24 horas, se pesaron y fueron almacenados a 4°C .

Se comprobó la pureza de los LPS obtenidos en la extracción mediante una electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, CONDALAB, Madrid, España) para comprobar la presencia de material genético y una electroforesis SDS-page en gel de

poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California), para detectar posibles proteínas en la muestra.

3.4. Cultivo y mantenimiento de células E-11

En este trabajo fueron cultivadas células E-11, una línea celular fibroblástica, inmortalizada e infectada permanente por un retrovirus, que proviene de la línea celular SSN-1 de alevines pez cabeza de serpiente rayada (*Channa striata*). Las células E-11 son susceptibles a ser infectadas por cualquiera de los cuatro genotipos del *Nodavirus*, siendo ideales para la replicación de este. Las células fueron cultivadas en medio de Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich, L4386) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, S181B-500) para su multiplicación o 5% para su mantenimiento, a una temperatura de 25 °C en una estufa de cultivo celular.

Cada cierto tiempo, las células fueron multiplicadas para su mantenimiento a largo plazo. Para cada una de las multiplicaciones, se eliminó el medio del frasco de cultivo, y se lavó el interior del mismo con PBS, para eliminar cualquier resto de medio y facilitar la separación de las células del frasco. Después, mediante acción mecánica, se separó el tapiz celular del frasco y se suspendió en 5 ml de medio L-15, pipeteando para eliminar los agregados celulares. Finalmente, se añadió el volumen necesario para el número de frascos a los que se iba a realizar el traspaso, y se repartieron las células en suspensión en los nuevos frascos de cultivo celular.

3.5. Replicación y titulación viral

3.5.1. Replicación viral

Los cuatro genotipos de *Nodavirus* fueron replicados en células E-11. Para ello, se inocularon 100 µl de virus suspendido en medio L-15 + 5% FBS en frascos celulares con un tapiz celular abundante y crecido, que se dejaron incubar en 25 °C para las cepas RGNNV y SJNNV, y 20 °C para las cepas TPNNV y BFNNV. Se revisaron los frascos a diario en el microscopio óptico, hasta que finalmente se observó vacuolización en las células y el desprendimiento del tapiz, síntomas de la infección por el virus, entonces, se raspó con una punta de pipeta la superficie de los frascos de cultivo celular para recoger el mayor número posible de células infectadas, y se centrifugaron a 6000 rpm durante

15 min a 4 °C. Finalmente, se desechó el precipitado y se guardó el sobrenadante donde se encontraba el virus a -80 °C.

3.5.2. Titulación viral

Para conocer la cantidad de partículas o cargas virales de las muestras de *Nodavirus* obtenidas tras la replicación del virus, se empleó el método de titulación viral desarrollado por Reed y Muench (1938). Para ello, se prepararon 27 pocillos con 100 µl de células E-11 en medio L-15 + 5% FBS, que se dejaron incubar a 25 °C durante dos días, para permitir al tapiz celular asentarse, hasta un recubrimiento del pocillo de entre 70 y 80%.

Se prepararon diluciones seriadas con medio L-15 + 5 FBS de cada cepa del virus, desde 10⁻¹ a 10⁻⁹. A cada dilución le fueron asignados un triplicado de pocillos, inoculándose una cantidad de 100 µl, y dejando la placa incubar a la temperatura 25 °C para las cepas RGNNV y SJNNV, y a 20 °C para las cepas TPNNV y BFNNV. Las placas fueron revisadas diariamente, hasta la producción del efecto citopático (ECP), caracterizado por espacios en el tapiz celular y vacuolización en las células (**Figura 1**). Finalmente, conociendo las diluciones que causaron al menos un 50% de ECP en las células, se aplicó la fórmula de Reed y Muench (1938) para calcular el título viral. La fórmula calcula el título viral mediante neutralización cuantitativa, utilizando la dilución del virus a la cual se produce el ECP en al menos el 50% de las muestras.

$$X = \frac{> 50\% - 50\%}{> 50\% - < 50\%}$$

$$\text{Título viral} = 10^{+[(Dil.\%>50)+X]}$$

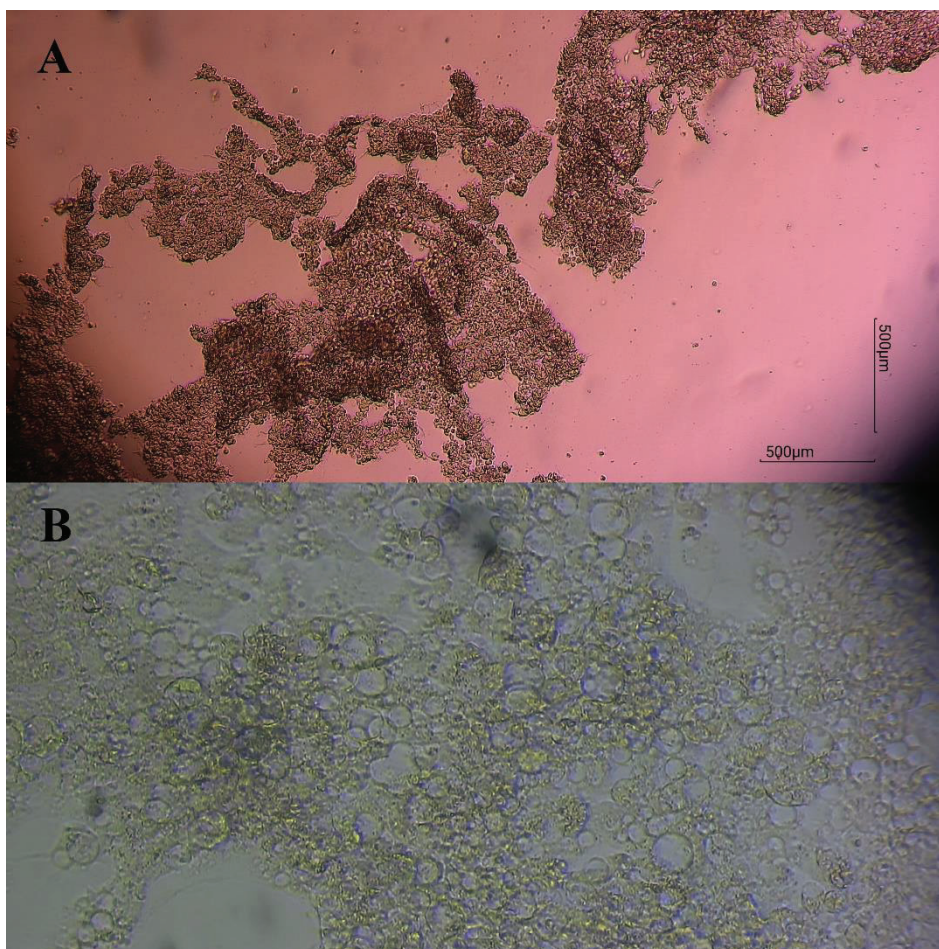


Figura 1. Efecto citopático en las células E-11 tras la infección con *Nodavirus*. Se puede observar la separación del tapiz celular (A) y la vacuolización de las células (B).

3.6. Diseño experimental

El experimento fue llevado a cabo en instalaciones del Parque Científico Tecnológico Marino (PCTM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) en Taliarte, municipio de Telde en la isla de Gran Canaria.

3.6.1. Evaluación *in vivo* de los LPS y poly (I:C) como inmunostimulantes para modular la respuesta inmune en lubina

Un total de 153 individuos de lubina provenientes de la empresa Aqunaria (Castillo del Romeral, San Bartolomé de Tirajana, Gran Canaria, España), con un peso medio de $19,88 \pm 5,51$ g fueron dispuestos en 12 tanques cilíndricos de fondo cónico de 500 litros de volumen, con un suministro de agua continua a partir de agua marina y controlando

la saturación de oxígeno mediante aireadores. Durante el experimento la temperatura del agua de los tanques osciló entre 18,4 °C y 19,8 °C. El fotoperiodo se controló con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los peces fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día con una dieta comercial (Skretting Alterna, D2).

Se aplicaron tres grupos experimentales con tratamientos distintos (PBS, LPS y poly (I:C)), para lo cual se distribuyó cada grupo en tanques triplicados y con un circuito distinto por grupo (**Figura 2**), a un total de 17 peces por tanque, que fueron inoculados vía intraperitoneal al inicio del experimento tras un periodo de aclimatación. Los individuos del primer grupo experimental fueron inoculados con 100 µl de PBS, que actuaron como grupo control negativo. El segundo grupo experimental fue inoculado con 100 µl de LPS a una concentración de 1 µg/µl, con objetivo de comprobar la eficacia del inmunostimulante. El tercer grupo fue inoculado con el inmunostimulante poly (I:C) (BIOSIGMA) a una concentración de 5 µg/µl.

Dos peces de cada tanque fueron sacrificados mediante sobredosis de aceite de clavo para tomar muestras en el momento inicial tras la inoculación y a 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 7 días y 15 días tras la inyección intraperitoneal. Se recogieron muestras de cerebro que se conservaron en TRIidty G (ITW Reagents) a -20 °C hasta el momento de su procesado.

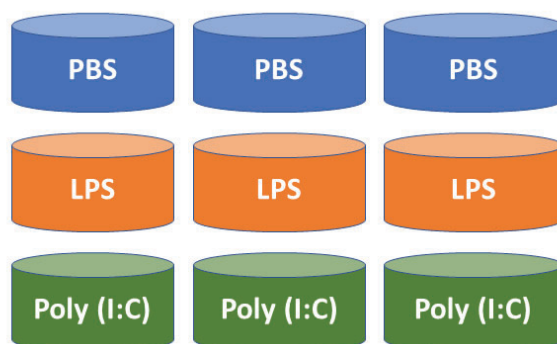


Figura 2. Esquema del ensayo experimental con lubina.

3.6.2. Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C)

Para la realización del experimento, se transfirieron las células E-11 a cuatro placas de cultivo celular de 24 pocillos, a una densidad de 175.000 células/ml, en medio L-15 + 5% FBS y se incubaron durante 24 h.

Se le asignó a cada placa un tratamiento distinto, y a cada pocillo un tiempo de toma de muestras, que se realizaron por triplicado. Se sustituyó el medio de cultivo de las células por 400 μ l de medio L-15 + 5% FBS por cada pocillo para la placa asignada como control negativo, 400 μ l de medio L-15 + 5% FBS con 50 ng/ μ l de LPS para el segundo grupo y 400 μ l de medio L-15 + 5% FBS suplementado con 50 ng/ μ l de poly (I:C) como tercer grupo.

Las tomas de muestras se realizaron al tiempo inicial tras el cambio del medio (0h), 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas posteriores. Las muestras se recogieron eliminando el medio y lisando las células con TRK Lysis Buffer (Omega Bio-tek, PR021) del kit de extracción de ADN, almacenándose a -20 °C para su posterior procesado.

3.6.3. Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con *Nodavirus*

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron células E-11 en placas de cultivo celular de 24 pocillos, a una densidad de 175.000 células/ml, con medio L-15 + 5% FBS durante 24 h.

Se utilizaron 8 placas en total, inoculando cuatro placas con poly (I:C) a una concentración de 50 ng/ μ l en un total de 400 μ l de medio L-15 + 5% FBS por pocillo. Tres días después, debido a los resultados obtenidos en el experimento realizado anteriormente de estimulación del sistema inmune en células E-11, las cuatro placas que no habían sido inmunoestimuladas, fueron inoculadas cada una por una cepa de *Nodavirus* (RGNNV, SJNNV, TPNNV y BFNNV) con una titulación viral de 10^5 TCID₅₀ en los grupos RGNNV y TPNNV, y de 10^4 TCID₅₀ en los grupos SJNNV y BFNNV, realizando también el mismo proceso en las placas inmunoestimuladas. Se recogieron muestras a 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h tras la infección. Las muestras se recogieron lisando las células mediante TRK y conservándolas a -20 °C.

Para calcular el título viral de cada una de las muestras una vez realizada la qPCR, se extrapolaron los resultados obtenidos realizando una curva de calibrado, obteniendo los valores de Cq para una serie de diluciones seriadas de cada cepa del virus, que partieron de una concentración conocida.

