



UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**Caracterización del perfil de expresión de genes
inmunorreguladores en trucha en respuesta a la
vacunación con una vacuna atenuada de *Aeromonas
hydrophila***

**Memoria presentada por Leticia Barrioluengo Pérez
para optar al grado de Doctor.**

León, a 27 de Agosto de 2012

Los trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral han sido financiados con fondos de los proyectos “Caracterización de respuestas inflamatorias post-vacunación en trucha” de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Ref. LE047A05) y “Caracterización del perfil de expresión de genes inmunorreguladores en trucha en respuesta a la vacunación con una vacuna atenuada (mutante *aroA* de *Aeromonas hydrophila*)” del Plan Nacional de I+D+i (Ref. AGL2005_02492), ambos cofinanciados con aportaciones del FEDER. La autora ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral para la formación de Personal Investigador de la Comunidad de Castilla y León, cofinanciada por el Fondo Social Europeo, durante los años 2007-2008 (Orden EDU/1165/2007) y de una ayuda predoctoral del Plan Nacional de Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación / Ciencia e Innovación) durante los años 2008-2011 (Ref. AP2007-02842).

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de un modo u otro han ayudado a que esta tesis se haya llevado a cabo.

En primer lugar agradecer al Dr. Alberto José Villena Cortés, director de esta Tesis Doctoral, el haberme brindado la oportunidad de iniciarme en el complicado mundo de la investigación. Al igual que a las Dras. Pilar López Fierro y Blanca Rázquin Peralta miembros de este grupo de investigación.

Mención especial merecen mis “compis” de grupo, Camino y Neila, con las que he pasado grandes momentos y mejores “jornadas gastronómicas”.

A todos los miembros del Área de Biología Celular con los que he compartido los últimos seis años, especialmente a todos los becarios.

A mi familia y amigos que a pesar de no entender mis horarios siempre han aguantado mis “depende”.

En último lugar, aunque no por ello menos importante, a Ángel quien realmente ha sabido como se viva una tesis, muchas gracias.

Índice

INTRODUCCIÓN	9
ENFERMEDADES INFECCIOSAS E INMUNOPROFILAXIS EN ACUICULTURA	11
Importancia de la inmunoprofilaxis en acuicultura	12
Tipos de vacunas utilizados en acuicultura	16
Adyuvantes.....	18
Métodos de vacunación.....	19
SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS	21
PATOLOGÍAS INFECCIOSAS POR AEROMONAS EN EL CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS ..26	
VACUNAS CONTRA <i>A. HYDROPHILA</i> EN ACUICULTURA	28
Vacuna aroA de <i>A. hydrophila</i>	29
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNITARIO DE TELEÓSTEOS	31
Órganos linfoides	33
Sistema inmunitario innato.....	35
Sistema inmunitario adaptativo.....	36
RESPUESTA INFLAMATORIA	42
Citoquinas	43
Enzimas con funciones regulatorias de la inflamación.....	53
ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS DE PECES POR ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.	55
JUSTIFICACIÓN Y PROPÓSITO	59
MATERIAL Y MÉTODOS	67
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	69
LÍNEAS CELULARES	70
Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	71
Medio de cultivo de las líneas celulares	72
VACUNAS AROA DE LA CEPA AROA DE <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i>	74
Confirmación de la identidad de la cepa bacteriana	74
Preparación de la vacunas	77
Estudio de la resistencia de <i>A. hydrophila</i> a gentamicina en medio TCMD	80
ENSAYOS DE VACUNACIÓN INTRAPERITONEAL	81
ENSAYOS DE EXPOSICIÓN <i>IN VITRO</i>	82
ENSAYOS DE EXPLOSIÓN RESPIRATORIA	83
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INMUNORREGULADORES	85
Extracción de RNA	87
Retrotranscripción	89
PCR semicuantitativa	90
Electroforesis en geles de agarosa.....	92
Análisis densitométrico	93

PCR cuantitativa	93
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	95
RESULTADOS.....	97
IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SEGURIDAD DE LA VACUNA	99
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	101
Expresión de genes inmunorreguladores tras la vacunación: análisis semicuantitativo	101
Expresión de genes inmunorreguladores tras la vacunación: análisis cuantitativo	102
ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	126
Efectos de la exposición de los cultivos a las vacunas aroA.....	127
Ensayo de explosión respiratoria	130
Expresión de genes inmunorreguladores en los cultivos expuestos a las vacunas.....	131
DISCUSIÓN.....	157
COMPROBACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL MUTANTE <i>ARO A</i> Y DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA VACUNA VIVA.....	160
EXPRESIÓN DE GENES INMUNORREGULADORES TRAS LA VACUNACIÓN.....	161
Las vacunas aroA inducen una respuesta proinflamatoria en <i>O. mykiss</i>	162
Expresión del gen de la cadena MHC-II β y su posible relación con la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa.	168
Modulación de la respuesta proinflamatoria: expresión de los genes de TGF- β y de COX-2	171
RESPUESTAS DE LAS LÍNEAS CELULARES TSS Y TPS-2 A LAS VACUNAS AROA	174
Las vacunas aroA activan respuestas microbicidas en las líneas celulares TSS y TPS-2.....	176
Expresión de genes inmunorreguladores en las líneas celulares expuestas a las vacunas aroA.....	178
COMPARACIÓN ENTRE LOS MODELOS DE VACUNACIÓN I.P. Y DE ENSAYO <i>IN VITRO</i> ...	183
LA VACUNA AROA VIVA ES MÁS EFECTIVA EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIA.....	185
CONCLUSIONES.....	193
BIBLIOGRAFÍA.....	197

ABREVIATURAS

Amp: ampicilina

APCs: células presentadoras de antígenos

CFUs: unidades formadoras de colonias

COX: ciclooxigenasa

DHB: ácido 2,3-dihidroxibenzoico

DL50: dosis letal 50

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FCS: suero fetal de ternera

HBSS: solución salina tamponada de Hanks

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible

i.p.: intraperitoneal

ISGs: genes estimulados por interferón

Ka: kanamicina

LPS: lipopolisacárido

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

NBT: azul de nitrotetrazolium

NCCs: células citotóxicas no específicas

NK: células citotóxicas naturales

PABA: ácido 4-aminobenzoico

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Poly I:C: ácido polinosínico - policitidílico

PRRs: receptores de reconocimiento de patrón

RPS: porcentaje de supervivencia relativa

ROS: metabolitos reactivos del oxígeno

RT: retrotranscripción

SOD: superóxido dismutasa

TAE: tampón Tris, acetato y EDTA

Tc: células T citotóxicas

TCMD: medio completo de Mishell y Dulton

TGF: factor de crecimiento transformante

Th: linfocitos o células T colaboradores

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TSA: agar de soja triptona

TSB: caldo de soja triptona

— Introducción —

ENFERMEDADES INFECCIOSAS E INMUNOPROFILAXIS EN ACUICULTURA

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos que implica algún tipo de intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, así como la propiedad individual o empresarial del stock cultivado, la planificación, desarrollo y operación de sistemas, sitios, instalaciones y prácticas de acuicultura y la producción y el transporte (Modificado de FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2008).

