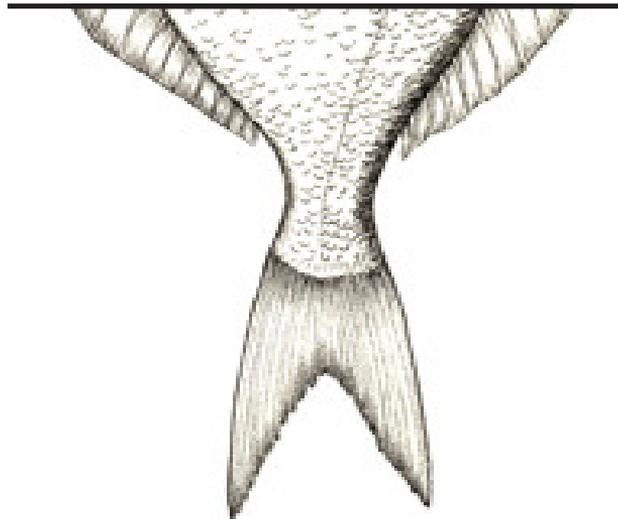


**INTERACCIÓN
DE *PHOTOBACTERIUM*
DAMSELAE SUBSP.
PISCICIDA CON
CÉLULAS SAF-1**



TESIS DOCTORAL
JUDIT VEGA ALONSO
ARUCAS, 2015



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal
y Seguridad Alimentaria



ANEXO I

D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 13 de noviembre de 2015 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: “**INTERACCIÓN DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* CON CÉLULAS SAF-1**”, presentada por la doctorando D. **Judit Vega Alonso**, dirigida por el Catedrático D. **Fernando Real Valcárcel** y por el doctor D. **Daniel Padilla Castillo**.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a dieciséis de noviembre de dos mil quince

ANEXO II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

PROGRAMA DE DOCTORADO

SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Título de la Tesis

**INTERACCIÓN DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE*
SUBSP. *PISCICIDA* CON CÉLULAS SAF-1**

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Judit Vega Alonso.**

Dirigida por el Catedrático **D. Fernando Real Valcárcel** y el Doctor **D. Daniel
Padilla Castillo.**

El Director

El Director

Fernando Real Valcárcel

Daniel Padilla Castillo

La Doctoranda

Judit Vega Alonso

Arucas, a 12 de Noviembre de 2015

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

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada: “**INTERACCIÓN DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* CON CÉLULAS SAF-1**” realizada por Dña. Judit Vega Alonso, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, 12 de Noviembre de 2015.

Fdo. Fernando Real Valcárcel

D. DANIEL PADILLA CASTILLO, PROFESOR ASOCIADO LABORAL DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada: “**INTERACCIÓN DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* CON CÉLULAS SAF-1**” realizada por Dña. Judit Vega Alonso, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, 12 de Noviembre de 2015.

Fdo. Daniel Padilla Castillo

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE
SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

**INTERACCIÓN DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE*
SUBSP. *PISCICIDA* CON CÉLULAS SAF-1**

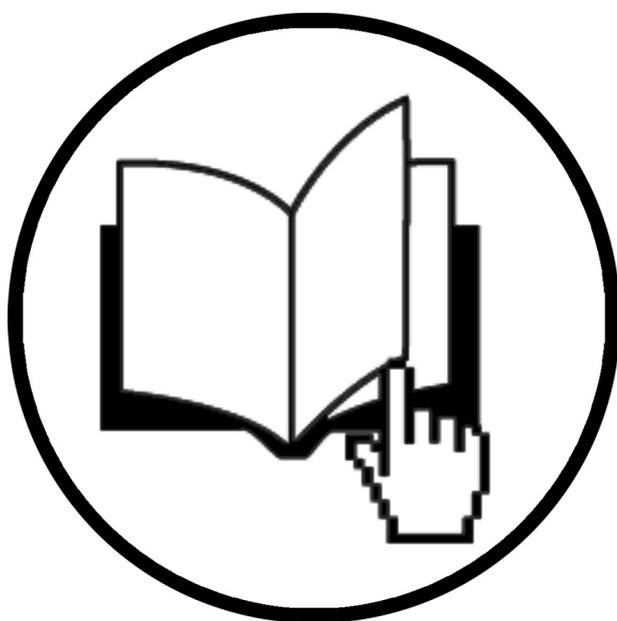
TESIS DOCTORAL
JUDIT VEGA ALONSO
ARUCAS, 2015

“También podía no hacer nada. Siempre se puede no hacer nada, aprender a vivir sin preguntas, sin respuestas, sin furia y sin piedad. Siempre se puede no vivir y hacer como que se vive...”

Almudena Grandes

El trabajo realizado ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Docente e Investigador (FPI) de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias.

A mi familia



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS	7
III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
III.1.- Las enfermedades infecciosas en acuicultura	13
III.2.- Estudio de la pasterelosis	17
III.2.1.- Importancia de la enfermedad en acuicultura continental y marina	17
III.2.2.- Etiología	19
III.2.3.- Epidemiología	22
III.2.4.- Patogenia	24
III.2.5.- Clínica y lesiones	28
III.2.6.- Diagnóstico	31
III.2.7.- Control de la enfermedad	35
III.2.7.1.- Quimioterapia	35
III.2.7.2.- Inmunoprofilaxis	37
III.3.- Cultivos celulares	39
III.3.1.- Cultivos celulares en peces	45
III.3.2.- Línea celular SAF-1	47
III.3.3.- Aplicación de métodos de cultivo celular en la sanidad animal en acuicultura	49
III.3.4.- Métodos de cultivo celular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas	49
III.3.5.- Estudios de adherencia e invasión celular	52
III.4.- Aplicaciones de la inmunofluorescencia al estudio de la adherencia, invasión y tráfico intracelular	56

III.5.-Sistema inmunológico de peces	61
III.5.1.- Inmunidad celular no específica	61
III.5.2.- Citoquinas	63
III.5.2.1.- Interleuquinas	64
III.5.2.2.- Factor de necrosis tumoral	64
III.5.2.3.- Interferón	65
III.5.2.4.- Quimioquinas	65
III.5.3.- Proteína Mx	66
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	67
IV.1.- Origen y conservación de las cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subespecies <i>piscicida</i> utilizadas	69
IV.2.- Línea celular	70
IV.3.- Ensayos de invasión bacteriana	71
IV.3.1.- Evaluación del efecto del tiempo de infección en la internalización	71
IV.3.2.- Determinación del efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión	72
IV.3.3.- Valoración de la supervivencia intracelular	73
IV.3.4.- Implicación del citoesqueleto celular en la entrada de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	74
IV.3.5.- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana	75
IV.3.6.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización	75
IV.3.7.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización bacteriana	76

IV.4.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia	77
IV.4.1.- Análisis de la adherencia e internalización intracelular por inmunofluorescencia	77
IV.4.2.- Análisis del tráfico intracelular por inmunofluorescencia	81
IV.5.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	83
IV.5.1.- Determinación de la multiplicidad de la infección (M.O.I.)	83
IV.5.2.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> cultivadas con y sin glucosa	83
IV.5.3.- Extracción de ARN	84
IV.5.4.- Transcripción inversa	85
IV.5.5.- Expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)	85
IV.6.- Análisis estadístico	88
V.- RESULTADOS	89
V.1.- Ensayos de invasión bacteriana	91
V.1.1.- Evaluación del efecto del tiempo de infección en la internalización	91
V.1.2.- Determinación del efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión	92
V.1.3.- Valoración de la supervivencia intracelular	93
V.1.4.- Implicación del citoesqueleto celular en la entrada de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	94

V.1.5.- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana	94
V.1.6.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización	95
V.1.7.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización bacteriana	96
V.2.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia	97
V.2.1.- Análisis de la adherencia e internalización celular por inmunofluorescencia	97
V.2.2.- Análisis del tráfico intracelular por inmunofluorescencia	101
V.3.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	102
V.3.1.- Determinación de la multiplicidad de la infección (M.O.I.)	102
V.3.2.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> cultivadas con y sin glucosa	104
V.3.2.1.- Expresión del gen Mx	104
V.3.2.2.- Expresión del gen IL1-β	106
V.3.2.3.- Expresión del gen IL1-r2	108
V.3.2.4.- Expresión del gen COX-2	110
V.3.2.5.- Expresión del gen TNF-α	112

VI.- DISCUSIÓN	115
VI.1.- Ensayos de invasión bacteriana	117
VI.2.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia	121
VI.3.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	123
VII.- CONCLUSIONES	129
VIII.- RESUMEN	133
IX.- SUMMARY	137
X.- BIBLIOGRAFÍA	141
XI.- AGRADECIMIENTOS	177

ÍNDICE TABLAS

Tabla I.- Características bioquímicas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	21
Tabla II.- Aislamientos de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	23
Tabla III. Proteínas descritas en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	27
Tabla IV.- Vacunas frente a <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	38
Tabla V.- Líneas celulares de peces para ensayos oficiales de la OIE	45
Tabla VI.- Cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> utilizadas	69
Tabla VII. Secuencias de cebadores empleados para la qPCR	86
Tabla VIII. Protocolo de ciclos de qPCR empleado para la expresión de los genes estudiados	87

ÍNDICE FIGURAS

Figura I.- Perfil bioquímico más habitual de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> mediante el sistema API 20E	32
Figura II.- Fórmula de Livak	88
Figura III.- Efecto del tiempo de infección en la invasión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1	91
Figura IV.-Efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1	92
Figura V.- Efecto del tiempo en la supervivencia intracelular de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1	93
Figura VI.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1	95
Figura VII.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1	96
Figura VIII.- Internalización y adherencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en SAF-1 por inmunofluorescencia	98
Figura IX.- Replicación intracelular de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en SAF-1	99
Figura X.- Bacterias intracelulares tras 7 días de infección de SAF-1 con la cepa 94/99 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	100
Figura XI.- Microfilamentos de actina en SAF-1 tras la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	101

Figura XII.- Expresión de citoquinas y gen Mx 4 horas después de la infección de SAF-1 con la cepa C2 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	103
Figura XIII.- Expresión de citoquinas y gen Mx 4 horas después de la infección de SAF-1 con la cepa PP3 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	103
Figura XIVa.- Expresión génica de Mx en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	105
Figura XIVb.- Expresión génica de Mx en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> crecidas en un medio con glucosa	105
Figura XVa.- Expresión génica de IL-1 β en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	107
Figura XVb.- Expresión génica de IL-1 β en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> crecidas en un medio con glucosa	107
Figura XVIa.- Expresión génica de IL-1r2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	109
Figura XVIb.- Expresión génica de IL-1r2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> crecidas en un medio con glucosa	109
Figura XVIIa.- Expresión génica de COX-2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	111
Figura XVIIb.- Expresión génica de COX-2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> crecidas en un medio con glucosa	111

- Figura XVIIIa.- Expresión génica de TNF- α en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* **113**
- Figura XVIIIb.- Expresión génica de TNF- α en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa **113**

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AIP	Apoptosis inducing protein
ANOVA	Análisis de la varianza
API	Índice analítico de perfil
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
ARN	Ácido ribonucleico
ASK	Atlantic salmon kidney
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BAB	Base agar sangre
BF	Bluegill fry
BFP	Proteína fluorescente azul
BHIA	Agar infusión cerebro corazón
BHIB	Caldo infusión cerebro corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
CHSE	Chinnok salmon embryo
CIB	Centro de investigaciones biológicas

COX	Ciclooxigenasa
CSIC	Consejo superior de investigaciones científicas
Ct	Valores de umbral de ciclo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL₅₀	Dosis letal
ECP	Producto extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEA	Early endosomal auto-antigen
EHN	Necrosis hematopoyética epizoótica
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EPC	Epitelioma papullusum cyprini
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FHM	Fathead minnow
GF	Blue striped Grunt fin
GFP	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanosín trifosfato
IFN	Interferón
IgM	Inmunoglobulinas M
IHNV	Necrosis hematopoyética infecciosa
IL	Interleuquina

IPRO	Índice de replicación intracelular
IU	Unidades internacionales
LAMP	Lysosomal associated membrane protein
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacáridos
MEM	Medio mínimo esencial
MOI	Multiplicidad de infección
NK	Células Natural Killer
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OMP	Outer membrane protein
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poly I:C	Ácido poliinosínico- policitidílico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RTG	Rainbow trout gonad
SAF	<i>Sparus aurata</i> fin

SFB	Suero fetal bovino
SHK	Salmon head kidney
SPSS	Statistical product and service solutions
TNF	Factor de necrosis tumoral
VHS	Septicemia hemorrágica viral



INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad que puede definirse como el cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente la producción. El cultivo acuático abarca muy variadas prácticas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción.

El mayor reto al que se enfrenta la humanidad para las próximas décadas, a parte de la obtención de energía, es alimentar a los 9.600 millones de personas que habitarán el planeta tierra hacia el año 2050. El reto es complejo dada la limitada disponibilidad de los recursos naturales y dada la necesidad de respetar los ecosistemas y la persistencia, aún hoy, de los más de 800 millones de personas que sufren desnutrición crónica (APROMAR, 2015).

Actualmente, la acuicultura juega un papel importante en los esfuerzos por eliminar el hambre y la malnutrición al proveer alimentos ricos en proteínas, vitaminas y minerales. Además puede contribuir a reducir la pobreza mejorando los ingresos económicos, fomentando el comercio local e internacional y ofreciendo oportunidades de empleo.

La acuicultura ha superado en producción a la pesca por primera vez en 2013 con 97,20 millones de toneladas a nivel mundial, frente a las 93,8 millones de toneladas de las capturas. Por tanto, más del 50% de los productos acuáticos en 2013 provienen de la acuicultura (APROMAR, 2015).

La FAO (2010) considera que la acuicultura contribuye de manera efectiva a la utilización eficaz de los recursos naturales, a la seguridad alimentaria y al desarrollo económico, con un limitado y controlable impacto sobre el medio ambiente.

A medida que la acuicultura se intensifica y diversifica, los peligros y riesgos biológicos para los animales, las personas y los ecosistemas también aumentan en número y diversidad. Entre los peligros se encuentran las enfermedades infecto-contagiosas que afectan a las explotaciones, los problemas de la salud pública en relación con los residuos y la resistencia a agentes antimicrobianos, las zoonosis, la aparición de especies exóticas invasoras, la liberación de organismos modificados genéticamente y los riesgos que el cambio climático plantea para la bioseguridad.

El movimiento no controlado, a nivel nacional e internacional, de huevos y progenitores infectados constituye una vía probada de introducción y diseminación de estos patógenos. Las enfermedades infecciosas están limitando el desarrollo y la sostenibilidad de la industria a causa de las pérdidas directas, los crecientes costes de funcionamiento, el desempleo, las restricciones del comercio y los efectos en la biodiversidad.

Para controlar estas enfermedades se emplean, habitualmente, agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o vacunas. En general, estos productos han incrementado la eficiencia de la producción y la industria acuícola las ha ido incorporando rápidamente gracias a un aprendizaje mejorado y un mayor entendimiento de la aplicación de la gestión sanitaria y de la bioseguridad a la acuicultura. Se reconocen sus beneficios en una amplia gama de aplicaciones, entre las que se encuentran, el desarrollo de nuevas especies destinadas a la acuicultura, las alternativas a estrategias de prevención fallidas, el desarrollo de la tecnología de cría y el bienestar de los animales.

No obstante, cada vez resultan más limitado el uso de muchos medicamentos veterinarios por los daños que pueden causar. Tales daños están

relacionados con la resistencia bacteriana, los residuos de agentes antimicrobianos en los productos de consumo, los costes para poner remedio a los efectos no deseados y la fiabilidad de su eficacia en diferentes medios acuáticos. A medida que se extiende su utilización aumentan las preocupaciones sobre el uso irresponsable, como por ejemplo el uso encubierto de productos prohibidos, la utilización inadecuada derivada de un diagnóstico incorrecto o el abuso debido a una falta de asesoramiento profesional.

Para poder luchar contra las enfermedades infecciosas en acuicultura, es indispensable tener los conocimientos necesarios sobre ellas. La comprensión de la patogenia, difusión y la transmisión de la enfermedad es clave para el control y la prevención de la misma. En este sentido, la investigación juega un papel fundamental.

La investigación en la prevención de las enfermedades infecto-contagiosas es el campo en el que los cultivos celulares y los ensayos *in vitro* han sido mayoritariamente aplicados en acuicultura.

La aplicación de estrategias preventivas y de control requiere obtener suficiente información de: a) mecanismos de patogénesis; b) la interacción entre el hospedador y los patógenos; y c) mecanismos de defensa del hospedador. Mejorar la resistencia a la enfermedad seleccionando caracteres genéticos apropiados se ha convertido en un enfoque interesante (Villena, 2003).

La expansión de la pasterelosis, como se conoce comúnmente a la enfermedad producida por la bacteria *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida*, ha llegado a convertirse en un problema de primer orden en la acuicultura marina mundial. En el Archipiélago Canario es una de las enfermedades de mayor prevalencia y repercusión económica para la acuicultura, con una tendencia de

presentación estacional, en épocas estivales. La dorada (*Sparus aurata*), junto a la lubina (*Dicentrarchus labrax*) cuyos valores económicos son elevados, son de las especies de peces más afectadas por este patógeno.

A pesar de los estudios sobre la inmunología de la dorada, la información sobre la patogénesis de la pasterelosis es todavía escasa. La mayoría de los estudios *in vitro* se centran en líneas fagocíticas para estudiar la inmunidad no específica contra este patógeno, siendo poca la información sobre la supervivencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células no especializadas en la fagocitosis y, por tanto, en los tejidos del pez.

Con la elaboración del presente trabajo, se pretende estudiar varios aspectos de la interacción de *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* en dorada a través de diferentes estudios realizados *in vitro* con células no fagocíticas de dorada (SAF-1), uno de sus hospedadores naturales de mayor relevancia biológica y económica.



OBJETIVOS

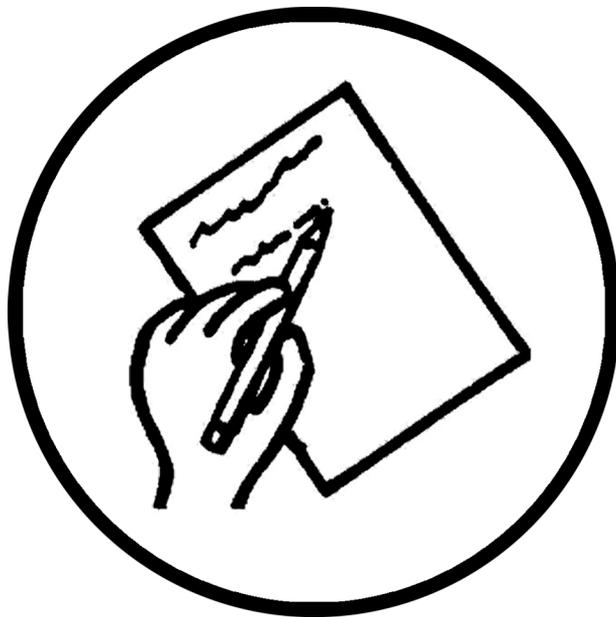
II.- OBJETIVOS

Con lo expuesto anteriormente, los objetivos que nos hemos planteado en el presente estudio son:

1) Analizar la cinética de invasión celular de *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* mediante su interacción con la línea celular fibroblástica de aleta de dorada SAF-1.

2) Dilucidar el tráfico intracelular de *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* en la línea celular fibroblástica de aleta de dorada SAF-1.

3) Estudiar la respuesta inmunitaria de células no fagocíticas (línea celular SAF-1) de dorada infectadas con *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* a través de la expresión génica de citoquinas y gen Mx por PCR a tiempo real.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1.- Las enfermedades infecciosas en acuicultura

Son muchas las infecciones bacterianas que pueden afectar a las granjas de acuicultura. En la bibliografía se describen infecciones por *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum* y otras flexibacterias, *Pseudomonas* spp., y *Streptococcus* spp., entre otras. La mayoría de estos microorganismos forman parte del medio acuático, y sólo en determinadas circunstancias van a sobrepasar las barreras defensivas de los peces. Es de especial interés en Canarias, la infección causada por *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida*, sobre la que profundizaremos más adelante.

Algunas de las enfermedades más importantes de origen bacteriano que afectan a las granjas de acuicultura marina y continental son:

- Vibriosis: dentro de la familia *Vibrionaceae*, las especies que causan mayores pérdidas económicas son *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida* y *V. vulnificus* biotipo 2 (Toranzo, 2004). *Vibrio anguillarum*, agente etiológico de la vibriosis clásica, tiene una amplia distribución mundial causando septicemia hemorrágica en gran variedad de peces de importancia económica, como el salmón pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Psetta maxima*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), lubina estriada (*Morone saxatilis*), bacalao (*Gadus morhua*), anguila japonesa (*Anguilla japonica*), anguila europea (*Anguilla anguilla*) y ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) (Toranzo y Barja, 1993; Actis y cols., 1999). Los peces afectados muestran signos típicos de una septicemia generalizada con hemorragia en la base de las aletas, exoftalmia y opacidad corneal. Los peces moribundos

frecuentemente tienen anorexia con branquias pálidas que indican una anemia severa. A menudo se observan edemas, sobre todo en la hipodermis.

- Forunculosis: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es el agente etiológico de esta enfermedad que causa graves pérdidas económicas en salmónidos. También afecta a peces no salmónidos y tiene una amplia distribución (Toranzo y cols., 1991a; Toranzo y Barja, 1992; Austin y Adams, 1996; Bernoth, 1997; Ellis, 1997; Bricknell y cols., 1999; Hiney y Oliver, 1999). La enfermedad típica se desarrolla con una septicemia hemorrágica crónica o aguda, a menudo con necrosis por licuefacción extensa. En los casos agudos, suelen aparecer úlceras profundas.
- Flexibacteriosis marina: causada por *Tenicibaculum maritimum* (Wakabayashi y cols., 1986; Bernardet y Grimont, 1989; Sukui y cols., 2001). Presenta una amplia distribución en peces de cultivo y salvajes en Europa, Japón, Norte América y Australia (McVicar y White, 1979 y 1982; Wakabayashi y cols., 1986; Devesa y cols., 1989; Pazos y cols., 1993; Chen y cols., 1995; Handler y cols., 1997; Ostland y cols., 1999; Santos y cols., 1999; Avendaño-Herrera y cols., 2004). Entre los peces de acuicultura, la enfermedad se ha descrito en rodaballo, lenguado (*Solea senegalensis*), dorada, lubina, besugo (*Pagellus bogaraveo*), chopo (*Acanthopagrus schlegeli*), platija (*Platichthys flesus*) y salmónidos. Aunque pueden verse afectados tanto adultos como juveniles, los peces más jóvenes sufren una forma más severa de enfermedad. Se ha descrito un aumento en la prevalencia y severidad de la enfermedad con temperaturas cercanas a los 15°C. Además de la temperatura del agua, influyen factores como el estrés y relacionados con el hospedador (estado de la piel) (Magariños y cols., 1995). En general, los peces afectados tienen la

boca erosionada y hemorrágica, lesiones ulcerativas en piel, aletas deshilachadas y podredumbre de la cola. La pérdida de la superficie epitelial, es una puerta de entrada para otras bacterias o parásitos (Toranzo, 2004).

- Pseudomonadiosis: dentro del Género *Pseudomonas*, *Pseudomonas anguilliseptica* se considera el patógeno más importante para los peces de acuicultura (Toranzo y Barja, 1993; Austin y Austin, 1999). La enfermedad se ha descrito en anguilas (Japón, Taiwan, Dinamarca, Escocia), chopo y ayu (Japón), salmónidos (Finlandia), arenque (Mar Báltico) (Toranzo, 2004) y desde 1995 se considera responsable de la enfermedad del invierno “*Winter disease síndrome*” de la dorada cultivada en el Mediterráneo (Berthe y cols., 1995; Doménech y cols., 1997). También se ha descrito como un patógeno emergente en rodaballo y besugo en España (López-Romalde y cols., 2003a y b). La enfermedad se da a bajas temperaturas (alrededor de 16°C) durante los meses de invierno. Los principales signos clínicos y lesiones son distensión abdominal y hemorragias petequiales en piel y órganos internos, pero las lesiones en anguilas son siempre más severas que las observadas en dorada.
- Estreptococosis: las infecciones por estreptococos en peces se considera una enfermedad reemergente que afecta a gran variedad de especies salvajes y de cultivo en el mundo (Kitao, 1993; Bercovier y cols., 1997; Romalde y Toranzo, 2002). Causó altas mortalidades en el cultivo del rodaballo a principios de los años 90. Gracias al desarrollo y registro de una vacuna la enfermedad se erradicó y, a finales de la década, incluso se dejó de vacunar. Sin embargo, en los últimos años, las elevadas temperaturas alcanzadas en

algunas granjas han provocado la aparición de nuevos casos graves, llevando a varias explotaciones a tener que vacunar de forma sistemática para prevenir la enfermedad (Skretting, 2007). Debe entenderse como un complejo de enfermedades similares producidas por diferentes géneros y especies capaces de provocar un daño nervioso central caracterizado por exoftalmia supurativa y meningoencefalitis (Toranzo, 2004). Los agentes etiológicos de las estreptococosis de “agua caliente” son zoonóticos. La fuente de infección suele estar relacionada con actividad humana y animal (ganadería) cercana a la explotación.

- Enfermedad de la boca roja: también conocida como yersiniosis, es una enfermedad emergente causada por *Yersinia ruckeri*. Aunque se ha aislado de otras especies, produce importantes pérdidas económicas en salmónidos, siendo especialmente sensible la trucha arcoíris (Furones y cols., 1993). Presenta una amplia distribución por Norte América, Sudáfrica, Australia y Europa (Tobback, 2009). La enfermedad se transmite por contacto directo con peces enfermos o portadores. Afecta a peces de todas las edades, pero se presenta de una forma aguda en los jóvenes. Los peces presentan letargia, hemorragias con enrojecimiento en la base de las aletas, línea lateral y en la cabeza. Las hemorragias características dentro y alrededor de la boca, no aparecen siempre en todos los peces afectados. También hay distensión abdominal y exoftalmia.

Los parásitos más comunes que pueden aparecer en peces de acuicultura marina son *Criptocaryon irritans*, *Amilodinium ocellatum*, *Enteromyxum leei*, *Furnestinia echenis* y *Sparycotyle chrysophrii*.

Las enfermedades más importantes producidas por virus en acuicultura marina son la Nodaviriosis y Enfermedad Linfoquística. En cuanto a la acuicultura continental, las enfermedades víricas más importantes son la Septicemia Hemorrágica Viral, Necrosis Hematopoyética Epizoótica, Necrosis hematopoyética infecciosa, Anemia Infecciosa del Salmón, Herpesvirosis de la carpa Koi y Viremia Primavera de la carpa.

III.2.- Estudio de la pasterelosis

III.2.1.- Importancia de la enfermedad en acuicultura continental y marina

En un principio esta enfermedad se denominó como pseudotuberculosis debido a la aparición de granulomas en el bazo e hígado de los peces infectados. La bacteria se aisló originariamente de mortalidades en poblaciones naturales de perca blanca (*Morone americanus*) y lubina estriada (*M. saxatilis*) en 1963 en Chesapeake Bay en Estados Unidos (Sniezko y cols., 1964). Posteriormente, pasó a llamarse pasterelosis, enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas a las empresas que afecta. Es un patógeno capaz de provocar mortalidades masivas en peces salvajes y en acuicultura. Entre 1963 y 1967 se desarrollaron graves epizootias en la costa este de Estados Unidos, por las que la industria acuícola en esa región decreció en un 42%. La única causa significativa de este decrecimiento se encontró en los brotes de enfermedad causada por la antiguamente encuadrada como *Pasteurella piscicida* (Sinderman, 1990), y hoy en día, denominada *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* (Gauthier y cols., 1995).

Los porcentajes de mortalidad en peces debido a brotes de pasterelosis varían según la especie y edad de los afectados y de la cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. En larvas causa mortalidades del 50-100% y en juveniles la

mortalidad puede alcanzar el 50% de la población (Toranzo y cols., 1991; Rodgers y Furones, 1998). Así, en alevines, Hawke y cols. (1987) describen un brote donde en un periodo de tres semanas muere el 80% del colectivo de peces; en el primer brote de pasterelosis descrito en España, Toranzo y cols. (1991), la mortalidad fue del 40%.

Balebona y cols. (1992) describieron un brote de esta enfermedad en lubinas del sudoeste de España, donde entre septiembre y octubre de 1991 murieron 30.000 peces, un 15% del total de animales producidos.

En una granja piscícola de jurel (*Pseudocaranx dentex*) en Japón, se produjo un brote de pasterelosis que provocó una pérdida de 10.000 animales en un mes, equivalente al 34% del total de juveniles de la explotación (Nakai y cols., 1992).

Candan y cols. (1996) estudiaron en Turquía un brote de este proceso, con unas pérdidas de unos 18.250 peces, lo que representó el 9% del colectivo en un periodo de dos semanas.

En Portugal, Baptista y cols. (1996) describen el primer brote de pasterelosis, donde se observaron mortalidades diarias entre 0,9 y 11%. Dicha enfermedad afectó a toda la población de alevines.

En Canarias, el primer brote de esta enfermedad fue descrito por Real y cols. (1997), viéndose afectados los animales juveniles de una explotación de lubinas, observándose mortalidades de unos 2.000 peces diarios durante una semana. Estas cifras se han mantenido constantes en brotes sucesivos ocurridos de forma rutinaria en verano.

En salmón Atlántico, Jones y Cox (1999) en su descripción de la enfermedad, reflejan una mortalidad muy baja, siendo esta desde abril a octubre, de un 6% en total.