3.7. Procesamiento de las muestras

Se extrajo el ARN total de las muestras de cerebro y células utilizando una modificación del protocolo designado por el Kit comercial de Omega “E.Z.N.A. Total RNA Kit 1”. Inicialmente se homogenizaron las muestras con un ultraturrax y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se añadieron 100 μ l de cloroformo a cada muestra, para después homogenizar con ayuda de un Vortex, dejando la muestra 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13.000 xg durante 15 minutos, para recoger el sobrenadante y transferirlo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, al que se le añadieron 350 μ l de etanol 70% frío. Se traspasaron las muestras a columnas (“Silica Mini spin column”) que se introdujeron en

microtubos de 2 ml, para después centrifugar a 10.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente, tras lo que se eliminó el contenido del microtubo. Se añadieron 500 µl de “RNA Wash Buffer I” a la columna, y se centrifugó a 10.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente, tras lo que se desechó el volumen del microtubo. Después, se añadieron 500 µl de “RNA Wash Buffer II” a la columna, y se centrifugó a 10.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente, se desechó el volumen del microtubo y se repitió el paso mencionado previamente una segunda vez. Tras ello, se movió la columna a un microtubo nuevo, y se centrifugó a 13.000 xg durante 2 minutos a temperatura ambiente, para desechar el microtubo y colocar la columna en un microtubo de centrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 60 µl de agua ultrapura con 1% de dietilpírocarbonato (DEPC) a la columna, y se centrifugó durante 2 minutos a 13.000 xg. Finalmente, se recogió el volumen total del microtubo de centrífuga y se transfirió de nuevo a la columna, para realizar un centrifugado a 13.000 xg durante 2 minutos, y almacenar las muestras de ARN obtenidas a -20 °C para continuar posteriormente con el trabajo.

Tras la extracción de ARN, se realizó una cuantificación del ARN obtenido mediante el instrumento Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Se diluyeron las muestras hasta una concentración de 100 ng/µl. Más tarde se utilizó el kit comercial “iScript” de BIORAD para realizar el proceso de retrotranscripción del ARN y obtener ADN complementario (ADNc) en un termociclador BIORAD T100.

Para realizar la retrotranscripción, se añadieron 5 µl de Tampón 5X (BIORAD) y 12 µl de agua DEPC a cada muestra de 2 µl (1 µg/µl) de ARN, y se dejaron incubar a 70 °C durante 10 minutos. Después se añadió 5 µl de agua DEPC y 1 µl de enzima transcriptasa inversa a cada muestra, para incubar 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42 °C y 15 minutos a 70 °C. Finalmente, las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C para su posterior procesado.

3.7.1. Evaluación de la expresión génica mediante qPCR

La expresión de genes del sistema inmune se evaluó mediante qPCR. Para ello, se emplearon placas de 96 pocillos diseñadas previamente, evaluando cada muestra por triplicado. Los genes valorados en el experimento fueron la β-actina como gen

constitutivo (“housekeeping”), Mx e IRF-3 como genes indicadores de respuesta antiviral, IL-1 β y TNF- α como genes indicativos de respuesta inflamatoria, IL-10 como gen indicador de la respuesta antiinflamatoria y el gen Snod R1 para la detección del *Nodavirus* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Cebadores empleados para evaluar la expresión de genes mediante qPCR.

Cebador	Secuencia	Referencia
β -actina	<i>Forward</i> 5' – ATGTGGATCAGCAAGCAGG – 3'	AJ537421
	<i>Reverse</i> 5' – AGAAATGTGTGGTGTGGTCG – 3'	
Mx	<i>Forward</i> 5' – GGTCAAGGAGCAGATCAAACAG – 3'	AM228974
	<i>Reverse</i> 5' – CTCGCATCAGGTTAGGGAATC – 3'	
IRF-3	<i>Forward</i> 5' – AGAGGTGAGTGGCAATGGTC – 3'	CBN81356
	<i>Reverse</i> 5' – GAGCAGTTTGAAGCCTTTGG – 3'	
IL-1 β	<i>Forward</i> 5' – ATTACCCACCACCCACTGAC – 3'	AJ269472
	<i>Reverse</i> 5' – TCTCTTCCACTATGCTCTCCAG – 3'	
TNF- α	<i>Forward</i> 5' – GCCAAGCAAACAGCAGGAC – 3'	DQ200910
	<i>Reverse</i> 5' – ACAGCGGATATGGACGGTG – 3'	
IL-10	<i>Forward</i> 5' – ACCCCGTTGCTTGCCA – 3'	DQ821114
	<i>Reverse</i> 5' – CATCTGGTGACATCACTC – 3'	
Snod R1	<i>Forward</i> 5' – TCC AAA AGA AAG AAG CAT AC – 3'	AB056571
	<i>Reverse</i> 5' – TGG CAT GTA CCA CGG AAC – 3'	

Una vez obtenidos los valores de ciclo de umbral (Ct) para cada una de las muestras, se normalizaron los resultados respecto al tiempo inicial de cada uno de los tratamientos mediante el método de Livak y Schmittgen (2001).

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics v26. Se analizaron los resultados de los experimentos de estimulación del sistema inmune de lubina y células E-11 mediante un test ANOVA de un factor y la prueba de rango post hoc Tukey, considerando que las diferencias en la expresión de genes eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados del experimento de infección de células E-11 inmunostimuladas fueron analizados mediante una prueba T para muestras independientes, considerando que las diferencias entre grupos eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Los gráficos de los resultados obtenidos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 9.

4. Resultados

4.1. Identificación de la bacteria

4.1.1. Identificación de la bacteria mediante pruebas bioquímicas

Tras aplicar la tinción de Gram, las bacterias se observaron de una tonalidad rojiza, por lo que se puede afirmar que se trataba de bacterias gramnegativas (**Figura 3A**).

Al realizar la prueba de movilidad y observar las bacterias al fresco en el microscopio óptico, se pudo determinar que las bacterias eran móviles.

Mediante la aplicación de una colonia en una tira reactiva para la prueba de oxidasa, se observó el viraje de la franja reactiva a color azul, por lo que se estableció un resultado positivo (**Figura 3B**).

Después de aplicar agua oxigenada a una colonia bacteriana, se advirtió la presencia de burbujas, determinante de un resultado positivo para la prueba de catalasa (**Figura 3C**).

Sembrando la bacteria en medio de Hugh Leifson en condiciones aerobias y anaerobias, se observó el viraje de ambos medios a una tonalidad amarillenta, siendo positiva para ambas reacciones de oxidación y fermentación (**Figura 4A**).

Tras sembrar la bacteria en un medio sin sal, se comprobó que no se produjo crecimiento de la bacteria, por lo que se considera positiva para el requerimiento de sal (**Figura 4B**).

Inoculando la bacteria en los medios preparados con aminoácidos, se produjo el viraje de color, que indicó el resultado negativo para arginina, positivo para lisina y negativo para ornitina.

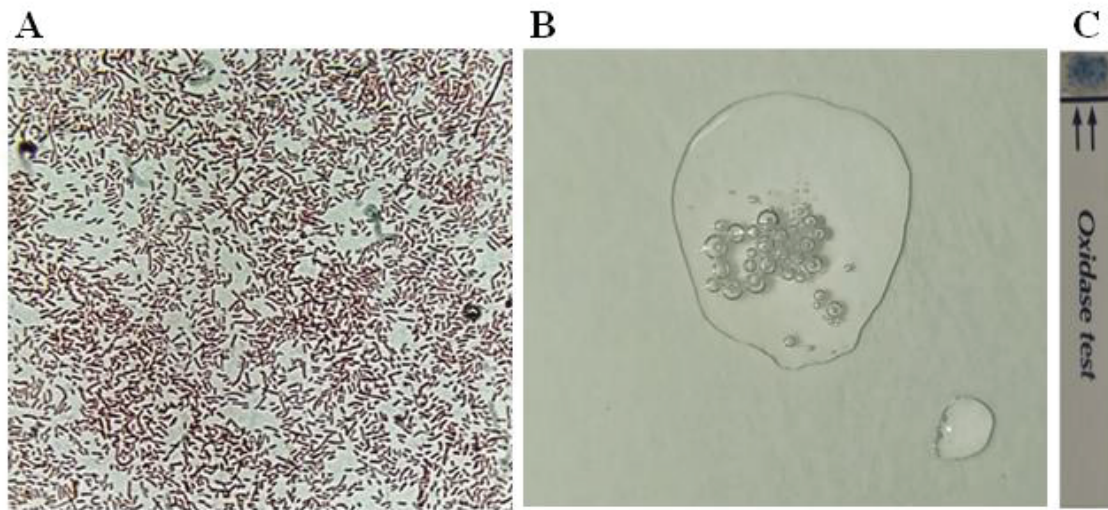


Figura 3. Identificación de *V. alginolyticus* mediante tinción de Gram, mostrando bacilos gramnegativos (A), prueba de la peroxidasa con formación de burbujas (B) y prueba de la oxidasa con un viraje de la tira reactiva a color azul (C).

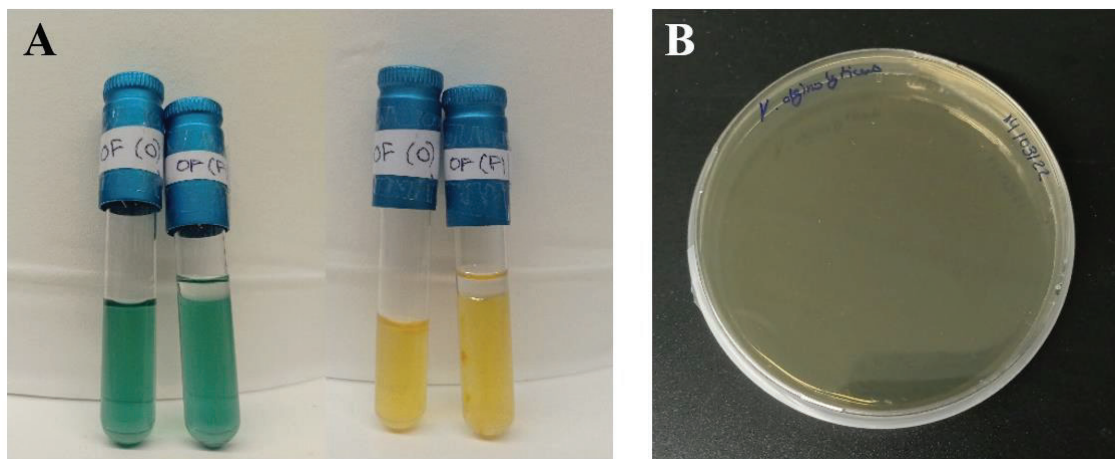


Figura 4. Identificación de *V. alginolyticus* mediante sembrado en Hugh Leifson, donde se aprecian los medios antes de ser sembrados (izquierda) y tras el crecimiento de la bacteria (derecha) (A) y mediante siembra en un medio sin sal, donde no se produjo crecimiento bacteriano (B).

4.1.2. Identificación de la bacteria mediante qPCR

El resultado de la qPCR para la identificación de *V. alginolyticus* se valoró como positivo, con un ciclo de cuantificación (Cq) medio para las muestras analizadas de $15,02 \pm 0,166$ (Figura 5). Se consideró que no existía presencia de bacteria en el control negativo, con un Cq de $31,19 \pm 0,487$.

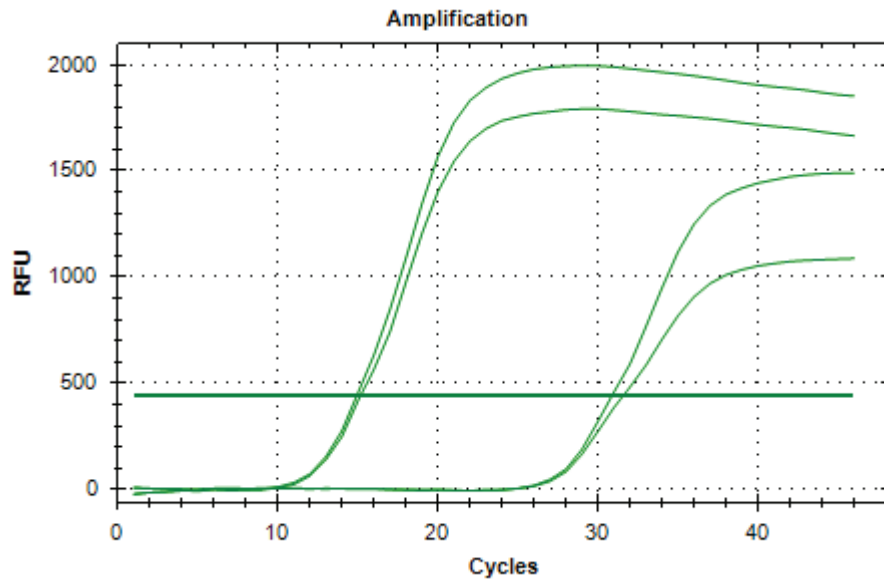


Figura 5. Resultado de la qPCR para la detección de *V. alginolyticus*.

4.2. Extracción de LPS

4.2.1. Electroforesis en SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para la detección de posibles proteínas y determinar la pureza en los LPS obtenidos tras la extracción.

Como se puede observar en la **Figura 6**, no se detectaron proteínas en la muestra de LPS extraída, ya que no se percibieron bandas en el pocillo de la muestra.