De acuerdo con la FAO (FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service [FAO FIPS], 2011) la producción mundial de pescado, crustáceos y moluscos alcanzó los 144,6 millones de toneladas en 2009, pero mientras que la producción de la pesca de captura se ha mantenido en un nivel en torno a los 90 millones de toneladas desde 2001, la producción acuícola ha seguido mostrando un fuerte crecimiento, aumentando a una tasa de crecimiento medio anual del 6,1%, pasando de 34,6 millones de toneladas en 2001 a 55,7 millones de toneladas en 2009. La FAO calculó que la acuicultura aportaría en 2012 más del 50% de consumo de pescado (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010).

Las condiciones de la acuicultura intensiva, donde se dan altas densidades poblacionales, un rápido crecimiento y altos niveles de estrés, traen consigo la propensión al desarrollo de enfermedades, especialmente las infecciosas (Newman, 1993). Así, al incremento de la acuicultura en las últimas décadas se ha asociado también un aumento significativo de la incidencia de brotes de enfermedades infecciosas, representando estas el mayor obstáculo para el desarrollo de esta industria ya que, a menudo, son causantes de pérdidas económicas de gran importancia (Noga *et al.*, 2011).

Las enfermedades infecciosas que afectan a los peces pueden ser causadas por diferentes agentes patógenos, incluyendo, virus, bacterias, hongos y parásitos; cada uno de estos patógenos requiere un tratamiento distinto y específico para su

control. En términos de producción, las enfermedades infecciosas son la causa mayoritaria de las pérdidas económicas en acuicultura debido a la mortalidad de los animales, los costes de los tratamientos y el descenso de la producción. Así, las pérdidas económicas debidas solo a la mortalidad por enfermedades infecciosas, incluso en países desarrollados con buenas prácticas de manejo, pueden suponer al menos un 10% del total (Parker, 2001). Para la acuicultura mundial, incluyendo aquellos países menos desarrollados donde las prácticas sanitarias acuícolas no son tan rigurosas, pérdidas del 10% equivalen a casi 5.000 millones de dólares (Noga *et al.*, 2011).

Además, esa situación hace que sea necesario el uso de de tratamientos para el control de las enfermedades (Thompson *et al.*, 2004), generalmente mediante el uso de antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, existe una creciente preocupación acerca del uso de estas sustancias en acuicultura debido a la aparición de cepas resistentes, la presencia de residuos en el medio y al efecto perjudicial en las poblaciones y ecosistemas microbianos acuáticos. Los antibióticos que se utilizan en acuicultura inducen resistencia en microorganismos patógenos y no patógenos, lo que es una amenaza tanto para el medio ambiente como para la salud del ser humano y de los animales (Sorum, 1998). Por ello, a partir de 1990 se está prestando especial atención a la prevención por medio de las mejoras en las estrategias de cría, selección genética de cepas tolerantes al estrés y enfermedades (Newman, 1993) y, particularmente, mediante el uso de métodos de inmunoprofilaxis, incluyendo vacunas e inmunoestimulantes (Yanong, 2008).

Importancia de la inmunoprofilaxis en acuicultura

Como se ha indicado anteriormente, para que la industria de la acuicultura pueda prosperar en un futuro es un requisito que las pérdidas ocasionadas por las enfermedades y, especialmente, el uso de antibióticos se mantengan en valores mínimos (Gudding *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2004).

En ese sentido, se considera que la inmunoprofilaxis, que incluye la estimulación de la inmunidad innata, mediante inmunoestimulantes, y de la

adquirida por vacunación (Thompson *et al.*, 2004; Hastein *et al.*, 2005; Sommerset *et al.*, 2005;), constituye uno de los cimientos para el desarrollo de una acuicultura sostenible (Gudding *et al.*, 1999). Generalmente, la inmunoprofilaxis produce un efecto positivo en la producción, reduciendo las pérdidas económicas provocadas por las enfermedades. Por ejemplo, en Noruega el uso de antibióticos se ha visto reducido desde aproximadamente 47 toneladas a una desde que la vacunación se ha convertido en una estrategia común para el control de las enfermedades bacterianas en piscifactorías (Markestad *et al.*, 1997).

Los primeros intentos de inmunización de peces datan de los años 1930, pero no fue hasta mediados de los 70 del siglo pasado cuando se comercializaron las primeras vacunas. Durante la década de 1980, simultáneamente al crecimiento global de la acuicultura, se incrementó el interés por el desarrollo y la aplicación de vacunas, inicialmente frente a enfermedades bacterianas (Newman, 1993). Generalmente, hoy en día, la vacunación es parte de la rutina de trabajo de las piscifactorías para el control de los brotes de enfermedades bacterianas (Hastein *et al.*, 2005). Por ejemplo, en salmonicultura los peces son vacunados entre tres y cinco veces durante su ciclo de producción, normalmente usando vacunas multivalentes, de modo que la productividad ha aumentado gracias a la vacunación (Sommerset *et al.*, 2005).

En el caso de los peces, debido a la importancia relativa de los sistemas defensivos innatos frente al lento desarrollo de las respuestas antígeno-específicas, el uso de inmunoestimulantes puede ser satisfactorio desde el punto de vista de la producción (Bostock *et al.*, 2010; Oliva-Teles, 2012). Sin embargo, el uso de inmunoestimulantes requiere un aporte continuo de los mismos ya que la protección inespecífica es de baja intensidad y corta duración (Galindo-Villegas *et al.*, 2004). Por otro lado, este método tiene la ventaja de producir una protección contra una amplia variedad de agentes infecciosos, especialmente bacterianos (Sakai, 1999; Magnadóttir, 2010).

No obstante, frente a algunas enfermedades muy virulentas y especialmente en ciclos de producción largos, la vacunación presenta claras ventajas de efectividad y, a la postre, económicas. Aunque en los peces, especialmente en salmones y truchas, el desarrollo de la inmunidad antígeno-específica es lento y no existe una respuesta secundaria comparable a la de los vertebrados homeotermos (Plouffe *et al.*, 2005; Magnadóttir, 2006), la vacunación produce una protección potente y de relativa larga duración (Hastein *et al.*, 2005; Plant *et al.*, 2011).

Así, el número de enfermedades que pueden ser controladas actualmente mediante vacunación está creciendo gracias a la inversión en el desarrollo de nuevas vacunas para acuicultura y a la disponibilidad de nuevas tecnologías de vacunación (Plant *et al.*, 2011). El creciente desarrollo de las técnicas moleculares así como de la ingeniería genética incrementa las oportunidades de mejorar las vacunas frente a distintos patógenos así como de desarrollar técnicas nuevas que mejoren la eficacia de esta técnica de inmunoprofilaxis (Gómez-Casado *et al.*, 2011).

Además, el incremento en la diversidad de las especies cultivadas, así como el desarrollo de vacunas para otros tipos de microorganismos, está provocando un aumento constante en el uso de vacunas en acuicultura. Actualmente, en relación con enfermedades bacterianas, existen vacunas comerciales (**Tabla 1**) frente a vibriosis, furunculosis, yersiniosis o enfermedad de la boca roja, pasteurelisis, síndrome del alevín de trucha arcoíris por agua fría (“Cold water disease”), enfermedad de la úlcera invernal (“Winter ulcer disease”), edwardseliosis, streptococosis y lactococosis (Hastein *et al.*, 2005; Midtlyng, 2006), y muchas otras vacunas experimentales están en desarrollo. La protección proporcionada por estos productos comerciales es generalmente buena y como resultado de su utilización los niveles de antibióticos utilizados para controlar las enfermedades bacterianas en las piscifactorías se han visto reducidos (Thompson *et al.*, 2004).