III.2.2.- Etiología

Gauthier y cols. (1995) basándose en el estudio del ARN ribosómico y relacionándolo con el ADN completo y con las características bioquímicas, reasigna a *Pasteurella piscicida* en una subespecie de *Photobacterium damsela*, aunque Thyssen y cols. (1998), basándose en estudios morfológicos y bioquímicos, concluyen que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* está relacionado con especies del Género *Photobacterium* pero es fácilmente distinguible de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

La caracterización de cepas de esta bacteria utilizando la AFLP “*Amplified fragment length polymorphism*” o polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, realizada por Thyssen y cols. (2000), demuestra que existe una homología entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* de un 77%, lo cual ratifica la idea de una proximidad taxonómica. A pesar de todo esto, la denominación de “pasterelosis” se mantiene más por motivos de tipo histórico que por taxonómicos (Daly, 1999).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es un bacilo Gram negativo inmóvil con tinción bipolar (Austin y Austin, 1999), y no produce esporas. El tamaño de las células varía con las condiciones de cultivo. Koike y cols. (1975) describen tamaños desde 0,6-1,2 x 0,8-2,6 μm . Son polimórficas y pueden ser observadas desde formas de micrococos hasta largos bacilos dependiendo de las condiciones de cultivo. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* presenta un metabolismo anaerobio facultativo (Austin y Austin, 1999). Para su cultivo se han usado diferentes medios como son el Agar Infusión Cerebro Corazón, Agar Triptona-Neopeptona, Agar Levadura-Peptona, Agar Leche y Agar Sangre, conteniendo todos entre un 1,5 y un 2% de NaCl (Egusa, 1992). En estos medios se observan colonias redondas,

incoloras, semi-transparentes en forma de “gotas de rocío” y de consistencia pegajosa. En Agar Nutritivo también se cultiva pero su crecimiento no es tan bueno, presentando también un crecimiento inadecuado en otros medios líquidos como el Caldo Nutritivo y el Agua de Peptona. Aunque mal, algunas cepas seleccionadas pueden crecer en Agar MacConkey.

Las propiedades bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* han sido descritas por numerosos autores. Sniezko y cols. (1964), Janssen y Surgalla (1968), Kimura y Kitao (1971), Simidu y Egusa (1972), Kusuda y Yamaoka (1972) describieron las características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, coincidiendo todos ellos de forma general en el comportamiento bioquímico de esta bacteria, exhibiendo unas características típicas como ser inmóvil, oxidasa y catalasa positiva, tener un metabolismo fermentativo, ser sensible a la acción del agente vibriostático O/129 (Austin y Austin, 1999), no producir gas a partir de la glucosa y ser halófila (Jansen y Surgalla, 1968; Magariños y cols., 1992a). Las características bioquímicas de los diferentes aislados de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a lo largo del tiempo se muestran en la Tabla I (Jansen y Surgalla, 1968; Yasunaga y cols., 1983, 1984; Toranzo y cols., 1991).

Esta bacteria se diferencia desde un punto de vista bioquímico del resto de bacterias pertenecientes al Género *Pasteurella* por no crecer a 37°C, por ser halófila y por no reducir los nitratos (Magariños y cols., 1992a).

Tabla I.- Características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Gram	-	Resistencia a:	
Tinción bipolar	+	Agente Vibriostático O/129	-
Movilidad	-	Novobiocina	-
Crecimiento en:		D-Tartrato	-
Agar Nutritivo	+	Gelatinasa	-
Agar Marino	+	Caseinasa	-
Caldo Nutritivo	+	Lipasa (Tween 80)	+
Agua de peptona	+	Fosfolipasa	+
Agar BHI+2%NaCl	+	Amilasa	-
Agar Sangre+2%NaCl	+	Hemólisis de eritrocitos:	
Agar McConkey	+	Oveja	+
Agar SS	-	Salmón	+
Crecimiento a:		Rodaballo	+
5°C	-	Trucha	-
10°C	-	Producción de ácido a partir de:	
15°C	+	Glucosa	+
25°C	+	Manosa	+
30°C	+	Galactosa	+
37°C	-	Fructosa	+
Crecimiento en:		Maltosa	-
0% de NaCl	-	Sucrosa	-
0,5% de NaCl	+	Ramnosa	-
3% de NaCl	+	Arabinosa	-
5% de NaCl	-	Amigdalina	-
Citocromo oxidasa	+	Melibiosa	-
Catalasa	+	Manitol	-
Rojo de metilo	+	Inositol	-
Voges Proskauer	+	Sorbitol	-
Producción de:		Glicerol	-
Indol	-	Xilosa	-
Nitrito	-	Lactosa	-
Amonio	-	Trealosa	-
Nitrito	-	Rafinosa	-
Citrato	-	Celibiosa	-
Sulfídrico	-	Dextrina	-
O/F Glucosa	F	Inulina	-
Gas de glucosa	-	Glicógeno	-
Arginina dehidrolasa	+	Adonitol	-
Lisina decarboxilasa	-	Inositol	-
Ornitina decarboxilasa	-	Dulcitol	-
Triptófano desaminasa	-	Eritriol	-
B-Galactosidasa	-	Salicina	-
Ureasa	-	Esculina	-

+: reacción positiva; -: reacción negativa; V: reacción variable; S: sensible; R: resistente

III.2.3.- Epidemiología

La enfermedad se distribuye en zonas donde se realiza acuicultura marina en regiones templadas. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ha sido aislada de peces enfermos en EEUU de América, Japón, Taiwan, España, Francia, Grecia, Turquía, Italia, Portugal, Malta, Noruega, Escocia, Israel, Croacia y China.

Además, este patógeno primario ha sido aislado de numerosas fuentes, afectando tanto a especies salvajes como de piscifactoría. Las diferentes especies afectadas se detallan en la Tabla II.

Las fuentes de infección ha sido motivo de discusión durante mucho tiempo, siendo el agua de mar uno de los puntos más discutidos. Así, Janssen y Surgalla (1968) observaron que la bacteria moría en 3 días al ponerla en agua estéril con un 1,7% de NaCl, lo cual llevó a pensar que la temperatura y la salinidad son factores restrictivos que hacían que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no pudiera vivir mucho tiempo fuera del hospedador. Toranzo y cols. (1982) afirman, de acuerdo con Janssen y Surgalla (1968), que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* sólo es capaz de sobrevivir en agua de mar no más de 3-5 días, sugiriendo que la forma de transmisión es por contacto directo pez a pez.

Magariños y cols. (1994a) describen a este agente causal con capacidad suficiente para sobrevivir en agua de mar, estando en ella en un estado viable pero no cultivable, y manteniendo la capacidad patógena sobre el rodaballo.

Tabla II.- Aislamientos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Nombre común	Nombre científico	País	Referencia
Perca blanca	<i>Morone americanus</i>	EEUU	Snieszko y cols., 1964 Janssen y Surgalla, 1968
Lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i>	EEUU	Snieszko y cols., 1964
Lacha tirana	<i>Brevoortia tyrannus</i>	EEUU	Lewis y cols., 1970
Seriola coreana	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japón	Kimura y Kitao, 1971
Ayu	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Japón	Kusuda y Miura, 1972
Black sea bream	<i>Mylio macrocephalus</i>	Japón	Onishi y cols., 1982
Red sea bream	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	Japón	Yasunaga y cols., 1983,1984
Black scraper	<i>Navodon modestus</i>	Japón	Yasunaga y cols., 1983,1984
Snakehead fish	<i>Channa maculata</i>	Taiwan	Tung y cols., 1985
Lebranco	<i>Mugil cephalus</i>	Francia	B. Laurecin y cols., 1991
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Francia	B. Laurecin y cols., 1991
Pejerrey	<i>Atherina boyeri</i>	Italia	Ceschia y cols., 1991
Bocinegro	<i>Pagrus pagrus</i>	Italia	Ceschia y cols., 1991
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	España	Toranzo y cols., 1991 Real y cols., 1997
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Noruega	Speilberg y cols., 1991
Jurel dentón	<i>Pseudocaranx dentex</i>	Japón	Nakai y cols., 1992
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	España	Balebona y cols., 1992
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	Portugal	Batista y cols., 1996
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Turquía	Canean y cols., 1996
Largescale blackfish	<i>Girella punctata</i>	Japón	Kawakami y cols., 1999
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Escocia	Jones y Cox, 1999
Lenguado	<i>Solea senegalensis</i>	España	Zorrilla y cols., 1999
Híbrido de lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i> × <i>M. chrysops</i>	Israel	Nitzan y cols., 2001
Híbrido de lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i> × <i>M. chrysops</i>	Taiwan	Huang H-T y cols., 2001
Híbrido de lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i> × <i>M.</i> <i>chrysops</i>	EEUU	Hawke y cols., 2003
Cobia	<i>Rachycentron canadum</i>	Taiwan	Ping-Chung y cols., 2003
Atún rojo	<i>Thunnus thynnus</i>	Croacia	Mladineo y cols., 2006
Tongue sole	<i>Cynoglossus semilaevis</i> <i>Gunther</i>	China	Wang y cols., 2007
Palometa	<i>Trachinotus ovatus</i>	China	Wang y cols., 2013

Las tasas de morbilidad y mortalidad son muy variables en función de la edad de los peces y de las condiciones ambientales que los rodean. La enfermedad aparece principalmente en los meses de verano (sobre todo cuando la temperatura del agua es cercana a los 25°C) y se ha asociado a altas temperaturas, baja salinidad y una calidad pobre del agua (Magariños y cols., 1996c; Romalde y cols., 1999a).

Romalde y cols. (1999b) detectaron el microorganismo en fluido seminal y ovárico de peces aparentemente sanos y también en huevos fertilizados, sugiriendo la posibilidad de que existe la transmisión vertical de la enfermedad.

Los reservorios están representados por portadores asintomáticos (generalmente peces adultos), resistentes a enfermar, y que mantienen la infección en los colectivos hasta el momento en el que se dan condiciones ambientales favorables para que aparezca la enfermedad. Son especialmente sensibles los alevines y juveniles.

III.2.4.-Patogenia

Diferentes estudios han revelado que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* posee factores de virulencia que intervienen en su patogénesis, como la presencia de cápsula (Magariños y cols., 1996a), plásmidos (do Vale y cols., 2005), mecanismos de captación de hierro (Magariños y cols., 1994b), proteínas con actividades apoptóticas (do Vale y cols., 2003), y otras actividades enzimáticas (Díaz-Rosales y cols., 2006; Naka y cols., 2007). Además, se ha descrito la resistencia que presenta este patógeno al suero de distintas especies de peces (Acosta y cols., 2006).

Una vía de infección no clara es el agua. Para comprobar el interés que tiene en los mecanismos de transmisión, Magariños y cols. (1994a) realizaron un

estudio en el que hicieron infecciones por baño en doradas y rodaballos, obteniendo que las doradas eran susceptibles de infectarse con una dosis letal 50 (DL₅₀) de 10⁵-10⁶ células/ml, mientras que el rodaballo se mostraba resistente y no se infectaba por esta vía.

A pesar de la gran homogeneidad fenotípica mostrada por todas las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, se han observado diferencias en el grado de virulencia dependiendo de la fuente de aislamiento, ya que los valores de DL₅₀ en los aislados de lenguado y lubina estriada fueron considerablemente menores que los de las cepas aisladas de otros hospedadores (Magariños y cols., 2003; Thune y cols., 2003).

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

Los estudios realizados en cuanto a la interacción de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con macrófagos han dado resultados contradictorios. Bacterias morfológicamente intactas han sido encontradas dentro de macrófagos *in vitro* (Kubota y cols., 1970; Nelson y cols., 1981; Noya y cols., 1995a y b), sugiriendo estos resultados que esta bacteria es capaz de invadir macrófagos. Skarmeta y cols. (1995), así como Arijo y cols. (1998), en estudios realizados *in vitro* han demostrado que los macrófagos de diferentes especies de peces estudiados: trucha arcoiris, lubina y dorada presentan actividad bactericida frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Barnes y cols. (1999) explican los resultados de los autores anteriores, al observar que este patógeno es incapaz de soportar el ataque oxidativo que experimenta durante el metabolismo respiratorio del macrófago.

Es posible que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* pueda eludir los mecanismos de defensa del hospedador y de los agentes antimicrobianos manteniéndose viable dentro de células no fagocíticas (Magariños y cols., 1996b), aspecto ya demostrado por la capacidad que presenta esta bacteria de invadir diferentes líneas celulares de peces (Magariños y cols., 1996b; Yoshida y cols., 1997).

Los productos extracelulares (ECPs) son letales para trucha y rodaballo, lo que indica que éstos deben jugar un importante papel en el mecanismo de acción patógena de esta bacteria (Magariños y cols., 1992a).

Magariños y cols. (1992b) han demostrado que los ECPs de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* presentan actividad fosfolipasa y hemolítica sobre eritrocitos de oveja, salmón y rodaballo, pero no sobre eritrocitos de trucha. La suplementación del medio de cultivo con un 1% de glucosa induce la presencia de una capa capsular lipopolisacárida que produce un aumento en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Bonet y cols., 1994), provocando que la DL₅₀ se pueda reducir hasta 4 logaritmos (Magariños y cols., 1996a). De la misma forma, la disponibilidad de hierro y los ECPs intervienen en la virulencia (Magariños y cols., 1992a y 1994b).

Se han llevado a cabo varios estudios sobre proteínas (extracelulares, periplásmicas, etc) de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* para aclarar su patogenia. Do Vale y cols. (2005) comprobaron que todas las cepas virulentas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* analizadas eran capaces de producir una exotoxina de 56 KDa llamada AIP56 "*Apoptosis Inducing Protein*". Dicha proteína, como su nombre indica, es capaz de inducir apoptosis en las células inmunitarias (neutrófilos y macrófagos) de muchas especies de peces provocando, además, una necrosis secundaria debida a la falta de eliminación de las células dañadas y como

resultado último un daño tisular irreversible que conlleva a la muerte del animal. La AIP56 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* por sí sola es capaz de reproducir la enfermedad y matar al pez afectado y, por lo tanto, cabe pensar que esta proteína sea uno de sus principales mecanismos de patogénesis. En la Tabla III se muestran las proteínas más destacadas descritas en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y, posiblemente, asociadas a su patogénesis.

Tabla III. Proteínas descritas en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

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

III.2.5.- Clínica y lesiones

Una de las principales características de esta enfermedad es la ausencia de signos patognomónicos, pudiéndose encontrar manifestaciones clínicas en los peces infectados, pero no de forma específica y exclusiva de esta enfermedad. Además, Roberts (1978) afirma que una de las características de esta enfermedad es que no se producen anomalías externas en los peces afectados.

Algunos síntomas de la enfermedad, como son la debilidad de los peces e irse al fondo de las redes donde morían ya eran descritos por Kubota y cols. (1970a y b, y 1972).

Snieszko y cols. (1964) describen en la "pseudotuberculosis" de la perca blanca la presencia de pequeñas zonas hemorrágicas en las branquias y en la base de las aletas, además de un aumento de la pigmentación de la piel.

La presencia de estos signos inespecíficos se repiten de forma rutinaria en la mayoría de las descripciones de la enfermedad, y sólo en alguna ocasión se observa algún síntoma de localización corporal distinta, como los descritos por Toranzo y cols. (1991) y Baptista y cols. (1996), los cuales observaron la aparición de hemorragias en la zona de la cabeza.

La forma de presentación de la enfermedad no es constante, existiendo cuadros desde sobreagudos a crónicos.

La forma sobreaguda de la enfermedad suele darse en alevines con escasa o nula inmunidad frente al agente causal, o cuando el medio ambiente es muy favorecedor para que la enfermedad se presente. En estas condiciones los peces suelen morir sin manifestar casi ningún signo previo; a lo sumo, cierta anorexia y melanosis, presentando muerte súbita que puede afectar al 60-80% del colectivo

afectado. No encontramos ninguna lesión externa ni interna en los peces afectados, al morir de forma súbita por shock endotóxico.

En la forma aguda encontramos melanosis, anorexia, e inflamación de branquias con gran presencia de mucus. Esta forma se produce en peces juveniles con escasa o nula inmunidad. En la necropsia, observamos esplenomegalia y congestión hepática (Daly, 1999), el riñón lo podemos encontrar aumentado de tamaño y anémico.

La forma crónica suele presentarse en peces que poseen una cierta inmunidad natural o artificial frente a dicho agente causal, en peces que hayan sobrevivido al brote de enfermedad, o cuando las condiciones ambientales no son las más adecuadas para que la enfermedad se presente. En estas circunstancias, los peces enfermos manifiestan una intensa debilidad, y cierto retraso en el crecimiento y anorexia. Además, hay un goteo continuado de animales muertos llegando a alcanzar un 20-30% del colectivo, pudiendo mostrar hinchazón del abdomen. No existen otros síntomas de la enfermedad. En la necropsia observamos la presencia de pequeños nódulos blanquecinos en el hígado, bazo y riñón que han destruido la estructura del tejido. La presencia de estos focos se asocia siempre a estos cuadros crónicos más que a muertes de forma aguda, la cual en las especies marinas es la más común (Toranzo y cols., 1991b; Balebona y cols., 1992). Microscópicamente, estos nódulos se corresponden con granulomas, donde la parte central necrótica se rodea por una cápsula epitelióide (Kubota y cols., 1970b).

Las infecciones subclínicas, donde los peces se transforman en portadores, también ocurre con temperaturas bajas (Magariños y cols., 2001). Los peces jóvenes son más susceptibles al patógeno (Toranzo y cols., 2005).

En su trabajo sobre la pasterelosis de la lubina estriada, Hawke y cols. (1987) describen los cambios histológicos encontrados en los peces, observándose en el bazo una necrosis aguda multifocal del tejido linfoide caracterizada por la pérdida de células, necrosis por coagulación, cariorrexis y por la presencia de muchas bacterias. En el hígado, hallaron una moderada necrosis aguda multifocal de los hepatocitos con una prominente cariorrexis. También observaron gran cantidad de bacterias en los sinusoides y dentro de los vasos hepáticos. Amplias áreas del hígado mostraron zonas de hiperplasia de las células reticuloepiteliales de revestimiento de los sinusoides hepáticos. En el páncreas describieron una necrosis aguda multifocal, acompañada con la pérdida o reducción del tamaño de los gránulos de zimógeno. Sin embargo, no se detectó infiltrado inflamatorio en ninguno de los tejidos afectados.

En el estudio en España del primer brote de esta enfermedad en dorada, Toranzo y cols. (1991b) encontraron alteraciones histológicas, tanto en peces infectados de forma natural como experimentalmente, una necrosis aguda con infiltrado de eritrocitos y la presencia de muchas bacterias en capilares y espacios intersticiales en bazo y riñón. En el hígado se observó la presencia de una necrosis multifocal moderada de los hepatocitos, así como bacterias en los sinusoides y espacios hepáticos. Las lesiones crónicas (granulomas) solo fueron encontradas en peces con infección natural, después de que estos fueron tratados y hubiesen superado el brote de la enfermedad. En los peces de la infección experimental no se encontró ningún animal con granulomas.

Noya y cols. (1993) inocularon tanto la bacteria como los ECPs de varias cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en doradas para estudiar los cambios histológicos que estos provocaban en los peces, observando la inexistencia

de lesiones externas e internas, a excepción de un oscurecimiento de la superficie dorsal y lateral del cuerpo de los peces inoculados. En la sangre de ambos grupos de peces (inoculados con bacteria o con ECPs) el número de leucocitos, principalmente neutrófilos y eosinófilos, aumentó considerablemente. También se apreciaron abundantes leucocitos inmaduros y eritrocitos degenerados. Algunos de los peces inoculados con bacterias mostraron septicemia, observándose que neutrófilos y monocitos contenían a menudo bacterias fagocitadas, y que un porcentaje elevado de estas células sufría necrosis. En la cavidad peritoneal observaron neutrófilos, macrófagos, con gran cantidad de bacterias fagocitadas y eosinófilos.

En la descripción de la enfermedad en salmón Atlántico, Jones y Cox (1999) observan como lesiones macroscópicas más importantes, hemorragias petequiales en intestino grueso y superficie peritoneal, y puntos blancos en hígado, bazo y corazón. Con el tiempo, se apreció también una peritonitis generalizada así como la formación de pseudomembranas difteroides entre los órganos y la vejiga natatoria.

III.2.6.- Diagnóstico

La identificación de esta bacteria se puede realizar por pruebas bioquímicas clásicas (Smibert y Krieg, 1981; West y Colwell, 1984) y por características morfológicas.

Kent y cols. (1982) describieron el uso del sistema miniaturizado API 20E (BioMérieux) como una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad, dando la bacteria resultados positivos a Arginina dehidrolasa, Glucosa, Galactosa, Manosa y Fructosa, y negativo al resto de pruebas de la galería. Santos y cols. (1993) evalúan la utilidad del sistema miniaturizado API 20E para identificar a esta bacteria obteniendo como resultado que ninguna de las cepas usadas pudo ser identificada como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, debido a que el perfil de esta bacteria

no se encuentra incluido en la base de datos de este sistema. Sin embargo, Magariños (1992a) sugiere que este sistema puede dar un diagnóstico presuntivo en base a un perfil característico que mayoritariamente corresponde al código 2005004, pudiéndose encontrar otros perfiles diferentes (Figura I).



Figura I. Perfil bioquímico más habitual de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* mediante el sistema API 20E

Kitao y Kimura (1974), así como Kawahara y cols. (1986) describen como técnica de diagnóstico para esta enfermedad el uso de anticuerpos fluorescentes para detectar la bacteria en tejidos de peces infectados.

La técnica de hibridación del ADN fue utilizada por Zhao y Aoki (1989) para evaluar la presencia de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* a partir de colonias bacterianas crecidas en medios de cultivo, pero la sensibilidad de esta técnica no fue descrita. También usaron la misma técnica para detectar directamente la bacteria sobre tejido (bazo y riñón), siendo capaces de detectar 3,9 ng de ADN, ó 10^5 células de este agente patógeno.

Zhao y Aoki (1992) describieron el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la infección por *Photobacterium damsela subsp. piscicida* utilizando unos cebadores elaborados a partir de la secuencia génica de un plásmido específico de esta bacteria y con un peso molecular de 5,1 Kb.

Un estudio comparativo realizado por Romalde y cols. (1995a) entre la técnica de aglutinación tradicional y unos sistemas para aglutinación en látex fabricados por Bionor®, muestra que en ambos casos se detectaron todas las cepas usadas de esta especie, no existiendo reacciones cruzadas con otros patógenos importantes en acuicultura como son *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*, ni con otras bacterias pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae*. Sí hubo diferencias notables en cuanto a la sensibilidad, donde los sistemas con látex sólo detectaron a partir de 10^{10} bacterias por ml. La técnica de aglutinación en placa fue capaz de detectar a partir de 10^7 bacterias por ml.

Romalde y cols. (1995b) evaluaron el sistema Aquararid-Pp de Bionor® para la detección de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* observando que es una buena herramienta de diagnóstico al detectar todas las cepas del estudio, y que su especificidad también era buena al no tener reacciones cruzadas con otros patógenos importantes en acuicultura como son *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*, ni con otras bacterias pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae*. La sensibilidad de la prueba permitió detectar 10^6 bacterias por 0,5 gr de tejido.

Un método para detectar este agente infeccioso en el agua fue descrito por Reali y cols. (1997). Para ello tomaron una muestra de agua y la pasaron por un filtro de nitrocelulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de poro y pusieron este filtro sobre un medio de cultivo (Agar Marino con un 1% de manitol y 0,5 % de rojo fenol), siendo este método capaz de detectar la bacteria con 8 días de antelación a la aparición de un brote de enfermedad, lo que permitió instaurar un tratamiento precoz frente a este patógeno.

Bakopoulos y cols. (1997) desarrollaron un ELISA para detectar la presencia de esta bacteria. Para ello probaron cepas de diferentes orígenes tanto en cultivos *in*

vitro como a partir de tejidos infectados. Estos autores obtuvieron que en cultivos *in vitro* y en tejidos infectados podían detectar valores desde 10^3 células/ml, lo que indicaba que el método ELISA podía ser una herramienta rápida, fácil y específica para detectar a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en brotes de enfermedad.

La sensibilidad y especificidad del “Magnetic Beads-EIA” de Bionor® Aquaia kit para el diagnóstico de pasterelosis fue demostrada por Romalde y cols. (1999b), detectando todas las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* probadas hasta una dosis de 10^4 u.f.c./ml y dando resultados negativos para las cepas probadas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* y *Photobacterium histaminum* hasta dosis de 10^9 - 10^{10} u.f.c./ml. El resultado fue positivo en gónadas, huevos, fluido ovárico y seminal, lo cual abrió una puerta a la posibilidad de la transmisión vertical de la pasterelosis.

Para realizar el diagnóstico de la enfermedad, Osorio y cols. (1999) diseñaron una serie de cebadores, a partir de una región conservada del ARN 16S de la bacteria, desarrollando una *Nested*-PCR la cual era capaz de detectar de forma específica solo a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, discriminándola perfectamente de otros patógenos en acuicultura. Esta técnica presenta una sensibilidad que permite detectar entre 1-10 fg de ADN (20-200 células).

Osorio y cols. (2000) para realizar el diagnóstico diferencial de la infección por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* frente a *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* utilizaron dos juegos de cebadores, uno a partir de una región conservada del ARN 16S de la bacteria y otro para el gen de la ureasa, desarrollando un método PCR, el cual fue capaz de detectar de forma específica solo a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* discriminándolo perfectamente de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, ya que esta última especie muestra dos bandas, una correspondiente al

ARN 16S y otra al gen de la ureasa, en cambio *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* solo muestra la banda del ARN 16S, lo cual revela que ésta es una buena técnica para el diagnóstico de la enfermedad.

Independientemente del origen geográfico y de la fuente de aislamiento, todas las cepas son bioquímica y serológicamente homogéneas (Magariños y cols., 1992a y b, 1996c; Bakopoulos y cols., 1997). Sin embargo, métodos de “ADN fingerprinting” como el ribotipado (Magariños y cols., 1997b), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados o AFLP realizada por Thyssen y cols. (2000), y amplificaciones aleatorias de ADN polimórfico o RAPD “random amplified polymorphic DNA” (Magariños y cols., 2000 y 2003; Hawke y cols., 2003) han demostrado ser buenas herramientas epidemiológicas ya que permiten detectar dos linajes clonales separados dentro de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Toranzo y cols., 2004). Mientras que un linaje engloba a todos los aislados europeos, el segundo incluye a los aislados de Japón y Estados Unidos.

III.2.7.- Control de la enfermedad

III.2.7.1.- Quimioterapia

La susceptibilidad antibiótica de 60 cepas japonesas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a 14 agentes quimioterápicos fue descrita por Aoki y Kitao (1985). Todas las cepas fueron sensibles a la ampicilina, 21 resistentes a furazolidona, y 5 a cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina y sulfamonometoxin, siendo detectado en estas cinco el plásmido R.

Takashima y cols. (1985) describieron las resistencias antibióticas de cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* de diferentes distritos de Japón. De 281 cepas probadas, 262 presentaban resistencia a la combinación de antibióticos

formada por ampicilina, ácido nalidíxico, furazolidona, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina y sulfamonometoxin, siendo detectado el plásmido R en 168 cepas, contradiciendo los resultados previos de Aoki y Kitao (1985).

La efectividad del florfenicol en el tratamiento de la enfermedad provocada de forma experimental, así como la ineficacia de otros agentes como ácido oxolínico, ampicilina y nifurestirenato sódico fue descrita por Yasunaga y Yasumoto (1988).

Toranzo y cols. (1991b) estudiaron el uso del cloranfenicol y la oxitetraciclina para el control del primer brote de pastereiosis en dorada descrito en España.

Kim y Aoki. (1993a, b y c, 1994, 1996a y b) han citado la presencia de diferentes plásmidos R transferibles, los cuales codifican resistencias a diferentes antibióticos usados en el tratamiento de la enfermedad. Estos antibióticos a los que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* adquiere resistencia por transferencia de plásmidos son el florfenicol, cloranfenicol, sulfonamida, tetraciclina y kanamicina.

Thyssen y Ollevier (2003) probaron la susceptibilidad de 145 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (de diferentes orígenes geográficos) frente a 15 antibióticos utilizados normalmente en las granjas de acuicultura. El 99% de las cepas fueron sensibles al florfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, el 93% presentaron resistencia a la eritromicina, todas las cepas americanas y europeas eran sensibles a la kanamicina, y el 49% de los aislados japoneses eran resistentes a este fármaco. Además, los resultados indican un aumento de la resistencia a varios antibióticos, particularmente en Japón, pero también en algunos países del Mediterráneo.

III.2.7.2.- Inmunoprofilaxis

Desde la primera aparición de un brote letal de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en Estados Unidos, muchos investigadores se han esforzado para diseñar y conseguir una vacuna eficaz contra este patógeno.

En general, la disminución de la efectividad de la quimioterapia, por resistencia a antibióticos o por la presencia del patógeno en el interior de los macrófagos, unido a una creciente preocupación económica y social para reducir el uso de antibióticos, ha favorecido que se hayan estimulado enfoques más respetuosos con el medio ambiente para el control de enfermedades (Hansen y Olafsen, 1999; Verschueren y cols., 2000b).

Por todo esto, los investigadores se han centrado en el desarrollo de vacunas efectivas para prevenir la pasterelosis y reducir el uso de antibióticos en las granjas de acuicultura con beneficios desde un punto de vista biológico y medioambiental (Hastein y cols., 2005).

En el mercado se encuentran disponibles varias vacunas comerciales contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, pero su eficacia depende de la especie y tamaño del pez, formulación de la vacuna y uso de inmunoestimulantes (Magariños y cols., 1996c; Romalde y Magariños, 1997).

Se han probado muchas formulaciones, y las vacunas convencionales contra este patógeno se basan en productos inactivados (bacterias inactivadas por calor o formol) y en antígenos solubles (lipopolisacáridos o formulaciones ribosomales) administrados por inmersión o inyección.