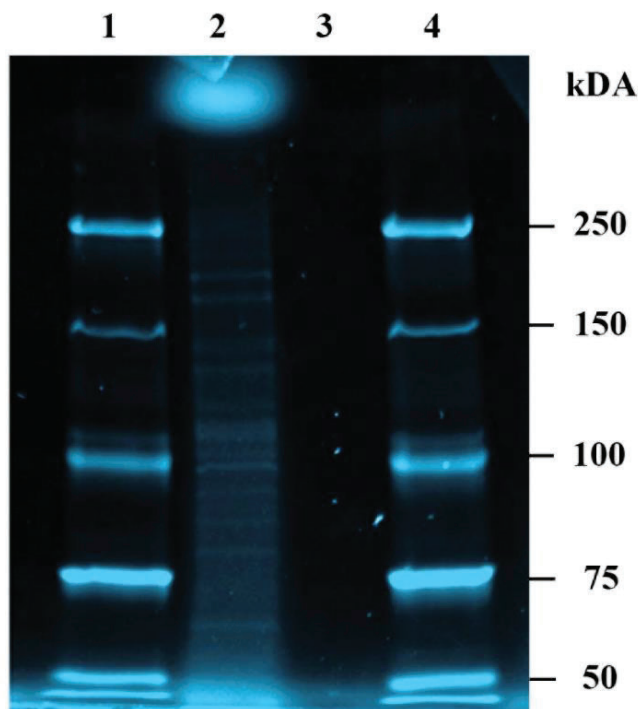


Figura 6. Perfil electroforético de marcador Precision Plus Protein™ WesternC™ Standars (carriles 1 y 4), *V.alginolyticus* sonificado como control positivo (carril 2) y muestra de LPS (carril 3) en gel SDS-PAGE.

4.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el objetivo de determinar la presencia de material genético (ADN genómico o ARN) en las muestras de LPS extraídas.

Tras la ejecución de la electroforesis (**Figura 7**), no se pudieron observar bandas en ninguno de los pocillos ocupados por las muestras, por lo que se determinó que no existía presencia de material genético en las muestras extraídas.

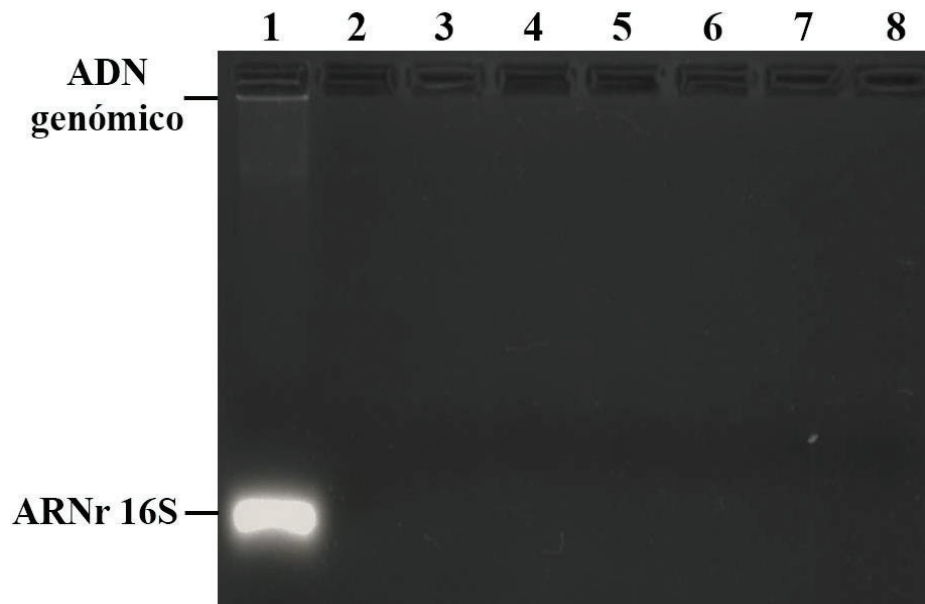


Figura 7. Perfil electroforético de *V. alginolyticus* calentado a 99 °C como control positivo (carril 1) y muestras de LPS (carriles 2 a 8) en gel de agarosa.

4.3. Evaluación *in vivo* de los LPS y poly (I:C) como inmunoestimulantes para modular la respuesta inmune en lubina

En las gráficas se representan los cambios en la expresión de los distintos genes analizados del sistema inmune de lubina en el experimento con inmunoestimulantes. La expresión génica fue normalizada mediante el método de Livak y Schmittgen (2001) y respecto a los resultados del tiempo inicial del gen constitutivo (β -actina).

En la **Figura 9A** se puede observar un elevado efecto estimulante de la respuesta antiviral mediada por el gen Mx para el grupo tratado con poly (I:C) entre los tiempos 12 y 72 h tras la inoculación del inmunoestimulante. Tras 48 h después de la inoculación, se observa una estimulación en el grupo control tratado con PBS, que coincide con una infección natural por *Vibrio harveyi* que fue identificada mediante PCR (**Figura 8A**) al observar una sintomatología en los peces del experimento compatible con Vibriosis (**Figura 8B**). En el tiempo 72 h, los tres tratamientos muestran una estimulación del gen Mx que concuerda con la infección. Una semana tras la inoculación, los grupos PBS y poly (I:C) permanecen con un nivel de estimulación mayor que el grupo LPS como se observa en las diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se observa en la **Figura 9B**, el grupo tratado con poly (I:C) muestra una estimulación de la respuesta antiviral regulada por el gen IRF-3 a partir de las 12 h, hasta las 72 h tras la inoculación. En el tiempo 48 h, se produjo una estimulación en el grupo control PBS a la par que la infección natural mencionada anteriormente. A 72 h tras la inoculación, la infección fue generalizada para los tres tratamientos, que se muestran inmunoestimulados. En los tiempos 7 d y 15 d, se retomaron valores basales sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos.

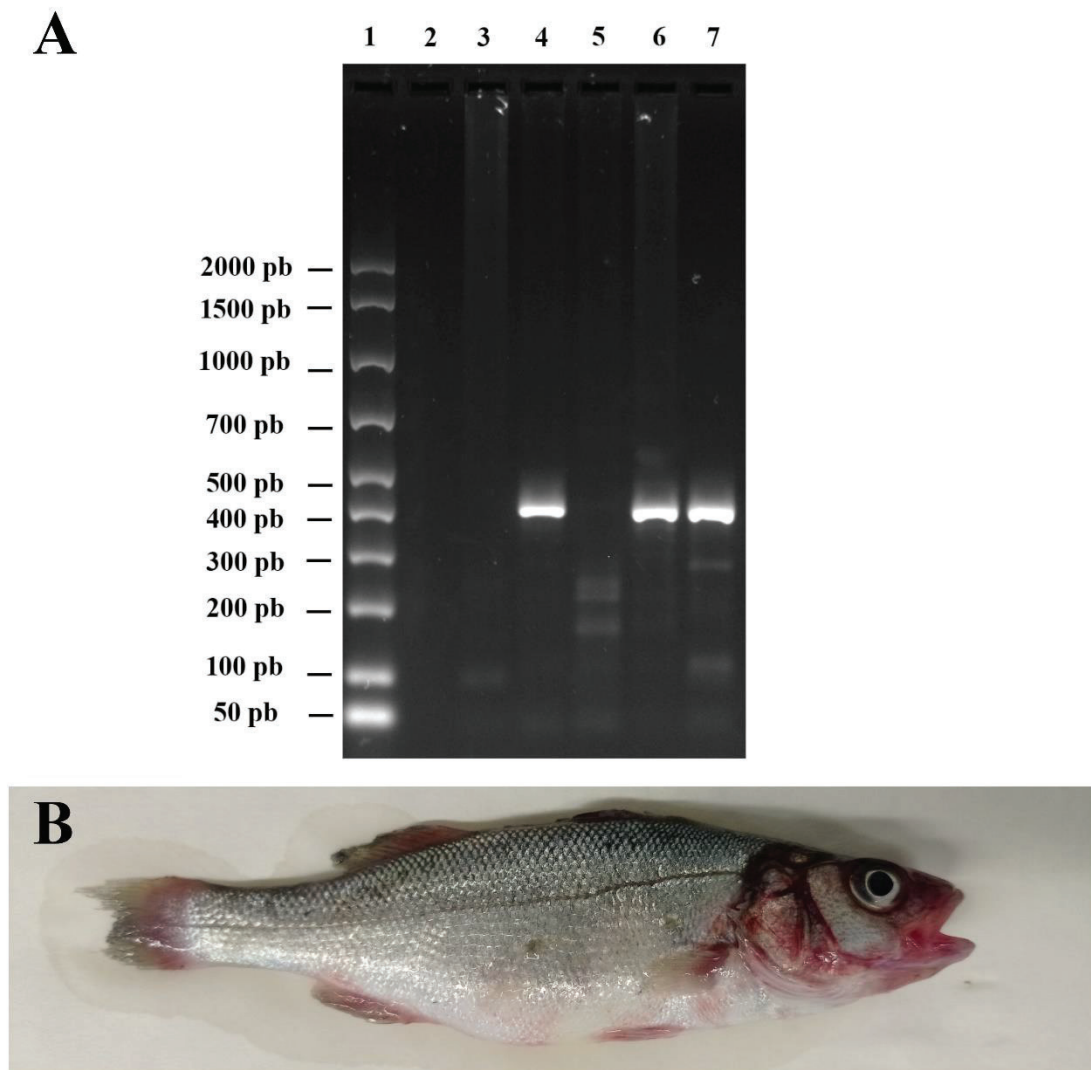


Figura 8. Perfil electroforético de marcador de peso molecular (carril 1), control negativo (carril 2), y muestras de ADN obtenidas a partir de bacterias sin identificar obtenidas del cultivo de órganos de peces enfermos (carriles 3 a 7) en gel de agarosa (A) y pez fallecido a causa de la enfermedad, con hemorragias en boca, branquias y aletas (B).

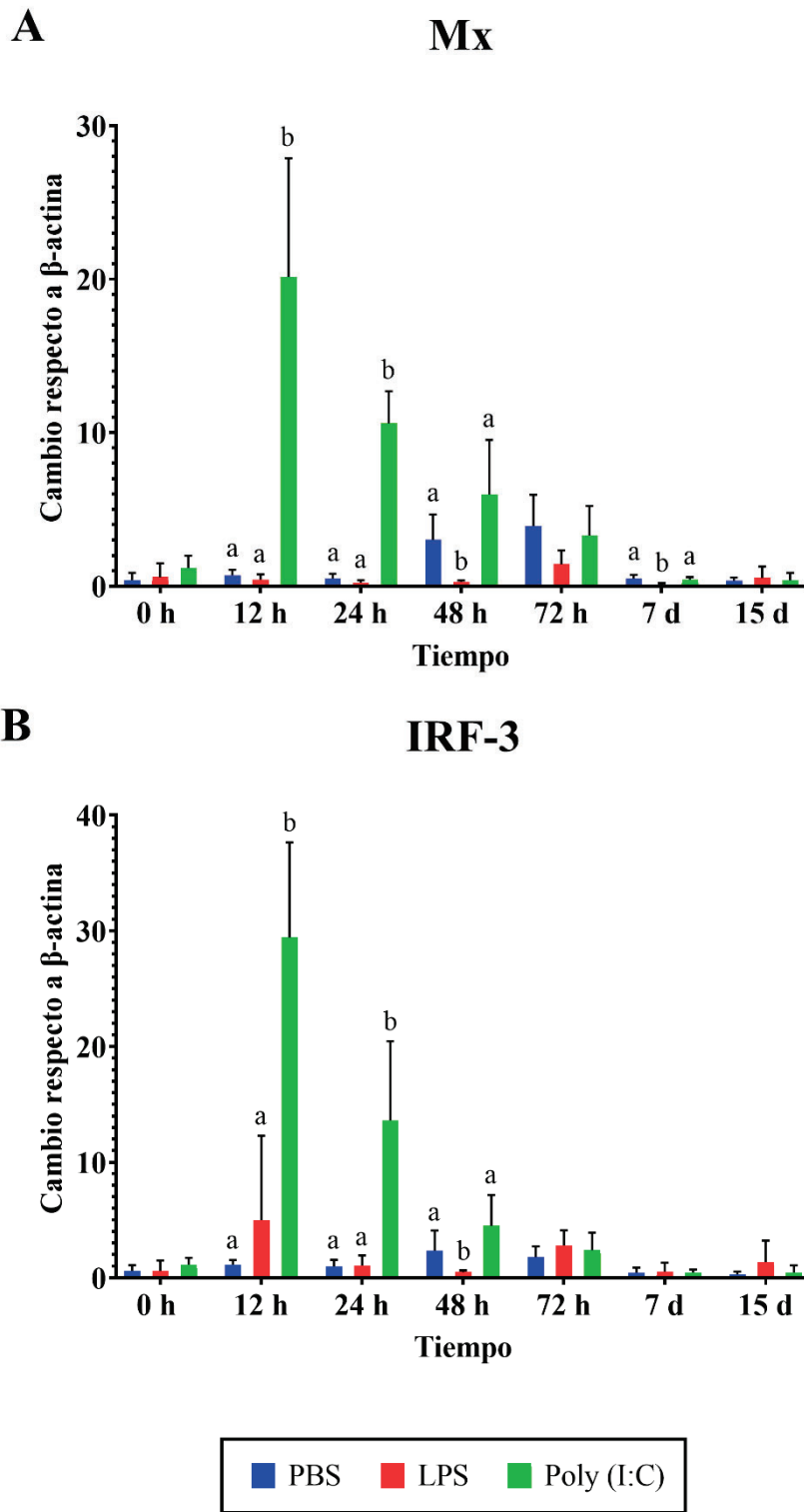


Figura 9. Expresión de los genes Mx (A) e IRF-3 (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Como se aprecia en la **Figura 10A**, a partir de 12 h tras la inoculación, se observa un efecto estimulante de la respuesta proinflamatoria debida a la IL-1 β para el grupo tratado con poly (I:C). En el grupo control, se observa un aumento de los niveles de IL-1 β en el tiempo 24 h, junto a la infección por *V. harveyi*. Tras 48 h, se observa un aumento de los niveles de IL-1 β en los grupos PBS y poly (I:C) durante el desarrollo de la infección. A 72 h la estimulación de la respuesta proinflamatoria se aprecia en los tres grupos a la vez que el proceso infeccioso. A los 7 d tras la inoculación, el grupo poly (I:C) muestra diferencias significativas frente al grupo LPS ($p < 0,05$). Finalmente, a 15 d tras el inicio del experimento, los niveles de IL-1 β volvieron a niveles basales en todos los grupos sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