Igualmente, ha comenzado a ser habitual el uso de algunas vacunas antivirales (Plant *et al.*, 2011) que han demostrado ser eficaces, la mayoría de ellas basadas en virus inactivados o en subunidades proteicas recombinantes. Por

ejemplo, se ha comercializado una vacuna inactivada frente a enfermedad pancreática (PD, causada por un alfavirus acuático) disponible en Irlanda, frente a la anemia infecciosa de salmón (ISA, causada por un ortomixovirus) disponible en Canadá y EEUU y vacunas de DNA frente a VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral) y IHNV (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa) (Somerset *et al.*, 2005) (**Tabla 1**).

VACUNAS FRENTE A ENFERMEDADES EN TRUCHA ARCOÍRIS	
Vibriosis clásica	<i>Listonella anguillarum</i> O1
Yersiniosis	<i>Yersinia ruckeri</i>
Furunculosis	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i>
Furunculosis atípica	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>Achromognes</i>
BKD	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
Piscirickettsiosis	<i>Piscirickettsia salmones</i>
Lactococcosis	<i>Lactococcus garviae</i>
Streptococcosis	<i>Streptococcus iniae</i> , <i>S. uberis</i>
IHN	Virus de la hematopoyesis infecciosa
VHS (investigación)	Virus de la septicemia hemorrágica viral
Enfermedad del sueño (investigación)	Alfa virus de salmónidos

Tabla 1. Algunas vacunas comerciales y en desarrollo frente a enfermedades en trucha arcoíris. Modificado de Hastein *et al.*, 2005.

Sin embargo, en general, esos tipos de vacunas antivirales no son tan eficaces como las vacunas contra enfermedades bacterianas. Por ello, se han seguido dos estrategias distintas para el desarrollo de vacunas antivirales en peces. Por una parte, se han desarrollado vacunas antivirales vivas atenuadas, que proporcionan buenas condiciones de protección, administración y coste (Lopez-Doriga *et al.*, 2001; Ronen *et al.*, 2003), pero que tienen el inconveniente para su uso comercial en los aspectos de bio- y ecoseguridad de las mismas, por la posibilidad de reversión de la virulencia. La otra estrategia de desarrollo de vacunas contra virus en acuicultura

consiste en el uso de vacunas de DNA (Jiménez *et al.*, 2005; Kurath, 2008). Una vacuna de este tipo, contra el virus causante de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) en salmones ya ha sido licenciada y está en uso comercial en Canadá (Corbeil *et al.*, 1999). No obstante, su uso no está permitido en Europa, ya que la farmacopea europea no permite su licenciamiento para la acuicultura.

Tipos de vacunas utilizados en acuicultura

Vacunas inactivadas (bacterinas)

Las vacunas más comunes para inmunizar peces son aquellas que se basan en preparaciones de bacterias inactivadas mediante calor o formalinización. Este tipo de vacunas inducen una buena respuesta humoral pero son menos eficaces a la hora de producir una respuesta celular o de las mucosas (Smith, 2000; Yanong, 2008)

Se han desarrollado vacunas inactivadas por formalinización para organismos gram negativos como *L. (Vibrio) anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida* y *Y. ruckerii*. Estas proporcionan buenos resultados cuando los serotipos utilizados en la preparación de la vacuna cubren todo el campo de cepas existentes y cuando la vacuna se usa correctamente. La administración se hace por inyección o inmersión y apenas presentan efectos colaterales (Gudding *et al.*, 1999). Para algunas enfermedades, incluyendo infecciones con *A. salmonicida* subs. *salmonicida*, solo mediante inmunización por inyección con bacterinas con adyuvante se consiguen niveles aceptables de protección (Midtlyng, 1996a; Midtlyng *et al.*, 1996b; Ingilæ *et al.*, 2000).

Vacunas de componentes bacterianos (subcelulares)

En este tipo de vacunas se utilizan fragmentos celulares y/o macromoléculas, como fimbrias, flagelos, toxinas inactivadas, polisacáridos capsulares, más o menos purificados, así como antígenos recombinantes, como componentes antigénicos de la vacuna (Smith, 2000; Yanong, 2008). El uso de estos productos elimina los problemas asociados con la reversión de la bacteria a una forma virulenta, y se usan como alternativa cuando las bacterinas no proporcionan la

protección deseada. Las exotoxinas secretadas por las bacteria contienen muchos de los productos responsables de producir daños durante la infección, por tanto, tienen que ser desactivadas, generalmente mediante formalinización, antes de ser inyectadas (Smith, 2000).

Vacunas vivas atenuadas

La inoculación con vacunas vivas es realmente una infección, que no causa enfermedad pero que permite que la cepa vacunal se reproduzca en los animales vacunados, produciéndose así una diseminación y presentación efectiva del antígeno, durante un periodo más o menos extenso de tiempo (Shoemaker *et al.*, 2009). Este tipo de vacunas estimulan tanto la respuestas inmunitarias innatas y adquiridas humoral y celular (Marsden *et al.*, 1996; Yanong, 2008) e inducen memoria (Smith, 2000). Económicamente hablando son de desarrollo sencillo y requieren bajas dosis de administración debido a su multiplicación en el pez (Gudding *et al.*, 1999).

En acuicultura se han desarrollado vacunas vivas experimentales contra enfermedades víricas y bacterianas. Inicialmente, se desarrollaron vacunas atenuadas contra virus, como los causantes de la VHS, la IHN, la necrosis infecciosa pancreática (IPN) y la viremia primaveral de carpas (SVC) (Fryer *et al.*, 1976; Jørgensen, 1982; Fijan, 1988; Christie, 1997), pero también se han utilizado de forma experimental diversas vacunas bacterianas atenuadas contra enfermedades de alto impacto económico, como furunculosis, edwardsiellosis, vibriosis o la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) (Shoemaker *et al.*, 2009).

Una de las mayores desventajas que presentan las vacunas vivas atenuadas es la potencial reversión a la forma virulenta (Thompson *et al.*, 2004). Por ello, frente a los métodos clásicos de atenuación, como los pases *in vitro*, mutagénesis química o el aislamiento de cepas mutantes espontáneas de baja virulencia, se está abriendo paso el uso de cepas en las que, mediante técnicas de DNA recombinante, se han introducido mutaciones definidas que afectan a genes de virulencia, genes de rutas metabólicas esenciales o genes “house-keeping” (Detmer *et al.*, 2006). En cualquier

caso, por el momento, las vacunas vivas atenuadas no se pueden licenciar para su uso en acuicultura, aunque se han permitido ensayos de campo en la industria del pez gato en Estados Unidos con una vacuna contra *Edwardsiella ictaluri* (Gudding *et al.*, 1999).

Vacunas de DNA

Este tipo de vacunas se basan en la inyección intramuscular de DNA desnudo. Los genes adecuados del patógeno son clonados en plásmidos y por medio de la inyección en el pez, los genes se expresan extracromosomalmente en los propios tejidos del animal (Thompson *et al.*, 2004). De esta forma, se consigue la expresión en el organismo vacunado del antígeno específico en una forma que induzca una respuesta inmunitaria adecuada (Lepa *et al.*, 2010; Gómez-Casado *et al.*, 2011). Así, en mamíferos, este tipo de vacunas induce una respuesta inmunitaria específica con producción de anticuerpos, células T-cooperadoras (T-helper) así como células citotóxicas (Gudding *et al.*, 1999).