La tabla IV muestra un resumen por orden cronológico de publicaciones científicas sobre vacunas realizadas frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Tabla IV.- Vacunas frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Formulación	Tipo de vacuna	Vía de administración	Especie	Referencia
Bacterina inactivada por formol y calor	Inactivada	Inmersión Oral	Seriola	Fukuda y Kusuda (1981) Hamaguchi y Kusuda (1989) Kusuda y Salati (1993)
LPS	De Subunidades	Inmersión Spray	Seriola	Fukuda y Kusuda (1985)
Antígenos ribosomales	De Subunidades	Inyección	Seriola	Kusuda y cols. (1988)
Bacteria viva atenuada	Viva atenuada	Inmersión	Seriola	Kusuda and Hamaguchi (1988)
Bacterina inactivada enriquecida con ECPs	Inactivada	Inmersión	Lubina Dorada Lenguado	Magariños y cols. (1994c)
LPS con bacterina inactivada con cloroformo	Inactivada	Inyección	Seriola	Kawakami y cols. (1997)
Bacterina inactivada con formol, ECP, y polisacárido capsular (cCPS)	Inactivada	Inyección Inmersión Oral	Lubina	Bakopoulos y cols. (2003)
Viva atenuada con gen mutante aroA	Viva atenuada	Inyección Inmersión	Híbrido de lubina estriada	Thune y cols. (2003)
Bacterina inactivada con formol con LPS de <i>Escherichia coli</i>	Inactivada	Inmersión	Lubina	Hanif y cols. (2005)
Bacterina inactivada con formol con OMP de 97 kDa y ECP de 52 kDa ECP	Inactivada	Inmersión	Lubina Seriola	Barnes y cols. (2005)
Antígenos de rHSP60, rENOLASE y rGAPDH, solos o combinados	Recombinante	Inyección	Cobia	Ho y cols. (2011) y Ho y cols. (2014)
Lipoproteína	Recombinante	Inyección	Lubina	Andreoni y cols. (2013)

III.3.- Cultivos celulares

El cultivo celular engloba un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, conservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las aplicaciones que presenta el cultivo celular abarcan un gran número de disciplinas.

La aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de co-cultivos.

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico.

Sin embargo, en los últimos años, y especialmente debido a la problemática del control de plagas e infecciones en agricultura y acuicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de poiquilotermos e invertebrados.

En la actualidad, los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular.

- Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como transcripción de ADN, síntesis de proteínas, metabolismo energético,...
- Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplo

ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del ARN,...

- Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular,...
- Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

Como ejemplo de áreas de investigación dependientes de las técnicas de cultivo celular podemos citar las siguientes:

- Virología: establecimiento de condiciones de cultivo de virus, estudio de la interacción del virus con su huésped, producción de vacunas antivirales,...
- Bacteriología: adherencia e invasión bacteriana.
- Investigación del Cáncer.
- Inmunología. Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
- Ingeniería de proteínas. Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento,...

- Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.
- Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad,...
- Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
- Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

Ventajas de los cultivos celulares

- Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial, etc.), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Esto es cierto completamente sólo para algunas líneas celulares para las que se han descrito los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en muchas líneas no se han llegado a establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el

mantenimiento del cultivo pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.

- Caracterización y homogeneidad de la muestra. Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.

- Economía. Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo.

- Motivaciones éticas. La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

Desventajas de los cultivos celulares

- Técnica sensible. El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, bacterias, micoplasmas,...) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el

plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.

- Cantidad y coste. El coste de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción en laboratorios normales.

- Inestabilidad. Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.

- Validez del modelo *in vitro*. Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:

- se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
- se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. Es de destacar que los avances más excitantes en la función celular proceden del reconocimiento de la importancia de las interacciones específicas de las células con otras células o con el sustrato.

- carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

Cuando se establece el cultivo, las células se desdiferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta desdiferenciación puede, en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos,...pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación *in vivo*.

III.3.1.- Cultivos celulares en peces

Son muchas las líneas celulares establecidas para peces. Las siguientes son las necesarias para ensayos de los patógenos de peces mencionados en el Código Acuático de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Tabla V).

Tabla V.- Líneas celulares de peces para ensayos oficiales de la OIE

Línea celular	Nombre completo	Especie	Morfología
BF-2	<i>Bluegill fry</i> (Células de pedúnculo de cola de carpa)	Mojarra oreja azul (<i>Leponis macrochirus</i>)	Fibroblástica
CHSE-214	<i>Chinook salmon embryo</i> (Células embrionarias de salmón real)	Salmón real (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Epitelial
EPC	<i>Epitelioma papullusum cyprini</i> (Papiloma epitelial de carpa)	Carpita cabeza (<i>Pinephales promelas</i>)	Epitelial
RTG-2	<i>Rainbow trout gonad</i> (Gónada de trucha arcoíris)	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Fibroblástica
FHM	Fathead minnow (Línea epitelial de carpita cabeza)	Carpita cabeza (<i>Pinephales promelas</i>)	Epitelial
GF	<i>Blue striped Grunt fin</i> (Aleta de ronco catire)	Ronco catire (<i>Haemulon sciurus</i>)	Fibroblástica
SHK-1	<i>Salmon head kidney</i> (Riñón anterior de salmón)	Salmón atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Leucocítica
ASK	<i>Atlantic salmon kidney</i> (Riñón de salmón)	Salmón atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Leucocítica

En cuanto a los medios de cultivo, el medio usado más ampliamente para el cultivo de células de peces es el tradicional medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con sales de Earle y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibióticos y 2mM de L-glutamina.

No obstante, el medio de Stocker, que es una forma modificada del medio anterior con doble concentración de algunos aminoácidos y vitaminas, se recomienda particularmente para aumentar el crecimiento celular, empleando los mismos suplementos que los arriba indicados más un 10% de triptosa fosfato.

Alternativamente, para algunas líneas celulares, se puede usar el medio de Leibovitz (L15) suplementado con SFB al 5 ó 10%, L-glutamina (4mM) y gentamicina (50 µg/ml).

Para el crecimiento celular, el contenido normal de SFB en el medio es del 10%, mientras que para el aislamiento de virus o para la producción de virus el SFB puede reducirse hasta el 2%. De modo similar, el pH del medio de cultivo para el crecimiento de las células es de 7,3-7,4 y se ajusta a 7,6 para la producción de virus o para el ensayo de virus.

La composición de la mezcla de antibióticos utilizada con más frecuencia es penicilina (100 IU/ml) y dihidroestreptomicina (100 µg/ml). Si se espera una contaminación por hongos puede usarse nistatina u otros antifúngicos (50 IU/ml). Se pueden emplear otros antibióticos y otras concentraciones de antibióticos según la conveniencia dependiendo de la sensibilidad antibiótica de las cepas bacterianas encontradas.

III.3.2.- Línea celular SAF-1

Desde la primera descripción de una línea celular de peces (Wolf y Quimby, 1962), se han desarrollado un gran número de éstas. Su principal aplicación ha sido el aislamiento, identificación y estudio de virus que provocan brotes epizooticos, causando pérdidas económicas (Nicholson, 1989; Bols, 1991).

En los últimos años, la dorada se ha convertido en la especie más importante para la acuicultura marina en los países mediterráneos europeos. Por tanto, se ha puesto mucho interés en mejorar su producción, mediante técnicas genéticas y/o previniendo enfermedades bacterianas y víricas. Sin embargo, antes de la creación de esta línea celular estable, ningún enfoque había sido adecuadamente estudiado *in vitro*, debido a la falta de líneas celulares apropiadas.

Solamente se habían usado líneas celulares heterólogas, hasta entonces, en estudios de patogenia (Balebona y cols., 1995) y no se había intentado nada en el campo de la genética.

Por estas razones, era necesario el establecimiento de una línea específica para la dorada para probar la susceptibilidad de esta especie a virus y bacterias, realizar ensayos *in vitro* en planes de manipulación genética, así como otras aplicaciones potenciales.

En 1997, Bejar y cols. establecieron esta línea celular de fibroblastos de aleta de dorada. Para evaluar la utilidad de la línea SAF-1 para diagnóstico virológico se evaluó su habilidad para permitir la replicación de varios virus comunes en peces.

Se valoró el efecto citopático en las células 7 días post inoculación. Aunque la línea funcionó para todos los virus probados, se detectó una mayor susceptibilidad para Rabdovirus, especialmente para IHNV (necrosis

hematopoyética infecciosa), donde se observa efecto citopático dentro de los dos primeros días.

En cuanto a los productos extracelulares, la mayoría de los ECPs de diferentes especies del Género *Vibrio* probados son citotóxicos para SAF-1. Los efectos citotóxicos pueden verse 3-6 horas después de la inoculación, aunque los resultados se recogen hasta 24 horas después para evitar descartar efectos positivos que se produzcan más tarde.

Los cambios morfológicos detectados son similares a los del efecto citopático que se produce por los virus. Las células se redondean, encogen y se pierden las uniones y finalmente se destruye la monocapa, además debido al efecto de los productos extracelulares de algunas especies del Género *Vibrio*, se forman numerosas vesículas y formaciones dendríticas.

Muchas ventajas hacen que esta línea sea fácil de mantener:

1. Buena adaptación para el crecimiento con un medio estándar sin requerimientos especiales, como añadir NaCl, que suele ser necesario para otras células marinas.
2. Su habilidad para el crecimiento óptimo con una concentración de SFB del 5%, lo que es muy inusual en peces.
3. La temperatura óptima de 25°C permite el mantenimiento a temperatura ambiente sin estufas especiales (en zonas donde el clima lo permite habitualmente).
4. Una tasa de supervivencia de las células congeladas del 50%, siendo mayor que la descrita para otras líneas celulares de peces.

A una temperatura de incubación apropiada, la línea celular SAF-1 permite la replicación de los virus causantes de la necrosis pancreática infecciosa, necrosis hematopoyética infecciosa y septicemia viral hemorrágica. Por tanto, es útil en el aislamiento y estudio de virus no detectados en esta especie y otros espáridos.

III.3.3.-Aplicación de métodos de cultivo celular en la sanidad animal en acuicultura

Varios métodos de cultivo celular y ensayos *in vitro* asociados, que analizan los mecanismos biológicos (por ejemplo, respuestas inmunitarias) son útiles para la aplicación de medidas preventivas y de control de enfermedades en acuicultura. Los modelos *in vitro* son sistemas experimentales que permiten un mayor control de las condiciones de los ensayos, reduciendo también la variabilidad de respuestas debido a las inevitables reacciones al estrés, en las que las interacciones entre agresores y hospedador pueden ser analizadas. Estos métodos están siendo aplicados para estandarizar y validar métodos de diagnóstico, y para desarrollar nuevas metodologías de control de enfermedad seguras, terapéuticas y efectivas (Villena, 2003). Se han desarrollado un número considerable de líneas celulares de peces (Fryer y Lannan, 1994), pero hay muy pocas disponibles para especies de mariscos (Tapay y cols., 1995; Chen y Wang, 1999a; Neumann y cols., 2000b).

III.3.4.- Métodos de cultivo celular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Los métodos de cultivo celular son herramientas esenciales para el diagnóstico de enfermedades víricas en granjas de acuicultura (Wolff, 1988; Hetrick y Hedrick, 1993). Estas técnicas se basan principalmente en el uso de líneas celulares sensibles a los diferentes virus (Ahne, 1985; Hetrick y Hedrick, 1993; O.I.E, 2000), en las que la infección viral se demuestra por el efecto citopático (debido a la lisis celular) o sincitial (producido por la fusión de células). Además, la infección viral *in*

in vitro de líneas celulares susceptibles facilita varias técnicas serológicas para la vigilancia y diagnóstico de enfermedades víricas (O.I.E, 2000), incluyendo la detección de anticuerpos de peces contra virus patógenos por medio del test de neutralización viral (LaPatra, 1996). La susceptibilidad de las líneas celulares a un virus concreto no tiene que estar relacionada con la susceptibilidad *in vivo* a la enfermedad, y varias líneas celulares que no proceden de salmónidos se usan rutinariamente para el diagnóstico de enfermedades virales de salmónidos (Lorenzen y cols., 1999a; Hostnik y Jencic, 2000).

Como el efecto citopático/sincitial puede llevar varios días, y en algunos casos no ocurren los mismos efectos bajo algunas condiciones de cultivo, en los últimos diez años los métodos serológicos que usan anticuerpos monoclonales (Nicholson, 1993; Lorenzo y cols., 1995) y las técnicas de biología molecular, como la PCR (Miller y cols., 1998a), o combinación de ambas (Estepa y cols., 1995), se han utilizado para hacer más rápido el diagnóstico de virus de peces.

El cultivo celular se ha usado también para la detección de algunas bacterias intracelulares patógenas para peces, como en *Rickettsia* spp. (Fryer y Lannan, 1996) y *Renibacterium salmoninarum* (McIntosh y cols., 1997). Una característica compartida por estos microorganismos es que son de crecimiento complicado en medios de cultivo bacteriológicos, pero puede crecer en una semana en la línea celular con origen en epitelio de carpa (EPC), un pez que no es susceptible al patógeno (McIntosh y cols., 1997). El patógeno crece intracelularmente en las células EPC, y este método de cultivo también permite la expresión de factores de virulencia específicos de *R. salmoninarum* y el mantenimiento de la virulencia *in vitro* de los aislados (McIntosh y cols., 1997).

El uso de cultivos celulares es clave para estudiar la biología y mecanismos patogénicos de virus cultivables que afectan a la acuicultura (Wolff, 1988; Hetrick y Hedrick, 1993; Bernard y Bremont, 1995; Essbauer y Ahne, 2001). Estos estudios no incluyen solo procedimientos diagnósticos, sino también análisis de las interacciones entre virus de peces y sus células hospedadoras para identificar alguno de los mecanismos involucrados en los diferentes pasos de la infección viral.

Sin embargo, los métodos de cultivo celular también se han desarrollado para estudiar factores de virulencia de bacterias (Toranzo y Barja, 1993; Austin y Cross, 1998; Austin y Austin, 1999) y parásitos (Nielsen y Buchmann, 2000; Buchmann y cols., 2000; Nolan y Johnson, 2000) patógenos de peces. Gran parte de los estudios sobre patogenicidad bacteriana se han centrado en los efectos citotóxicos de los productos extracelulares en células de peces para identificar factores de virulencia (Villena, 2003).

Además, los métodos de cultivo celular han dado un conocimiento más profundo sobre los mecanismos de la interacción hospedador-patógeno para algunas bacterias patógenas. Los ensayos *in vitro* se han usado para analizar los mecanismos de patogenicidad incluidos en los diferentes estadios de las enfermedades, como fijación bacteriana y entrada en el hospedador, anulación de los mecanismos de defensa e infección (Evensen y cols., 1993; Austin y Austin, 1999). Este es el caso de bacterias que son patógenos intracelulares obligados o facultativos como *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., algunas *Aeromonas* spp., o *Renibacterium salmoninarum*. Al mismo tiempo, la combinación de cultivo celular y métodos de biología molecular aportan nuevas y útiles herramientas para la investigación de patógenos y hospedador (Villena, 2003), como se ha demostrado con *Edwardsiella tarda* (Ling y cols., 2000). En este estudio, cepas virulentas y

avirulentas se transformaron con plásmidos que contenían proteínas fluorescentes verdes (GFP) y azules (BFP), y la bacteria marcada se usó para examinar los mecanismos moleculares subyacentes a la adhesión e invasión *in vitro* de células EPC.

III.3.5.- Estudios de adherencia e invasión celular

En general, al ser un procedimiento donde se tienen controlados todos los pasos, el cultivo celular se ha establecido como método de referencia para dilucidar las distintas etapas que se producen en la colonización y difusión de los tejidos por parte de distintos patógenos. Actualmente, los estudios de adherencia e invasión celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, se usan para profundizar en diferentes aspectos de la patogenia de las enfermedades infecciosas.

En el establecimiento de la infección de bacterias patógenas se requiere de la adhesión a células del hospedador, colonización de los tejidos, y en determinados casos, la invasión celular seguida de la multiplicación intracelular, diseminación a otros tejidos o persistencia (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

La adherencia bacteriana ocurre entre moléculas de superficie del microorganismo, que pueden ser fimbriales o afimbriales, y receptores del huésped generalmente constituidos por glicolípidos o glicoproteínas.

La unión a la célula puede conducir a alteraciones estructurales y/o funcionales de las proteínas del hospedador y a la activación de mecanismos celulares que incluyen a la invasión del patógeno a células y tejidos, facilitando no solo la entrada de patógenos a las células del huésped, sino que así también estos puedan escapar de la acción de ciertos antibióticos y de la respuesta inmune (Preissner y Shingh, 2000; Tran Van y Sansonetti, 2000).

Entre las estrategias usadas por las bacterias patógenas para adherirse a células no fagocíticas destacamos las siguientes:

- Adhesinas: Las adhesinas son componentes de la superficie celular o apéndices bacterianos que facilitan la adhesión. En bacterias Gram negativas, la gran mayoría de sus fimbrias funcionan como adhesinas, pero en muchos casos la verdadera adhesina es una proteína de una subunidad menor en la punta de la fimbria. Por el contrario, en bacterias Gram positivas, proteínas de superficie o polisacáridos actúan como adhesinas específicas. Diversas adhesinas microbianas pueden mediar la unión a los tejidos, al inicio de la infección, pudiendo unirse a células no fagocíticas o a la matriz extracelular y muchos microorganismos invasivos entran a la célula del huésped después de unirse a estructuras de superficie. Existen una gran cantidad de adhesinas bacterianas, incluyendo componentes de la matriz extracelular como colágeno, lamininas, elastina, proteoglicanos e hialuronos.

- Pili o fimbrias: El mecanismo más conocido de adherencia bacteriana involucra la formación de enlaces mediados por proteínas fibrilares denominadas pili o fimbrias. Un pilus se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica. Los pili son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedadora. La punta de los pili media en la adherencia bacteriana uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células de los tejidos. Por lo general, estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria consiste en mantener unidas a las células de los tejidos. La unión de los pili a su célula diana es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del

hospedador determinan el tipo de bacterias que colonizan la zona implicada. En algunos casos, la unión “específica” entre el carbohidrato superficial de la célula hospedadora y el extremo distal del pilus depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fibrilla. No obstante, numerosas reacciones de adhesión se basan en la participación directa de la pilina (Deitsch y cols., 1997; Finlay y Falkow, 1997; Hacker y cols., 1997).

- Adhesinas no fimbriales: Algunas bacterias poseen proteínas superficiales cuya estructura y proceso de ensamblaje difieren de los observados en los pili, aunque también funcionan eficazmente como determinantes de adherencia. Dichas sustancias reciben genéricamente el nombre de “adhesinas no fimbriales” y su participación suele ser independiente de la ausencia o presencia de pili. Además, buena parte de ellas reconocen como sus receptores a ciertas proteínas superficiales de tejidos diana en lugar de unirse a carbohidratos (Hacker y cols., 1997; Edwards y Puente, 1998). Dado que prácticamente todos los estudios asociados a los pili se han realizado en bacterias Gram negativas, aún persisten diversas dudas acerca de estas estructuras de adherencia en las bacterias Gram positivas.

La capacidad de ciertas bacterias de invadir células no fagocíticas (epiteliales o fibroblásticas) es considerada como un factor de virulencia importante de varias bacterias patógenas humanas como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995), *Listeria* (Cossart y Lecuit, 2000), *Brucella abortus* (Pizarro-Cerdá y cols., 2000).

Este tipo de estudios de adherencia e invasión se ha llevado a cabo en multitud de especies bacterianas, como los realizados con: *Haemophilus influenzae*, donde se demostró capacidad invasiva en células humanas (Ketterer y cols., 1999), *Klebsiella pneumoniae* (Oelschlaeger y Tall, 1997), donde además de demostrar la

capacidad de invadir células epiteliales, describieron que la despolarización de microfilamentos de actina inhibía su internalización, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (Harvey y cols., 1997; Edwards y cols., 2000), *Campylobacter jejuni* como invasora de células intestinales de origen humano (Monteville y Konkel, 2002; Monteville y cols., 2003) y *Hafnia alvei* en células HeLa (Padilla y cols., 2008). Para todos estos patógenos, se asume que la internalización bacteriana es un mecanismo de virulencia.

Entre los patógenos de peces, la capacidad de invadir células no fagocíticas está demostrada en *Aeromonas hydrophila* (Leung y cols., 1996; Tan y cols., 1998), *Vibrio anguillarum* (Wang y cols., 1998), *Yersinia ruckeri* (Romalde y Toranzo, 1993; Tobback y cols., 2009), *Streptococcus iniae* (El Aamri y cols., 2012) y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Magariños y cols., 1996; López-Dóriga y cols., 2000).

Los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia intracelular de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en los tejidos de peces son poco conocidos, a pesar del uso de modelos *in vivo* e *in vitro*.

La internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* está descrita en células no fagocíticas de carpa, pez gato, carpita cabeza y salmón (Magariños y cols., 1996^a y b; López-Dóriga y cols., 2000) y se ha hallado un bajo índice de replicación intracelular (Elkamel y Thune, 2003) en algunas de estas líneas celulares de peces.

En dichas líneas celulares, se considera que la invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es ligera o moderada. La bacteria invade las células y permanece viable en el interior celular durante al menos dos días. No existe correlación entre los índices de adherencia e invasión, es decir, no siempre la cepa bacteriana que más se adhiere es la más invasiva (Magariños y cols., 1996b)

De forma similar a lo que ocurre con otras bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (Plotkowski y cols., 1994) y *Haemophilus ducreyi* (Totten y cols., 1994), la invasión por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la línea celular CHSE-214 puede inhibirse con citocalasina D, indicando que la internalización requiere de un mecanismo dependiente de la formación de microfilamentos de actina (Magariños y cols. 1996b).

III.4.- Aplicaciones de la inmunofluorescencia al estudio de la adherencia, invasión y tráfico intracelular

El uso de anticuerpos con derivados fluorescentes para la detección de trazas de antígenos fue introducido por Coons en el año 1941.

Una reacción inmunológica del tipo de unión antígeno-anticuerpo puede ser puesta en evidencia por la emisión de fluorescencia si se utiliza en ella anticuerpos unidos a radicales orgánicos con propiedades fluorescentes y se hace uso de un microscopio de fluorescencia para visualizarla.

Dicha fluorescencia consiste en la propiedad de ciertas sustancias, denominadas fluorocromos, de emitir luz de mayor longitud de onda de la que reciben mientras dura la excitación con la luz incidente.

El fluorocromo es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorocromo como de su ambiente químico. Las sustancias fluorescentes pueden contener tanto un fluorocromo, el

grupo excitable lumínicamente, como otras partes no excitables, denominadas fluoróforos.

Esta tecnología es particularmente importante en el campo de la bioquímica y de los estudios sobre proteínas, por ejemplo en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica; o en el análisis de ADN, mediante la técnica de PCR en tiempo real.

La inmunofluorescencia es una herramienta muy útil para el diagnóstico en enfermedades infecciosas, ya que proporciona un diagnóstico rápido. Desde Coons en 1960 hasta la actualidad, las aplicaciones de esta técnica, han sido de vital importancia.

El uso de anticuerpos fluorescentes se considera un método estándar de identificación de muchos patógenos importantes en medicina humana, como *Legionella* spp. (Blyth, 2009) o por ejemplo de los que se pueden considerar causantes de enfermedades emergentes o reemergentes o pueden utilizarse como armas biológicas como: *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, virus del dengue, virus ébola, virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del valle del Rift (Peruski y Peruski, 2003).

La inmunofluorescencia tiene especial aplicación en la detección de virus en medicina humana: virus respiratorio sincitial, Influenza A y B, Adenovirus, Parainfluenza (tipos 1-4), Herpes simplex y Citomegalovirus (Madeley y Peiris, 2002).

En peces, es una técnica de diagnóstico oficial (junto a ELISA y la seroneutralización viral) para septicemia hemorrágica viral (VHS) y necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) (DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 22 de febrero

de 2001 por la que se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces y se deroga la Decisión 92/532/CEE).

Además, se utiliza en el diagnóstico de otras enfermedades víricas no incluidas en la lista de la OIE, como encefalopatía y retinopatía viral (causada por betanodavirus), y necrosis hematopoyética epizoótica (EHN).

La inmunofluorescencia también tiene su aplicación en el diagnóstico de enfermedades de peces causadas por bacterias como: *Flavobacterium psychrophilum* (Lorenzen y Karas, 1992), *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* (OIE).

La inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales se ha usado con éxito en la detección de *Streptococcus iniae* en tejidos (Klesius y cols., 2006).

Panangalal y cols. (2006) desarrollaron una técnica de inmunofluorescencia indirecta que permite detectar simultáneamente dos patógenos de peces, como *Edwardsiella ictaluri* y *Flavobacterium columnare*, usando fluorocromos con diferentes espectros de emisión, Alexa Fluor 488 y 594, emitiendo en verde y rojo, respectivamente.

La inmunofluorescencia es una técnica útil para el estudio de la relación patógeno-hospedador. La supervivencia de patógenos intracelulares dentro del hospedador viene determinada por la evasión microbiana, que puede ser parcialmente atribuida a sus estrategias de tráfico intracelular. Las técnicas de microscopía han ido cobrando importancia para entender la biología celular de las infecciones microbianas. Estas técnicas pueden usarse para la localización subcelular de antígenos en cultivos celulares y en tejidos (van der Wel y cols., 2005).

Un ejemplo de tráfico intracelular habitual de una bacteria dentro de una célula no fagocítica sería el que sigue *Brucella abortus*. Hablamos de un patógeno intracelular facultativo que favorece su propia internalización en este tipo de células. Inicialmente, la bacteria interactúa con compartimientos de la cascada endocítica temprana. Luego, rápidamente se asocia con la cascada autofagocítica. En fases más tardías de la infección, *Brucella* prolifera en el retículo endoplasmático de las células hospedadoras (Pizarro-Cerdá y cols., 2000). La técnica de inmunofluorescencia para marcar estructuras que se forman durante el tránsito intracelular bacteriano es útil para dilucidar las distintas fases. El EEA-1 y el LAMP-1 son marcadores utilizados para poder evidenciar este tipo de estructuras en multitud de estudios relacionados con el tráfico intracelular, tanto en macrófagos como en líneas no fagocíticas.

El EEA-1 "*early endosomal auto-antigen 1*" es un marcador específico de membranas de endosomas primarios o vacuolas. Por lo tanto, se localizará en estructuras de tipo vacuolar, que marcarán el borde de un compartimento donde se encuentren partículas que hayan entrado en el interior celular.

El LAMP-1 "*Lysosomal-associated membrane protein 1*" es una proteína presente en la membrana de endosomas tardíos y lisosomas. La presencia de LAMP-1 sugiere que la partícula está en compartimentos lisosomales dentro de la célula.

Muchos estudios han empleado la inmunofluorescencia utilizando anticuerpos frente EEA-1 y LAMP-1 para tratar de marcar dichas estructuras (con la ayuda de un anticuerpo secundario fluorescente) y conocer el tráfico intracelular de virus, bacterias o proteínas. Es el caso del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (Van Gorp y cols., 2009), Parvovirus (Harbison y cols., 2009),

Clostridium perfringens (Nagahama y cols., 2012), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Nazareth y cols., 2015), *Bordetella pertussis* (Lamberti, 2010), *Brucella abortus* (Bellaire y cols., 2005) y Péptido C (Luppi y cols., 2009).

López-Doriga y cols. (2000) observaron, mediante microscopía electrónica de transmisión, que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no estaba libre en el citoplasma de las células de la línea celular de carpa EPC, sino dentro de grandes vacuolas citoplasmáticas. Por tanto, la inmunofluorescencia utilizando anticuerpos frente a EEA-1 y LAMP-1 puede ser útil para tratar de elucidar si determinadas estructuras está involucradas en el tráfico intracelular de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la línea celular no fagocítica SAF-1.

III.5.-Sistema inmunitario de peces

El sistema inmunitario de los peces es fisiológicamente similar al de los vertebrados superiores, a pesar de ciertas diferencias. Al contrario de lo que ocurre con los vertebrados superiores, los peces son organismos de vida libre que desde las primeras etapas embrionarias de la vida dependen de su sistema inmunitario innato para la supervivencia (Rombout y cols., 2005). La inmunidad inespecífica es un mecanismo de defensa fundamental para el pez, y además, desempeña un papel clave en la respuesta inmunitaria adquirida y la homeostasis a través de un sistema de proteínas receptoras. Estas proteínas receptoras identifican patrones moleculares que son típicos de microorganismos patógenos, incluyendo los polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos bacterianos, ADN, ARN viral y otras moléculas que no están normalmente en la superficie de organismos multicelulares. Esta respuesta se divide en barreras físicas y respuesta inmunitaria celular y humoral. Estos parámetros inmunológicos incluyen los inhibidores de crecimiento, enzimas líticas, sistema del complemento, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas y péptidos antibacterianos. Los cambios de temperatura, el estrés, el manejo y la densidad del cultivo pueden tener efectos supresores sobre este tipo de respuesta, mientras que los alimentos, varios aditivos e inmunoestimulantes pueden mejorar su eficiencia (Magnadottir, 2006 y 2010).

III.5.1.- Inmunidad celular no específica

El componente celular de las defensas inmunitarias inespecíficas de los peces incluye a las células fagocíticas móviles (macrófagos y granulocitos) que son reclutadas de la sangre y de los tejidos linfoides, las células eosinofílicas granulares, que son menos móviles y están presentes en sitios mucosos como el intestino o las branquias y son consideradas análogas a los mastocitos de los mamíferos, y a las

células citotóxicas no específicas, consideradas el equivalente funcional en los peces de las células NK (*Natural Killer*) de los mamíferos.

La fagocitosis es uno de los procesos defensivos más importantes en los animales poiquiloterms, porque es el proceso que está menos influenciado por la temperatura (Blazer, 1991; Lange y Magnadottir, 2003; Magnadottir y cols., 2005). Las principales células implicadas en la fagocitosis en los peces son los neutrófilos y los macrófagos (Secombes y Fletcher, 1992). Estas células eliminan las bacterias principalmente por la producción de reactivos del oxígeno en un mecanismo conocido como explosión respiratoria. Además, los neutrófilos poseen mieloperoxidasa en sus gránulos citoplasmáticos, que en presencia de peróxido de haluro de hidrógeno mata a las bacterias por halogenación de su pared celular. Por otra parte, estas células tienen lisozimas y otras enzimas hidrolíticas en sus lisosomas (Fischer y cols., 2006). Del mismo modo, los macrófagos pueden producir óxido nítrico, que durante el proceso de la explosión respiratoria se une con el superóxido (O_2^-) para producir el peroxinitrito, un radical libre muy potente como agente antibacteriano (Ischiropoulos y cols., 1992; Carreras y cols., 1994).

Varios patógenos bacterianos pueden inducir o inhibir la apoptosis de las células hospedadoras. La modulación de las vías celulares que resulta en la inducción o el retraso de la apoptosis de la célula huésped es un mecanismo importante de la virulencia bacteriana (Cotran y cols., 1999; Häcke y cols., 2002). Estos procesos pueden ser mediados por diferentes vías de señalización de células anfitrionas que están subvertidos por las bacterias. Los patógenos pueden activar las proteínas apoptóticas tales como caspasas e inactivar proteínas anti-apoptóticas como $Nf-kB$. Sobre la base de sus funciones principales, se pueden agrupar las caspasas en dos subfamilias, pro-apoptóticas y proinflamatorias (Li y Yuan, 2008).