En la **Figura 10B** se puede percibir un aumento en la expresión de TNF- α en el grupo poly (I:C) a partir de las 12 h tras la inoculación. A tiempo 24 h, se observan valores similares a los obtenidos en el tiempo inicial. A partir de las 48 h se aprecia un aumento de la expresión génica en los tratamientos PBS y poly (I:C) coincidiendo con la infección por bacteria, estando a 72 h todos los grupos inmunostimulados y afectados por el proceso infeccioso. Finalmente, a tiempo 7 y 15 d, los valores retornan a niveles basales sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

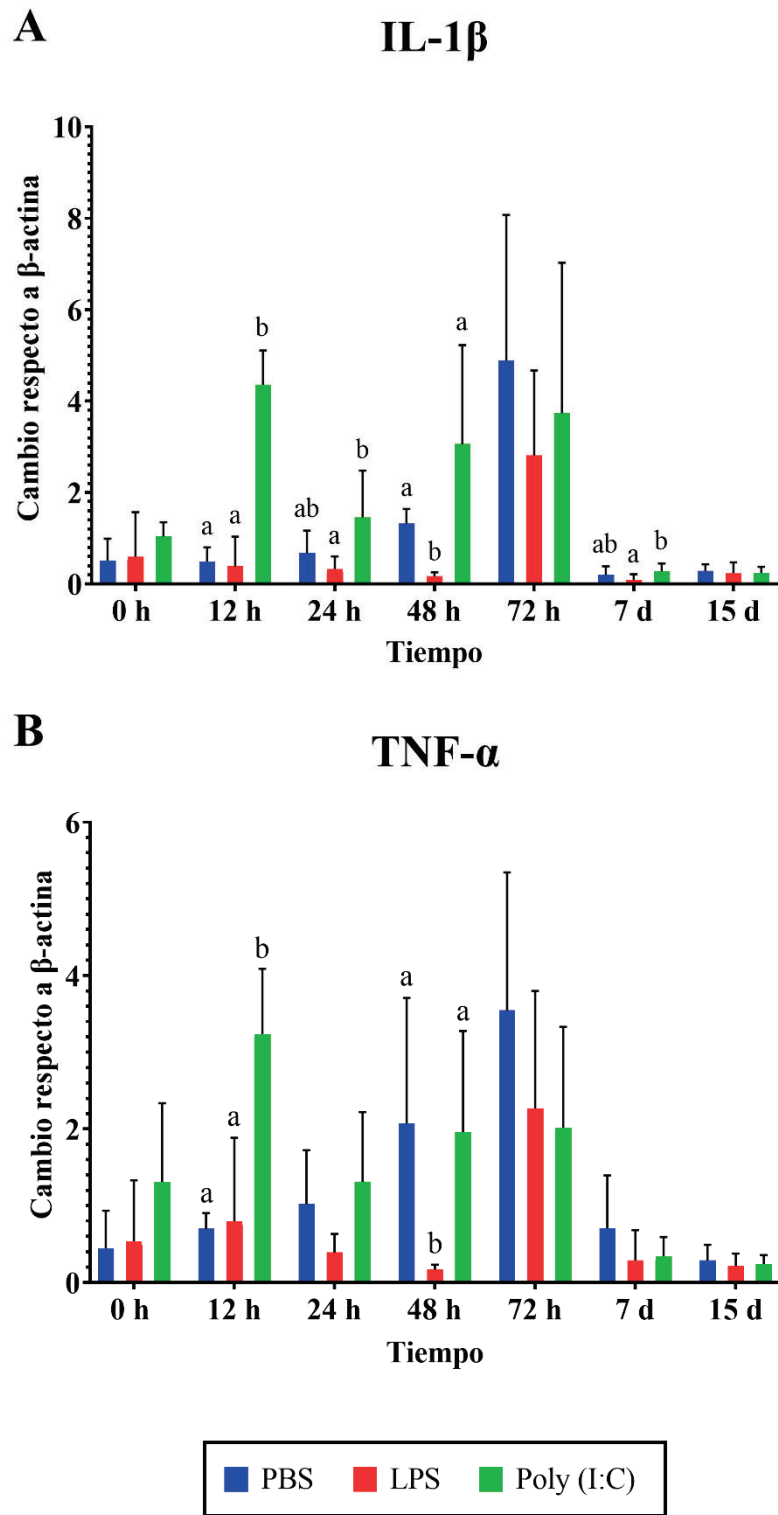


Figura 10. Expresión de los genes IL-1 β (A) y TNF- α (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

En la **Figura 11** se observa un aumento de la respuesta antiinflamatoria mediada por la IL-10 en el grupo poly (I:C) a 12 h tras la inoculación del inmunostimulante, que continúa elevada a 24 h respecto al grupo LPS. 48 horas tras la inoculación, y durante el transcurso de la infección natural, se aprecia un aumento de la expresión de la IL-10 en los grupos PBS y poly (I:C), siendo a 72 h elevada para los tres grupos. A 7 d, el grupo LPS tiene menos expresión que los tratamientos PBS y poly (I:C), mientras que, a 15 d, las diferencias estadísticas ($p < 0,05$) únicamente se encuentran entre LPS y poly (I:C), teniendo este último mayores niveles de expresión.

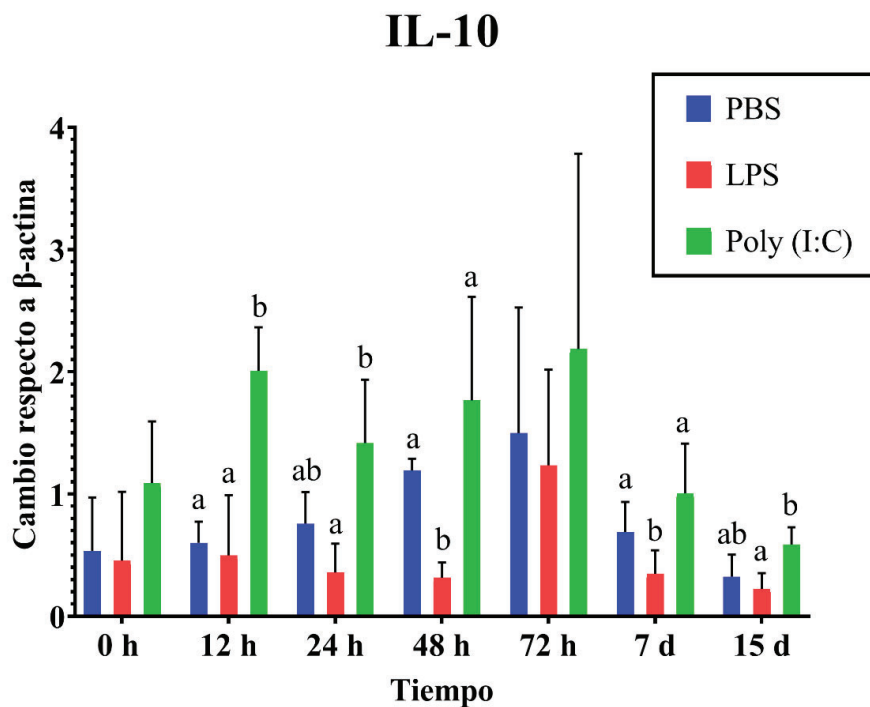


Figura 11. Expresión del gen IL-10 para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de lubina. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

4.4. Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C)

En las gráficas que se muestran a continuación se representan las variaciones en la expresión de los distintos genes analizados del sistema inmune de células E-11 en el experimento con inmunoestimulantes. La expresión génica fue normalizada mediante el método de Livak y Schmittgen (2001) y respecto a los resultados del tiempo inicial del gen constitutivo (β -actina).

En la **Figura 12A** se puede observar una tendencia al alza generalizada en la expresión de IL-1 β entre 0 y 12 h. Después de 6 h tras añadir los inmunoestimulantes al medio, los niveles de IL-1 β se muestran más elevados en el grupo tratado con LPS que en los otros dos tratamientos. En el tiempo 12 h, se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, siendo la expresión más elevada la del grupo LPS, seguida de poly (I:C) y encontrándose el grupo control por debajo de estos. Después de 24 h, disminuyen los niveles de expresión en todos los tratamientos. A 48 h, el grupo tratado con LPS se encuentra más expresado que el grupo estimulado con poly (I:C). Finalmente, a 72 h, los valores de todos los grupos se encuentran con niveles de expresión bajos.

Como se observa en la **Figura 12B**, los niveles de expresión de TNF- α se mantienen hasta el tiempo 12 h, en el que se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores de expresión obtenidos en el grupo control y el LPS. A 24 h, los niveles de expresión se muestran similares a los tiempos iniciales. Después de 48 h, hay diferencias ($p < 0,05$) entre los tres grupos, siendo el grupo tratado con LPS el que tiene niveles más elevados de expresión, seguido del grupo control y, por último, el tratado con poly (I:C). En el tiempo 72 h se produjo una elevación en los tres grupos de los niveles de expresión de TNF- α .

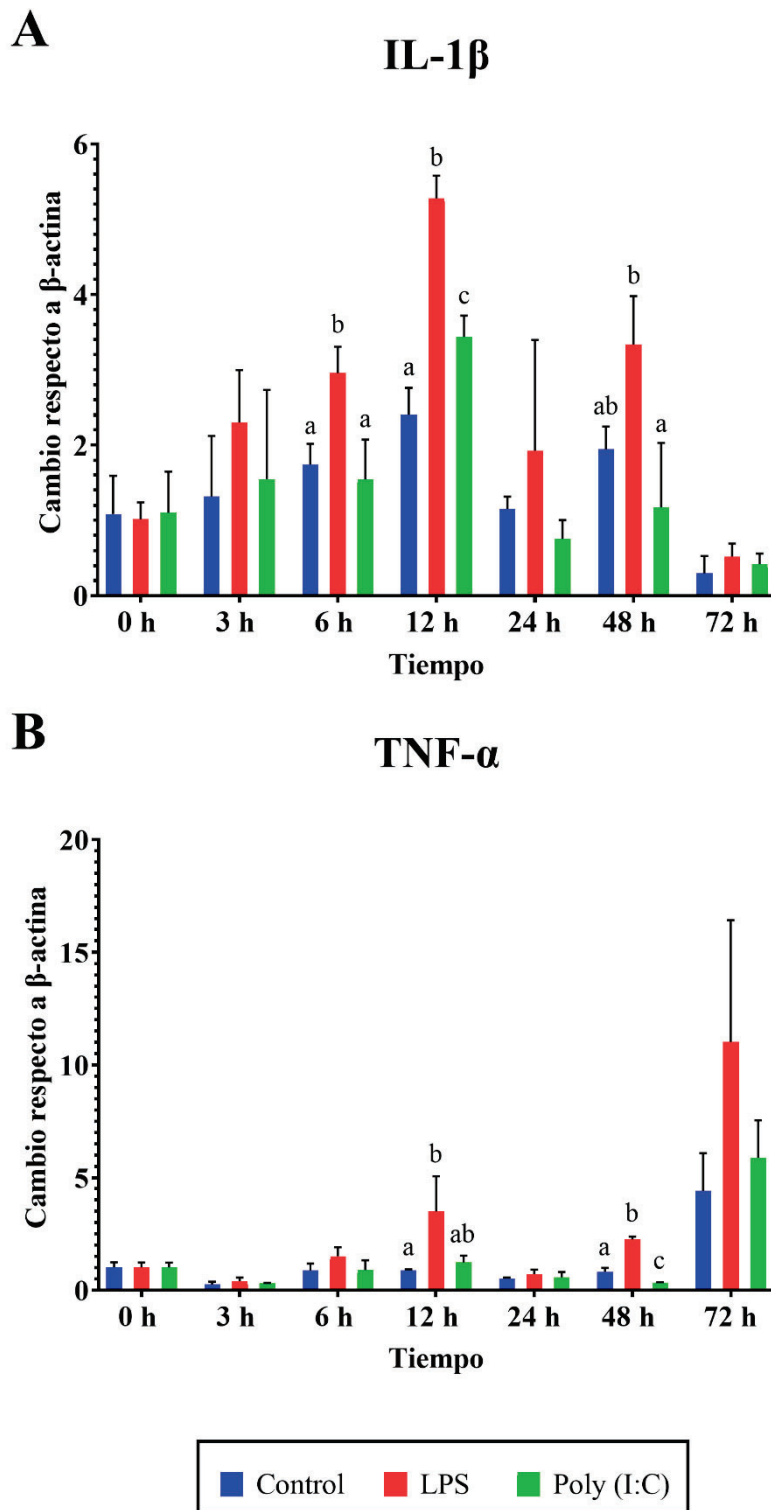


Figura 12. Expresión de los genes IL-1 β (A) y TNF- α (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de células E-11. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