Las vacunas de DNA presentan muchas ventajas sobre las vacunas convencionales, siendo más fáciles de usar y almacenar, y de producción barata. Además no existe la posibilidad de reversión a forma virulenta.

En acuicultura la investigación de vacunas de DNA se ha centrado en vacunas virales. Las glucoproteínas de los virus causantes de la VHS y de la IHN en trucha arcoíris causan la producción de niveles moderados de anticuerpos protectores y neutralizantes bajo condiciones experimentales (Lorenzen *et al.*, 1993). Una vacuna de este tipo, contra el virus causante de IHN en salmones ya ha sido licenciada y está en uso comercial en Canadá (Corbeil *et al.*, 1999) y otras están en desarrollo o ya se ha demostrado su eficacia, como las vacunas contra la VHS (McLauchlan *et al.*, 2003; Chico *et al.*, 2009).

Adyuvantes

Las primeras vacunas de peces, desarrolladas en la década de los 70 del siglo pasado, casualmente contenían potentes inmunógenos de *Y. ruckeri*, *L. anguillarum*

o *V. ordalli*, que proporcionaban una fuerte respuesta en trucha arcoíris (Thompson *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se utilizan antígenos más débiles, como es el caso de los de *A. salmonicida*, patógeno causante de la furunculosis, es necesario el uso de adyuvantes para obtener un nivel aceptable de protección (Midtlyng, 1996a). En salmónidos, una única inyección de vacunas con adyuvantes basados en aluminio o glucanos induce una protección aceptable, sin embargo, la duración es relativamente corta (Gudding *et al.*, 1999), mientras que los adyuvantes oleosos inducen una mayor protección y más duradera en el tiempo (Midtlyng, 1996a; Midtlyng *et al.*, 1996b; Midtlyng *et al.*, 1996c). Los adyuvantes oleosos se usan ampliamente hoy en día en las bacterinas inyectables comerciales.

Los adyuvantes actúan de distintos modos. Por un lado, el antígeno es retenido en puntos donde se encuentra en alta concentración o, en el caso de los emulsionados en gotitas de aceite, liberado de modo gradual a lo largo del tiempo, lo que permite una respuesta inmunitaria más fuerte y duradera (Smith, 2001). Además, inducen una respuesta inflamatoria, que atrae leucocitos a la zona de inyección. Estas células engloban el antígeno y lo transportan a los tejidos linfoides donde las células presentadoras de antígenos (APCs) los presentan a los linfocitos, que son quienes en última instancia producen una respuesta inmunitaria específica y memoria inmunológica frente al patógeno (Thompson *et al.*, 2004).

Generalmente, los adyuvantes de las bacterinas inyectables provocan reacciones locales con granulomas en el sitio de inyección. Los adyuvantes oleosos son los que inducen las reacciones más adversas que, en algunas ocasiones, han afectado a la tasa de crecimiento y al bienestar de los peces, así como a la calidad del producto final (Midtlyng *et al.*, 1998).

Métodos de vacunación

Los peces pueden ser inmunizados de tres modos, mediante inyección, preferentemente intraperitoneal (i.p.) o intramuscular; mediante inmersión o baño, introduciendo al pez en una solución diluida de la vacuna; u oralmente, introduciendo la vacuna en el alimento del pez (Yanong, 2008). Estos métodos

tienen diferentes ventajas y desventajas con respecto al nivel de protección, efectos colaterales, practicidad y coste-eficiencia (Gudding *et al.*, 1999). Aunque se han desarrollado y ensayado diversos métodos de vacunación en peces (Plant *et al.*, 2011), solo los métodos de inyección y de inmersión han sido desarrollados a escala industrial, y en la producción comercial de salmónidos ambos tipos de vacunaciones son prácticas establecidas e integradas como parte de las rutinas de producción.

Inyección

Este método de administración, generalmente intraperitoneal o intramuscular, proporciona unos rendimientos de respuesta muy buenos en los peces vacunados, y es mejor que la que se obtiene por inmersión o administración oral (Evelyn, 1997). Presenta la ventaja de que se pueden utilizar los antígenos a las dosis adecuadas para proporcionar una respuesta inmunitaria fuerte y además se pueden añadir adyuvantes e inmunoestimulantes para aumentar el nivel y prolongar la duración de esta. Sin embargo, el procedimiento es mucho más laborioso y provoca unos niveles altos de estrés en los peces, con aumento de la producción de corticosteroides lo que se asocia con inmunosupresión (Spelid *et al.*, 1996), pero a pesar de esto los peces son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria contra la vacuna. Este procedimiento no es válido para peces con un tamaño inferior a los 15 gramos.

Inmersión o baño

La vacunación por inmersión proporciona niveles intermedios de protección entre la inyección y la administración oral (Evelyn, 1997). Sin embargo presenta muchas ventajas con respecto a la vacunación por inyección (Nakanishi *et al.*, 1997). Causa menos estrés en los peces y es menos laboriosa. La desventaja radica en que solo es práctica para usarse en peces de pequeño tamaño, aunque peces más grandes pueden vacunarse mediante rociado con spray.

Existen distintos métodos de vacunación por inmersión, siendo la inmersión directa el más usado para la administración de vacunas comerciales. Existen

diversos factores que pueden influir en la captura del antígeno durante la inmersión, entre los más importantes la concentración de éste en la vacuna y la duración de la inmersión, de modo que cuanto más corto es el tiempo de inmersión menos eficaz es la vacunación (Ototake *et al.*, 1999).

Administración oral

La administración oral es el método ideal de vacunación ya que la vacuna se incorpora en la comida del pez. Es mucho menos laborioso que los métodos anteriores y puede utilizarse para vacunar un gran número de peces de todos los tamaños. No se produce estrés debido a la manipulación de los peces. Sin embargo, la mayor desventaja son los bajos niveles de protección que se logran así como la corta duración de esta (Thompson *et al.*, 2004). Una de las principales causas de los bajos niveles de protección es la degradación del antígeno por parte de los fluidos gástricos, de modo que cuando son absorbidos los antígenos pueden estar ya desactivados.

El número de vacunas orales comercializadas es muy bajo, y además estas suelen usarse como vacuna de refuerzo más que como la forma primaria de inmunización.

SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS

La trucha arcoíris (**Figura 1**), *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972), perteneciente a la clase Actinopterygii, orden Salmoniformes, familia Salmonidae, es una especie nativa de las cuencas que desembocan en el Pacífico en Norte América, abarcando desde Alaska a México y desde 1874 ha sido introducida en las aguas de todos los continentes, excepto el Antártico, con propósitos recreativos, como la pesca deportiva, y principalmente para su acuicultura.

RAINBOW TROUT

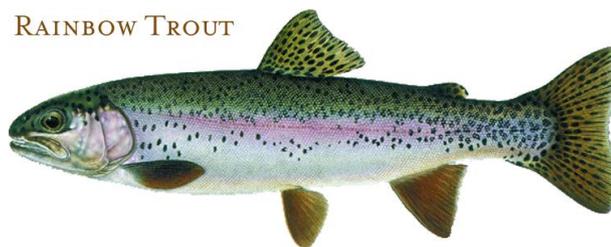


Figura 1. *Oncorhynchus mykiss*. (Tomado de <http://www.southforkoutfitters.com/FishingDetails/FishSpeciesInfo.html>).