Caspasas pro-apoptóticas (caspasa-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) son conocidas por estar principalmente involucradas en la mediación de la transducción de la señalización de la muerte celular, mientras que las caspasas pro-inflamatorias (caspasa-1, -4, -5, -11, -12) regulan la maduración de citoquinas durante la inflamación.

Durante la infección, la invasión y la transcitosis bacteriana pueden producir efectos citotóxicos sobre las células que se pueden evaluar mediante la medición de lactato deshidrogenasa (LDH), un marcador de la muerte celular (Nizet y cols., 1996). Para varios patógenos estreptocócicos, ha sido reconocido la capacidad para inducir la lesión de las células hospedadora, que se considera un primer paso en la patogénesis (Gibson y cols., 1999; Charland y cols., 2000; Fuller y cols., 2001).

III.5.2.- Citoquinas

Las citoquinas son un grupo de proteínas glicosiladas, generalmente de bajo peso molecular, secretadas por células inmunitarias. Como moduladores de la respuesta inmunitaria, las citoquinas se han estudiado poco en los peces y un número significativo son funcionalmente activas en los teleósteos (Secombes, 1996). Las citoquinas tienen funciones superpuestas y pleiotrópicas, lo que dificulta su clasificación. Pueden dividirse en interleuquinas (ILs), interferones (IFNs), factores de necrosis tumoral (TNFs), factor estimulante de las colonias y quimioquinas.

Según sus funciones, se puede clasificar las citoquinas en diferentes familias tales como, linfoquinas, factores de crecimiento, interferones, quimioquinas e interleuquinas (IL) (Savan y cols., 2003).

III.5.2.1.- Interleuquinas

Su principal función es regular la activación, diferenciación o proliferación de los linfocitos, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis y la producción de otras citoquinas. Pocas IL han sido clonadas en peces debido a su baja homología con las IL humanas y al hecho de que aparecen en el organismo solo en respuesta a determinados estímulos. En este trabajo nos vamos a centrar sobre la interleuquina 1 beta (IL-1 β) y su receptor IL-1r2.

La interleuquina-1 (IL-1), miembro importante del grupo de las citoquinas pro-inflamatorias, puede ser producida por monocitos, macrófagos activados, granulocitos, células endoteliales, linfocitos T y otras células. La IL-1 α e IL-1 β se han caracterizado en peces, así como en diferentes grupos animales como aves, anfibios y mamíferos (Secombes y cols., 2001). Es un mediador importante de la inflamación en respuesta a la infección y se ha descrito que en la trucha afecta directamente a la función del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, estimulando la secreción del cortisol (Holland y cols., 2002).

III.5.2.2.- Factor de necrosis tumoral

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina pro-inflamatoria que pertenece a la superfamilia de mediadores que llevan su nombre, donde el TNF- α es el más conocido. El TNF puede ser producido, entre otros, por monocitos, macrófagos activados, granulocitos, células endoteliales y linfocitos T y juega un papel importante en la inflamación, organogénesis, diferenciación, apoptosis celular, siendo el principal mediador del shock séptico y de la caquexia (Idriss y Naismith, 2000).

III.5.2.3.- Interferón

Los interferones son proteínas o glicoproteínas que producen distintos tipos celulares como respuesta a estímulos diversos entre los que destacan las infecciones víricas. Además de sus propiedades antivirales, el interferón tiene un efecto regulatorio en la activación de los macrófagos y la proliferación de células T y B (Shao y cols., 2001). Se distinguen tres clases de interferones según sus características estructurales y biológicas: interferón α o tipo leucocitario, interferón β o tipo fibroblástico e interferón γ o tipo inmune, producido por linfocitos T y células NK. Los interferones α y β , también conocidos como interferones tipo I, poseen propiedades antivíricas, anti-proliferativas e inmunomoduladoras, mientras que los interferones γ , producidos por los linfocitos T en respuesta a estímulos antigénicos, actúan únicamente como inmunomoduladores.

III.5.2.4.- Quimioquinas

Las quimioquinas son moléculas atractivas que dirigen la migración leucocitaria e intervienen en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, fundamentalmente en procesos inmunitarios e inflamatorios (Mantovani, 1999; Zlotnik y Yoshie, 2000). Son proteínas de bajo peso molecular (de aproximadamente 70 aminoácidos), secretadas por diversas células e involucradas en la migración y activación de leucocitos, en los procesos de angiogénesis, en la producción de colágeno y en la proliferación de los precursores hematopoyéticos. Se clasifican de acuerdo a la posición relativa de sus residuos cisteína N-terminal. Las dos familias más importantes y más estudiadas son las quimioquinas-CXC (cuando los dos residuos de cisteína están separados por un aminoácido) y las quimioquinas-CC (ambas cisteínas están unidas).

III.5.3.- Proteína Mx

Las proteínas Mx pertenecen a la familia de GTPasas y son proteínas inducidas por el interferón tipo I en vertebrados en respuesta a la infección por myxovirus. La inducción de Mx no se debe solo a virus sino también a lipopolisacáridos de membrana, a ADN sintético y también en respuesta a vacunas inactivadas frente a bacterias (Acosta y cols., 2004). La presencia y conservación de estas proteínas en mamíferos, aves, y peces teleósteos, sugiere su importancia en los mecanismos de defensa frente a virus (McBeath y cols., 2007).



MATERIAL Y MÉTODOS

IV- MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.- Origen y conservación de las cepas de *Photobacterium damsela* subespecies *piscicida* utilizadas

Las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizadas en este trabajo fueron cuatro, dos pertenecientes a nuestra colección de cepas clínicas (C2 y 94/99), otra de la colección de la Universidad de Santiago de Compostela (DI-21), y la última perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC 17911). Los datos de estas cepas se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.- Cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizadas

Cepa	Origen	País de aislamiento	Fuente/Referencia
C2	Dorada(<i>Sparus aurata</i>)	España	Real y cols.,1997
94/99	Dorada(<i>Sparus aurata</i>)	España	Real y cols., 1999
DI-21	Dorada(<i>Sparus aurata</i>)	España	Toranzo y cols., 1991
ATCC 17911	Perca blanca (<i>Morone americanus</i>)	USA	ATCC, 1968

Para el cultivo de las diferentes cepas y su utilización en el laboratorio se usaron varios medios de cultivo, que fueron el Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) (Cultimed), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Cultimed) suplementados con un 1,5% de NaCl (Panreac), los cuales se prepararon según las instrucciones del fabricante. También se utilizó como alternativa, el medio Base de Agar Sangre (BAB) suplementado con un 5% de sangre desfibrinada de oveja, conteniendo un 1,5% de NaCl adicional. Las cepas fueron incubadas a 25°C en ambiente aerobio durante 48 horas.

Todas las cepas fueron sometidas a análisis morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares para comprobar sus características fenotípicas y su taxonomía.

Para su conservación, cepas en cultivo puro se resuspendieron en BHIB adicionado con un 15% de glicerol y fueron congeladas a -80°C.

IV.2.- Línea celular

La línea celular SAF-1 es una línea estable de fibroblastos de aleta de dorada. Ha sido previamente caracterizada por investigadores españoles (Béjar y cols., 1997), y nos fue proporcionada por el Dr. José García de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Se cultivó usando medio Leibovitz (L15) (Sigma) (pH 7,2) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado previamente tras incubación a 56°C en baño María durante 30 minutos.

Las células se incubaron a 25°C en una estufa sin atmósfera de CO₂. Cuando las células alcanzaron su máximo nivel de confluencia, se realizaron pases celulares utilizando una solución de tripsina-EDTA (Sigma).

IV.3.- Ensayos de invasión bacteriana

Los ensayos de invasión bacteriana se basaron en una modificación de los trabajos descritos con anterioridad por Pizarro-Cerdá y cols. (2002) y Padilla y cols. (2008).

Las células SAF-1 fueron cultivadas a 25°C en placas de 24 pocillos (Corning Costar, Corning Incorporated, USA) con una densidad de 10⁵ células por pocillo, alcanzada en unas 24 horas. Las cuatro cepas usadas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se cultivaron en BHIB con 1,5% de NaCl durante 48 horas a 25°C. Los ensayos realizados se describen a continuación.

IV.3.1.- Evaluación del efecto del tiempo de infección en la internalización

Este ensayo se realizó para tratar de averiguar cuánto tiempo necesita *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* para penetrar en las células SAF-1.

Para realizar la infección celular, añadimos 5 µl del cultivo bacteriano (de la cepa que corresponda) a cada pocillo con las células SAF-1 con 500 µl de medio L15 (pH 7,2) suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Posteriormente centrifugamos a 500 rpm durante 4 minutos para facilitar el contacto entre célula y bacteria e incubamos las placas a 25°C.

Transcurridos distintos tiempos postinfección (30, 60 y 90 minutos), las bacterias externas no adheridas (suspendidas en el medio) se retiraron realizando 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS), mediante succión cuidadosa con pipeta.

Después, las células se incubaron durante 2 horas con medio que contenía gentamicina (100 µg/ml) para eliminar las bacterias adheridas al tapiz celular. Tras este periodo, se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS y se añadieron 100 µl de

Tritón X-100 (1% en PBS) a cada pocillo durante 5 minutos, para provocar la lisis de las células.

Se realizaron diluciones seriadas del contenido de los pocillos y se sembraron alícuotas de 10 µl en placas de BHI Agar con 1,5% de NaCl, incubándose durante 48 horas a 25°C, para poder realizar el recuento de bacterias.

IV.3.2.- Determinación del efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión

El objetivo de este ensayo es determinar la existencia de receptores celulares implicados en la invasión celular y su posible saturación al aumentar la concentración del inóculo inicial.

Para determinar el efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión (entendida como el porcentaje de inóculo inicial internalizado), se utilizaron 3 volúmenes diferentes de inóculo de cada cepa bacteriana: 1 µl, 5 µl y 25 µl con un tiempo de infección de 90 minutos.

Tras este tiempo, las bacterias externas no adheridas (suspendidas en el medio) se retiraron realizando 3 lavados con PBS, mediante succión cuidadosa con pipeta, y posterior incubación durante 2 horas con medio L15 con gentamicina (100 µg/ml). Tras este periodo, se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS y se añadieron 100 µl de Tritón X-100 (1% en PBS) a cada pocillo durante 5 minutos, para lisar el tapiz celular.

Se realizaron diluciones seriadas del contenido de los pocillos y se sembraron alícuotas de 10 µl en placas de BHI Agar con 1,5% de NaCl, incubándose durante 48 horas a 25 °C, para poder realizar el recuento bacteriano.

IV.3.3.- Valoración de la supervivencia intracelular

El objetivo de este ensayo es determinar si *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, una vez producida la invasión celular, sobrevive, se multiplica o muere en el interior de las células SAF-1.

Para realizar la infección, añadimos 5 μ l del cultivo bacteriano (de la cepa que corresponda) a cada pocillo con el tapiz celular, con una confluencia aproximada del 70%, con 500 μ l de medio L15 (pH 7,2) suplementado con un 10% de SFB y posteriormente centrifugamos a 500 rpm durante 4 minutos para facilitar la adherencia celular y posterior invasión. Las placas se incubaron a 25°C.

Tras 90 minutos de contacto entre bacteria y células, las bacterias externas no adheridas (suspendidas en el medio) se retiraron realizando 3 lavados con PBS, mediante succión cuidadosa con pipeta.

Para estos experimentos de supervivencia intracelular de larga duración, tras matar las bacterias extracelulares usando gentamicina (2 horas, a 100 μ g/ml), el medio de cultivo se reemplazó por medio L15 con gentamicina a 10 μ g/ml, y las células infectadas se incubaron desde 24 horas a 7 días. El recuento de bacterias intracelulares se hizo cada 24 h, tras lavados con PBS y adición de 100 μ l de Tritón X-100 (1% en PBS) a cada pocillo durante 5 minutos.

Se realizaron diluciones seriadas del contenido de los pocillos y se sembraron alícuotas de 10 μ l en placas de BHI Agar con 1,5% de NaCl, incubándose durante 48 horas a 25 °C para el recuento en placa.

La tasa de replicación intracelular (índice IPRO) expresa la relación existente entre el número de bacterias intracelulares viables presentes a las 24 horas con las presentes tras 90 minutos postinfección. Un índice IPRO mayor a 2 expresa

proliferación activa, entre 1 y 2 indica ligera proliferación, y menor de 1 evidencia muerte celular.

Como control negativo, utilizamos la cepa no invasiva de *Escherichia coli* DH5- α . La integridad de las células infectadas fue examinada mediante microscopía durante todo el experimento (desde 24 horas a 7 días) y la viabilidad de las células se comprobó mediante tinción con azul tripán, donde las células alteradas adquieren color azul.

IV.3.4.- Implicación del citoesqueleto celular en la entrada de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Con el objetivo de saber si la penetración de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1 era llevada a cabo mediante la formación de microfilamentos de actina por parte del citoesqueleto celular, se diseñó este experimento, utilizando para ello la citocalasina D, un agente disruptor que inhibe la polimerización de los microfilamentos de actina.

La citocalasina D (1 μ g/ml) se utilizó antes de proceder a la infección para evitar la función del citoesqueleto y, por tanto, la entrada de la bacteria. Las células se preincubaron con el agente bloqueante durante 30 minutos.

Para realizar la infección celular, añadimos 5 μ l del cultivo bacteriano (de la cepa que corresponda) a cada pocillo con las células SAF-1 con 500 μ l de medio L15 (pH 7,2) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y luego centrifugamos a 500 rpm durante 4 minutos para mejorar el contacto entre célula y bacteria. Las placas se incubaron a 25°C.

Tras una infección de 90 minutos, las bacterias externas no adheridas (suspendidas en el medio) se retiraron realizando 3 lavados con PBS, mediante

succión cuidadosa con pipeta, y se incubaron durante 2 horas con medio L15 con gentamicina (100 µg/ml). Tras este periodo, se realizaron de nuevo 3 lavados con PBS y se añadieron 100 µl de Tritón X-100 (1% en PBS) a cada pocillo durante 5 minutos, para romper las células.

Se realizaron diluciones seriadas del contenido de los pocillos y se sembraron alícuotas de 10 µl en placas de BHI Agar con 1,5% de NaCl, incubándose durante 48 horas a 25 °C para el recuento en placa.

Se realizaron controles donde se manifestó que la citocalasina D no afectaba a la viabilidad de las células ni de las bacterias.

IV.3.5.- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana

El objetivo de este ensayo es determinar la intervención del metabolismo celular en el proceso de invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la línea celular SAF-1. Unos 20 minutos previos a la infección, incubamos una placa de cultivo celular de 24 pocillos a 4°C. Una vez infectados los pocillos, incubamos durante 90 minutos a 4°C y procedemos al recuento de bacterias intracelulares tras eliminación de bacterias adheridas con gentamicina. El control de la infección se realiza al mismo tiempo pero incubando a 25°C.

IV.3.6.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización

El objetivo de esta experiencia es determinar las tasas de internalización/invasión celular de las cepas en función de la temperatura de incubación (25°C - 20°C).

Las cepas usadas en este estudio se cultivaron en BHIB con 1,5% de NaCl durante 48 horas y se incubaron en estufa a 20°C y 25°C. Cada pocillo, a una confluencia del 80-90%, se infectó con 5µl de las diferentes suspensiones bacterianas. Una vez inoculadas, las placas se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos, y se incubaron a 25°C.

Transcurridos 90 minutos de incubación y tras la eliminación de bacterias adheridas con gentamicina, procedemos al recuento de bacterias intracelulares del mismo modo que en los apartados anteriores.

IV.3.7.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización bacteriana

En las células eucariotas, muchos receptores celulares son azúcares que son reconocidos por ligandos bacterianos por lo que de existir en este caso, si previamente bloqueamos estos ligandos adicionando azúcares durante la incubación de los inóculos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, se bloquearía la posterior unión con el receptor celular y se evitaría en parte la internalización celular de la bacteria. Para ello, preparamos los inóculos bacterianos en medio de cultivo BHIB suplementado con un 1,5% de NaCl y un 1% de glucosa, así como un inóculo control sin azúcares (lote testigo). Tras 48 horas de incubación con o sin azúcares, el ensayo prosigue como ensayos previos inoculando 5µl de las diferentes cepas y condiciones en placas de 24 pocillos con la línea celular SAF-1, observando tasas de invasión celular.

Además, la adición de un 1% de glucosa al medio de cultivo induce la formación de una capa capsular lipopolisacárida que produce un aumento en la virulencia en esta bacteria (Bonet y cols., 1994), por lo que pretendemos valorar si la presencia de esta capa afecta a los índices de invasión.

IV.4.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia

IV.4.1.- Análisis de la adherencia e internalización intracelular por inmunofluorescencia

Las células de la línea SAF-1 fueron depositadas en placas de 24 pocillos con una lentilla de vidrio de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo.

Para la infección se inocularon 5 µl del cultivo bacteriano de la cepa 94/99 por pocillo.

Tras la incubación de las células a 25°C durante 90 minutos (o de 1 a 7 días), se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron con paraformaldehído frío (4% en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las lentillas con las células fijadas fueron extraídas cuidadosamente de los pocillos y depositadas en una cámara húmeda donde se realizó la técnica de la inmunofluorescencia.

Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron a una concentración de 1:500 en albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) (1% en PBS).

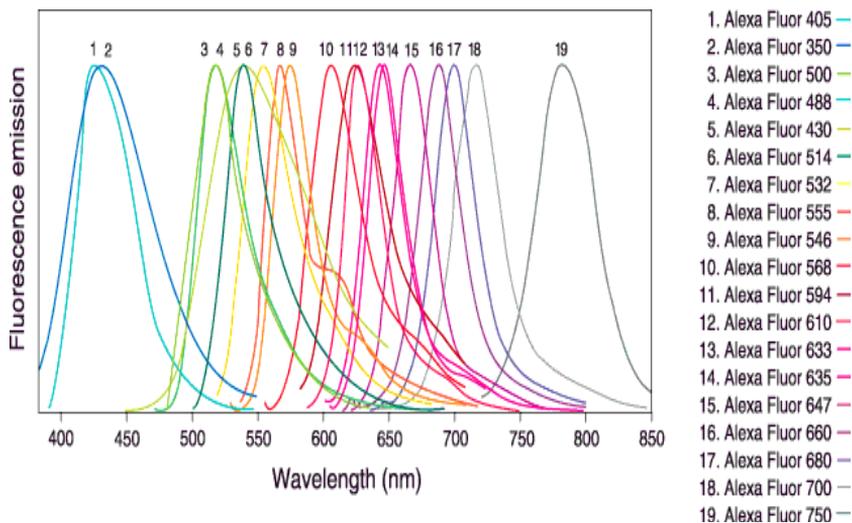
Las lentillas se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti- *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* de conejo, cuya obtención se describe más adelante).

Se realizaron nuevos lavados con PBS y las lentillas se incubaron durante 20 minutos con un anticuerpo secundario anti-conejo (Alexa® Fluor 594) para teñir las bacterias extracelulares.

Posteriormente, las células se permeabilizaron utilizando Tritón X-100 (0,1% en PBS) durante 4 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavar las lentillas con PBS.

Para teñir las bacterias intracelulares se añadió el anticuerpo primario siguiendo el proceso anteriormente descrito, y luego el anticuerpo secundario anti-conejo, que en este caso es el Alexa® Fluor 488.

Después de realizar otros 3 lavados con PBS, se procedió al montaje de las lentillas en portaobjetos con ProLong Gold con DAPI (Invitrogen®). Todas las preparaciones se examinaron con microscopio de fluorescencia usando el modelo Olympus BX51 con los objetivos de inmersión de 100 ó 60. Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara Olympus DP-70 y se procesaron con Photoshop CS3 (Adobe). Las imágenes fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. José Ramos Vivas en el Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid. Los anticuerpos secundarios utilizados son anticuerpos fluorescentes del tipo Alexa® Fluor de cabra anti-conejo (Invitrogen®). El Alexa® Fluor 594 tiene una emisión roja y el Alexa® Fluor 488 emite en verde. Ambos son inmunoglobulinas tipo G.



Espectro de emisión de anticuerpos Alexa Fluor

Obtención del antisuero de conejo

La obtención del antisuero policlonal anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se realizó según la metodología descrita por Harlow y Lane (1988) y Acosta y cols. (2002), utilizándose 2 conejos de unos 2 Kg de peso de raza californiana, procedentes de una explotación local que desparasita y vacuna sus ejemplares periódicamente frente a mixomatosis, enfermedad vírica hemorrágica y enterotoxemia.

A cada animal se le administró 2 ml de un inóculo compuesto por 1ml de una suspensión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* inactivada y 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto (Sigma).

La suspensión inactivada de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se realizó mediante cultivo en medio BHIB de la cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99, a 25°C durante 48 horas con agitación continua y suave. Posteriormente se lavó dos veces la suspensión bacteriana centrifugando el medio a 3.000 rpm durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendimos el centrifugado en PBS. Finalmente, tomamos el centrifugado y se resuspende en PBS, adicionándole un 5‰ de formol e incubando durante 24 horas a 25°C para inactivar las bacterias. A las 24 horas tomamos una alícuota de la suspensión y la cultivamos en Agar Sangre con 1,5% de NaCl a 25°C durante 48 horas para garantizar la esterilidad de la misma.

Cada conejo recibió los 2 ml del inóculo (1ml de la suspensión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* inactivada y 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto) repartidos en 10 puntos de inyección subcutánea por diversas zonas del lomo del animal.

Tras 5 semanas desde la primera inoculación, se les aplicó una segunda dosis con el mismo inóculo, para provocar así una buena hiperinmunización. A los 15 días de esta segunda inoculación se procedió a la sangría completa de los conejos (previamente anestesiados mediante la aplicación intramuscular de una solución compuesta por 0,2 ml de acepromacina y 0,4 ml de ketamina) por punción cardíaca. La sangre se recolectó en tubos con gelatina y paredes siliconadas para la retracción del coagulo y obtención del suero.

Una vez obtenida la sangre, se dejó coagular a 4°C y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El suero se conservó alicuotado a -80° C hasta su utilización en la técnica de la inmunofluorescencia.

IV.4.2.- Análisis del tráfico intracelular por inmunofluorescencia

Las células de la línea SAF-1 fueron depositadas en placas de 24 pocillos con una lentilla de vidrio de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo. Para la infección se inocularon 25 µl del cultivo bacteriano de la cepa 94/99 por pocillo.

Con el objetivo de poder visualizar la posible emisión de microfilamentos de actina, las lentillas se fijaron con se fijaron con paraformaldehído frío (4% en PBS) a diferentes tiempos tras la inoculación bacteriana. Los tiempos fueron: 5, 10, 15, 30 y 45 minutos. La técnica se realizó siguiendo los pasos descritos en el apartado anterior (IV.4.1.).

El anticuerpo utilizado para marcar la actina fue el Faloidina Alexa® 488 (anticuerpo primario que emite en verde).

Con el objetivo de poner de manifiesto la posible formación de endosomas, las lentillas se fijaron con paraformaldehído frío (4% en PBS) a diferentes tiempos tras la infección bacteriana (1, 2 y 4 horas). La técnica se realizó siguiendo los pasos descritos en el apartado anterior (IV.4.1.) comenzando la tinción a partir de la permeabilización con Tritón X-100 (0,1% en PBS), ya que solo nos interesa lo que ocurra en el interior celular.

Los anticuerpos utilizados para marcar los endosomas fueron EEA-1 (anticuerpo primario de ratón) y Alexa® Fluor 568 (secundario anti-ratón y con emisión en rojo).

Para poder ver la posible formación de lisosomas, las lentillas se fijaron con paraformaldehído frío (4% en PBS) a diferentes tiempos tras la infección bacteriana (4, 8, 24 y 48 horas). La técnica se realizó siguiendo los pasos descritos en el

apartado IV.4.1., comenzando la tinción a partir de la permeabilización con Tritón X-100 (0,1% en PBS), ya que solo nos interesa lo que ocurra en el interior celular.

Los anticuerpos utilizados para marcar los lisosomas fueron LAMP-1 (anticuerpo primario de ratón) y Alexa® Fluor 568 (secundario anti-ratón y con emisión en rojo).

Todas las preparaciones se examinaron con microscopio de fluorescencia usando el modelo Olympus BX51 con los objetivos de inmersión de 100 ó 60. Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara Olympus DP-70 y se procesaron con Photoshop CS3 (Adobe). Las imágenes fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. José Ramos Vivas en el Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.

IV.5.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

En este ensayo usamos las cuatro cepas descritas en el apartado IV.1., más la cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PP3 aislada de *Seriola coreana* (*Seriola quinqueradiata*) en Japón y cedida por el Dr. Andrew Barnes.

IV.5.1.- Determinación de la multiplicidad de la infección (M.O.I.)

Con el objetivo de determinar qué proporción célula:bacteria puede favorecer la expresión de citoquinas en SAF-1, se realizó un experimento que consideramos preliminar. Para ello, se probaron cuatro multiplicidades de infección (MOI): 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 utilizando dos de las cinco cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, la C2 y la PP3. Posteriormente, se midió la expresión génica 4 postinfección (tras 90 minutos de contacto entre bacteria y célula).

IV.5.2.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* cultivadas con y sin glucosa

Las células SAF-1 (depositadas en placas de 6 pocillos) fueron infectadas durante 90 minutos con las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con un MOI de 1:10 tras analizar los resultados de la experiencia preliminar. La mitad de las células se infectaron con las 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en BHIB suplementado con un 1,5% de NaCl y la otra mitad, con las mismas 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en el mismo medio pero suplementado con 1% de glucosa. Asimismo, las células utilizadas como control (no infectadas-lote testigo) se inocularon con PBS. Las placas fueron centrifugadas, a 500 rpm durante 4 minutos para mejorar el contacto entre célula y bacteria, e incubadas a 25°C.

Transcurridos 90 minutos, 4, 12, 24 y 48 horas postinfección se recogió el contenido de los pocillos correspondientes (3 por cepa, tiempo y condición) para realizar la extracción de ARN y posterior análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.

IV.5.3.- Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se usó el kit comercial E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek®). Inicialmente, ponemos sobre la placa donde están las células, ya sin medio de cultivo, 600 µl del buffer TRK (al que se le añaden previamente 20 µl de 2-mercaptoetanol por cada ml de buffer). Recogemos las células lisadas mediante succión con pipeta y las pasamos a un microtubo de 1,5 ml. Añadimos el mismo volumen de etanol frío al 70%, (600 µl) y mezclamos con la pipeta sin centrifugar. Una vez homogeneizada la muestra, pasamos la mezcla a la columna de extracción previamente adaptada a una campana de 2 ml de capacidad y centrifugamos a 14.000 rpm (Minispin plus, Eppendorf) durante 30 segundos. Tras la centrifugación, desechamos el líquido de la campana y realizamos un lavado con 700 µl de la solución de lavado I (RNA Wash Buffer I). Tras una centrifugación como la anterior y desechar el sobrante de la campana, añadimos 500 µl de la solución de lavado II (RNA Wash Buffer II) que tenemos preparado previamente, y al que se le ha añadido 4 veces el volumen de etanol, y centrifugamos a 14.000 rpm durante 30 segundos. Seguidamente, volvemos a añadir 500 µl de RNA Wash Buffer II y centrifugamos a 14.000 rpm durante 2 minutos. Luego, poner la columna en una campana nueva y centrifugar 2 minutos a 14.000 rpm, para asegurarnos de que no queden restos del buffer que puedan degradar el ARN. Finalmente, colocamos la columna dentro de un microtubo de 1,5 ml y añadimos 40 µl de agua libre de RNAsa (agua DEPC) volviendo a centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos.

El ARN obtenido de la extracción se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 ajustando a una concentración de 0,1 µg/µl. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

IV.5.4.- Transcripción inversa

Este paso consiste en convertir el ARN extraído en ADN complementario (ADNc), debido a que el ARN es mucho más frágil e inestable en el tiempo que el ADNc. Para ello es necesaria la enzima transcriptasa inversa, que se encarga de construir la cadena complementaria de ácidos nucleicos de la cadena de ARN molde. La cadena iniciadora hibridará en el extremo 3' de la cadena molde.

Para que tenga lugar la reacción, tomamos 2 µl de ARN (previamente ajustado a una concentración de 0,1 µg/µl) de cada muestra, añadiendo 5 µl de tampón 10X (Biorad) y 12 µl de agua DEPC. La mezcla se incubó durante diez minutos a 70 °C. A continuación, a cada muestra pre-calentada se le añade 1 µl de la enzima retro-Transcriptasa iScript™ (cDNA synthesis kit BIORAD)(200 U/ml) y 5 µl de agua DEPC. Posteriormente, se incubó a 25 °C durante 10 minutos, 50 minutos a 42 °C y 15 minutos a 70 °C, finalizando el ciclo a 16°C.

IV.5.5.- Expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Para el estudio de la expresión de los genes implicados en la posible respuesta inmunitaria de la línea celular SAF-1 se utilizó la PCR semi cuantitativa (qPCR), analizando los niveles de expresión de los siguientes genes: Mx, Interleuquina-1β (IL-1β), Ciclooxigenasa-2 (COX-2), Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α) y Receptor de la Interleucina-1 de tipo II (IL-1r2).

Para los cebadores de IL-1 β , TNF α y COX-2 se utilizó la secuencia descrita por Sepulcre y cols. (2007) y para IL-1r2 se utilizó la secuencia descrita por Roca y cols. (2012). Para la expresión del gen Mx la secuencia fue diseñada por nosotros con el software “Gene Runner” utilizando la secuencia del gen completo descrita por Tafalla y cols. (2004) y depositada en Gene bank (número de acceso AF491302). El uso de SYBR Green implica un diseño muy cuidadoso de los cebadores con el fin de evitar dímeros y la amplificación de DNA genómico contaminante en la muestra de ADNc. La Tabla VII muestra la secuencia de los cebadores utilizados. Como control interno (gen constitutivo) hemos escogido el gen β -actina, cuya secuencia fue descrita por Bravo y cols. (2011).

Tabla VII. Secuencias de cebadores empleados para la qPCR

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

Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo con un termociclador (IQ--5, Biorad). La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l para cada reacción, conteniendo: 2 μ l de ADNc, 12 μ l de IQ SYBR Green Supermix (Biorad), 0,5 μ l de cada uno de los cebadores, y 10 μ l de agua DEPC.