En la **Figura 13A** se pueden apreciar los niveles de la expresión génica de IRF-3 que se relaciona con la respuesta antiviral. En la gráfica se observa como los valores se mantienen relativamente constantes desde el inicio del experimento hasta las 24 h. A las 12 h, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo tratado con poly (I:C) y los grupos control y LPS. A 48 h los valores del grupo control y LPS muestran un aumento de los niveles de expresión. En el último tiempo de muestreo a 72 h, se aprecia un drástico aumento de los niveles de IRF-3 en el grupo poly (I:C), que se muestra diferente estadísticamente frente a los grupos restantes.

Los valores de la expresión de IL-10 se muestran en la **Figura 13B**. Entre los tiempos 0 y 3 h, la expresión de la citoquina se mantiene con valores similares en todos los grupos, hasta tiempo 6 h, en el que se encuentran diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre el grupo LPS, en el que se encuentran valores más elevados, y los grupos control y poly (I:C). Las diferencias ($p < 0,05$) encontradas a 6 h, se mantienen también a las 12 h. Tras 24 h después del comienzo del experimento, los valores de IL-10 vuelven a niveles bajos y sin diferencias entre los grupos. A 48 h, el grupo poly (I:C) se encuentra menos expresado que los dos grupos restantes, con los que muestra diferencias significativas ($p < 0,05$). Finalmente, a 72 h, se observa una estimulación generalizada en todos los grupos en los niveles de expresión génica.

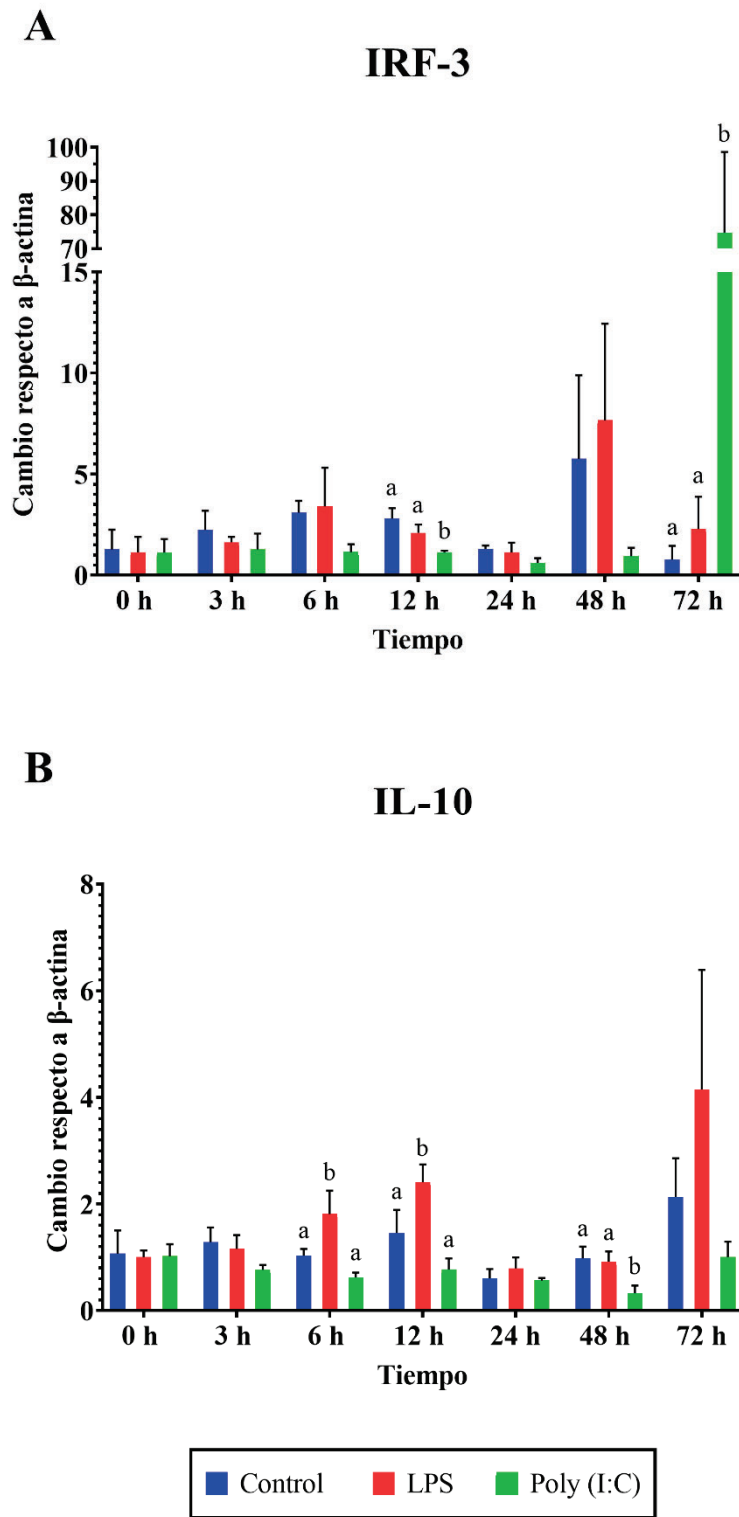


Figura 13. Expresión de los genes IRF-3 (A) e IL-10 (B) para los tratamientos utilizados en el experimento de estimulación del sistema inmune de células E-11. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

4.5. Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con *Nodavirus*

En las gráficas representadas en este apartado, se observan las variaciones en el tiempo del título viral de cada una de las cuatro cepas empleadas en el experimento (RGNNV, SJNNV, TPNNV y BFNNV). El título viral fue calculado extrapolando valores de Cq obtenidos mediante qPCR gracias a una recta de calibrado. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos para cada cepa de *Nodavirus*.

En la **Figura 14** se observa la evolución del título viral del grupo inmunoestimulado y sin estimular infectado con la cepa RGNNV. Durante las primeras horas tras la infección comienza a aumentar el título viral en ambos tratamientos. Entre las 6 y 12 h tras el inicio del experimento, aunque no existan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se observa una tendencia del grupo infectado no inmunoestimulado a poseer más carga viral que el grupo inmunoestimulado. A tiempo 24 h, el virus alcanza sus valores más altos en el grupo no estimulado, con un título de $5,6 \pm 0,126$ TCID₅₀/ml. Los valores máximos del grupo estimulado se dan en tiempo 48 h, con $5,16 \pm 0,22$ TCID₅₀/ml. Finalmente, a tiempo 72 h, se produce una pronunciada caída en los valores título viral de ambos grupos.

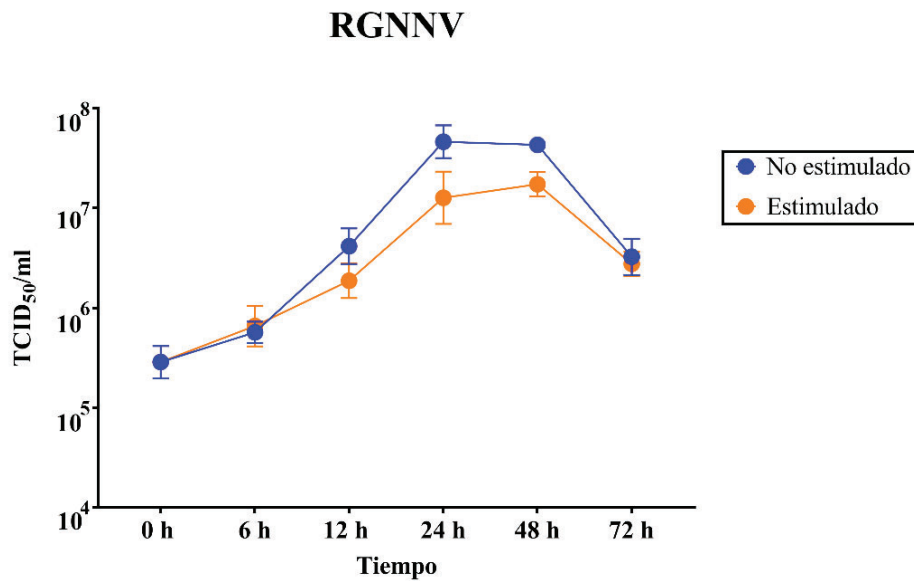


Figura 14. Título viral (TCID₅₀/ml) cuantificado en células E-11 infectadas con RGNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/μl).

En la **Figura 15** se aprecia los valores de título viral para el grupo infectado con SJNNV estimulado con poly (I:C) y sin estimular. Se observa cómo tras 6 h, la replicación viral se inicia y los valores comienzan a aumentar. A 12 h, pese a que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), existe una tendencia del virus a replicarse más en el grupo sin estimular, que permanece hasta el fin del experimento. A 24 h se alcanzan los valores máximos para ambos grupos con un título viral de $6,93 \pm 0,20$ TCID₅₀/ml para el grupo no inmunestimulado y $6,12 \pm 0,16$ TCID₅₀/ml en el grupo estimulado. Durante los tiempos 48 h y 72 h, se observa como la tendencia del título viral es a la baja en ambos grupos, permaneciendo el grupo sin estimular con valores más elevados que el grupo únicamente infectado con el virus.

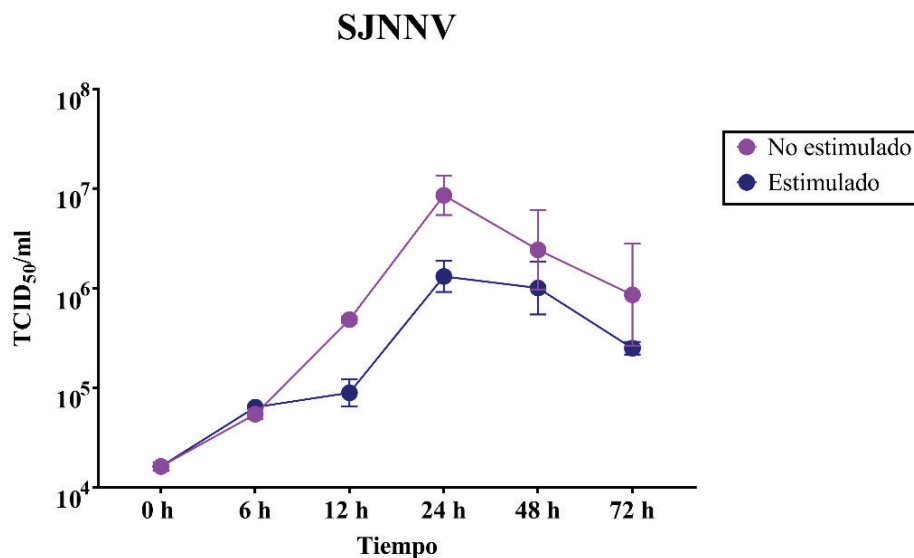


Figura 15. Título viral (TCID₅₀/ml) cuantificado en células E-11 infectadas con SJNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/μl).