La trucha arcoíris presenta unas características que favorecen su cultivo: es de cría fácil, los alevines son grandes en comparación con la mayoría del resto de especies acuícolas y pueden ser iniciados fácilmente en la alimentación con una dieta artificial. Crecen rápidamente, aproximadamente 2,5 cm por mes a la temperatura ideal del agua, que son los 15 °C, y alcanzan la talla de mercado (400 a 650 g) entre los 10 y 13 meses de edad. Además puede soportar temperaturas entre los 0 ° y 28 °C y cría satisfactoriamente entre los 2 ° y los 12 °C.

El monocultivo es la práctica más común en el cultivo de trucha arcoíris y, para hacer la operación económicamente rentable, se considera necesario el uso de sistemas intensivos en la mayoría de las situaciones. Gracias a esto, la producción de trucha arcoíris ha crecido exponencialmente desde los años 1950 (**Figura 2**), especialmente en Europa y más recientemente en Chile, que es actualmente el mayor productor. Noruega, Francia, Italia, España, Dinamarca, EE.UU., Alemania, Irán y el Reino Unido son también importantes productores.

La producción acuícola en España se situó en el año 2010 en más de 281.200 toneladas, de las que 263.503,92 correspondieron al cultivo de especies marinas (93,7% del total de la producción) y el resto a la acuicultura continental (17.701,41 toneladas; 6,3% de la producción total) (**Figura 3**). El valor estimado de la producción acuícola en este año fue de 380.445.946 EUR, de la cual 30.081.558 EUR corresponden a la producción de trucha (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2005-2012).

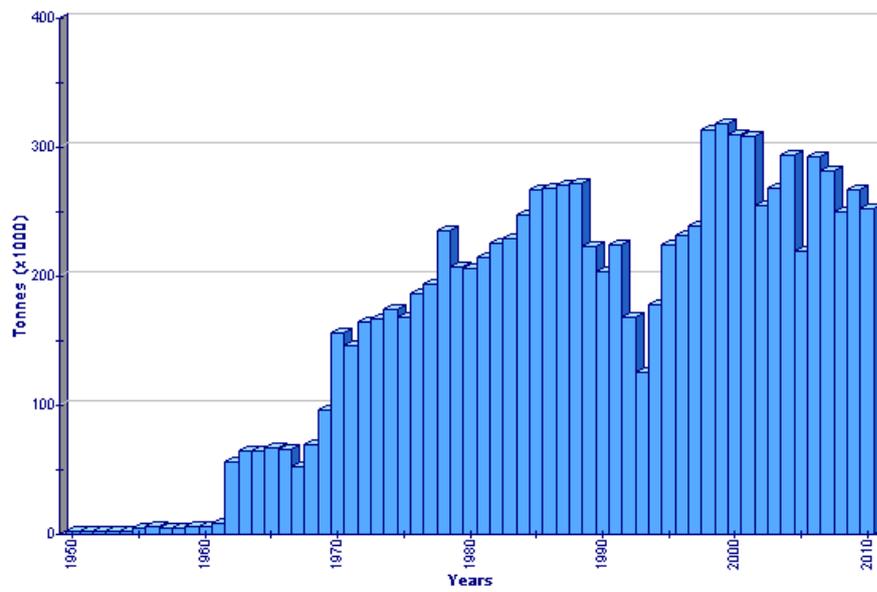


Figura 2. Producción de acuicultura global de *Oncorhynchus mykiss* (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2005-2011).

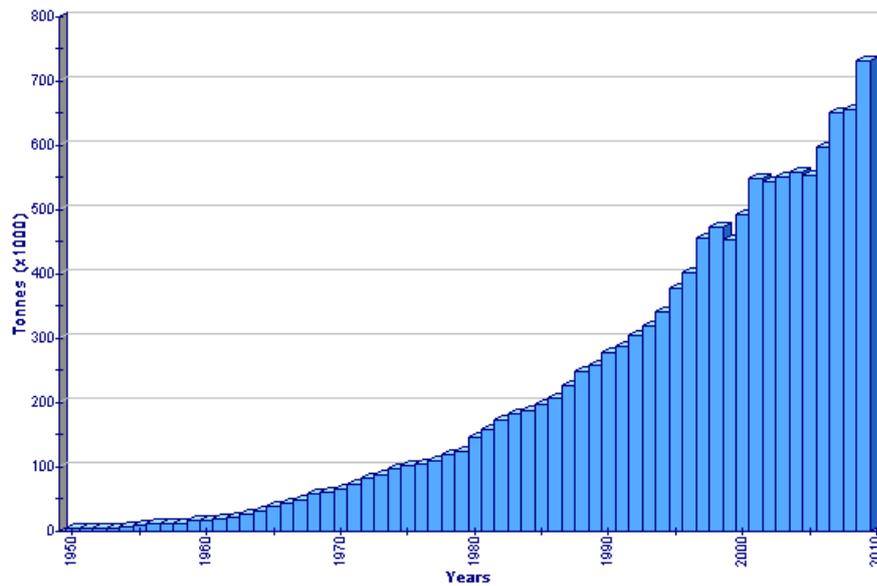


Figura 3. Producción de la acuicultura de España (a partir de 1950) (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2005-2012).

En cuanto a la acuicultura continental en España, su desarrollo se ha centrado en la producción de trucha, debido a la alta calidad de los recursos acuáticos continentales existentes en España. Así, la trucha arcoíris supone el 7% de la producción acuícola total y el 99% de la producción de acuicultura continental española.

Existen una gran variedad de enfermedades y parásitos que pueden afectar a la trucha arcoíris en acuicultura, incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos (Tabla 2).

ENFERMEDAD	AGENTE	SÍNDROME
VIRALES		
Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)	IPNV (Birnavirus)	Natación errática, eventualmente hasta el fondo del tanque donde ocurre la muerte
Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN)	IHNV (Rhabdovirus)	Natación errática eventualmente flotando al revés mientras respiran rápidamente después de lo cual ocurre la muerte; ojos hinchados; pérdida de sangre desde la base de las aletas pectorales, aleta dorsal y orificios respiratorios
Septicemia Hemorrágica Viral (VHS)	VHSV (Rhabdovirus)	Ojos hinchados, en algunos casos, ojos sangrantes; branquias pálidas; abdomen hinchado; letargo
Enfermedad del sueño	SAV 2 (Alphavirus)	Peces recostados de cúbito lateral en el fondo del tanque por necrosis del músculo esquelético rojo. Falta de apetito, nado errático, letargo, exoftalmia, distensión abdominal, emaciación.
PARASITARIAS		
Punto blanco	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Parches o manchas blancas sobre el cuerpo; los peces se ponen letárgicos; intentan remover los parásitos frotándose contra los costados del tanque
Enfermedad del torneo (Myxosomiasis)	<i>Myxobolus cerebralis</i>	Oscurecimiento de la piel; natación de manera giratoria; deformaciones alrededor de las branquias y aleta caudal; la muerte ocurre eventualmente
Girodactilosis gusanos planos	<i>Gyrodactylus sp.</i>	Parásitos fijados a las aletas caudal y anal; erosiones en el cuerpo y aletas, dejando lesiones que son atacadas por Saprolegnia
FÚNGICAS		
Saprolegniasis	<i>Saprolegnia diclina</i>	Crecimiento de manchas blanquecinas en el tegumento, especialmente el dorso.