En la Tabla VIII podemos observar el protocolo de PCR a tiempo real diseñado para analizar la expresión de los genes de estudio.

Tabla VIII. Protocolo de ciclos de qPCR empleado para la expresión de los genes estudiados

Ciclo (repeticiones)	Pasos	T^a x Tiempo
Ciclo 1 (1x)	Paso 1	95 °C x 5'
Ciclo 2 (45x)	Paso 1	95 °C x 15"
	Paso 2	60 °C x 30"
	Paso 3	72 °C x 30"
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	95 °C x 1'
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	70 °C x 1'
Ciclo 5 (81x)	Paso 1	55 °C x 30"
Ciclo 6 (1x)	Paso 1	16 °C x ∞

Para determinar el nivel de expresión de los genes analizados, se utilizó la fórmula de Livak (Livak & Schmittgen, 2001) (Figura II). Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se basan en la comparación de los valores Ct, usando la β -actina como control interno de la reacción. La fórmula expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores de Ct de la muestra y los valores de Ct del control (lote testigo), por lo que los resultados se expresan como aumento sobre los valores del control.

$$\text{Ratio} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control})}$$

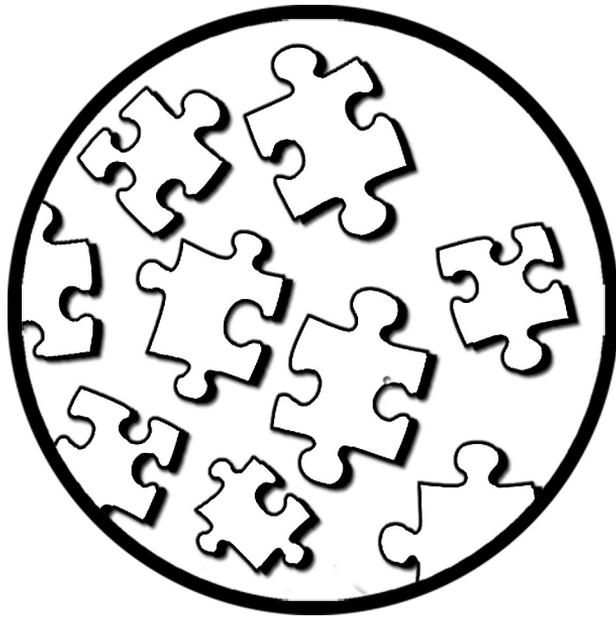
Figura II. Fórmula de Livak

$$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct (\text{gen analizado en la muestra}) - Ct (\beta\text{-actina en la muestra})$$

$$\Delta Ct \text{ control} = Ct (\text{gen analizado en el control}) - Ct (\beta\text{-actina en el control})$$

IV.6.- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Los datos fueron estudiados con un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). En los casos en los que fue necesario se realizó un test de TUKEY. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de significación fueron menores de 0,05 ($p < 0,05$).



RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- Ensayos de invasión bacteriana

V.1.1.- Evaluación del efecto del tiempo de infección en la internalización

En la Figura III, se observa la tasa de internalización intracelular de las diferentes cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* usadas en el estudio, en función de los diferentes tiempos de infección probados. La tasa de invasión aumenta con el tiempo de incubación en las 4 cepas. El máximo nivel de invasión se observó en la cepa 94/99, siendo de 0,21% a los 90 minutos. Las otras tres cepas mostraron patrones de invasión similares entre ellas. Como la invasión es tiempo-dependiente, y una vez probado que a los 90 minutos de incubación todas las cepas reflejaron una tendencia creciente, hemos utilizado este tiempo para los siguientes experimentos, permitiendo así la máxima invasión.

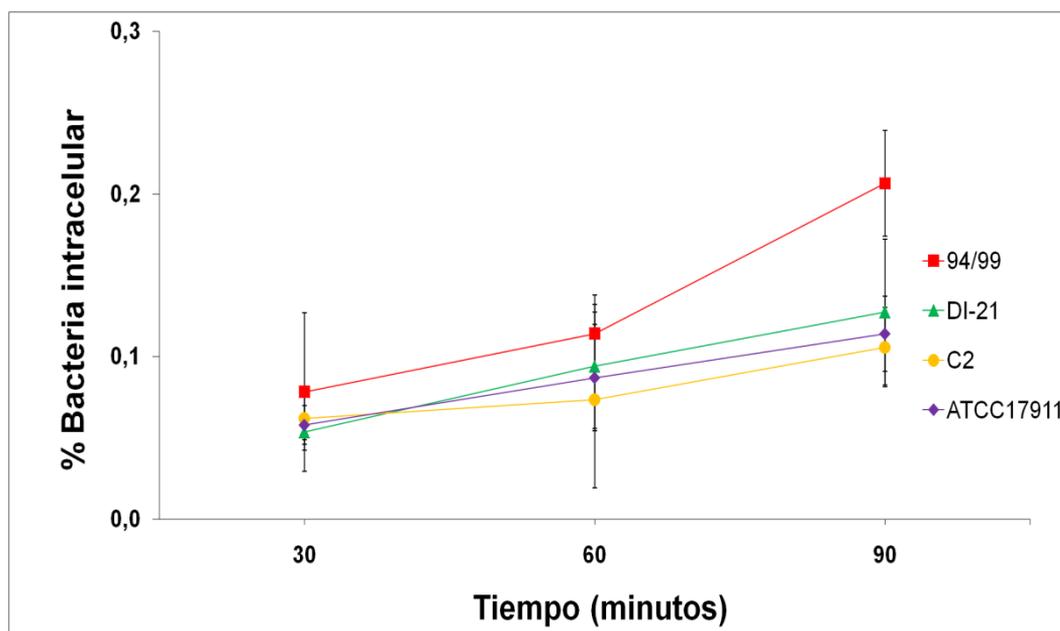


Figura III.- Efecto del tiempo de infección en la invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1

V.1.2.- Determinación del efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión

La internalización de las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se evaluó con diferentes concentraciones bacterianas en un número fijo de células por pocillo. En la Figura IV, se observa que la tasa de internalización aumenta con el incremento de la concentración del inóculo, es decir, en general el número de bacterias intracelulares aumentó con el número de bacterias añadidas. Para la cepa 94/99 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre 1X y 5X. El resto de cepas estudiadas muestran una tendencia, pero no hay diferencias estadísticamente significativas.

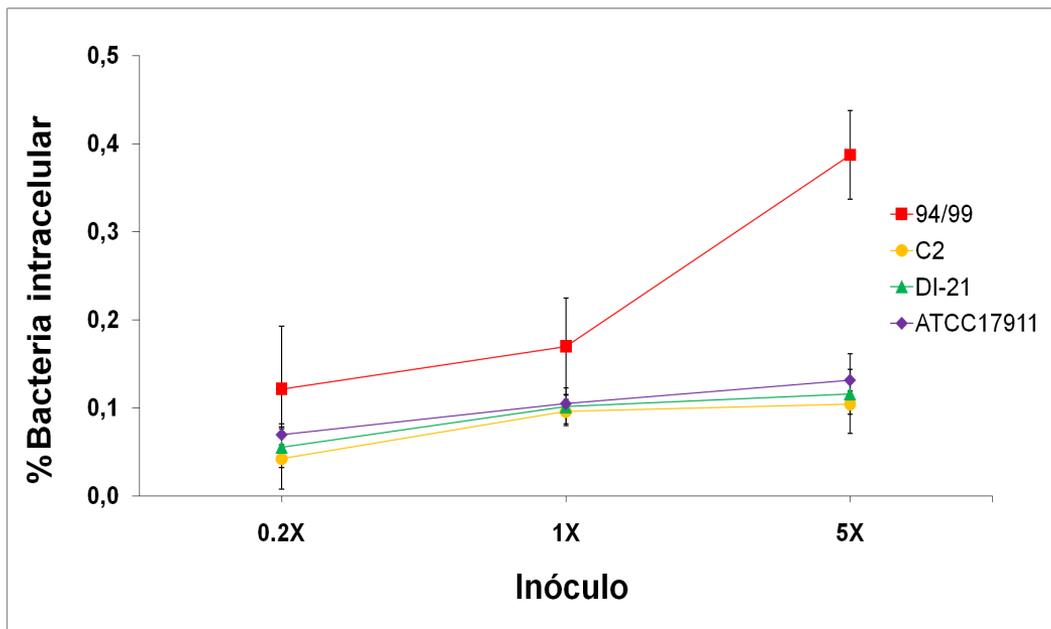


Figura IV.-Efecto de la concentración bacteriana en la eficacia de invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1

V.1.3.- Valoración de la supervivencia intracelular

Para determinar si las cepas internalizadas morían, se replicaban y/o sobrevivían en la línea celular SAF-1, las infecciones se llevaron a cabo a diferentes tiempos. Después de los periodos de incubación (hasta 6 días), se contaron las bacterias intracelulares viables y los resultados se expresaron como porcentaje de bacterias intracelulares respecto al inóculo inicial. La tasa de proliferación intracelular (Índice IPRO), entendida como la relación existente entre las bacterias viables a las 24 horas y 90 minutos se situó alrededor de 1,1 para las 4 cepas analizadas, indicando una ligera replicación bacteriana en el interior celular. En la Figura V se aprecia que todas las cepas fueron capaces de proliferar ligeramente tras un periodo de supervivencia intracelular y sobrevivir durante al menos 3-5 días. La cepa que alcanzó mayor supervivencia en la línea SAF-1 fue la 94/99.

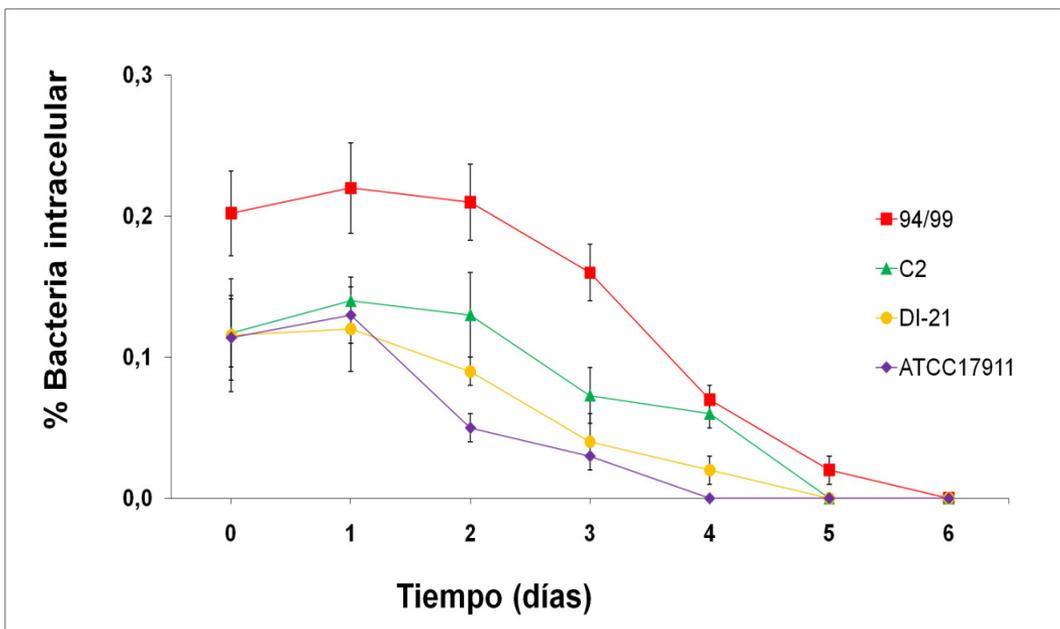


Figura V.- Efecto del tiempo en la supervivencia intracelular de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1

V.1.4.- Implicación del citoesqueleto celular en la entrada de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Las células SAF-1 se trataron con citocalasina D para evitar la formación de microfilamentos de actina y posteriormente fueron infectadas con las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. No se recuperaron bacterias intracelulares de las cepas C2, DI-21 ni ATCC 17911, encontrando únicamente un 0,0034% de la cepa 94/99, la cepa que mostró una mayor tasa de invasión tras 90 minutos de incubación.

V.1.5.- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana

Para evaluar la intervención del metabolismo celular eucariota en el proceso de invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se realizaron las infecciones a 4°C. No se recuperaron bacterias intracelulares de ninguna de las 4 cepas de estudio en los experimentos realizados a esta temperatura.

V.1.6.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización

Como observamos en la Figura VI, las tasas de internalización tras 90 minutos de incubación de las cuatro cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* analizadas presentaron valores con diferencias estadísticamente significativas ($*=p<0,05$) en función de la temperatura de incubación (25°C y 20°C). Las mayores tasas de internalización se observaron cuando la temperatura de incubación fue de 25°C, siendo de nuevo la cepa 94/99 la que ofrece los valores más elevados.

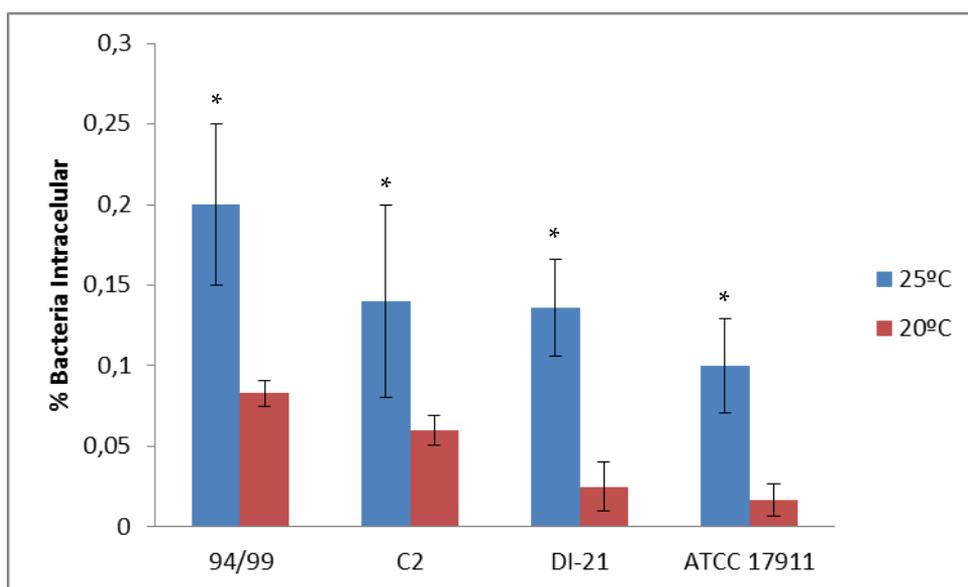


Figura VI.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

V.1.7.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización bacteriana

En la Figura VII, se representa el efecto que produce en la invasión el cultivo de las diferentes cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en presencia de glucosa. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los índices de invasión entre las cepas cultivadas en el medio habitual con respecto a las crecidas con glucosa.

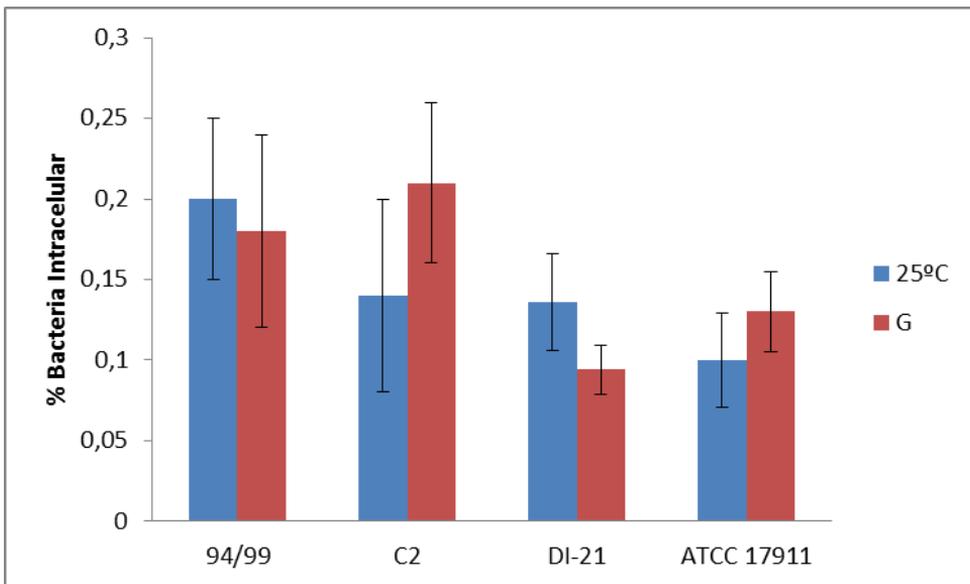


Figura VII.- Efecto de la presencia de glucosa en la internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1

V.2.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia

V.2.1.- Análisis de la adherencia e internalización celular por inmunofluorescencia

La técnica de la inmunofluorescencia muestra que todas las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se adhieren a las células con una distribución uniforme de la bacteria en la superficie celular, y que la bacteria es capaz de penetrar en células SAF-1 tras 30 minutos de incubación. Los niveles de invasión dependen de la cepa utilizada. En la Figura VIII, observamos la secuencia de la tinción doble por inmunofluorescencia realizada en la línea celular SAF-1 tras 90 minutos de infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Las bacterias extracelulares las observamos teñidas en rojo con el fluorocromo Alexa® Fluor 594 en células sin permeabilizar (Figura VIIIa). Una vez permeabilizadas las células, en verde observamos el total de bacterias (adheridas e internas) teñidas con el fluorocromo Alexa® Fluor 488 (Figura VIIIb) en donde la flecha indica una bacteria que está siendo internalizada. La Figura VIIIc muestra la acción del DAPI, que tiñe de manera selectiva el ADN bacteriano y celular. La última imagen (Figura VIIId) se corresponde con la superposición de las imágenes anteriores, donde podemos observar en naranja, bacteria adherida teñida con ambos fluorocromos, en verde bacterias internas, y en azul, ADN bacteriano y celular.

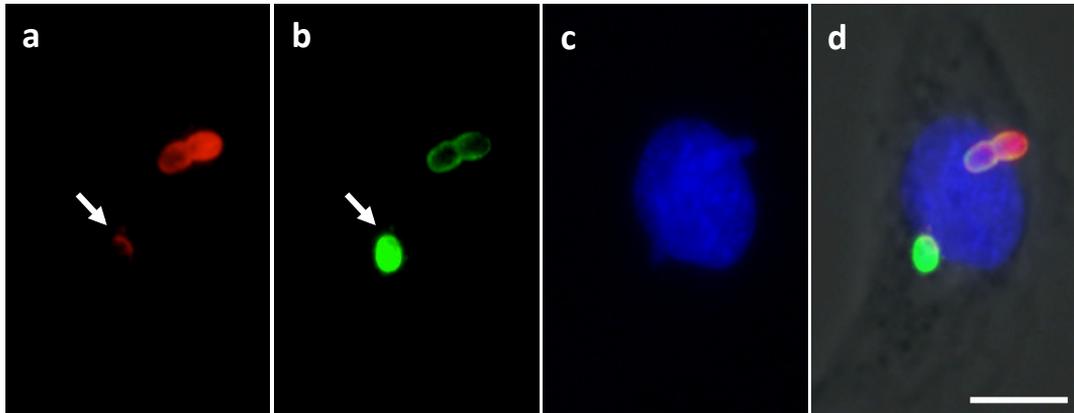


Figura VIII.- Internalización y adherencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en SAF-1 por inmunofluorescencia

No se apreciaron diferencias en la viabilidad de las células hospedadoras cuando fueron infectadas con las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* durante 7 días usando el método de exclusión de azul tripán.

En la Figura IX, se observa la multiplicación de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* que tiene lugar en el interior de las células SAF-1. En la Figura IXa, se muestra una imagen en contraste de fase de las células SAF-1 transcurridas 48 horas desde la infección. La imagen siguiente (Figura IXb) se corresponde con bacterias intracelulares teñidas en verde. Superponiendo estas dos imágenes, se obtiene la Figura IXc, donde observamos en azul el ADN celular y bacteriano, y en verde las bacterias intracelulares. La Figura IXd se corresponde con una magnificación del recuadro presente en la Figura IXc, en la que se aprecian las bacterias replicándose (flechas).

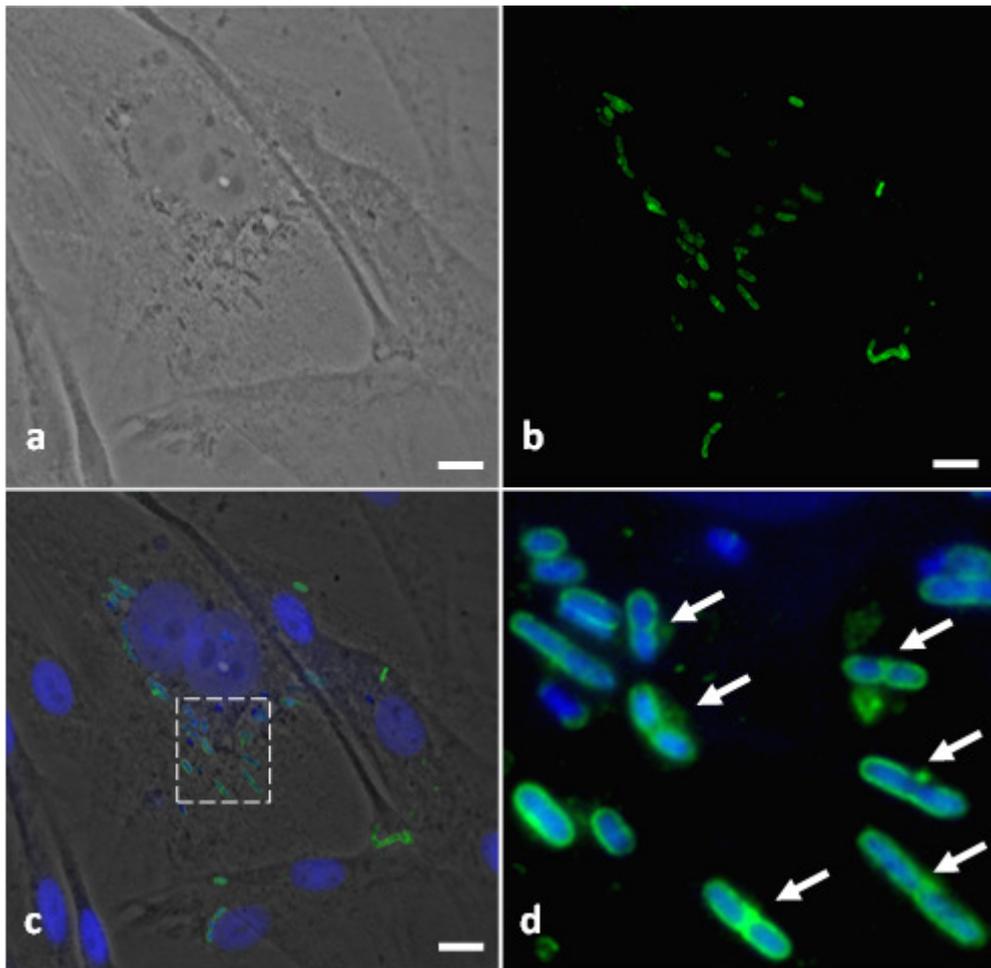


Figura IX.- Replicación intracelular de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en SAF-1

Después de tres días, bacterias con forma cocobacilar coexistían con bacterias de morfología redondeada, probablemente indicando que algunas bacterias intracelulares estaban siendo degradadas o adquiriendo formas cocáceas resistentes (Figura X). En la imagen, se observan en verde las bacterias intracelulares y restos bacterianos. Las flechas señalan bacterias intracelulares que colocalizan con DAPI.

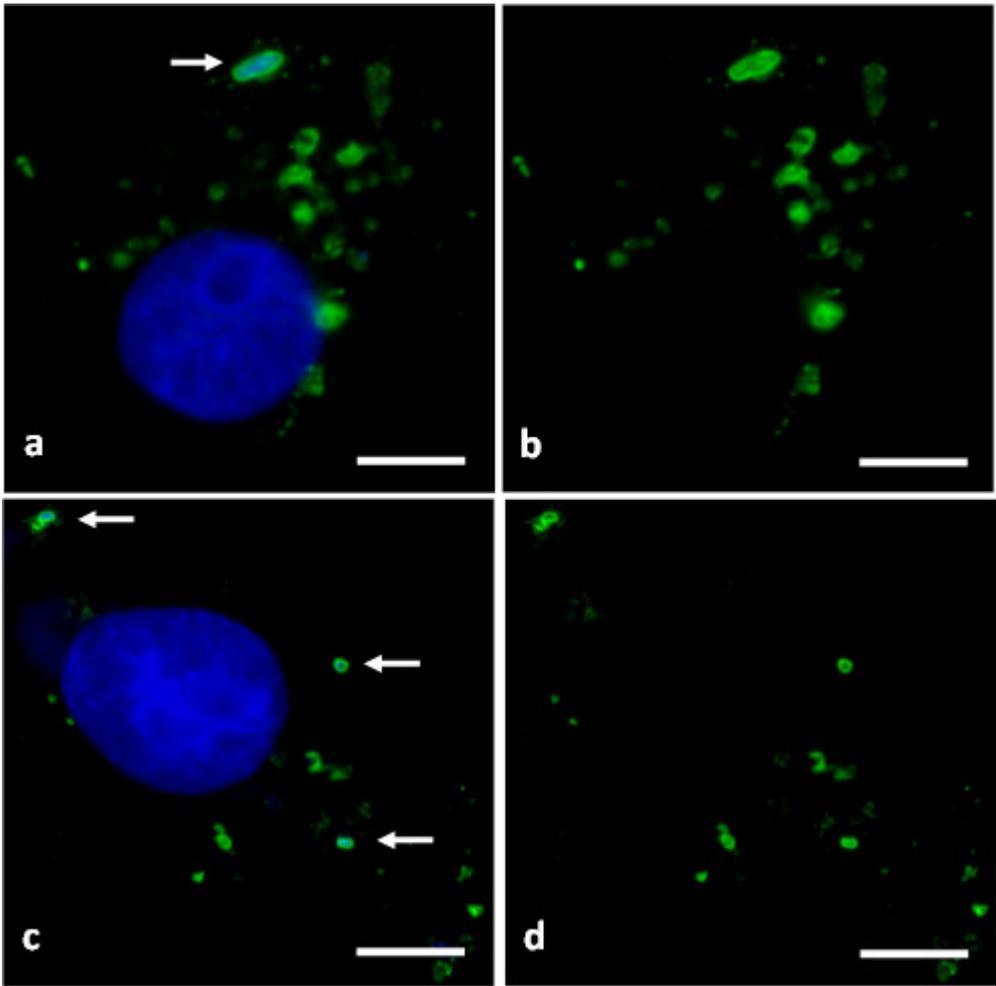


Figura X.- Bacterias intracelulares tras 7 días de infección de SAF-1 con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

V.2.2.- Análisis del tráfico intracelular por inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia realizada muestra la emisión de microfilamentos de actina por parte de las células SAF-1 X minutos después de ser infectadas con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

En la Figura XI (izquierda) se observan estos filamentos en verde tras el marcaje con el anticuerpo Faloidina Alexa® 488. A la derecha, una imagen de contraste de fase del mismo campo de la preparación microscópica.

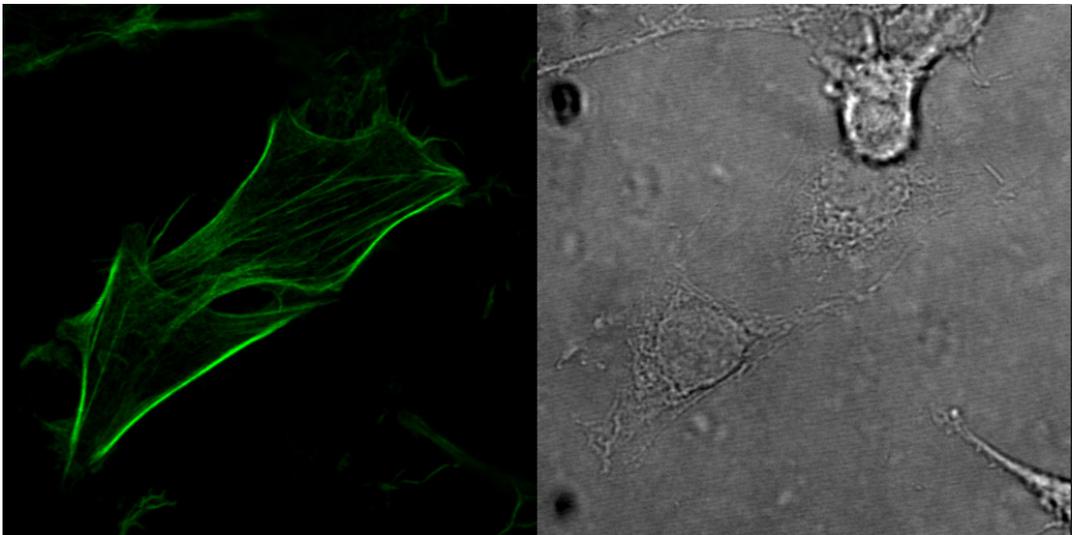


Figura XI.- Microfilamentos de actina en SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Las tinciones con EEA-1 y LAMP-1 para poner de manifiesto la posible formación de endosomas y lisosomas como estrategia de tráfico intracelular por parte de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1 resultaron negativas.

V.3.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

V.3.1.- Determinación de la multiplicidad de la infección (M.O.I.)

Con este experimento se pretendía definir la cantidad de bacterias por célula para experimentos posteriores. Se observa cómo, en general, a menor MOI, mayor ratio alcanza la expresión de los genes estudiados. El MOI 1:10 provocó unos niveles mayores de expresión génica con las cepas C2 (Figura XII) y PP3 (Figura XIII) a las 4 horas después de la infección. Por tanto, se decidió que el MOI 1:10 era el más adecuado para proseguir con los experimentos.