Los valores de título viral para los grupos infectados con TPNNV estimulado y sin estimular se ven reflejados en la **Figura 16**. A las 6 h y aunque no se encuentren diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se observa una tendencia a una mayor replicación del virus en el grupo estimulado, sin embargo, el título viral se aproxima en ambos grupos en tiempo 12 h. A las 24 h tras el inicio del experimento, se observa un aumento pronunciado del título viral en el grupo no estimulado, mientras que el grupo estimulado aumenta de forma más moderada. En el tiempo 48 h, los valores se vuelven a aproximar en ambos grupos, para volver a darse una tendencia al alza en el grupo sin inmunostimular a las 72 h, donde se encuentran los valores máximos de título viral para cada tratamiento, con $6,74 \pm 0,12$ TCID₅₀/ml en el grupo no estimulado y $6,2 \pm 0,33$ TCID₅₀/ml en el grupo estimulado.

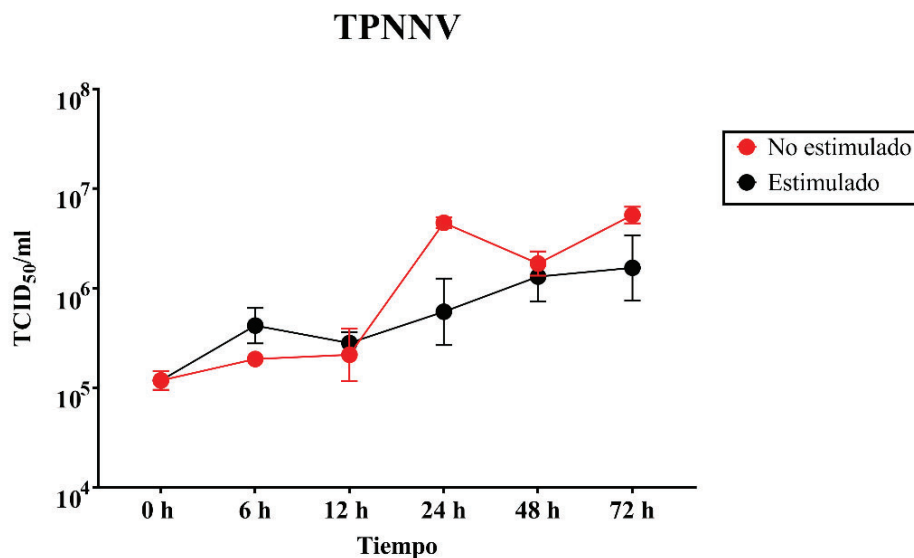


Figura 16. Título viral (TCID₅₀/ml) cuantificado en células E-11 infectadas con TPNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/μl).

En la **Figura 17** se puede observar el título viral del grupo no estimulado y estimulado a través de los tiempos de muestreo para la cepa BFNNV. Entre el tiempo inicial (0h) y las 12 h, se aprecia una ligera tendencia al alza de ambos grupos, con valores similares. Entre las 12 y las 24 h, se detecta un mayor título viral en el grupo sin estimular que en el estimulado, con una tendencia al alza en ambos, donde el grupo no estimulado alcanza su máximo valor, con $5,6 \pm 0,12$ TCID₅₀/ml. A las 48 h, se observa una tendencia descendente en los valores del grupo no estimulado, sin embargo, la tendencia es ascendente en el grupo estimulado, con valores de $5,15 \pm 0,22$ TCID₅₀/ml. Finalmente, la tendencia de ambos grupos a 72 h es descendente, encontrándose el grupo sin inmunoestimular con un mayor título viral que el estimulado.

Estudio de la respuesta temprana del sistema inmune de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y células E-11 ante inmunostimulantes y *Nodavirus*

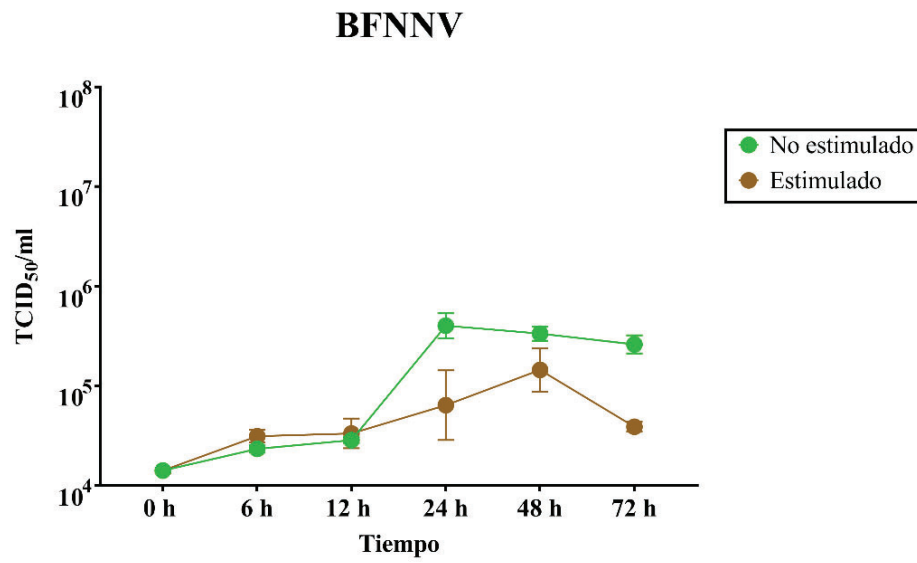


Figura 17. Título viral (TCID₅₀/ml) cuantificado en células E-11 infectadas con BFNNV sin estimular y estimuladas con poly (I:C) (50 ng/μl).

5. Discusión

5.1. Evaluación *in vivo* de los LPS y poly (I:C) como inmunoestimulantes para modular la respuesta inmune en lubina

En el presente experimento, se pudo observar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la expresión de los genes entre los distintos tratamientos empleados en lubina.

5.1.1. Respuesta antiviral

En cuanto a la respuesta antiviral, se produjo una respuesta temprana para el grupo inoculado con poly (I:C), tal y como se produjo en otros experimentos *in vivo* realizados (Salinas *et al.*, 2004; Falco *et al.*, 2014; Carballo *et al.*, 2016). La expresión de los genes Mx e IRF-3 muestran su expresión más elevada después de 12 h tras la estimulación, para comenzar a descender progresivamente a lo largo del tiempo. La estimulación del gen Mx tras la inoculación del poly (I:C) en lubina fue observada también por Carballo *et al.* (2016), y en otros peces en numerosos estudios, como en rodaballo japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Thanasaksiri *et al.*, 2015), rohu (*Labeo rohita*) (Das *et al.*, 2019), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Lulijwa *et al.*, 2020) o catla (*Labeo catla*) (Panda *et al.*, 2021). Ambos genes parecen alterarse ligeramente durante la infección bacteriana natural que cursó en todos los circuitos aproximadamente entre las 24 y 72 h del experimento.

En el grupo tratado con LPS no se produjo una respuesta antiviral, encontrándose incluso menos estimulado que los demás grupos en el tiempo 7 d para Mx, posiblemente debido a la infección natural. La vía de reconocimiento principal de los LPS es mediante la vía de activación de los receptores TLR-4, precedida por la recepción de los LPS y de la proteína de unión al LPS (LBP) mediante el antígeno CD14, y la asociación de los LPS con la proteína MD-2. Los receptores TLR-4, el antígeno CD-4 y la MD-2 no han sido detectados en los genomas de la gran mayoría de especies de peces teleósteos (Iliev *et al.*, 2005; Sepulcre *et al.*, 2015). Además, en otros experimentos, se ha comprobado como los LPS son incapaces de producir una respuesta inmune a no ser

que se inoculen en concentraciones muy elevadas, tanto en especies con la ausencia de receptores TLR-4 como la dorada (*Sparus aurata*) o el fugu (*Takifugu rubripes*), como en el pez cebra (*Danio rerio*), en el que se ha demostrado la presencia de los receptores TLR-4 (Sepulcre *et al.*, 2015).

En otros trabajos realizados sí se produjo una estimulación del sistema inmune tras la exposición a LPS en peces sin presencia de receptores TLR-4, como en dorada por Bravo *et al.* (2013). Sin embargo, esto probablemente se debe a subproductos bacterianos de la extracción de LPS mediante el método de agua-fenol, como pueden ser las islas CpG bacterianas, que son reconocidos por el sistema inmune y producen una estimulación de la respuesta antiviral mediante los IFN tipo I y otras vías alternativas a la activación mediante TLR-4, como por los receptores TLR8 por medio del IRF-5 e IRF-7 (Kawai *et al.*, 2004; Iliev *et al.*, 2005).

Por estos factores, es probable que el reconocimiento de forma efectiva de los LPS en peces teleósteos no sea posible, ya que no parecen mostrar una respuesta inmune, impidiendo que se produzca el shock endotóxico y la activación de la respuesta antiviral (Iliev *et al.*, 2005; Sepulcre *et al.*, 2015).

5.1.2. Citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias

En el presente trabajo, se observó una estimulación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α tras la inducción con los inmunoestimulantes empleados.

En el presente estudio, inicialmente se observó una mayor actividad a las 12 h en el grupo poly (I:C) después de la inoculación. Se produjo una fluctuación en los valores de la citoquina IL-1 β , descendiendo a las 24 h y volviendo a ascender durante las 48 y 72 h. En otros estudios, como el realizado por Hu *et al.* (2018), también se produjo la actividad oscilatoria de la citoquina observada en este experimento, tras inducir la expresión de la IL-1 β mediante la estimulación con poly (I:C).

El grupo LPS no mostró estimulación de la respuesta inflamatoria durante las primeras horas, posiblemente debido a la incapacidad de producirse la estimulación del sistema inmune dada la ausencia de receptores TLR-4 en lubina. A partir de las 24 h, se produjo

un aumento de los valores de IL-1 β en el grupo control, que se mantuvieron elevados hasta las 72 h. También en el tiempo de 72 h, el grupo LPS se mostraba con niveles elevados.

La citoquina TNF- α se comportó de forma muy semejante a IL-1 β en el presente experimento, con un patrón oscilatorio similar. He *et al.*, (2020) observaron el mismo comportamiento entre las dos citoquinas tras una prueba de estimulación del sistema inmune en carpa cruciana (*Carassius carassius*).

En este experimento se utilizó la IL-10 como indicadora de la respuesta antiinflamatoria, ya que inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias y disminuye la presentación de antígenos. Pese a ello, también es capaz de activar algunas funciones del sistema inmune, como la producción de anticuerpos, maduración de células B o la activación de células T (Uribe *et al.* 2011).

A las 12 h después de la inoculación, se apreció un aumento de los valores de IL-10 en el grupo poly (I:C), tal y como ocurrió con las citoquinas proinflamatorias analizadas. También se observó la misma pauta, disminuyendo sus valores a las 24 h para después producirse un aumento a las 48 h y 72 h. En grupo tratado con poly (I:C), durante los tiempos de muestreo 7 y 15 d, la citoquina presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a LPS, permaneciendo más elevada hasta el final del experimento. La estimulación de la IL-10 en peces estimulados con poly (I:C) ya se ha observado en otros estudios (Seppola *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

En el grupo control negativo, se observó un aumento de los valores de IL-10 a partir de las 48 h, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo LPS, en la que estaba menos expresada, mientras que a las 72 h, todos los tratamientos mostraron una alta expresión de IL-10, posiblemente como respuesta a la infección natural ocasionada por *V. harveyi* (Biswas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, a los 7 d tras la inoculación, el grupo LPS permanecía menos elevado que los grupos control y poly (I:C), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), posiblemente, debido a un diferente grado de afección de la enfermedad en cada tratamiento.

Pese a que la actividad oscilante de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias mencionadas anteriormente han sido registradas en otros trabajos, en la presente experiencia se observaron elevaciones de estas citoquinas en el grupo control, no estimulado. Las elevaciones observadas se podrían deber a que, especialmente tanto IL-1 β como TNF- α son citoquinas envueltas en la inducción de la respuesta inflamatoria producida por bacterias gramnegativas, como el *V. harveyi* que produjo la infección natural durante el experimento (Parrillo, 1993; Marsh y Wewers, 1996).

5.2. Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune de células E-11 ante LPS y poly (I:C)

5.2.1. Respuesta antiviral

El IRF-3 tiene un papel importante durante las infecciones víricas, ya que modula la activación de múltiples vías inductoras del IFN.

La expresión del gen IRF-3 se mantuvo relativamente constante en todos los tratamientos durante el experimento, a excepción del grupo poly (I:C), que mostró una expresión elevada del gen durante el tiempo 72 h. Este comportamiento por parte del IRF-3 ya había sido observado anteriormente por Valero *et al.* (2015) tras una infección con *Nodavirus*. Por ello, el tratamiento poly (I:C) y el tiempo 72 h, fueron escogidos como el inmunoestimulante y tiempo más efectivos, y utilizados para la realización de la prueba experimental de infección con *Nodavirus*.