ENFERMEDAD	AGENTE	SÍNDROME
BACTERIANAS		
Furunculosis	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Inflamación del intestino; enrojecimiento de las aletas; furúnculos sobre el cuerpo; aletas pectorales infectadas; muerte de tejidos
Furunculosis atípica	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>mascoicida</i> y <i>achromogenes</i>	Disminución del apetito, letargo. Septicemia hemorrágica. Hemorragia periocular, ano hemorrágico, descamación y despigmentación de la piel.
Septicemia hemorrágica	<i>A. hydrophila</i>	Lesiones más pequeñas sobre el cuerpo que se convierten en llagas abiertas; las aletas se enrojecen y los tejidos se rompen
Vibriosis	<i>L. anguillarum</i> (<i>V. anguillarum</i>)	Pérdida de apetito; enrojecimiento de las aletas y áreas alrededor de orificios respiratorios y boca; a veces pérdida de sangre alrededor de la boca y branquias; alta mortalidad potencial
BKD (Enfermedad Bacteriana del Riñón)	<i>R. salmoninarum</i>	Lesiones blanquecinas en el riñón; pérdida de sangre desde los riñones e hígado; algunos peces pueden perder el apetito y nadar cerca de la superficie; apariencia de color oscuro
Enfermedad bacteriana de las agallas	Myxobacterium	Pérdida de apetito; hinchazón y enrojecimiento de las branquias; eventualmente los filamentos de las branquias forman una masa juntos y se ponen más pálidos con una secreción que bloquea la función de las branquias en etapas posteriores
Yersiniosis (enfermedad de la boca roja, ERM)	<i>Y. ruckeri</i>	Letargo, oscurecimiento, exoftalmia, congestión de los vasos de la zona oral y hemorragias en la boca (a veces en el opérculo branquial).
Lactococcosis	<i>L. garviae</i>	Letargo, exoftalmia, hemorragias en piel y globos oculares. Congestión de órganos internos. Alta mortalidad
Flavobacteriosis	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Oscurecimiento, erosiones y ulceramientos en la piel. Necrosis de aletas y branquias. Descamación de aleta caudal. Nado errático y movimientos espiralados en peces muy jóvenes.
Flexibacteriosis	<i>Flexibacter columnaris</i>	Manchas blanquecinas que pueden derivar en úlceras. Movimiento zigzagueante.
Streptococcosis	<i>S. iniae</i> , <i>S. uberis</i>	Falta de apetito, letargo y adelgazamiento. Petequias, abdomen ascítico, esplenomegalia e hígado friable.
Piscirickettsiosis	<i>P. salmonis</i>	Oscurecimiento, anorexia y letargo. Comportamiento irregular al nadar.
Ulceración invernal	<i>Moritella viscosa</i>	Úlceras epidérmicas circulares, en lesiones subagudas quedan expuestas las vísceras, hígado pálido con petequias.

Tabla 2. Enfermedades que afectan a la trucha arcoíris en acuicultura (modificado de FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2005-2011; Hastein *et al.*, 2005; Sommerset *et al.*, 2005).

PATOLOGÍAS INFECCIOSAS POR AEROMONAS EN EL CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS

Dentro de las enfermedades bacterianas que afectan a los cultivos de *O. mykiss*, destacan las producidas por patógenos del género *Aeromonas*, especialmente *A. salmonicida* en la salmonicultura y *A. hydrophila* en especies piscícolas que se cultivan a temperatura del agua que oscila entre 18 ° y 28 °C (Austin *et al.*, 1999). A continuación, se presenta una breve descripción del género *Aeromonas* y, con más detalle, de *A. hydrophila*.

El género *Aeromonas*, junto con *Oceanimonas* y *Tolumonas*, pertenece a la familia Aeromonadaceae (Janda *et al.*, 2010) de la clase de las Gamma-proteobacterias. Según la 9ª edición del manual Bergey, las aeromonas se clasifican en dos grupos principalmente: aeromonas psicrófilas, no móviles, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 22-25 °C que infectan reptiles y peces; y el grupo más grande constituido por aeromonas mesófilas, móviles, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 35-37 °C (Parker *et al.*, 2011).

Los microorganismos del género *Aeromonas* son bacterias bacilares gram negativas, con extremos redondeados y un tamaño de entre 1 y 3,5 µm. Pueden aparecer de modo individual o por parejas y en ocasiones formando cadenas cortas (Holt, 1994). Son anaerobios facultativos, citocromo oxidasa, catalasa e indol positivos. Las aeromonas producen una serie de factores de virulencia como hemolisinas, incluyendo la aerolisina, proteasas, adhesinas, invasinas, enterotoxinas, fosfolipasa y lipasa (Parker *et al.*, 2011).

Aeromonas spp. crecen bien en medios rutinarios de laboratorio, incluyendo Luria Bertani, MacConkey's, agar entérico de Heckteon, agar nutritivo y agar sangre. La mayoría de aeromonas puede crecer en un amplio rango de temperaturas (4-42 °C). La tolerancia al pH y a la concentración de sal varía entre especies siendo la concentración óptima de NaCl entre 0,3 y 5 % (Parker *et al.*, 2011).

En relación con la acuicultura, *A. salmonicida* y *A. hydrophila* son las especies que mayores pérdidas producen. *A. salmonicida* está presente en ambientes acuáticos con una temperatura óptima de crecimiento entre 20-25 °C (Holt, 1994) y comprende diferentes subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* o *A. salmonicida* típica y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *mascoucida* o *A. salmonicida* atípica. *A. salmonicida* típica es el patógeno causante de la furunculosis en peces. En el pasado se asoció más con salmónidos ya que estos eran las principales especies cultivadas en acuicultura. En los años 80, antes de la existencia de una vacunación efectiva, las pérdidas de salmones en granjas de agua salada podían alcanzar el 15-20 % por año (Ellis, 1997). Por su parte, *A. salmonicida* atípica ha sido asociada con la furunculosis atípica en salmón atlántico en Islandia, enfermedad ulcerativa en carpín dorado (*Carassius auratus*) y la eritrodermatitis en carpa (*Cyprinus carpio*).

A. hydrophila es una aeromona móvil, catalasa positiva, que convierte el nitrato en nitrito y ureasa negativa (Edberg *et al.*, 2007). Está presente en ambientes acuáticos de todo el mundo y tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 20-35 °C (Holt, 1994). *A. hydrophila* es resistente a ampicilina (Austin *et al.*, 1999) y está relacionada con enfermedades en humanos y otros mamíferos, aves y réptiles y también en animales acuáticos (Janda *et al.*, 1988; Altwegg *et al.*, 1989; Paniagua *et al.*, 1990; Vivas, 2003).

En la acuicultura, *A. hydrophila* provoca enfermedades en gran variedad de especies de agua dulce (Newman, 1993; Thune *et al.*, 1993), siendo particularmente problemática en aguas cálidas, donde se asocia con la septicemia y al síndrome de la enfermedad ulcerativa (UDS) por aeromonas móviles (Borrego *et al.*, 1991). Así, durante la pasada década, se han atribuido a *A. hydrophila* grandes mortandades de peces cultivados en todo el mundo, incluyendo, 25.000 carpas comunes en St. Laurence River en 2001, 820 toneladas de carpín dorado en Indonesia en 2002, así como elevadas pérdidas de pez gato en Minnesota y Dakota del Norte en 2007, siendo la causa de enormes pérdidas económicas (Janda *et al.*, 2010).