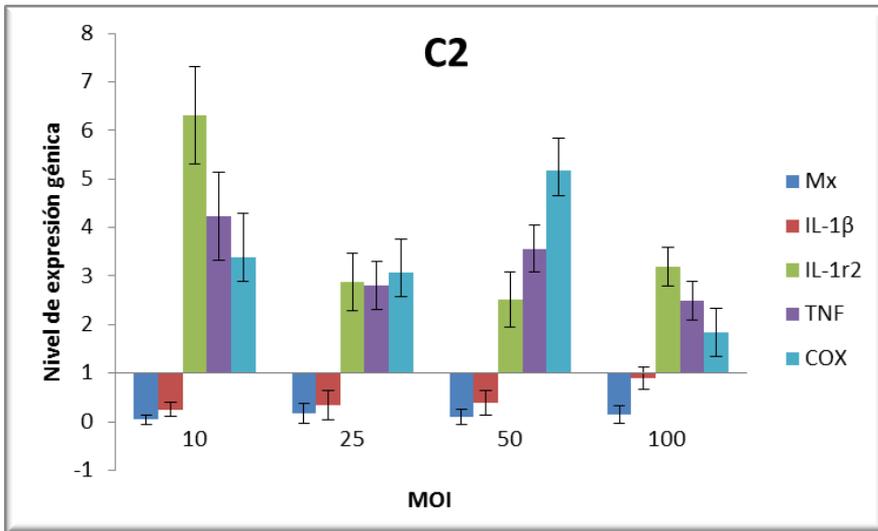


Figura XII.- Expresión de citoquinas y gen Mx 4 horas después de la infección de SAF-1 con la cepa C2 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

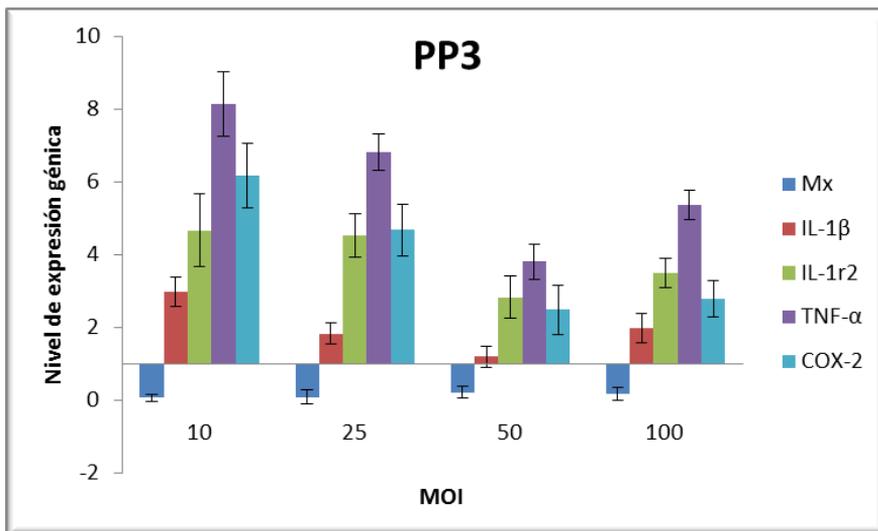


Figura XIII.- Expresión de citoquinas y gen Mx 4 horas después de la infección de SAF-1 con la cepa PP3 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

V.3.2.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* cultivadas con y sin glucosa

En este apartado se puede observar la cinética de expresión de los distintos genes estudiados como respuesta al estímulo de la línea celular SAF con distintas cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con y sin glucosa. Con la inclusión en el experimento de cepas crecidas con glucosa en el medio de cultivo se pretende probar algún efecto adicional con la bacteria que posee capa capsular lipopolisacárida.

V.3.2.1.- Expresión del gen Mx

En las Figuras XIVa y XIVb puede apreciarse cómo el gen Mx se expresa con la mayoría de las cepas utilizadas, entre las 24 y 48 horas. No existe de forma patente una diferencia entre el modelo de expresión referido a la presencia o ausencia de glucosa en el medio, aunque puede notarse cómo la ausencia de glucosa adelanta el inicio de la expresión génica entre las 4 y las 12 horas para las células SAF-1 infectadas con las cepas C2 y PP3. El pico máximo de expresión del gen Mx se alcanza con la cepa PP3 a las 24 horas en ambas condiciones.

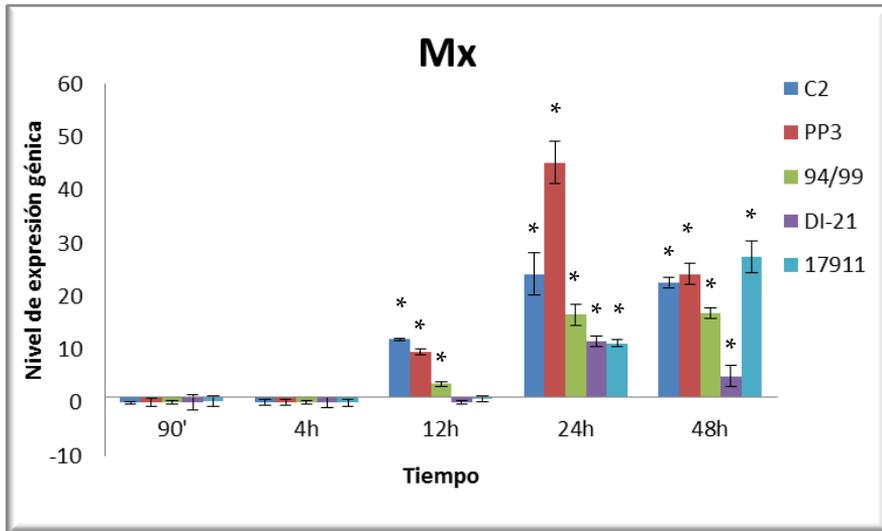


Figura XIVa.- Expresión génica de Mx en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

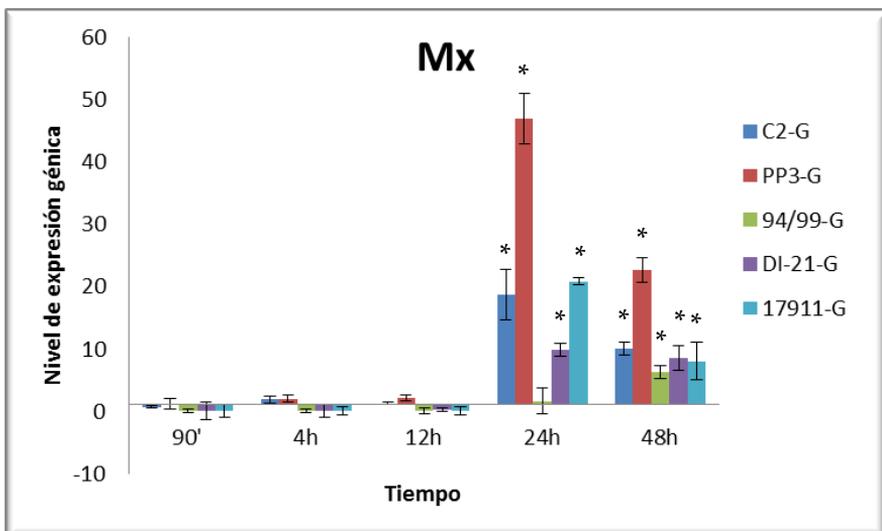


Figura XIVb.- Expresión génica de Mx en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

V.3.2.2.- Expresión del gen IL1- β

La expresión del gen IL-1 β refleja un modelo de respuesta muy similar al descrito anteriormente para el gen Mx. Aunque algunas cepas (94/99, DI 21 y 17911) no producen suficiente estímulo de la línea celular, las otras dos cepas (C2 y PP3) producen una expresión notable del gen entre las 24 y 48 horas, siendo ligeramente superior en los casos en los que la glucosa no fue añadida al medio de crecimiento. La respuesta inicial al estímulo se obtiene con la cepa PP3 a las 4 horas de incubación con y sin presencia de glucosa en el medio. La máxima expresión del gen IL-1 β vuelve a alcanzarse a las 24 horas con la cepa PP3 crecida con y sin glucosa, para descender notablemente a las 48 horas, como ocurre también con la cepa C2. Para el resto de los tiempos utilizados, las células no expresan el gen IL-1 β , observándose una subexpresión con respecto al control.

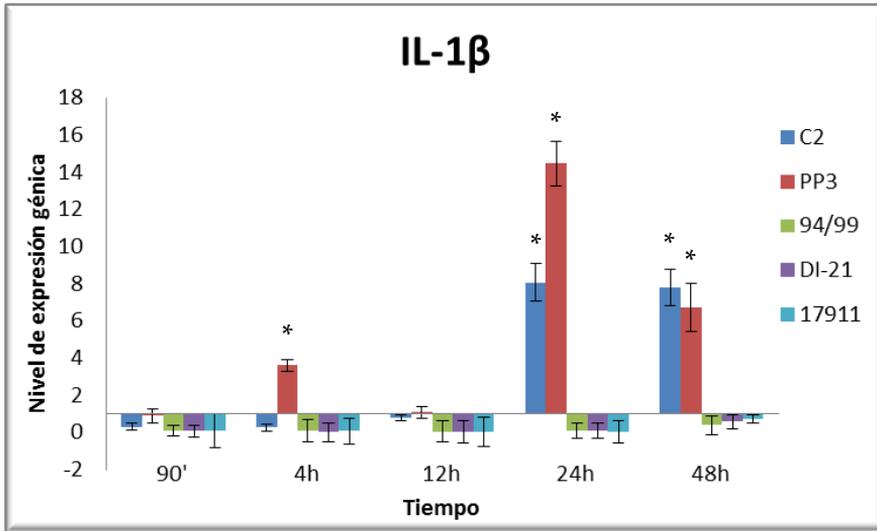


Figura XVa.- Expresión génica de IL-1 β en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

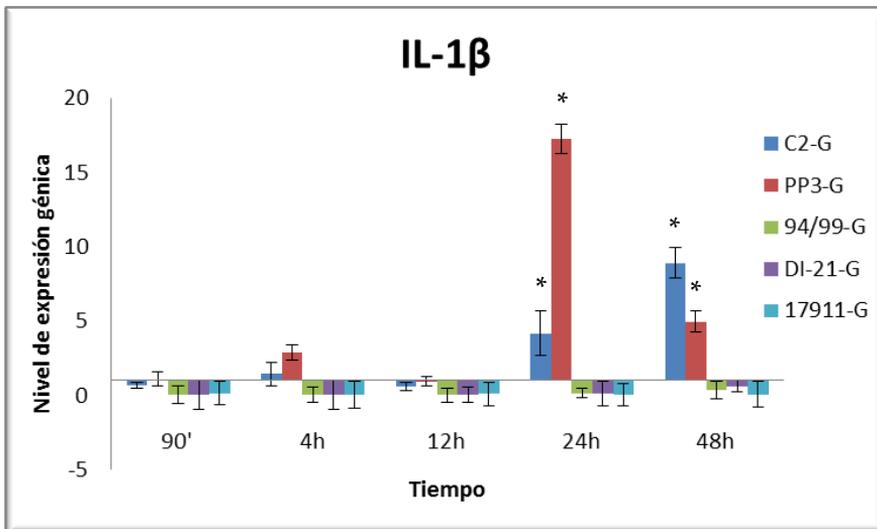


Figura XVb.- Expresión génica de IL-1 β en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

V.3.2.3.- Expresión del gen IL-1r2

Aunque el modelo de respuesta para la expresión del gen IL-1r2 es muy parecido a la IL-1 β , apreciamos una cinética de expresión con mayor intensidad cuando las cepas se mantuvieron en ausencia de glucosa, aunque la duración es similar con o sin glucosa en el medio, correspondiéndose con las 48 horas de incubación. En ambos casos, las cepas que claramente provocan expresión para este gen son la C2 y PP3. La respuesta se inicia a las 4 horas postincubación para la cepa PP3 y alcanza su máximo a las 48 horas cuando se mantuvo sin glucosa añadida en el medio. Para la cepa C2, el máximo nivel de expresión llega a las 24 horas post-infección en ambas condiciones. En el resto de los tiempos estudiados con las cepas 94/99, DI-21 y 17911 se observó subexpresión respecto al control en todos los casos.

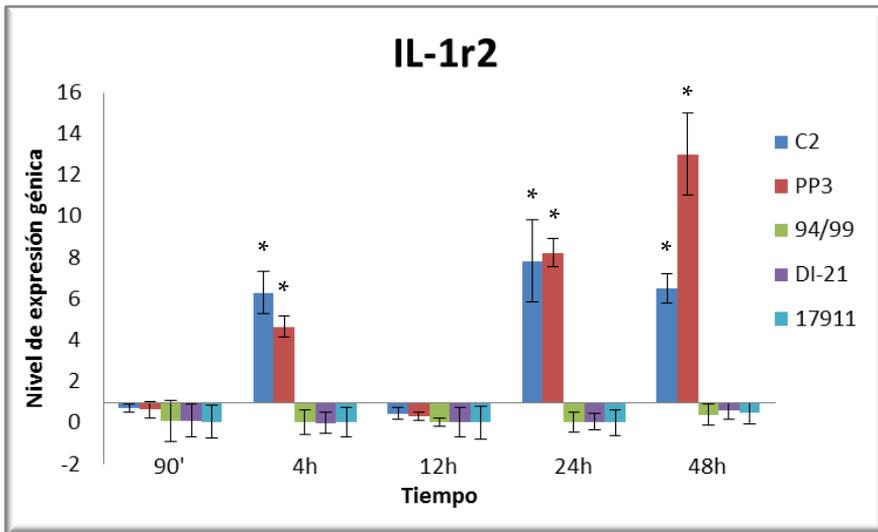


Figura XVIa.- Expresión génica de IL-1r2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

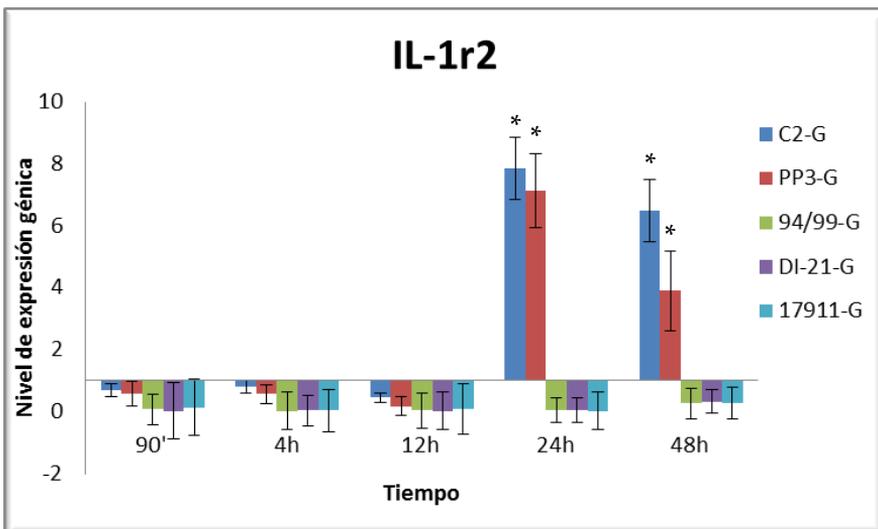


Figura XVIb.- Expresión génica de IL-1r2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

V.3.2.4.- Expresión del gen COX-2

En las Figuras XVIIa y XVIIb se muestra la expresión del gen COX-2 en células SAF-1 tras la incubación con cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas sin y con glucosa. En ambos casos, las cepas que presentan un potente efecto inmunomodulador son la C2 y PP3, mientras todas las demás provocan subexpresión del gen para todos los tiempos utilizados. La respuesta se inicia desde las 4 horas de incubación y alcanza su máximo a las 48 horas para estas dos cepas. Los valores con la cepa C2 crecida con glucosa van en aumento conforme avanza el tiempo. La mayor expresión se obtiene con la cepa PP3 sin glucosa a las 48 horas.

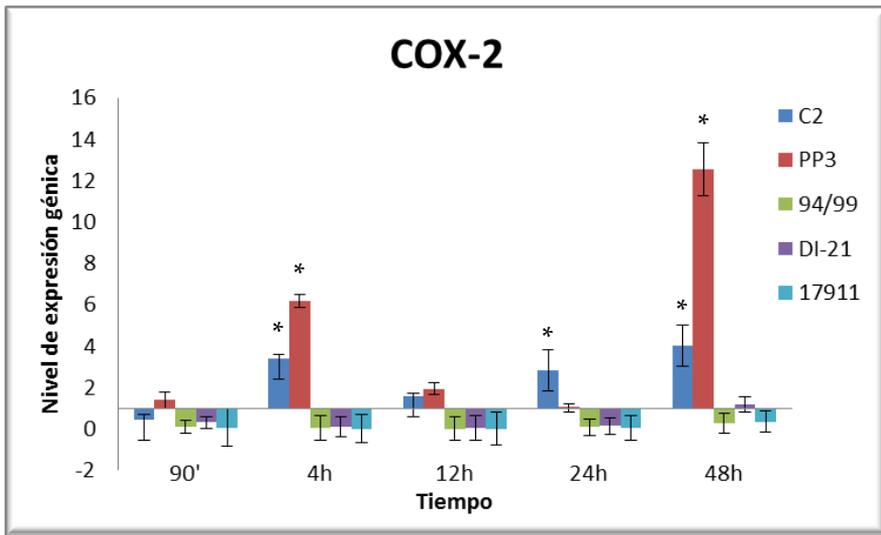


Figura XVIIa.- Expresión génica de COX-2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

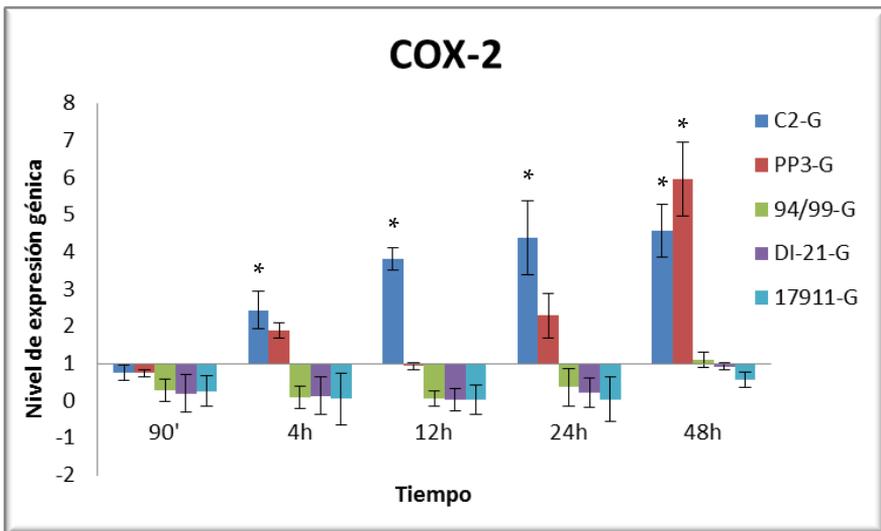


Figura XVIIb.- Expresión génica de COX-2 en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

V.3.2.5.- Expresión del gen TNF- α

Finalmente, la expresión génica para el gen TNF- α se produce también de forma más intensa en ausencia de glucosa en el medio, siendo la respuesta de mayor duración con la cepa C2, que se inicia a las 4 horas de incubación y alcanza su pico máximo de expresión a las 48 horas.. La cinética se expresa de forma mantenida a las 24 y 48 horas de incubación independientemente de la presencia de glucosa para el estímulo con las cepas C2 y PP3. No obstante, la cepa 94/99 inicia una cinética de expresión tardía a las 48 horas cuando existió presencia de glucosa en el medio. Con el resto de las cepas se obtienen niveles de subexpresión génica para todos los tiempos utilizados, independientemente de la presencia o no de glucosa del medio.

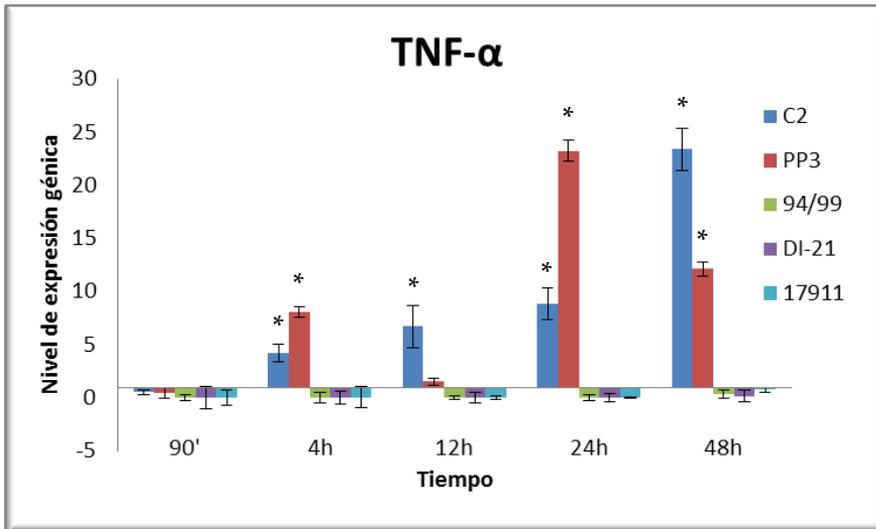


Figura XVIIIa.- Expresión génica de TNF- α en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

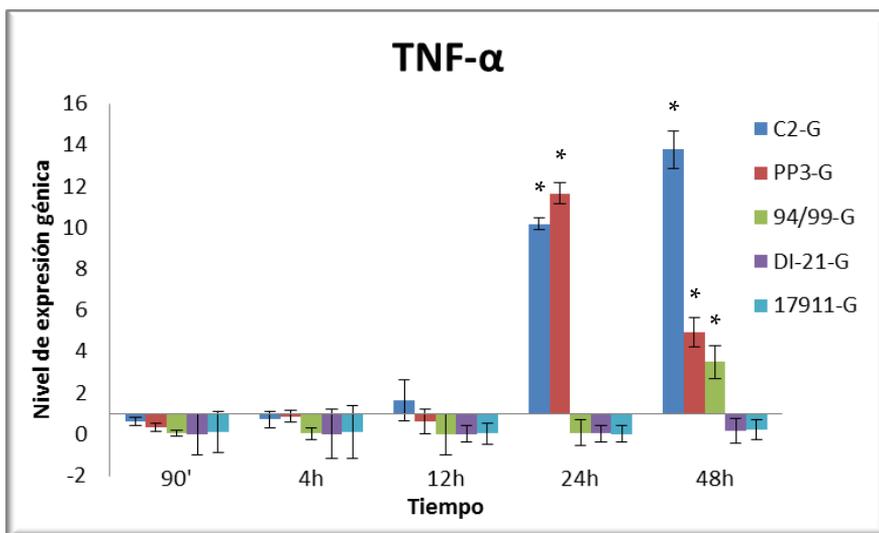
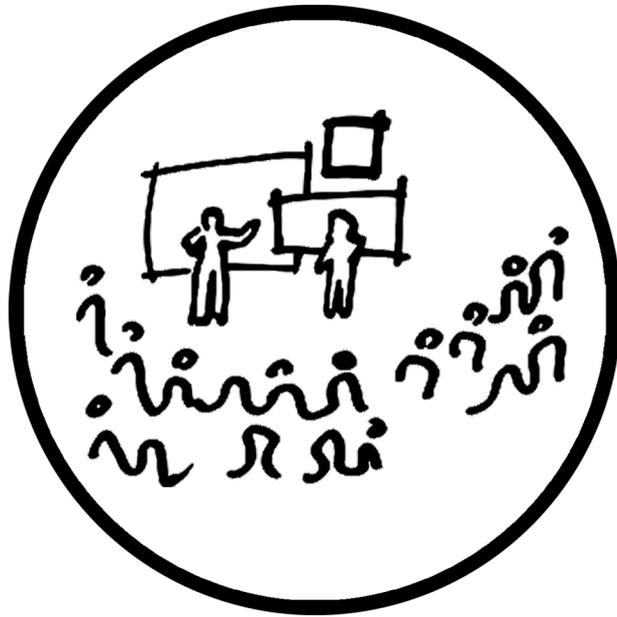


Figura XIIIb.- Expresión génica de TNF- α en células SAF-1 infectadas con 5 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con glucosa. Valores expresados como media \pm SE de la expresión del gen relativo al control. El asterisco encima de las barras indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).



DISCUSIÓN

Con la realización de este trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento de las interacciones de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* con SAF-1, línea celular no fagocítica de dorada.

VI.1.- Ensayos de invasión bacteriana

El establecimiento de la infección por patógenos bacterianos, requiere la adhesión a las células del hospedador, la colonización de los tejidos, y en ciertos casos, la invasión celular, seguido de la multiplicación intracelular, la difusión a otros tejidos, o la persistencia (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006), por lo que la capacidad de algunas bacterias de invadir células no fagocíticas es considerado como un importante factor de virulencia (Hanski y cols., 1989; Perdomo y cols., 1994; Clark y cols., 1994; Sansonetti y cols., 1996), siendo demostrada en especies como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* spp. (Finlay y Falkow 1988; Finlay 1990; Jouve y cols., 1997; Schaible y cols., 1999).

Los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia intracelular de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* en los tejidos de peces son poco conocidos a pesar del uso de modelos *in vivo* e *in vitro*.

Mientras que *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* es internalizada por células no fagocíticas de carpa, pez gato, carpita cabezona y salmón (Magariños y cols., 1996a y b; López-Doriga y cols., 2000), solo se ha descrito un bajo índice de replicación intracelular (Elkamel y Thune, 2003) en algunas de estas líneas celulares de peces. Sin embargo, cuando se comparan resultados de varios estudios, hay que considerar algunos aspectos, ya que se usan diferentes cepas bacterianas y líneas celulares, distintos medios de cultivo y diferentes métodos para cuantificar las bacterias intracelulares. Un ejemplo lo constituye lo descrito en la línea celular de carpa EPC, donde se obtienen resultados contradictorios en la capacidad de

replicación intracelular de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (López-Doriga y cols., 2000; Elkamel y Thune, 2003).

En nuestro ensayo para determinar el tiempo de infección (Figura III) en la invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la línea celular SAF-1, se detectaron bacterias en el interior celular a partir de 30 minutos postinfección, aumentando progresivamente hasta los 90 minutos postinfección. Este aumento en la tasa de invasión respecto al tiempo de infección, coincide con el trabajo realizado por Elkamel (2003). Sin embargo, en un estudio que también utilizaba gentamicina para controlar las bacterias extracelulares (Magariños y cols., 1996b), el número de bacterias recuperadas de las células infectadas no aumentaba con el tiempo de incubación. Este último trabajo utilizaba una multiplicidad de infección (MOI), número de bacterias añadidas por célula a infectar, de 100 a 1 y un periodo de infección de 5 horas, (mientras que en el trabajo de Elkamel (2003), la MOI fue de 1 a 1 y el tiempo de contacto fue solo de 30 minutos), y esto podría suponer un gran número de bacterias por célula desde el comienzo y una rápida acumulación de bacterias intracelulares, lo que deriva en lisis celular y liberación de bacterias al medio.

La máxima eficiencia de invasión observada en el presente estudio es más baja que las mostradas por otros patógenos en estudios semejantes como *Brucella* (Pizarro-Cerdá y cols., 2000) y *Salmonella* (Mills y Finlay, 1994), pero similares o superiores a los descritos en *Campylobacter* (Friis y cols., 2005; Byrne y cols., 2007), *Burkholderia* (Martin y Mohr, 2000; Stevens y cols., 2003), *Hafnia alvei* (Padilla y cols., 2008), *Prevotella* (Dorn y cols., 1998) y *Streptococcus iniae* (El Aamri y cols., 2012).

Nuestros estudios *in vitro* demostraron que, tras su internalización, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de invadir las células SAF-1 y que

una vez en el interior celular, se replican ligeramente durante al menos 48 horas sin producir efecto citopático en las células hospedadoras, permaneciendo viables durante 3-5 días en el interior celular (Figura V). Este hecho sugiere con elevada probabilidad, que la bacteria podría persistir o difundirse a través de células no fagocíticas en diferentes tejidos de los peces, facilitando así la progresión de la infección y de la enfermedad en los animales infectados. El periodo de viabilidad intracelular parece depender de la línea celular usada y las condiciones del ensayo, ya que Magariños y cols. (1996a) encontraron que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* permanece dentro de las células CHSE-214 durante al menos dos días, y en el estudio de López-Doriga y cols. (2000), con la línea celular de carpa EPC, las bacterias eran liberadas al medio entre 7 y 9 horas postinfección.

Probablemente, esta táctica de invasión confiere un nicho de protección celular para que las bacterias resistan o se repliquen, estando protegidas de los mecanismos de defensa del hospedador y/o de la acción de agentes antimicrobianos, incluidos los antibióticos (Plotkowski y cols., 1994). Un estadio intracelular proporciona varias ventajas a las bacterias, como ser inaccesibles a la respuesta inmune humoral y a la acción del complemento, no necesitar un mecanismo de adherencia específico para mantenerse en el lugar de infección y tener acceso a un medio rico en nutrientes (Elkamel, 2003).

El proceso de invasión fue dependiente de la temperatura (Figura VI), existiendo tasas de invasión mayores estadísticamente significativas cuando el proceso se realiza a 25°C frente a los 20°C. Además, la invasión bacteriana se inhibe totalmente al incubar las células a 4°C, lo que sugiere que el metabolismo celular juega un papel activo en el proceso de invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la línea celular analizada, tal y como sugieren diferentes autores

(Magariños y cols., 1996; López-Doriga y cols., 2000; Padilla y cols., 2008; Acosta y cols., 2009). Nuestros datos también sostienen la idea de que el proceso de internalización en células SAF-1 involucra a los microfilamentos de actina de la célula y que el metabolismo celular juega un papel activo en la internalización ya que el proceso de internalización fue inhibido por la citocalasina D y por la incubación celular a bajas temperaturas. Esto es compatible con los resultados publicados en otras líneas celulares de peces (Magariños y cols., 1996 a y b; López-Doriga y cols., 2000).