5.2.2. Citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias

Respecto a la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-10, el tratamiento que mostró una mayor activación de la respuesta inmune fue el grupo estimulado con LPS, en el que se pudo observar un aumento de los valores de las citoquinas, con un comportamiento oscilatorio como ocurrió en el experimento previo. En otros estudios *in vitro* con células de peces, se ha observado también como los LPS son capaces de activar la producción de citoquinas proinflamatorias en concentraciones muy elevadas ($\mu\text{g/ml}$) en comparación con las dosis requeridas para producir una activación similar en mamíferos

(ng/ml). Además, la ausencia de los receptores TLR-4 en la gran mayoría de peces, así como las moléculas necesarias para su activación (MD-2 y CD14), podría indicar que los LPS son reconocidos por una vía diferente que en mamíferos, alternativa a los TLR-4 (MacKenzie *et al.*, 2003; Sepulcre *et al.*, 2007).

5.3. Inmunosusceptibilidad de células E-11 inducidas con LPS y poly (I:C) e infectadas con *Nodavirus*

El *Nodavirus* afecta a especies de peces por todo el mundo, y posee cuatro genotipos distintos, cada uno adaptado a unas condiciones ambientales distintas. Sin embargo, muy poco se conoce acerca de cómo afectan distintos genotipos a una misma especie (Mori *et al.*, 2003; Buonocore *et al.*, 2019; Bandín y Souto, 2020). En el experimento de Chérif *et al.* (2021) se realizó una estimulación del sistema inmune de las células E-11, no obstante, se sabe poco acerca de la efectividad de los diversos inmunoestimulantes para dotar a las células de una mayor resistencia contra infecciones de cada una de las cepas del *Nodavirus*. Además, es conveniente comprobar la eficacia de los estudios *in vitro* para sustituir en la medida de lo posible a los ensayos *in vivo*, puesto que evitar trabajar con animales reduce el costo, evita gran cantidad de posibles errores y plantea menos cuestiones bioéticas.

Los resultados obtenidos en el experimento, sugieren que las cepas RGNNV y SJNNV tienen una mayor capacidad para replicarse en las células E-11 que las cepas TPNNV y BFNNV, tal y como se observa en la mayor capacidad de replicación del virus observando el título viral, tal y como observaron Iwamoto *et al.* (2000).

Como se observa en los resultados, existe una tendencia de los grupos no inmunoestimulados con poly (I:C) a alcanzar un mayor título viral en su punto máximo. Aunque en el experimento no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos estimulados y sin estimular, poly (I:C) parece un inmunoestimulante adecuado para establecer un estado antiviral en las células E-11.

En estudios *in vivo* con peces, se ha observado un comportamiento similar del *Nodavirus* en el hospedador al inocular con poly (I:C), reduciéndose la capacidad infectiva del virus por el efecto del inmunoestimulante en comparación con los grupos

control sin estimular (Wu y Chi, 2007; Chen *et al.*, 2008; Nishizawa *et al.*, 2009; Valero *et al.*, 2015). Los resultados *in vivo* de los experimentos de infecciones de *Nodavirus* parecen asemejarse a los resultados obtenidos en experimentos *in vitro*, con una respuesta similar, inhibiendo la replicación del *Nodavirus* tras la inmunostimulación con poly (I:C), por lo que se requieren realizar más experimentos *in vitro* en el futuro, con objetivo de sustituir a los experimentos *in vivo* siempre que sea posible, dadas las desventajas que tienen frente a los experimentos *in vitro*.

Sin embargo, sería conveniente realizar el presente experimento de nuevo con un mayor tamaño muestral, con objetivo de obtener datos más consistentes y posibles diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

6. Conclusiones

- En lubina, poly (I:C) es un inmunostimulante adecuado para inducir la respuesta inmune antiviral de forma temprana, teniendo su punto de estimulación máxima a las 12 h tras la inoculación. En el presente experimento los LPS no estimularon la respuesta antiviral en lubina.
- En células E-11, poly (I:C) estimula la producción del IRF-3 relacionado con la respuesta antiviral, teniendo una respuesta pronunciada a las 72 h tras la adición del inmunostimulante. Los LPS bacterianos estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, pero no fueron capaces de estimular la respuesta antiviral en el presente experimento.
- Las células E-11 inmunostimuladas con poly (I:C) e infectadas con *Nodavirus* 72 h tras la inoculación del estimulante, muestran una tendencia no estadísticamente significativa a tener un menor título viral que las células no inmunostimuladas.
- Los estudios con células sin utilizar animales vivos se muestran prometedores como métodos alternativos acordes con las actuales tendencias bioéticas, además de minimizar posibles errores o factores externos al experimento y reducir el costo de los experimentos.

7. Bibliografía

- Abdel-Latif, H. M., Dawood, M. A., Menanteau-Ledouble, S., & El-Matbouli, M. (2020). The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*, 43(6), 651-664. <https://doi.org/10.1111/jfd.13164>
- Acosta, F., Ellis, A. E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J., & Real, F. (2006). 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 & Shellfish Immunology*, 20(5), 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.08.011>
- Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., & Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions: a review. *Aquaculture International*, 28(3), 1017–1041. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00509-0>
- Ángeles Esteban, M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *International Scholarly Research Notices*, 2012. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/853470>
- Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR), (2020): Aquaculture in Spain. Consultada el 21 de febrero de 2022 en www.apromar.es
- Azad, M. A. K., Islam, S. S., Sithi, I. N., Ghosh, A. K., Banu, G. R., Bir, J., & Huq, K. A. (2019). Effect of probiotics on immune competence of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Research*, 50(2), 644–657. <https://doi.org/10.1111/are.13942>
- Bandín, I., & Souto, S. (2020). *Betanodavirus* and VER Disease: A 30-year Research Review. *Pathogens*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020106>.
- Barange, M., Bahri, T., Beveridge, M. C., Cochrane, K. L., Funge-Smith, S., & Poulain, F. (2018). Impacts of climate change on fisheries and aquaculture. *United Nations' Food and Agriculture Organization*.

- Barman, D., Nen, P., Mandal, S. C., & Kumar, V. (2013). Immunostimulants for aquaculture health management. *J Marine Sci Res Dev*, 3(3), 1–11. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9910.1000134>
- Biller, J. D., & Takahashi, L. S. (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 3403-3414. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
- Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Yoshida, T., Kono, T., & Sakai, M. (2013). Elevated cytokine responses to *Vibrio harveyi* infection in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) treated with *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(3), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.004>
- Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology*, 1–30. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00251-020-01196-0>
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>
- Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annual Review of Immunology*, 28, 157–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101305>
- Bowden, T. J., Cook, P., & Rombout, J. H. W. M. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 413-427. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.02.003>
- Boyd, C. E., D'Abramo, L. R., Glencross, B. D., Huyben, D. C., Juarez, L. M., Lockwood, G. S., ... & Valenti, W. C. (2020). Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(3), 578-633. <https://doi.org/10.1111/jwas.12714>

- Bravo, J., Real, F., Padilla, D., Oliveira, J. G., Grasso, V., Román, L., & Acosta, F. (2013). Effect of lipopolysaccharides from *Vibrio alginolyticus* on the Mx gene expression and virus recovery from gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) experimentally infected with *Nodavirus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *34*(1), 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.012>
- Buonocore, F., Nuñez-Ortiz, N., Picchiatti, S., Randelli, E., Stocchi, V., Guerra, L., Toffan, A., Pascoli, F., Fausto, A. M., Mazzini, M., & Scapigliati, G. (2019). Vaccination and immune responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) against *Betanodavirus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *85*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.039>
- Carballo, C., Garcia-Rosado, E., Borrego, J. J., & Alonso, M. C. (2016). SJNNV down-regulates RGNNV replication in European sea bass by the induction of the type I interferon system. *Veterinary Research*, *47*(1), 1–11.
- Chen, J., Sun, R., Pan, C., Sun, Y., Mai, B., & Li, Q. X. (2020). Antibiotics and food safety in aquaculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(43), 11908–11919. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03996>
- Chen, Y.-M., Su, Y.-L., Shie, P.-S., Huang, S.-L., Yang, H.-L., & Chen, T.-Y. (2008). Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Developmental & Comparative Immunology*, *32*(7), 825–836. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.12.003>
- Cheng, A.-C., Cheng, S.-A., Chen, Y.-Y., & Chen, J.-C. (2009). Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *26*(5), 768–772. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.011>
- Chérif, N., Amdouni, F., Bessadok, B., Tagorti, G., & Sadok, S. (2021). Chitosan Treatment of E-11 Cells Modulates Transcription of Nonspecific Immune Genes and Reduces *Nodavirus* Capsid Protein Gene Expression. *Animals*, *11*(11), 3097. <https://doi.org/10.3390/ani11113097>
- Chinchar, V. G., Bryan, L., Silphadaung, U., Noga, E., Wade, D., & Rollins-Smith, L. (2004). Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by

- amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology*, 323(2), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.02.029>
- Ciji, A., & Akhtar, M. S. (2021). Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2190-2247. <https://doi.org/10.1111/raq.12565>
 - Costa, J. Z., & Thompson, K. D. (2016). Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 35–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.033>
 - Dara, M., Giulianini, P. G., Manfrin, C., Parisi, M. G., Parrinello, D., La Corte, C., Vasta, G. R., & Cammarata, M. (2021). F-type lectin from serum of the Antarctic teleost fish *Trematomus bernacchii* (Boulenger, 1902): Purification, structural characterization, and bacterial agglutinating activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 256, 110633. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110633>
 - Das, B. K., Roy, P., Rout, A. K., Sahoo, D. R., Panda, S. P., Pattanaik, S., Dehury, B., Behera, B. K., & Mishra, S. S. (2019). Molecular cloning, GTP recognition mechanism and tissue-specific expression profiling of myxovirus resistance (Mx) protein in *Labeo rohita* (Hamilton) after Poly I:C induction. *Scientific Reports*, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40323-0>
 - Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
 - Dehaghani, P. G., Baboli, M. J., Moghadam, A. T., Ziaei-Nejad, S., & Pourfarhadi, M. (2015). Effect of synbiotic dietary supplementation on survival, growth performance, and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Czech Journal of Animal Science*, 60(5), 224–232. <http://dx.doi.org/10.17221/8172-CJAS>
 - Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M. da S. C., Junior, M. R. M., Moreno, Y. M. F., & Pastore, G. M. (2011). The putative effects of prebiotics as

- immunomodulatory agents. *Food Research International*, 44(10), 3167–3173. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.032>
- Dempsey, P. W., Allison, M. E. D., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., & Fearon, D. T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 271(5247), 348–350. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.348>
 - Díaz-Rosales, P., Muñoz-Atienza, E., & Tafalla, C. (2019). Role of teleost B cells in viral immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.039>
 - Du, X., Li, Y., Li, D., Lian, F., Yang, S., Wu, J., Liu, H., Bu, G., Meng, F., Cao, X., Zeng, X., Zhang, H., & Chen, Z. (2017). Transcriptome profiling of spleen provides insights into the antiviral mechanism in *Schizothorax prenanti* after poly (I: C) challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.004>
 - Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 827-839. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00038-6)
 - El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36–52. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2021.07.007>
 - Evans, D. L., & Jaso-Friedmann, L. (1992). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 109–121. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90059-7)
 - Falco, A., Miest, J. J., Pionnier, N., Pietretti, D., Forlenza, M., Wiegertjes, G. F., & Hoole, D. (2014). β -Glucan-supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 494–502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.005>
 - FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.