Los brotes de esta enfermedad normalmente ocurren sólo cuando el pez está inmunológicamente comprometido a causa del estrés, bien debido a una alta densidad de individuos o por otras enfermedades en curso (Stevenson, 1988). Dependiendo de la especie hospedadora, la cepa o la dosis bacteriana y las condiciones ambientales (ej. temperatura), la enfermedad puede ser aguda, crónica o estar latente, con síntomas que incluyen lesiones en las superficies, exoftalmia, distensión abdominal, necrosis muscular y úlceras dérmicas (LaPatra *et al.*, 2009).

A. hydrophila produce diversos determinantes de virulencia (Yu *et al.*, 2005), incluyendo citotoxinas y enterotoxinas (Ljungh *et al.*, 1981) y un repertorio de enzimas que digieren los componentes celulares, principalmente proteasas y hemolisinas (Allan *et al.*, 1981). Otros factores de virulencia, como la capa S (Dooley *et al.*, 1988) y la resistencia al suero (Leung *et al.*, 1995), también están implicados en el aumento de la resistencia bacteriana al ataque por los mecanismos de respuesta no específica del hospedador. Además, se ha descrito que *A. hydrophila* puede inducir apoptosis en macrófagos de mamíferos (Majumdar *et al.*, 2009) y de peces (Shao *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2012) como un mecanismo para favorecer la infección.

La enfermedad puede manifestarse de distintos modos, desde una forma aguda caracterizada por la septicemia acompañada de hemorragias en la base de las aletas, falta de apetito y melanosis, hasta una forma subaguda a crónica en peces adultos, consistente en letargo, exoftalmia y hemorragias musculares y en órganos internos (Janda *et al.*, 2010). Se cree que la bacteria está presente de modo latente en el intestino del animal y que la enfermedad se desarrolla en respuesta al estrés (Hiney *et al.*, 1997).

VACUNAS CONTRA *A. hydrophila* EN ACUICULTURA

Al contrario de lo que sucede en la acuicultura de especies de peces de aguas templadas y tropicales, el impacto de las infecciones causadas por *A. hydrophila* en especies piscícolas de aguas frías no ha recibido tanta atención, probablemente

debido a que se presentan de forma esporádica, bien de forma estacional o asociadas a otras infecciones preexistentes (Stevenson, 1988).

Eso, unido a un diagnóstico muchas veces deficiente, que no llega a caracterizar al agente causal a nivel de especie y subespecie, así como a que muchas veces estas infecciones no producen mortandades agudas y a la gran variabilidad antigénica entre cepas, probablemente explica que, al contrario de lo que ha sucedido para prevenir la furunculosis causada por *A. salmonicida* mediante la vacunación (Gudding *et al.*, 1999), no se haya puesto tanto interés en desarrollar una vacuna comercial contra *A. hydrophila* en salmónidos.

Así, se han desarrollado diversos tipos de vacunas para peces frente a *A. hydrophila* (Fang *et al.*, 2004) conteniendo: organismos enteros (Lamers *et al.*, 1985; Leung *et al.*, 1997), proteínas de membrana externa (Rahman *et al.*, 2000), productos extracelulares, preparaciones de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Baba *et al.*, 1988) y biofilms (Azad *et al.*, 2000). A pesar de que se demostró que estos preparados proporcionan diferentes grados de protección en peces, aun no existe una vacuna comercial disponible para *A. hydrophila* (LaPatra *et al.*, 2009), lo que en parte puede deberse a la incapacidad de esas vacunas de proporcionar una protección cruzada frente a distintas cepas de *A. hydrophila*.

Vacuna aroA de *A. hydrophila*

Debido al hecho de que, incluso en la acuicultura tropical y subtropical, las vacunas contra *A. hydrophila* que se utilizan son autovacunas de eficacia no muy elevada (LaPatra *et al.*, 2009; Poobalane *et al.*, 2010), siguiendo el camino trazado por el interés despertado por el uso de vacunas bacterianas atenuadas que utilizan mutantes auxótrofos (Shoemaker *et al.*, 2009), incluida la obtenida para *A. salmonicida* (Thornton *et al.*, 1991; Vaughan *et al.*, 1993), nuestro grupo de investigación, en colaboración con el dirigido por el Dr. German Naharro, del Departamento de Sanidad Animal de nuestra universidad, desarrollamos un vacuna atenuada *aroA* de *A. hydrophila* (Hernanz-Moral *et al.*, 1998) y analizamos sus

características respecto a la producción, ecoseguridad y capacidad de inducir protección heteróloga (Vivas, 2003).

La mutación en el gen *aroA* hace a las bacterias auxótrofas para ácido 4-aminobenzoico (PABA), el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) y para los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina (Pollack *et al.*, 1970; Hoiseth *et al.*, 1981). Los estudios de virulencia y persistencia en truchas arcoíris (Hernanz-Moral, 2001) demostraron que la cepa *aroA* de *A. hydrophila* estaba altamente atenuada y que, utilizando un antisuero policlonal frente a *A. hydrophila*, se observaban fragmentos inmunopositivos de las bacterias en riñón y bazo durante los 9 días posteriores a la vacunación (Hernanz-Moral, 2001).

La vacunación con la cepa *aroA* de *A. hydrophila* proporciona un porcentaje de supervivencia relativa (RPS) del 75 % a 18 °C cuando las truchas son infectadas experimentalmente con una dosis equivalente a 20×DL50 de la cepa salvaje AG2 por vía intraperitoneal (i.p.). Además, esta vacuna es capaz de conferir protección cruzada, con una RPS del 60 %, contra dos cepas virulentas (Hooke y DK30) de *A. salmonicida* (Vivas *et al.*, 2004a), estimulando eficazmente la respuestas inmunitarias innata y adquirida, como demuestran los experimentos de Vivas en los que se detectaron aumentos en los niveles de lisozima y antiproteasa en el suero de los peces vacunados, estimulación de la respuesta de los leucocitos frente al antígeno-O de *A. hydrophila* y de *A. salmonicida* (Vivas *et al.*, 2005) y el desarrollo de anticuerpos frente a ambas especies de *Aeromonas* (Hernanz-Moral *et al.*, 1998; Vivas *et al.*, 2005).

La cepa *aroA* de *A. hydrophila* fue también caracterizada fenotípica y metabólicamente en mayor detalle (Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a; Vivas *et al.*, 2004b). Igualmente, se estudió la influencia del medio y condiciones de cultivo del mutante en la eficacia de la vacuna (Vivas *et al.*, 2005) y su comportamiento en microcosmos acuáticos (Vivas *et al.*, 2004b).

Todos estos trabajos demostraron que el mutante *aroA* de *A. hydrophila* puede ser utilizado en truchas arcoíris como una vacuna viva efectiva y segura

contra infecciones de *A. hydrophila* y de *A. salmonicida*, y estaban dirigidos a establecer las bases de conocimiento sobre la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* que pudieran ser usadas para la comercialización de esta vacuna, atendiendo al marco regulatorio para la licencia de este tipo de vacunas (EMEA 2004; Directiva 2009/9/CE).

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNITARIO DE TELEÓSTEOS

Los teleósteos muestran los principales mecanismos de defensa inmunitaria presentes en mamíferos (Alvarez-Pellitero, 2008). Son la primera clase de vertebrados que presentan elementos tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la adaptativa (Whyte, 2007). Tradicionalmente se ha dividido el sistema inmunitario en innato (no específico) y adquirido (específico). Sin embargo, tanto la inmunología de peces como la de mamíferos muestran que estos son sistemas combinados. La respuesta innata generalmente precede a la respuesta adaptativa, y activa y determina la naturaleza de la respuesta adaptativa, así como coopera con ella en el mantenimiento de la homeostasis (Fearon *et al.*, 1996; Fearon, 1997; Dixon *et al.*, 2001).