Finalmente, la preincubación de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con glucosa (Figura VII), no parece que produzca el bloqueo de receptores bacterianos específicos y/o ligandos celulares al no observarse diferencias estadísticamente significativas en las tasa de internalización bacteriana. En muchos sistemas, la adhesión y posterior internalización está mediada por lectinas presentes en la superficie del agente patógeno que se unen a hidratos de carbono complementarios de los tejidos del animal infectado (Acord y cols., 2005). Se ha demostrado que hidratos de carbono solubles, reconocidos por las lectinas superficiales de bacterias, bloquean la adhesión de las bacterias a las células animales *in vitro* (Sharon, 2006) y, por tanto, su posterior internalización, hecho que no ocurre en nuestro ensayo. Además, la presencia del 1% de glucosa en el medio de cultivo, para que las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* generasen una capa capsular lipopolisacárida, no parece afectar a los índices de invasión en las condiciones estudiadas. Según Bonet y cols. (1994), esta envuelta produce un aumento en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

VI.2.- Análisis de la interacción celular por inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia muestra que las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* conservan su capacidad de dividirse tras 48 horas localizadas en el interior celular. Tras la internalización, la bacteria se mantiene viable durante al menos 6 días. Al séptimo día, se detectaron algunas bacterias intracelulares con morfología redondeada y el espacio intracelular eucariota mostró un patrón de inmunofluorescencia intenso y difuso, sugiriendo un proceso de destrucción bacteriana.

En conjunto, nuestras observaciones con la técnica de la inmunofluorescencia dan información cuantitativa y morfológica directa de que estas cepas son internalizadas y sobreviven en las células SAF-1. Estas observaciones subrayan la necesidad de estudiar la posibilidad de que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* pueda persistir *in vivo* en células no fagocíticas de los tejidos de la dorada o que puedan contribuir a la progresión de la enfermedad en el pez infectado, ya que los estudios de inmunofluorescencia muestran que algunas cepas pueden permanecer intracelulares con una morfología relativamente bien conservada, durante al menos 6 días.

Los microorganismos, una vez internalizados por células no fagocíticas, tienen diferentes estrategias para sobrevivir en las células hospedadoras. Algunas bacterias, como *Shigella* spp. (Sansonetti y cols., 1986) y *Rickettsia* (Heinzen y cols., 1993), escapan de las vacuolas para multiplicarse en el citoplasma y posteriormente infectar células adyacentes. Sin embargo, hay numerosas especies bacterianas que permanecen dentro de las vacuolas de las células epiteliales durante la infección, y dentro de este grupo se encuentran especies como *Salmonella* y *Yersinia* (Finlay y Falkow, 1988; Janda y cols., 1991), *Haemophilus influenzae* (Virji y cols., 1991) o

estreptococos del grupo B (Rubens y cols., 1992). López-Doriga y cols. (2000), observaron que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no estaba libre en el citoplasma, sino dentro de grandes vacuolas citoplasmáticas y la bacteria se mantenía viable durante varias horas.

La observación de la reorganización de los microfilamentos de actina en células SAF-1 visualizada tras la tinción con Faloidina Alexa Fluor 488 (Figura XI) refuerza la idea de que la internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* involucra a los microfilamentos de actina, sumado a que el proceso de internalización fuese inhibido por la citocalasina D.

La tinción mediante técnica de inmunofluorescencia para EEA-1 y LAMP-1 en SAF-1 infectada con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* resultó negativa. El EEA-1, “*early endosomal auto-antigen 1*”, es un marcador específico de membranas de endosomas primarios o vacuolas, por lo que se localizará en estructuras de tipo vacuolar, que marcarán el borde de un compartimento donde se encuentren partículas que hayan entrado en el interior celular. Por su parte, el LAMP-1 “*Lysosomal-associated membrane protein 1*” es una proteína presente en la membrana de endosomas tardíos y lisosomas. La presencia de LAMP-1 sugeriría que la partícula se encuentra en compartimentos lisosomales dentro de la célula. Esperábamos poder poner de manifiesto un tráfico intracelular similar al descrito para *Brucella abortus* por Pizarro-Cerdá y cols. (2000) en una línea no fagocítica, el cual consistiría en observar un contacto rápido de la bacteria con los microfilamentos de actina, para luego ser localizada en una estructura marcada con EEA-1 (un endosoma o vacuola), para posteriormente observar la posible fluorescencia de un compartimento marcado con EEA1 y LAMP-1 (fusión de endosoma y lisosoma), para continuar colocalizando la bacteria con LAMP-1

(lisosoma), y finalmente restos bacterianos con LAMP-1 (enzimas del lisosoma actuando sobre la bacteria).

Hasta el momento, el tráfico intracelular en células no fagocíticas no está descrito en ningún patógeno de peces. La no observación de endosomas y lisosomas puede deberse a que los anticuerpos primarios utilizados (de ratón) no reconozcan las estructuras que se podrían estar formando en el fibroblasto del pez. También cabe pensar que, después de la emisión de microfilamentos de actina, la internalización de la bacteria no siga ese tipo de ruta para su tráfico intracelular. Esperamos que estudios posteriores de biología celular usando el microscopio electrónico y confocal ayuden a conocer el mecanismo exacto de invasión y posterior tráfico intracelular de este patógeno.

VI.3.- Expresión de citoquinas y gen Mx en SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Como es lógico, la mayoría de estudios sobre expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en peces están llevados a cabo en células clásicamente involucradas (fagocíticas) en esta respuesta tras su estimulación *in vivo* o *in vitro*, lo que complica establecer paralelismos con nuestro trabajo realizado en una línea celular no fagocítica como es SAF-1 con origen en fibroblastos de aleta de dorada.

La expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria por parte de la línea celular no fagocítica SAF-1 está descrita en pocos trabajos. Así, Pelegrín y cols. (2003) describieron por primera vez la secreción de IL-1 β por parte de macrófagos de dorada activados con LPS y ADN bacteriano, y a su vez observaron en la línea celular SAF-1 un precursor de la IL-1 β de distinto peso molecular al de los macrófagos almacenado en microvesículas. La adición de ATP al medio inhibió la

producción de esta citoquina en macrófagos, pero no en SAF-1, sugiriendo que en esta línea celular, la post-traducción de IL-1 β debe ser impedida por un inhibidor específico.

Como los fibroblastos están involucrados en procesos de reparación del daño tisular, Castillo-Briceño y cols. (2011) utilizaron la línea celular SAF-1 para estudiar procesos relacionados con el colágeno. El incremento en la expresión de IL-1 β y COX-2 por parte de SAF-1 es parte de la fase inflamatoria en dichos procesos.

Por otra parte, Picchietti y cols. (2012) estudiaron la respuesta de SAF-1 (estimulada con LPS o poly I:C) al ser puesta en contacto con un extracto de aloe. Entre otros genes, midieron la expresión de IL-1 β , Mx, COX-2 y TNF- α . El aloe actuó como inmunoestimulante en conjunción con el LPS o el poly I:C.

En cuanto a la expresión de citoquinas y gen Mx de nuestro estudio en células SAF-1 tras la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* crecidas en un medio con o sin glucosa, observamos que únicamente las cepas C2 y PP3 son capaces de estimular la expresión de todos los genes estudiados (apartado V.3.2.).

Tafalla y cols., (2004) midieron la expresión del gen Mx en la línea celular SAF-1 tras poner en contacto las células con Poly: I:C y Nodavirus. A diferencia de otros tipos celulares, la línea celular SAF-1 no mostró expresión constitutiva para el gen Mx, pero el tratamiento con Poly I:C o Nodavirus durante 24 indujo su expresión. Se utilizó una técnica de PCR convencional, buscando presencia o ausencia del gen. Al igual que Tafalla y cols. (2004), García-Rosado y cols. (2008) estudiaron la expresión del gen Mx en células SAF-1 y TV-1 (línea celular no fagocítica procedente de rodaballo). Tras las incubación con diferentes concentraciones de poly I:C, se midió la expresión del gen a diferentes tiempos. La expresión del gen Mx en SAF-1 observada en geles tras las PCR convencional, fue

más evidente que en la línea TV-1, donde la expresión comenzó a las 12 horas y fue en aumento hasta las 120 horas. Nuestros resultados para el gen Mx (mediante qPCR) después de la infección de la misma línea con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a las 12 horas comienza a observarse la expresión del gen Mx para 3 de las cepas estudiadas (C2, PP3 y 94/99), llegando al pico a las 24 horas (especialmente destacado para las cepas C2 y PP3) para descender ligeramente transcurridas 48 horas tras la infección. El sistema interferón es uno de los mecanismos de defensa antivírica más importantes y las proteínas Mx son uno de sus receptores moleculares mejor conocidos. El interferón es un factor celular inducido después del establecimiento de la infección y aparece antes que cualquier otro mecanismo de defensa. Debido a la falta de estudios sobre los genes que codifican para el interferón en la mayoría de las especies de peces, a que la vida media del transcriptor del interferón es muy corta (Johansen y cols., 2004) y a la elevada conservación de las proteínas Mx a través de la evolución de los vertebrados, estas han sido empleadas como marcadores para medir la respuesta de interferón tipo I inducida por virus ARN de doble cadena en peces (Lockhart y cols., 2007), cadenas de ARN doble de cadenas como el Poly I:C (Eaton, 1990; Tafalla y cols., 2004; Wu y Chi, 2007), LPS o ADN bacteriano (Acosta y cols., 2004) y otros componentes bacterianos (Ortega y Enríquez, 2007).

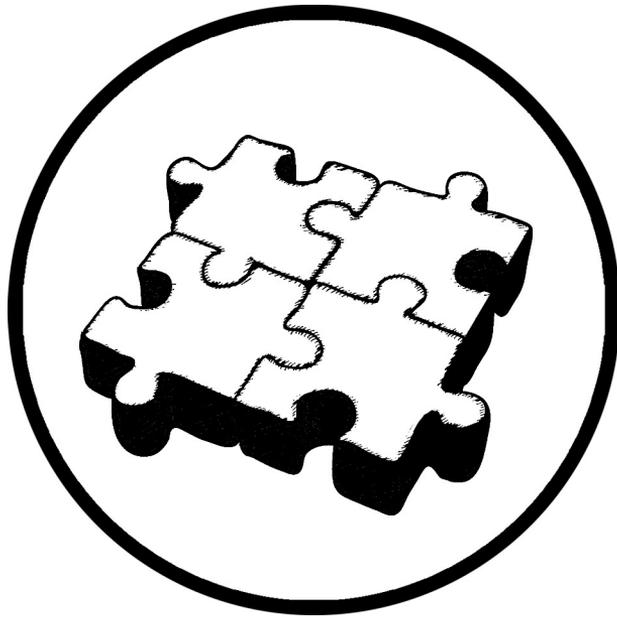
Las citoquinas son mediadores celulares del sistema inmune. La IL-1 β es un miembro de la familia de las interleuquinas IL-1 que juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria, maduración y proliferación de muchos tipos de células inmunitarias (Dinarello, 2002). Existen dos tipos de receptores de la IL-1 β , el IL-1r1 y el IL-1r2. El primer receptor interviene mediando los efectos de IL-1 β , mientras que el segundo actúa inhibiendo su actividad. La IL-1r2 ha sido clonada en dorada y su expresión ha sido estudiada por diferentes autores (López-Castejón y cols., 2007).

En nuestro trabajo, dos cepas (C2 y PP3) producen una expresión notable del gen IL-1 β entre las 24 y 48 horas. La respuesta inicial al estímulo se obtiene con la cepa PP3 a las 4 horas de incubación con y sin presencia de glucosa en el medio. La máxima expresión del gen IL-1 β vuelve a alcanzarse a las 24 horas con la cepa PP3 crecida con y sin glucosa, para descender notablemente a las 48 horas, como ocurre también con la cepa C2. Ingerslev y cols. (2010) estudiaron la expresión de citoquinas en una línea no fagocítica de trucha (RTHDF) tras su incubación con LPS, PAMPs y restos celulares de la misma línea. La única citoquina estudiada cuyo gen fue expresado en todas las condiciones fue la IL-1 β . La expresión comenzó 1 hora después de la incubación, alcanzando su pico a las 4 horas y decreciendo ligeramente a las 24 horas. Por la expresión de este gen, concluyeron que los fibroblastos intervienen en reacciones inflamatorias en conjunto con las células inmunitarias tradicionales. Por otro lado, Grasso (2013) en su tesis doctoral sobre vacunas inactivadas señala que la vacunación por baño con las diferentes bacterinas analizadas frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β a las 24 horas en dorada. En cuanto a la expresión del gen IL-1r2 en nuestro estudio, la respuesta se inicia a las 4 horas postincubación para la cepa PP3 y alcanza su máximo a las 48 horas cuando se mantuvo sin glucosa añadida en el medio. Para la cepa C2, el máximo nivel de expresión llega a las 24 horas post-infección en ambas condiciones. López-Castejón y cols. (2007) describieron una sobre-expresión de IL-1r2 en dorada después de la infección con *Vibrio anguillarum* en todos los tejidos examinados, encontrando además que la expresión de este gen se indujo más que la de IL-1 β en riñón anterior, hígado y bazo.

Sepulcre y cols. (2007) estudiaron *in vitro* la estimulación del gen de la molécula proinflamatoria COX-2 en la dorada. En este trabajo, los granulocitos y

macrófagos de dorada fueron estimulados con diferentes sustancias simuladoras de patógenos (PAMPs), obteniendo estimulación de IL-1 β , TNF- α y COX-2. En nuestro trabajo, el gen COX-2 en SAF-1 se estimula en las cepas C2 y PP3 desde las 4 horas de incubación, alcanzando su máximo a las 48 horas. Abelli y cols. (2009) encontraron sub-expresión de COX-2 (y otras moléculas pro-inflamatorias) en intestino de alevines de doradas y lubinas alimentadas con una dieta enriquecida con probióticos, sugiriendo una disminución de la inflamación.

El TNF- α es una citoquina con potente acción proinflamatoria secretada por varias células inmunes a lo largo de una infección o de un daño tisular. El homólogo del TNF- α humano ha sido clonado en dorada y muchas otras especies de peces. Roca y cols., (2008) afirman que el TNF- α desempeña en peces funciones diferentes que en mamíferos, señalando la complejidad de la evolución que ha tenido lugar en la regulación de la inmunidad innata por las citoquinas. En nuestro estudio, la expresión del gen TNF- α se produce de forma más intensa en ausencia de glucosa en el medio de cultivo (bacteria normal, sin capa lipopolisacárida), siendo la respuesta de mayor duración con la cepa C2, que se inicia a las 4 horas de incubación y alcanza su pico máximo de expresión a las 48 horas. La cinética se expresa de forma mantenida a las 24 y 48 horas de incubación independientemente de la presencia de glucosa para el estímulo con las cepas C2 y PP3. No obstante, la cepa 94/99 inicia una cinética de expresión tardía a las 48 horas cuando existió presencia de glucosa en el medio. En el trabajo de Roca y cols. (2008), se comparó la expresión de este gen en leucocitos de riñón anterior frente a la de células endoteliales del endocardio de dorada. La expresión de TNF- α fue mayor en células endoteliales. Aunque esta activación del TNF- α sugiere que puede facilitar la diseminación de los patógenos, también encontraron que se favorece la producción de genes antivirales.



CONCLUSIONES

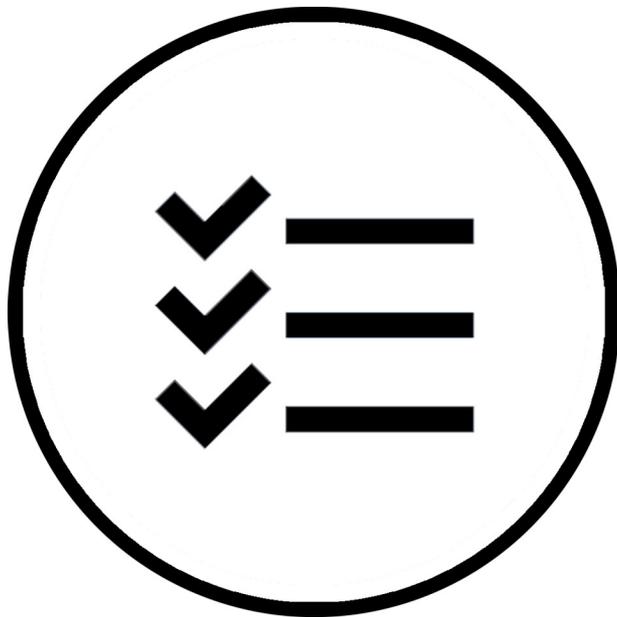
VII.- CONCLUSIONES

Primera.- La capacidad de invadir la línea celular no fagocítica de dorada SAF-1 por parte de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se ve influenciada por la temperatura de incubación bacteriana y el metabolismo celular.

Segunda.- *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de adherirse e invadir la línea celular SAF-1, y una vez en su interior, se replica ligeramente, permaneciendo viable hasta siete días, planteando la posibilidad de que dicho patógeno se difunda a través de células no fagocíticas, pudiendo así facilitar la progresión de la infección en un hospedador.

Tercera.- En el proceso de internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1 se produce una reorganización de los microfilamentos de actina. El posterior estudio del tráfico intracelular requiere de la utilización de anticuerpos específicos de peces.

Cuarta.- *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de modular la expresión de todas las citoquinas analizadas y gen Mx en células no fagocíticas de dorada, siendo dicha inmunomodulación de mayor intensidad con las cepas C2 y PP3.



RESUMEN

VIII.- RESUMEN

Toda intensificación en los sistemas de producción desencadena una mayor aparición de enfermedades infectocontagiosas. Las enfermedades infecciosas son la mayor causa de pérdidas económicas en la acuicultura, estimándose que en conjunto un 10% de todos los animales cultivados se pierden cada año debido a dichas enfermedades.

La pasterelosis, provocada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ha llegado a convertirse en un problema de primer orden en la acuicultura marina mundial. En Canarias es una de las enfermedades de mayor prevalencia y repercusión económica para la acuicultura, con una tendencia de presentación estacional, en épocas estivales. La dorada (*Sparus aurata*) es una de las especies de peces más afectadas por este patógeno.

Para poder luchar contra las enfermedades infecciosas en acuicultura, es indispensable tener los conocimientos necesarios sobre ellas. La comprensión de la patogenia, difusión y la transmisión de la enfermedad es clave para el control y la prevención de la misma.

Mediante ensayos de invasión celular y microscopía de fluorescencia evidenciamos que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es una especie con capacidad de adherirse, invadir y sobrevivir en el interior de la línea celular no fagocítica SAF-1, hecho importante para el posible establecimiento de un estado portador en especies marinas de peces.

Mediante la técnica de la inmunofluorescencia demostramos que la actina está involucrada en el proceso de internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en SAF-1, quedando pendiente la descripción del tráfico intracelular de esta bacteria en los fibroblastos.

Las cepas C2 y PP3 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* estimulan la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en las células SAF-1, a pesar de ser una línea no fagocítica.



SUMMARY

IX.- SUMMARY

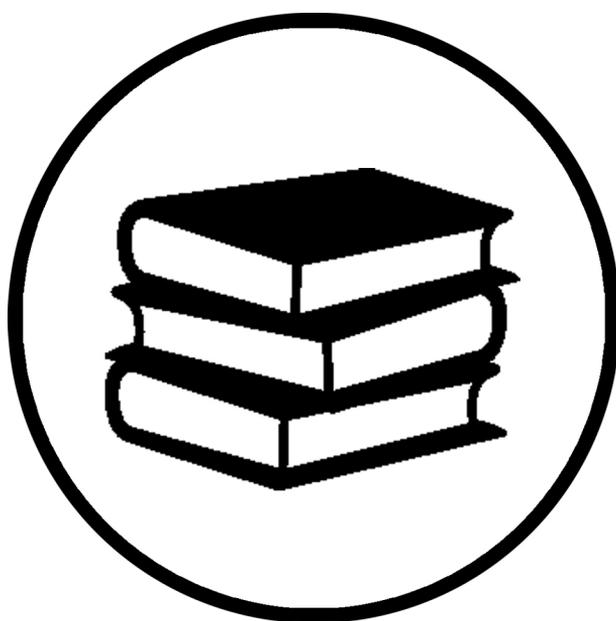
Any intensification of production systems produces an increased occurrence of infectious diseases. Infectious diseases are the major cause of economic losses in aquaculture, it estimated that altogether 10% of all farmed animals are lost each year due to these diseases.

Pasterelosis, caused by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* has come to become a major issue in the global marine aquaculture. In the Canary Islands it is one of the most prevalent disease and economic impact for aquaculture, with a presentation seasonal trend in summer times. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) is one of the fish species most affected by this pathogen.

To fight against infectious diseases in aquaculture is essential to have the necessary knowledge of them. The understanding of the pathogenesis, dissemination and transmission of the disease is key to controlling and preventing it.

The bacterial invasion assays and fluorescence microscopy showed that *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is a species with ability to adhere, invade and survive inside the non-phagocytic fish cell line SAF-1, and this fact is important for the possible establishment of a carrier state in marine fish species.

The immunofluorescence study showed that actin is involved in the internalization process of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in SAF-1, pending the description of the intracellular trafficking of this bacterium in fibroblasts cells. The strains C2 and PP3 stimulate expression of related genes to immune response in the SAF-1 cells, despite being a non-phagocytic cell line.



BIBLIOGRAFÍA

X.- BIBLIOGRAFÍA

Abelli, L., Randelli, E., Carneval, O., Picchietti, S. (2009). Stimulation of gut immune system by early administration of probiotic strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163:340-342.

Acosta, F., Real, F., Caballero, M.J., Siero, C., Fernández, A. y Rodríguez, L.A. (2002). Evaluation of immunohistochemical and microbiological methods for the diagnosis of brown trout infected with *Hafnia alvei*. *Journal of Aquatic Animal Health* 14: 77-83.

Acosta, F. (2004), Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F., Ellis, A.E. (2004). Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 255-63.

Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J. y 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 and Shellfish Immunology* 20: 709-717.

Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., Real, F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in nonphagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Disease* 32: 535-541.

Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., (1999). Vibriosis. En: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), "*Fish Diseases and Disorders*", vol. 3. CAB Intern., Publ., United Kingdom, pp. 523-558.

Andreoni, F., Boiani, R. y Serafini (2013). Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine* 31 (5): 820-826.

Aoki, T. y Kitao, T. (1985). Detection of transferable R plasmids in strains of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 8: 345-350.

APROMAR (2015). Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. La acuicultura marina de peces en España. Informe Apromar, 89pp.

Arijo, S., Borrego, J.J., Zorrilla, I., Balebona, M.C. y Moriñigo, M.A. (1998). Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L) macrophages. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 63-72.

Austin, B. y Adams, C. (1996). Fish pathogens. En: Austin, B., Altwegg, A., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 197-244.

Austin, B. y Austin, D.A. (1999). Bacterial Fish Pathogens. En: "*Disease of Farmed and Wild Fish*". 3rd edn. Springer-Verlag, Chichester.

Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 58:1-8.

Bakopoulos, V., Volpatti, D., Papapanagiotou, E., Richards, R.H., Galleoti, M. y Adams, A. (1997). Development of an ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in culture and in "spiked" fish tissues. *Aquaculture* 156: 359-366.

Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galleoti, M. Adams, A y Dimitriadis, J. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases* 26 (2): 77-90.

Balebona, M.C., Moriñigo M.A., Sedano, J., Martínez-Manzanares, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J. y Toranzo A.E. (1992). Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in southwestern Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 12(1): 168-170.

Baptista, T., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (1996). First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 16: 92-95.

Barg, U. y Lavilla-Pitogo, C.R. (1996). The use of chemicals in aquaculture: A summary brief of two international expert meetings. *FAO Aquaculture Newsletter* 14: 12-13.

Barnes, A.C., Balebona, M.C., Horne, M.T. y Ellis, A.E. (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145(2): 483-494.

Barnes, A.C. dos Santos, N.M.S. y Ellis, A. E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in Biologicals* 121: 75-84.

Bejar J., Borrego J.J. y Alvarez M.C. (1997). A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 150: 143-153.

Bellaire, B. H., Martin Roop, R.M., and James A. Cardelli, J.A. (2005) Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes. *Infection and Immunity* June: 3702-3713.

Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. En: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), *Fish Vaccinology*. Karger, Basel, Switzerland, pp. 153-160.

Bernardet, J.F., Grimont, P.A.D. (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characteristics of *Flexibacter columnaris* sp. nov. nom. rev. *Flexibacter psychrophilus* sp. nov. nom rev. and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masamura, 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 346-354.

Bernoth, E.M., 1997. Furunculosis: the history of the disease and of disease research. En: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Smith, P. (Eds.), *Furunculosis. Multidisciplinary Fish Disease Research*. Academic Press, United Kingdom, pp. 1-20.

Berthe, F.C.J., Michel, C., Bernardet, J.F. (1995). Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Disease of Aquatic Organisms* 21:151-155.

Blyth, C.C., Adams, D.N., Chen, S.C.A. (2009) Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection *NSW Public Health Bulletin* 20(9-10): 157-161.

Bonet, R., Magariños, B., Romalde, J.L., Simon-Pujol, M.D., Toranzo, A.E., Congregado, F. (1994) Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 124: 285-9.

Bricknell, I.R., Bowden, T.J., Bruno, D.W., MacLachlan, P., Johnstone, R., Ellis, A.E., (1999). Susceptibility of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to infection with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 175: 1-13.

Çandan, A., Kucuker, M.A. y Karatas, S. (1996). Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 16: 150-153.

Castillo-Briceño, P., Bihan, D., Nilgesc, M., S Hamai, S., Meseguera, J., García-Ayala, A., Farndaleb, R.W., Mulero, V. (2011) A role for specific collagen motifs during wound healing and inflammatory response of fibroblasts in the teleost fish gilthead seabream. *Molecular Immunology* 48:826–834.

Chen, M.F., Henry-Ford, D., Groff, J.M., (1995). Isolation of *Flexibacter maritimus* from California. *Fish and Health Section/Asian Fisheries Society Newsletters*. 22: 7-11.

Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H. (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells, *Res. Microbiol.* 145:543-552.

Craven, R.R., Hall, J.D., Fuller, J.R., Taft-Benz, S., Kawula, T.H. (2008). *Francisella tularensis* Invasion of Lung Epithelial Cells. *Infection and immunity*, 76 (7): 2833-2842.

Daly, J.G. (1999). Other Bacterial Pathogens. En: "Fish disease and disorders", Vol. 3. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. eds. CAB International, New York. pp. 577-598.

Deitsch, K.W., Moxon, E.R. Wellems, T.E. (1997). Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (3), 281-293.

Devesa, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1989). Ulcerative and skin and fin lesions in reared turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fish Diseases* 12: 323-333.

Díaz-Rosales, P., Chabrillon, M., Arijó, S., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M.A. y Balebona, M.C. (2006) Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 29: 355-364.

Dinarello, C.A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology* 20: 1-13.

do Vale, A., Marques, F., y Silva, M.T. (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 15(2): 129-44.

do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., y Azevedo, J.E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology* 58(4): 1025-38.

Doménech, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Lawson, P., García, J.A., Cutúli, M.T., Blanco, M., Gibello, A., Moreno, M.A., Collins, M.D., Domínguez, L. (1997). Winter disease outbreak in sea bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquaculture* 156: 317-326.

Eaton, W.D. (1990) Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic:cytidylic acid. *ol. Diseases of Aquatic Organisms* 9: 193-198.

Edwards, R.A., Puente, J.L. (1998). Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis, *Trends in Microbiology* 6 (7), 282-287.

Edwards, J., Shao, J., Ault, K., Apicella, M. (2000). *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infection and Immunity* 68: 5354-5363.

Egusa, S. (1992). Bacterial pseudotuberculosis in *Seriola quinqueradiata*. En: "Infectious diseases of fish". Kotheke, V.S. ed. A.A Balkema publishers, Brookfield (USA). pp. 219-230.

El Aamri, F., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Valdivia, J., Ramos-Vivas, J., Padilla, D., (2012). *In vitro* study of adherence, invasion, and persistence of *Streptococcus iniae* in fibroblastic-like fish cell line SAF-1. *Journal of Aquatic Animal Health*. 24: 165-170.

El Aamri, F., Real, F., Acosta, F., Bravo, J., Román, L. Déniz, S., Padilla, D. (2015) Differential innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology* 46(2):436-41.

Elkamel, A.A. y Thune, R.L. (2003). Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health* 15: 167-174.

Elkamel, A.A., Hawke, J.P., Henk, W. y Thune, R.L. (2003). *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health* 15: 175-183.

Ellis, A.E. (1997). Immunization with bacterial antigens: furunculosis. En: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, P.R. (Eds.), *Fish Vaccinology*. Karger, Basel, pp. 107-116.

FAO (2010). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la pesca y la Alimentación. ISBN 978-92-5-306029-0

Fukuda, Y. y Kusuda, R. (1981). Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, vol. 47: 147-150.

Fukuda, Y. y Kusuda, R. (1985). Vaccination on yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathology* 15: 263-269.

Furones, M.D., Rodgers, C.J. y Munn, C.B. (1993) *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 105-125.

García-Rosado, E., M., Alonso, C., Béjar, J., Manchado, M., Cano, I., Borrego, J.J. (2008). Expression analysis of Mx protein and evaluation of its antiviral activity against sole aquabirnavirus in SAF-1 and TV-1 cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121: 123-129.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M. y Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniezko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 139-144.

Grasso, V. (2013) Tesis Doctoral: "Vacunas inactivadas frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en dorada (*Sparus aurata*): efecto sobre la producción de células igm positivas y la expresión génica de moléculas proinflamatorias y Mx".

Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B. Rikarsen, K.S., Greger, E. y Vignuelle, M. (1998). Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology* 14: 159-162.

Hamaguchi, M. y Kusuda, R. (1989). Field testing of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin against pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bulletin of Marine Science and Fisheries* 11: 11-16.

Hanif, A., Bakopoulos, V., I. Leonardos, I., y Dimitriadis, G.J., (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology* 19(4) 345-361.

Handlinger, J., Soltani, H., Percival, V. (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species of Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 20: 159-168.

Hanski, C., Kutschka, U., Schmoranzler, H.P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H., Riecken, E.O.(1989). Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infection and Immunity* 57:673-678.

Harbison, C.E., Lyi, S. N., Wendy S. Weichert, W.S., Colin R. Parrish, C.R. (2009). Early Steps in Cell Infection by Parvoviruses: Host-Specific Differences in Cell Receptor Binding but Similar Endosomal Trafficking. *Journal of Virology* 83 (20): 10504-10514.

Harvey, HA., Ketteter, MB., Preston, A., Lubaroff, D., Williams, R., Apicella, MA. 1997. Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity* 65, 2420-2427.

Hastein, T., Gudding, R. and Evensen, Ø. (2005). "Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide," *Developments in Biologicals* 121: 55-74.

Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider, T.G. y Guarino, A.M. (1987). Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture* 65: 193-204.