- Farooqi, F. S., & Qureshi, W. U. H. (2018). Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1441-1447.
- Fillatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, J. O., & Boudinot, P. (2013). The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Frontiers in Immunology*, 4, 28. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00028>
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Köllner, B., Ototake, M., & Nakanishi, T. (2006). Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 209–226. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.013>
- FishStatJ, F. A. O. (2019). a Tool for Fishery Statistics Analysis. *FAO Fisheries and Aquaculture Department, FIPS–Statistics and information: Rome, Italy.*
- Fletcher, J., & Huehns, E. (1968). Function of transferrin. *Nature*, 218(5148), 1211–1214. <https://doi.org/10.1038/2181211a0>
- Froehlich, H. E., Runge, C. A., Gentry, R. R., Gaines, S. D., & Halpern, B. S. (2018). Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 5295-5300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801692115>
- Ganz, T. (2009). Iron in innate immunity: starve the invaders. *Current Opinion in Immunology*, 21(1), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.011>
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology*, 41(11), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.011>
- Geven, E. J., & Klaren, P. H. (2017). The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, 66, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.025>
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- He, M., Liu, G., Liu, Y., Yang, K., Qi, X., Huang, A., Liu, T., Wang, G., & Wang, E. (2020). Effects of geniposide as immunostimulant on the innate immune response and disease resistance in crucian carp. *Aquaculture*, 529, 735713. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735713>

- Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C. J., & Wang, T. (2013). Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(12), 5959–5972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301584>
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y.-Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 2429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>
- Hu, B., Chen, B., Mao, M., Chen, M., Liu, X., Cui, Q., Liu, Y., & Jiang, C. (2018). Molecular characterization and expression analysis of the interleukin 1b gene in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Developmental & Comparative Immunology*, *88*, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.025>
- Iglesias, A. V. (2020). Importancia de la pesca y la acuicultura en España. *Mediterráneo económico*, (33), 309-317.
- Iliiev, D. B., Roach, J. C., Mackenzie, S., Planas, J. V., & Goetz, F. W. (2005). Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *FEBS Letters*, *579*(29), 6519–6528. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.061>
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, *31*(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
- Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review. *Journal of Fish Biology*, *16*(1), 23-60. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.x>
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., & Furusawa, I. (2000). Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, *43*(2), 81–89. <https://doi.org/10.3354/dao043081>
- Janda, J. M., Newton, A. E., & Bopp, C. A. (2015). Vibriosis. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 273–288. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.007>

- Jeney, G. (Ed.). (2017). *Fish diseases: prevention and control strategies*. Academic press.
- Jiang, C., Yang, X., Xu, H., Mao, M., Chen, B., Yang, Z., Guan, Y., & Wang, H. (2021). Molecular characterization and expression profiles of two interleukin genes IL-8 and IL-10 in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Aquaculture Reports*, 21, 100788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100788>
- Johnson, E. E., & Wessling-Resnick, M. (2012). Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes and Infection*, 14(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.001>
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., & Uematsu, S. (2004). Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology*, 5(10), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/ni1118>
- Kibenge, F. S. (Ed.). (2016). *Aquaculture virology*. Academic Press.
- Kim, S.-H., Lee, K.-Y., & Jang, Y.-S. (2012). Mucosal immune system and M cell-targeting strategies for oral mucosal vaccination. *Immune Network*, 12(5), 165–175. <https://doi.org/10.4110%2Fin.2012.12.5.165>
- Kishore, U., & Reid, K. B. M. (2000). C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49(1–2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)80301-x](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)80301-x)
- Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., & Anderson, J. L. (2015). Fish to 2030: the role and opportunity for aquaculture. *Aquaculture economics & management*, 19(3), 282-300. <http://dx.doi.org/10.1080/13657305.2015.994240>
- Kordon, A. O., Karsi, A., & Pinchuk, L. (2018). Innate Immune Responses in Fish: Antigen Presenting Cells and Professional Phagocytes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(9), 1123–1138. http://dx.doi.org/10.4194/1303-2712-v18_9_11
- Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., & Pal, A. K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.).

Aquaculture Research, 37(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01551.x>

- Land, W. G. (2015). The role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human diseases: part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 15(2), e157.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Sun, Y., Huang, P. L., Kung, H., Blithe, D. L., & Chen, H.-C. (1999). Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2678–2681. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2678>
- Li, S., Hou, Y., Liu, K., Zhu, H., Qiao, M., Sun, X., & Li, G. (2022). Metformin Protects Against Inflammation, Oxidative Stress to Delay Poly I:C-Induced Aging-Like Phenomena in the Gut of an Annual Fish. *The Journals of Gerontology: Series A*, 77(2), 276–282. <https://doi.org/10.1093/gerona/glab298>
- Li, Y., Li, Y., Cao, X., Jin, X., & Jin, T. (2017). Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038%2Fcmi.2016.50>
- Lichtenstein, A. (1991). Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(1), 93–100. <https://doi.org/10.1172/jci115310>
- Lulijwa, R., Alfaro, A. C., Merien, F., Burdass, M., Meyer, J., Venter, L., & Young, T. (2020). Metabolic and immune responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) smolts to a short-term Poly (I:C) challenge. *Journal of Fish Biology*, 96(3), 731–746. <https://doi.org/10.1111/jfb.14266>
- MacKenzie, S., Planas, J. V., & Goetz, F. W. (2003). LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor- α mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(5), 393–400. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(02)00135-0)

- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Magnadóttir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 429-439. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.010>
- Marsh, C. B., & Wewers, M. D. (1996). THE PATHOGENESIS OF SEPSIS: Factors That Modulate the Response to Gram-Negative Bacterial Infection. *Clinics in Chest Medicine*, 17(2), 183–197. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(05\)70308-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0272-5231(05)70308-7)
- Mathew, J. A., Guo, Y. X., Goh, K. P., Chan, J., Verburg-van Kemenade, B. M. L., & Kwang, J. (2002). Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(2), 85–95. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0383>
- Mokhtar, D. M., & Abdelhafez, E. A. (2021). An overview of the structural and functional aspects of immune cells in teleosts. *Histology and histopathology*, 36(4), 399–414. <https://doi.org/10.14670/hh-18-302>
- Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S., Nakai, T. (2003). Serological relationships among genotypic variants of *Betanodavirus*. *Dis. Aquat. Organ.* 57, 19–26. <https://doi.org/10.3354/dao057019>
- Munday, B. L., Kwang, J., & Moody, N. (2002). *Betanodavirus* infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25(3), 127–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00350.x>
- Nishizawa, T., Takami, I., Kokawa, Y., & Yoshimizu, M. (2009). Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly (I: C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish *Nodavirus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(2), 115–122. <https://doi.org/10.3354/dao02001>
- Nor-Amalina, Z., Dzarifah, M. Z., Mohd-Termizi, Y., Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio* species isolates from *Epinephelus* species in Selangor, Malaysia. *Proceedings of the International Conference on Advances in Fish Health*, 4–6. <http://dx.doi.org/10.21608/bvmj.2018.53527>

- O'Sullivan, T. E., Sun, J. C., & Lanier, L. L. (2015). Natural killer cell memory. *Immunity*, 43(4), 634–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.013>
- ONU. *The Sustainable Development Goals Report*. (Organización de las Naciones Unidas, New York, 2018).
- Oren, Z., & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 47(6), 451–463. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0282\(1998\)47:6%3C451::aid-bip4%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0282(1998)47:6%3C451::aid-bip4%3E3.0.co;2-f)
- Palaksha, K. J., Shin, G. W., Kim, Y. R., & Jung, T. S. (2008). Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 24(4), 479-488. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.005>
- Panda, S. P., Soren, D., Nayak, K. K., Roy, P., & Das, B. K. (2021). Poly I: C stimulates, Mx transcript and promotes an antiviral state in blood of *Labeo catla* (Hamilton 1822). *Indian Journal of Fisheries*, 68(3). <http://dx.doi.org/10.21077/ijf.2021.68.3.112825-12>
- Parrillo, J. E. (1993). Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New England Journal of Medicine*, 328(20), 1471–1477. <https://doi.org/10.1056/nejm199305203282008>
- Pearse, G. (2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic pathology*, 34(5), 504-514. <https://doi.org/10.1080/01926230600865549>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends in microbiology*, 26(11), 896-903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Press, C. M., Dannevig, B. H., & Landsverk, T. (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 4(2), 79-93. <https://doi.org/10.1006/fsim.1994.1007>

- Rabinovich, G. A., & Toscano, M. A. (2009). Turning 'sweet' on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 338–352. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
- Ragap, H. M., Khalil, R. H., & Mutawie, H. H. (2012). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(2), 26.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Robinson, T. P., & Pozzi, F. (2011). Mapping supply and demand for animal-source foods to 2030. *Animal production and health working paper*, 2, 1-154.
- Sahoo, B. R. (2020). Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR). *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1602-1617. <https://doi.org/10.1016%2Fj.ijbiomac.2020.07.293>
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525–539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Salinas, I., Lockhart, K., Bowden, T. J., Collet, B., Secombes, C. J., & Ellis, A. E. (2004). An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(2), 159–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.01.003>
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1346–1365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3), 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Secombes, C. J., Bird, S., & Zou, J. (2005). Adaptive immunity in teleosts: cellular immunity. *Developments in Biologicals*, 121, 25–32.
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K. S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H., & Vaughan, L. (2012). Health of farmed fish:

- its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 85–105. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9517-9>
- Seong, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
 - Seppola, M., Larsen, A. N., Steiro, K., Robertsen, B., & Jensen, I. (2008). Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Molecular Immunology*, 45(4), 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.003>
 - Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., & Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *The Journal of Immunology*, 182(4), 1836–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>
 - Sepulcre, M. P., López-Castejón, G., Meseguer, J., & Mulero, V. (2007). The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*, 44(8), 2009–2016. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.022>
 - Sha, Z.-X., Wang, Q.-L., Liu, Y., & Chen, S.-L. (2012). Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5), 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.010>
 - Shen, L., Stuge, T. B., Zhou, H., Khayat, M., Barker, K. S., Quiniou, S. M., ... & Miller, N. W. (2002). Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 141–149. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00056-8](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00056-8)
 - Singh, A., & Benjakul, S. (2018). Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 496–509. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12337>

- Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., & Han, F. (2021). Lysozymes in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(50), 15039–15051. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06676>
- Stafford, J. L., & Belosevic, M. (2003). Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(6–7), 539–554. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(02\)00138-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(02)00138-6)
- Sun, B., Skjæveland, I., Svingerud, T., Zou, J., Jørgensen, J., & Robertsen, B. (2011). Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of Virology*, 85(17), 9188–9198. <https://doi.org/10.1128/jvi.00319-11>
- Takano, T., Kondo, H., Hirono, I., Endo, M., Saito-Taki, T., & Aoki, T. (2011). Toll-like receptors in teleosts. *Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Malaysia*, 197–208.
- Tasumi, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Suetake, H., Suzuki, Y., & Aida, K. (2002). Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27305–27311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202648200>
- Thanasaksiri, K., Hirono, I., & Kondo, H. (2015). Temperature-dependent regulation of gene expression in poly (I: C)-treated Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.036>
- Toni, M., Angiulli, E., Malavasi, S., Alleva, E., & Cioni, C. (2017). Variation in environmental parameters in research and aquaculture: effects on behaviour, physiology and cell biology of teleost fish. *J. Aquac. Mar. Biol*, 5(6), 001-37. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.05.00137>
- Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R., & Moran, G. J. V. M. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486. <http://dx.doi.org/10.17221/3294-VETMED>

- Valero, Y., Cuesta, A., Cammarata, M., Esteban, M. A., & Chaves-Pozo, E. (2018). Immune-endocrine interactions in the fish gonad during infection: an open door to vertical transmission. *Fishes*, 3(2), 24. <https://doi.org/10.3390/fishes3020024>
- Valero, Y., García-Alcázar, A., Esteban, M. Á., Cuesta, A., & Chaves-Pozo, E. (2015). Antimicrobial response is increased in the testis of European sea bass, but not in gilthead seabream, upon *Nodavirus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 203–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.015>
- Valero, Y., Morcillo, P., Meseguer, J., Buonocore, F., Esteban, M. A., Chaves-Pozo, E., & Cuesta, A. (2015). Characterization of the IFN pathway in the teleost fish gonad against vertically transmitted viral nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 96(8), 2176–2187. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000164>
- Vasta, G. R., & Ahmed, H. (2008). Animal lectins: a functional view. *Boca Raton: CRC*.
- Vasta, G. R., Nita-Lazar, M., Giomarelli, B., Ahmed, H., Du, S., Cammarata, M., Parrinello, N., Bianchet, M. A., & Amzel, L. M. (2011). Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1388–1399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.011>
- Wang, J., Zhang, N., Wang, Z., Yanan, W., Zhang, L., & Xia, C. (2018). Structural insights into the evolution feature of a bony fish CD8 α homodimer. *Molecular Immunology*, 97, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.023>
- Wang, Y.-B., Li, J.-R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1–4), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.002>
- Wangkahart, E., Secombes, C. J., & Wang, T. (2019). Studies on the use of flagellin as an immunostimulant and vaccine adjuvant in fish aquaculture. *Frontiers in Immunology*, 9, 3054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03054>

- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, 23(6), 1127-1151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005>
- Wu, L., Li, L., Gao, A., Ye, J., & Li, J. (2022). Antimicrobial roles of phagocytosis in teleost fish: Phagocytic B cells vs professional phagocytes. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.12.008>
- Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2007). Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.008>
- Yamaguchi, T., & Dijkstra, J. M. (2019). Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes and Disease Resistance in Fish. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040378>
- Ye, X., Zhang, L., Tian, Y., Tan, A., Bai, J., & Li, S. (2010). Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(5), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.009>
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., & Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>
- Zhang, Q. Q., Ying, G. G., Pan, C. G., Liu, Y. S., & Zhao, J. L. (2015). Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental science & technology*, 49(11), 6772-6782.
- Zhang, X.-H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2(3), 231–245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class

specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11(9), 827–835.
<https://doi.org/10.1038/ni.1913>

- Zhou, M., Yu, S., Hong, B., Li, J., Han, H., & Qie, G. (2021). Antibiotics control in aquaculture requires more than antibiotic-free feeds: A tilapia farming case. *Environmental Pollution*, 268, 115854.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115854>
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>