Hawke, J.P., Thune, R.L., Cooper R.K., Judice, E., Kelly-Smith, M. (2003). Molecular and phenotypic characterization of strains of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from hybrid striped bass cultured in Louisiana, USA. *Journal of Aquatic Animal Health* 15: 189-201.

Hiney, M., Oliver, G., 1999. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). *Fish Diseases and Disorders* 3: 341-426.

Ho L.-P., Lin, J.H.Y., Liu, H.-C., Chen, H.-E., Chen, T.-Y. y Yang, H.-L.(2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 30 (1): 412-419.

Ho, L.-P., Chang, C.-J, H.-C. Liu,H.C., H.-L.Yang, H.L. y Lin, J. H.-Y. (2014). Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. *Journal of Fish Diseases* 37(1):51-62.

Huang H-T, Tu C, Chuang S-H, Hung H-H, Su J-F, Lin S-Y (2001). Pasteurellosis in Reared Hybrid Striped Bass (*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*). *Fish Pathology* 36(1): 35-37.

Jngerslev, H.C., Ossum, C.G. Lindenstrøm T, Nielsen ME PLoS One. 2010 Feb 18;5(2):e9304. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Janssen, W. A. y Surgalla, M. J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology* 96: 1606-1610.

Johansen, A., Collet, B., Sandaker, E., Secombes C.J., Jørgensen, J.B. (2004) Quantification of Atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay. *Fish and Shellfish Immunology* 16(2):173-84.

Jones, M.W. y Cox, D.I. (1999). Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family *Pasteurellaceae*, a case report. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 19(2): 75-78.

Kawahara, E., Nelson, J.S. y Kusuda, R. (1986). Fluorescent antibody technique compared to standard media culture for detection of pathogenic bacteria for yellowtail and amberjack. *Fish Pathology* 21: 39-45.

Kawakami, H., Shinohara, N. y Sakai, M. (1998). The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, Chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in Yellowtail. *Fish Pathology* 33(4): 287-292.

Kawakami, H., Shinohara, N., Fukuda, Y., Yamashita, H., Kihara, H. y Sakai, M. (1997). The efficacy of lipopolisaccharide mixed chlorophorm-killed cell (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 154: 95-105.

Kent, M.L. (1982). Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API 20E (Analytab Products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1725-1729.

Ketterer, MR., Shao, J., Hornick, D., Buscher, B., Bandi, V., Apicella, M. 1999. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infection and Immunity* 67, 4161-4170.

Kim, E.H. y Aoki, T. (1993a). Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiology and Immunology* 37(2): 103-109.

Kim, E.H. y Aoki, T. (1993b). The structure of the Chloramphenicol resistance gene on a transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology* 37(9): 705-712.

Kim, E.H. y Aoki, T. (1993c). Detection of R plasmid encoded with resistance to Florfenicol in *Pasteurella piscicida*. *Gyobyo Kenkyu* 28(4): 165-170.

- Kim, E.H. y Aoki, T. (1994). The trasposon-like structure of IS26-Tetraciline, and Kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology* 38(1): 31-38.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1996a). Sulfonamide resistance gene in a transferable R plasmid of *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology* 40(5): 397-399.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1996b). Sequence analysis of the Florfenicol resistance gene encoded in the transferable R plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology* 40(9): 665-669.
- Kimura, M., y Kitao, T. (1971). On the etiological agent of "bacterial tuberculosis" of *Seriola*. *Fish Pathology* 6: 8-14.
- Kitao, T. y Kimura, M. (1974). Rapid diagnosis of pseudotuberculosis in yellowtail by means of the fluorescent antibody technique. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 40: 889-893.
- Kitao, T. (1993). Streptococcal infection. En: Bacterial diseases of fish. Inglis, Roberts y Bromage (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 196-210.
- Klesius, P., Evans, J., Shoemaker, C. H., Yeha, H., Goodwin, A.E., Adams, A. y Thompson, K. (2006) Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquaculture* 258: 180-186.

Koike, Y., Kuwahara, A. y Fujiwara, H. (1975). Characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. *Japan Journal of Microbiology* 19: 241-247.

Kubota, S., Kimura, M., y Egusa, S. (1970a). Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-I. Symptomatology and histopathology. *Gyobyō Kenkyū* 4: 103-110.

Kubota, S., Kimura, M., y Egusa, S. (1970b). Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-II. Mechanism of nodule formation. *Gyobyō Kenkyū* 5: 31-34.

Kubota, S., Kimura, M. y Egusa, S. (1972). Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-III. Findings on nodules and bacterial colonies in tissues. *Gyobyō Kenkyū* 6: 69-72.

Kusuda, R. y Miura, W. (1972). Characteristics of a *Pasteurella* sp. Pathogenic for pond culture ayu. *Fish Pathology* 7: 51-57.

Kusuda, R. y Yamaoka, M. (1972). Etiological studies on pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. I. On the morphological and biochemical properties. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 1325-1332.

Kusuda, R. y Hamaguchi, M. (1988). The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in culture Yellowtail. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 8: 51-53.

Kusuda, R., Ninomiya, M., Hamaguchi, M., Muraoka, A. (1988). Efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Fish Pathology*, vol. 23, no. 3: 191-196.

Lamberti, Y.A., Álvarez Hayes, J., Pérez, M.L. (2010). Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages. *Infection and Immunity*, 78: 907-913.

Lockhart, K., Bowden, T.J., Ellis, A.E. (2004). Poly I:C-induced Mx responses in Atlantic salmon parr, post-smolts and growers. *Fish and Shellfish Immunology* 17(3):245-54.

López-Castejón, G., Sepulcrea, M.P., Francisco J. Roca, F.J., Barbara Castellana, Planas, J.V. José Meseguera, J., Mulero, V. The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels, , Volume 44, Issue 10, April 2007, Pages 2772–2780.

López-Dóriga, M.V., Barnes, A.C., dos Santos, N.M., y Ellis, A.E. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology* 146: 21-30.

López-Romalde, S., Magariños, B., Núñez, S., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (2003a). Phenotypic and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 15: 39-47.

López-Romalde, S., Núñez, S., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (2003b). Black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*), a new susceptible host for *Pseudomonas anguilliseptica*. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 23: 258-264.

Lorenzen, E. y Karas, N. (1992) Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Disease of aquatic organisms* 31: 209-220.

Luppi, P., Geng, X., Cifarelli, V., Drain, P., Trucco, M. (2009). C-peptide is internalised in human endothelial and vascular smooth muscle cells via early endosomes. *Diabetologia* 52(10):2218-2128.

Medeley, C.R. y Peiris, J.S.M. (2002) Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *Journal of Clinical Virology* 25: 121-134.

Magariños, B., Romalde, J., Byin, I., Fouz, B. y Toranzo, A.E. (1992a). Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3316-3322.

Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1992b). Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of General and Applied Microbiology* 138: 2491-2498.

Magariños, B., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (1994a). Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 15(3): 88-90.

Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., y Toranzo, A.E. (1994b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2990-2998.

Magariños, B., Noya, M., Romalde, J.L., Pérez, G. y Toranzo, A.E. (1994c). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 14: 120-122.

Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to the skin mucus of marine fish. *Disease of Aquatic Organisms* 21, 103-108.

Magariños, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martínez, M.J., Congregado, F., y Toranzo, A.E. (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis* 21(4): 289-97.

Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., y Toranzo, A.E. (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters* 138:29-34.

Magariños, B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (1996c). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases* 6: 41-64.

Magariños, B. y Romalde, J.L. (1997a). Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. En: "Fish Vaccinology". R. Gudding, A. Lillehaug, P. J. Midtlyng y F. Brown, eds. Basel: Karger. pp. 167-177.

Magariños, B., Osorio, C., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (1997b). Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Systematics and Applied Microbiology* 20: 634-639.

Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Núñez, S. y Toranzo, A.E. (1999). Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 19(4): 159-161.

Magariños, B., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L. (2000). Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiology and Infection* 125: 213-219.

Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E., Lamas, J. (2001). Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195: 17-21.

Magariños, B., Romalde, J.L., López-Romalde, S., Moriñigo, M.A., Toranzo, A.E., (2003). Pathobiological characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 23: 183-190.

McVicar, A.H., White, P.G. (1979). Fin and skin necrosis of Dover sole (*Solea solea* L.). *Journal of Fish Diseases* 2: 557-562.

McVicar, A.H., White, P.G. (1982). The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 26: 213-222.

Mladineo, I., Miletic I., Bočina, I. (2006). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* outbreak in Cage-Reared Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Aquatic Animal Health* 18: 51-54.

Monteville, MR., Konkel, ME. (2002). Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infection and Immunity* 70: 6665-6671.

Monteville, MR., Yoon, JE., Konkel, ME. (2003). Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149: 153-165.

Magahama, M., Umezaki, M., Tashiro, Ryo, Oda, M., Kobayashi, K., Shibutani, M., Takagishi, T., Ishidoh, K., Fukuda, M., Sakurai, J. (2012). Intracellular trafficking of *Clostridium perfringens* iota-toxin b. *Infection and Immunity* 80(10):3410-3416.

Naka, H., Hirono, I., y Aoki, T. (2007). Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *Journal of Fish Diseases*, 30(11), 681-90.

Nakai, T., Fujiie, N., Muroga, K. Arimoto, M., Mizuta, Y. y Matsuoka, S. (1992). *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Gyobyo Kenkyu* 27(2): 103-108.

Nazareth, N., Magro, F., Appelberg, R., Silva, J., Gracio, D., Coelho, R., Cabral, J.M., Abreu, C., Macedo, G., Bull, T.J., Sarmiento, A. (2015) Increased viability but decreased culturability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in macrophages from inflammatory bowel disease patients under Infliximab treatment. *Medical Microbiology and Immunology* 204:647–656.

Nelson, J. S., Kawahara, E., Kawai, K. y Kusuda, R. (1981). Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bulletin of Marine Sciences and Fisheries*, Kochi University 1: 17-22.

Nitzan, S., Shwartsburd, B., Vaiman, R. y Heller, E.D. (2001). Some characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Israel during outbreaks of pasteurellosis in hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*). *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 21: 77-80.

Noya, M., Magariños, B. y Lamas, J. (1993). Histología asociada a *Pasteurella piscicida* y sus productos extracelulares en dorada, *Sparus aurata*. Actas IV Congreso Nacional de Acuicultura Illa de Arousa. pp. 599-604.

Noya, M., Magariños, B. y Lamas, J. (1995a). Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture* 131: 11-21.

Noya M., Magariños B., Toranzo A.E. y Lamas J. (1995b). Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light- and electron-microscopic study. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 177-186.

Oelschlaeger, T., Tall, B. (1997). Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract. *Infection and Immunity* 65, 2950-2958.

Onishi, K., Watanabe, K. y Jo, Y. (1982). Pasteurella infection in young black seabream. *Fish Pathology* 16: 207-210.

Ortega, C. y Enriquez, R. (2007). Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria* 39:7-18.

Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (1999). 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2942-2946.

Ostland, V.E., la Trace, C., Morrison, D., Ferguson, H.W. (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11: 35-44.

Padilla, D., Acosta, F., Bravo, J., Grasso, V., Real, F. y Vivas, J. (2008). Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* strains in human epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology* 105(5):1614-22

Panangalal, V.S., Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Mitra, A., Morrison, E.E. (2006). Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. *Disease of aquatic organisms* 68(3): 197-207.

Pazos, F., Santos, Y., Núñez, S., Toranzo, A.E., (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in marine aquaculture of Spain. *Fish Health Section/American Fisheries Society Newsletter* 21: 1-2.

Pelegrín, P., Chaves-Pozo, E., Mulero, V., Meseguer, J. (2004). Production and mechanism of secretion of interleukin-1b from the marine fish gilthead seabream. *Developmental and Comparative Immunology* 28:229-237

Perdomo, O.J., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P.J. (1994). Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *Journal of Experimental Medicine* 180: 1307-1319.

Peruski A.H. y Peruski L.F. (2003) Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10(4): 506-513.

Picchietti, S., Bernini, C., Belardinelli, M.C., Ovidi, E., Taddei, A.R., Guerra, L., Abelli, L., Fausto, A.M. (2013) Immune modulatory effects of *Aloe arborescens* extract on the piscine SAF-1 cell line. *Fish and Shellfish Immunology* 34(5):1335-44.

Ping-Chung, L., Ji-Yang, L. y Kuo-Kau, L. (2003). Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology* 43(6): 499-507.

Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Gorvel, J.P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and Infection* 2: 829-835.

Pizarro-Cerdá, J., Lecuit, M., y Cossart, P. (2002). Measuring and Analysing Invasion of Mammalian Cells by Bacterial Pathogens: The *Listeria monocytogenes* System. *Methods in Microbiology* 31: 161-176.

Pizarro-Cerdá, J. y Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124: 715-727.

Plotkowski, M. C., A. M. Saliba, S. H. Pereira, M. P. Cervante, and O. Bajolet Laudinat.(1994). *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. *Infection and Immunity* 62:5456-5463.

Preissner, KY., Shingh, C. 2000. Extracellular matrix and host cell surface. En: Cellular Microbiology. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington DC. 46-69.

Real, F., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P. y Déniz, S. (1997). Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 17(5): 153-157.

Reali, D., Pretti, C., Tavanti, L. y Cognetti-Varriale, A.M. (1997). *Pasteurella piscicida* (Janssen y Surgalla, 1964): a simple method of isolation and identification from rearing-water. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 17(2): 51-52.

Roberts, R.J. (1978). Fish pasteurellosis. En: Fish Pathology, Bailliere-Tindall, Londres, pp. 298-300.

Roca, F.J., Mulero, I., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw,S.A. Meseguer, J., Mulero, V. (2008). Evolution of the Inflammatory Response in Vertebrates: Fish TNF- Is a Powerful Activator of Endothelial Cells but Hardly Activates Phagocytes. *Journal of Immunology* 181:5071-5081.

- Rodgers, C.J., Furones, M.D. (1998). Disease problems in cultured marine fish in the mediterranean. *Fish Pathology* 33: 157-164.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Fouz, B., Byín, I., Núñez, S. y Toranzo, A.E. (1995a). Evaluation of BIONOR mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Disease of Aquatic Organisms* 21: 25-34.
- Romalde, J.L., Breton, A., Magariños, B. y Toranzo, A.E. (1995b). Use of Bionor Aquarapid-Pp kit for the diagnosis of *Pasteurella piscicida* infections. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 15(2): 64-66.
- Romalde, J.L. y Magariños, B. (1997). Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Developmental Biology Standards* 90: 167-177.
- Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (1999). Streptococcosis of marine fish. En: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. No. 56. International Council for the Exploration of the Sea. Copenhagen, Denmark, pp. 1-8.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Toranzo, A.E. (1999a). Pasteurellosis. ICES Leaflet No 54. International Council for the Exploration of the Sea.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R., Toranzo, A.E. (1999b). Assessment of a magneticbead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *Journal of Microbiology Methods* 38: 147-154.

Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2002). Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. En: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Cunningham, Cunningham, C.O. (Ed.). Kluwer Academic Publ, Netherlands, pp. 211-223.

Sansonetti, P.J., Arondel, J., Cantey, J.R., Prévost, M.C., Huerre, M., (1996) Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infection and Immunity* 64: 2752-2764.

Santos, Y, Romalde J.L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja J.L. y Toranzo, A.E. (1993). Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogen. *Aquaculture* 116: 111-120.

Santos, Y., Pazos, F., Barja, J.L., (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. No. 55. International Council for the Exploration of the Sea. Copenhagen, Denmark, pp. 1-6.

Sepulcre M.P., López-Castejón G., Meseguer J., Mulero V. (2007) The activation of gilthead sea bream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology* 44:2009–2016.

Simidu, U. y Egusa, S. (1972). A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 803-812.

Sinderman, C.J. (1990). Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Vol I. En: "Disease of Marine Fish". 2nd ed. Academic Press, New York. pp. 106-125.

Skarmeta, A.M., Bandin, I., Santos, Y. y Toranzo, A.E. (1995). In vitro killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Disease of Aquatic Organisms* 23: 51-57.

Skretting (2007). Enfermedades Emergentes en la Piscicultura Marina Española. *Skretting Informa Primavera* 2007: 22-31.

Smibert RM y Krieg NR. (1981). Systematics: general characterization, En: Manual of Methods for General Bacteriology. Herhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg y Phillips (ed.). *American Society of Microbiology*. Washington, D.C. pp 409-443.

Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E. y Boone, J.G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 88: 1814-1815.

Subasinghe, R. (1997) Fish health and quarantine. *En: Review of the State of World Aquaculture*. FAO Fisheries Circular 886 FIRI/C886 (Rev.1), FAO, Roma.

Sukui, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1639-1652.

Tafalla, C., R. Aranguren, R., C.J. Secombes, C.J., A. Figueras, A., B. Novoa A. (2004) Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 11 -24.

Takashima, N., Aoki, T. y Kitao, T (1985). Epidemiological surveillance of drug-resistant strains of *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathology* 20: 209-217.

Thune, R.L., Fernández, D.H., Hawke, J.P., Miller, R. (2003). Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Diseases of aquatic organisms* 57: 51-58.

Thyssen, A., Grisez, L., Van Houdt, R. y Ollevier, F. (1998). Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1145-1151

Thyssen, A., Van Eygen, S., Hauben, L., Goris, J. Swings, J. y Ollevier, F. (2000). Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1013-1019.

Thyssen, A., Ollevier, F. (2003). In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. *Aquaculture* 200: 259-269.

Tobback, E. (2009) Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). PhD thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

Toranzo, A.E., Barja, J. y Hetrick, F.M. (1982). Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 3: 43-45.

Toranzo, A.E., Santos, Y., Núñez, S., Barja, J.L. (1991a). Biochemical and serological characteristics, drug resistance, and plasmid profiles of Spanish isolates of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Pathology* 26: 55-60.

Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. y Barja, J. (1991b). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain. *Aquaculture* 99: 1-15.

Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1992). First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest of Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 12: 147-149.

Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for cold water fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 5-36.

Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L. (2004). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37-61.

Totten, P. A., J. C. Lara, D. V. Norn, and W. E. Stamm. 1994. *Haemophilus ducreyi* attaches to and invades human epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 62:5632-5640.

Tran Van, G., Sansonetti, P.(2000). Cell adhesion molecules and bacterial pathogens. En: "Cellular Microbiology". Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington D.C. 46-69

Tung, M.C., Tsai, S.S., Ho, L.F., Huang, S.T. y Chen S.C. (1985). An acute septicemic infection of *Pasteurella* organisms in pond-cultured Formosa Snakehead fish (*Chana maculata* Lacepede) in Taiwan. *Fish Pathology* 20: 143-148.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Archives of Virology* 154:1939-1943.

Villena, A.J. (2003). Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 111-140.

Wakabayashi, H., Hikida, H., Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 396-398.

Wang, Y., Han, Y., Li, Y., Chen, J.X., Zhang, X.H. (2007). Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Gunther) in China. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 47(5): 763-768.

Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., Wang, J.(2013). Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus*) and antibacterial agents sensitivity. *Veterinary Microbiology* 162(2-4):957- 963.

West, P.A. y Colwell, R.R. (1984). Identification and classification of Vibrionaceae: an overview. En: "Vibrios in the Environment". R.R. Colwell ed. Wiley. New York. pp. 263-285.

Wu YC1, Chi SC. Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene.(2007). *Fish and Shellfish Immunology* 23(1):97-108.

Yasunaga, N., Hatai, K. y Tsukahara, J. (1983). *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured sea bream. *Fish Pathology* 18: 107-110.

Yasunaga, N., Yasumoto, S., Hirakawa, E. y Tsukahara, J. (1984). On a masive mortality of oval file fish (*Navodan modestus*) caused by *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathology* 19: 51-55.

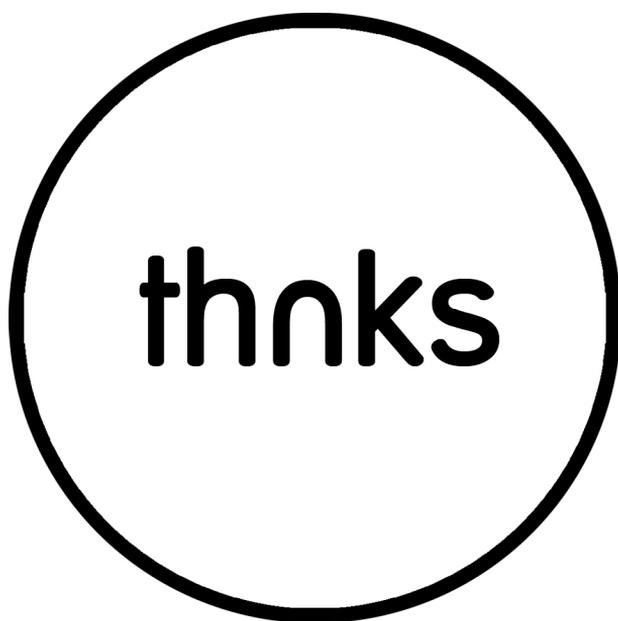
Yasunaga, N. y Yasumoto, S. (1988). Therapeutic effect of florfenicol on experimentally induced pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathology* 23: 1-5.

Yoshida, T., Inglis, V., Misawa, N., Kruger, R. y Sakai, M. (1997). In vitro adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. *Journal of Fish Diseases* 20: 77-80.

Zhao, J. y Aoki, T. (1989). A specific DNA hybridization probe for detection of *Pasteurella piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 7: 203-210.

Zhao, J. y Aoki, T. (1992). Plasmid profile analysis of *Pasteurella piscicida* and use of a DNA probe to identify the species. *Journal of Aquatic Animal Health* 4: 198-202.

Zorrilla, M.C., Balebona, M.A., Moriñigo, C., Sarasquete, C. y Borrego, J.J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Disease* 22: 167-172.



AGRADECIMIENTOS

XII.- AGRADECIMIENTOS

Este apartado es el único que puede escribirse sin haber leído antes. Eso debería hacerlo sencillo, pero no lo es. Cuesta mucho resumir lo agradecida que me siento con tantas personas que, de una manera u otra, han colaborado para que mi tesis doctoral pueda leerse y para que yo llegue entera. Son muchos años (más de uno piensa que demasiados) y resulta que al final voy con prisas para poder terminar e imprimir las nueve copias de este libro... Esto pretende ser un agradecimiento, pero sepan que también lo escribo sintiéndolo como una dedicatoria a las personas que han estado en algún punto del camino que llega hasta aquí. Señalar que el orden de aparición no está necesariamente vinculado con la importancia.

GRACIAS:

A Fernando, por darme la oportunidad desde que estaba en cuarto de carrera, por quererme en el grupo, por animarme cuando se me han escapado las lágrimas, por hacerme salir de cada reunión con esperanza y por hacer que esta tesis terminara de salir adelante.

A Dani, porque sin ti no habría tesis. Por complicarme y solucionarme las cosas, por combinar caos y perfección, por ser jefe y compañero. Te doy las gracias, pero también te pido perdón por todo el estrés generado a última hora.

A mi madre, por su empeño y dedicación, por demostrarme varias veces que cuando uno se propone algo seriamente, se puede conseguir. Gracias por tu ejemplo multitarea y por cuidarme (con 3 o con 30).

A mi padre, por enseñarme cosas que no se aprenden en la universidad y a dar gracias por todo. Gracias por ser mejor hombre cada día que pasa.

A Anu, por madurar de repente y comportarte como si fueras la hermana mayor. La lata que me das y lo orgullosa que estoy de ti...

Gracias a los tres por todos los esfuerzos que han hecho por mí siempre, especialmente en los últimos meses.

A Maye y Tati por hacernos la vida más fácil, mínimo desde que nací.

A (mi) Marcos por aparecer en el momento justo, en el que menos lo esperaba. Gracias por estar, por la alegría y por la ayuda, en todos los ámbitos imaginables, para poder acabar esta tesis. Sabes que (si lo consigo yo) serás Doctor consorte.

A mi abuela Lola, por su sentido del humor.

A mi abuelo Bartolo, por enseñarme desde chiquitita (baraja mediante) que unas veces se gana y otras se pierde.

A mi abuelo Isidro, por transmitirme (creo que sin darse cuenta) el amor a los animales.

A Flor y Santi, por ser la mejor “familia adoptiva” (Andrés incluido) que se puede escoger, por el apoyo incondicional y por poder hablar con ustedes sin tener que medir las palabras.

A Jimena, por tus consejos y apoyo dentro y fuera del laboratorio. Eres de lo mejor que me llevo de este doctorado.

A Sara, por acompañarme en tantas batallas desde el 2002. ¡Que sean muchos años más juntas!

A Raquelilla por ayudarme y animarme cuando más lo necesité. Gracias por estar siempre disponible, incluso con la agenda que tienes...

A Tatiana, amiga querida, por mantener una amistad mucho más allá de las paredes del IUSA.

A Juanmi, por estar en muchos momentos del camino y por permitirme contar contigo (y por traer a Santi y Flor de regalo). Gracias también a tu familia.

A mi gente del hospi: Tere, Debi, Oliver, Manola, Luigi, Pitti, María,... Por los ratos buenos y no tan buenos, por los desahogos, las risas, los karaokes, los queques, las cenas de Navidad,...

A mis chiquillos de La Conki, sin ustedes seguramente esto habría llegado antes, pero no hubiera sido igual. Culpables de meterme el gusanillo de una bendita droga: la del CID, la del Granca, la de la liga de Gáldar, la del baloncesto en general y, por qué no decirlo, la de Twitter. Gracias por tantos momentos y por las cervezas. Gracias también a novias y demás familia.

A Félix, por la raíz de esto y por muchas cosas del camino.

A mis compañeras de laboratorio: A Lore, por tu ayuda, por los cantes, las recetas, los chistes, la comprensión,... A Fati, por tu profesionalidad, por tu cariño y por la comida tan rica que haces. A Valen, por tu ayuda y por las conversaciones que no van de trabajo. A Lita, por ayudarme, especialmente abriendo peces, aunque no fueran de esta tesis. A Belinda, por tu buena educación y tu sonrisa. A Elena, por tu simpatía, aunque coincidiéramos poquito. A Mónica (y Dani), por ser un gran descubrimiento detrás de una chica de estancia y por haberme permitido estar en una boda inolvidable. A Justo, el punto masculino, tantas mujeres que tuviste que aguantar...

A Jose, por tus ideas, protocolos, artículos y fotos.

A la gente con la que compartí el día a día en el IUSA: A Carmen, por la amabilidad para dejarme las mil cosas que te puedo haber pedido. A Juan *Pulpo*, por las nociones de estadística y las conversaciones profundas en desayunos, almuerzos o meriendas. A Silvia, Tibi, Mónica, Natalia, Yurena, Davinia, Ana, Guaci, por favores varios y por los ratos de charla en la cocina. A Orestes, por hacerme reír (y mortificar) con tus puntos de vista. A Alejandro, Lidia, Carlos y Ana Sofía, por saber que podía contar con los del piso de arriba. A Elisa, Pedro, Juan e Isa, por la cercanía y por traer o arreglar lo que hiciera falta. A Fela, por saludar cada día sonriendo.

A muchas personas de la facultad: A Mercedes, por ser tan resolutiva y por tu paciencia. A Toño, por el respaldo. A Yania, por cosillas de última hora. A Begoña y Soraya. A los profesores que se interesaron por cómo íbamos mi tesis y yo (Oti, Jose, Antonio, Ique, Manolo Arbelo, Mame, Raduán,...) A Carlos, por las charlas sobre baloncesto. A la buena gente de producción (Aridany, Antonio, Lorenzo, Noemí y Tacho). A Sergio, por ser un gran investigador y mejor amigo, ¡Gracias, Feluco! A todas las niñas de parasitología por ser buenas compañeras y prestarme lo que necesitara. A Yeray, ¡Feliz Año! A todas las personas del PAS del módulo 7, de conserjería y de administración por la amabilidad cuando pedí algo. A Ricardo, por facilitar siempre el papeleo. A Loli y Nuha, por el trato estupendo que dan en la cafetería.

A Paco, por alegrarme el día con piropos y tu forma de hablar (aunque vinieras con algún marrón).

A Lola, por saberlo todo sobre Tercer Ciclo y explicarlo.

A Dani Montero, Rafa, Rayco, Javi,... por ayudarme para poder trabajar en Taliarte (aunque no sea parte de esta tesis).

A Serhat, por haberme prestado tu ordenador para imprimir con urgencia.

A mis compañeros de promoción con los que he vivido tantas cosas, durante y después de la carrera. Da igual lo mucho o lo poco que los vea. Mención especial para Noe, Isra, Tony (niños de Tejeda incluidos, aquel cumpleaños con ustedes fue punto de inflexión), Alejandro, Yeray, Norber y Edu.

A más veterinarios: A Bea, por tu amistad y por el sufrimiento del doctorado compartido en la distancia. Tengo pendiente un viaje a Barcelona... A Aquilino, por dejar huella en mucha gente en no tanto tiempo (y por las fiestas en tu casa). A Samuel y Armiche, por las risas.

A Vero, porque da igual lo mucho o poco que hablemos, sé que estás ahí.

A Mercy, por ser mi amiga desde el cole.

A Nau, Lea y Dolo, porque sé que se puede contar con ustedes.

A todas las buenas personas que me ha dado el mundo del baloncesto.

A Pedro, por tu amistad y tu visión de las cosas.

A Yure y Teisy, por estar siempre dispuestas a echarme una mano, por las buenas vibraciones y por la tranquilidad que da a nuestra familia poder contar con ustedes.

Si consideras que alguna vez a lo largo de estos años me ayudaste y no te menciono, discúlpame. Me gustaría que me lo dijeras para poder agradecértelo personalmente.

Resumiendo: GRACIAS, este reto personal tiene un cachito tuyo.



La comprensión de la patogenia, difusión y la transmisión de la enfermedad es clave para el control y la prevención de la misma. En este sentido, la investigación juega un papel fundamental. La información sobre la patogénesis de la pasterelosis es todavía escasa. La mayoría de los estudios *in vitro* se centran en líneas fagocíticas para estudiar la inmunidad no específica contra este patógeno, siendo poca la información sobre la supervivencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células no especializadas en la fagocitosis y, por tanto, en los tejidos del pez.

Con la elaboración del presente trabajo, se pretende estudiar varios aspectos de la interacción de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con la dorada a través de diferentes estudios realizados *in vitro* con células no fagocíticas de dorada (SAF-1), uno de sus hospedadores naturales de mayor relevancia biológica y económica.