Al igual que en otros vertebrados la respuesta inmunitaria innata representa la primera línea de defensa frente al ataque de patógenos (Alvarez-Pellitero, 2008). Esta se fundamenta en el reconocimiento de estructuras moleculares que son únicas de los microorganismos, y que conocemos con el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), por medio de una serie de receptores (*pattern recognition receptors*, PRRs) que presentan una amplia especificidad y que están codificados en la línea germinal (Janeway *et al.*, 2002; Medzhitov *et al.*, 2002; Palti, 2011; Boltaña *et al.*, 2011).

Los patrones moleculares que son reconocidos por los PRRs son, por ejemplo, peptidoglucanos y los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana, el β 1,3-glucano de hongos, el RNA vírico de doble cadena y el DNA bacteriano.

Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) es el término colectivo utilizado para estas moléculas altamente conservadas que, generalmente, no se expresan en organismos pluricelulares (Elward *et al.*, 2003).

Por otro lado, los PPRs también reconocen señales de peligro representadas por moléculas liberadas o expuestas debido a un daño, infección, inflamación o apoptosis normal de las células, pero que generalmente no se expresan en la superficie de estas (Matzinger, 1998). Esto incluye moléculas como DNA, RNA, proteínas de choque térmico y otras chaperonas y oligomanosas de glucoproteínas de secreción.

La respuesta inmunitaria adaptativa recae en la generación de una serie de repertorios altamente variables de receptores antigénicos expresados por los linfocitos (células)-T (Laing *et al.*, 2011) y -B (Edholm *et al.*, 2009). La variabilidad de estos receptores antigénicos está incrementada por los productos de genes de activación de la recombinación (RAGs), que generan nuevas regiones de reconocimiento de determinantes antigénicos por recombinación somática, contribuyendo así a una respuesta más específica y eficiente contra los patógenos (McGuinness *et al.*, 2003; Medzhitov, 2007).

A pesar de la diferenciación entre distintos tipos de respuesta inmunitaria, debemos tener en cuenta que esta es una clasificación artificial y que siempre que un agente patógeno ataca al organismo, este se defiende mediante la interacción de la mayoría de los elementos que conforman su sistema inmunológico (Flajnik *et al.*, 2004).

Una característica de las respuestas inmunitarias en teleósteos, al igual que en otros vertebrados poiquilotermos, es su susceptibilidad a los cambios en la temperatura externa y a los relacionados con ciclos estacionales, incluyendo el fotoperiodo (Zapata *et al.*, 1992; Tort, 2011). En peces, el descenso de la temperatura afecta a las respuestas T-dependientes en particular (Clem *et al.*, 1984; Bly *et al.*, 1997).

Órganos linfoides

Los peces carecen de ganglios linfáticos y médula ósea y los principales órganos linfoides de teleósteos son el timo, el riñón (pronefros y mesonefros), el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas.

En teleósteos, el timo es un órgano par, lobulado, presente en la región dorsolateral de las cámaras branquiales. Está rodeado por una cápsula de tejido conectivo (Pastoret *et al.*, 1998) y recubierto por el epitelio faríngeo. Debido a su posición anatómica se dice que es un órgano intraepitelial, cuyo estroma está formado por células retículoepiteliales que forman una red tridimensional en la que se encuentran dispersos los timocitos y otras células libres, como son los macrófagos, otros leucocitos (granulocitos, células granulares eosinófilas) y células mioides (Chilmonczyk, 1983), definiendo los microambientes que permiten el desarrollo y producción de linfocitos T competentes (Chilmonczyk, 1992; Mohammad *et al.*, 2007).

La involución tímica que se da en vertebrados superiores no sucede en todos los peces, persistiendo en muchos individuos adultos y siendo dependiente también de la especie. Cuando se ha descrito, la involución puede darse en asociación al envejecimiento y la madurez sexual y puede verse inducida por el estrés, cambios estacionales y hormonales (Pastoret *et al.*, 1998; Press *et al.*, 1999).

El riñón de los teleósteos, formado por el pronefros o riñón cefálico y el mesonefros (riñón troncal) es un órgano que tiene función linfohematopoyética, además de excretora en el caso del mesonefros (Zapata, 1979; Zapata *et al.*, 1990). El tejido linfohematopoyético contiene un estroma y microvascularización formados respectivamente por células reticulares, asociadas a fibras conjuntivas reticulares, y sinusoides sanguíneos, formados por células endoteliales sinusoidales, de carácter fagocítico (Zapata, 1979; Zapata *et al.*, 1990). Entre ellos se disponen las células hematopoyéticas, macrófagos y melanomacrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Estos últimos tienden a estar dispersos, pero en ocasiones pueden formar pequeñas agrupaciones (Meseguer *et al.*, 1991; Press *et al.*, 1994).

El pronefros es el principal órgano hematopoyético de peces y tiene similitudes morfológicas y funcionales con la médula ósea de vertebrados superiores (Zapata, 1979; Meseguer *et al.*, 1995). Además de ser el principal sitio de producción de células sanguíneas (Zapata, 1979; Zapata, 1981), el pronefros de peces tiene una alta capacidad fagocítica (Dannevig *et al.*, 1994), de procesamiento de antígenos (Kaattari *et al.*, 1985; Brattgjerd *et al.*, 1996) y de producción de anticuerpos y es un locus asociado a la memoria inmunitaria humoral (Ye *et al.*, 2011), que se ha asociado a los centros melanomacrofágicos (Herraez *et al.*, 1986; Tsujii *et al.*, 1990).

El bazo de teleósteos se localiza normalmente en posición caudoventral con respecto al estómago. Está encapsulado por tejido conjuntivo denso, pero no existen grandes trabéculas que compartimentalicen al órgano, como ocurre en mamíferos (Ellis, 1989). La pulpa roja ocupa la mayor parte del órgano y contiene linfocitos, macrófagos y granulocitos, así como sus precursores, dispuestos en una red de células reticulares y de sinusoides sanguíneos (Grace *et al.*, 1980; Secombes *et al.*, 1980). La pulpa blanca normalmente está poco desarrollada y contiene centros melanomacrofágicos y elipsoides, asociados ocasionalmente a pequeños grupos de linfocitos (Press *et al.*, 1994).

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) de teleósteos se localiza en la piel, branquias e intestino (Salinas *et al.*, 2011). El intestino de los peces carece de placas de Peyer, pero presenta abundante tejido linfoide disperso en toda su longitud (Press *et al.*, 1999). El MALT presenta poblaciones de células linfoides, células plasmáticas, granulocitos y macrófagos (Zapata, 1979; Temkin *et al.*, 1986; Hart *et al.*, 1988), algunas de las cuales son intraepiteliales, pero la mayoría se localizan en la lámina propia (McMillan *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998). La respuesta inmunitaria asociada al MALT en peces no ha sido bien caracterizada, pero en los últimos años se ha descrito que existen clases e isotipos de inmunoglobulinas asociadas preferencialmente a la respuesta inmunitaria humoral secretora, incluyendo formas monoméricas y tetraméricas de bajo peso molecular de inmunoglobulina M (IgM) y en trucha y pez cebra (*Danio rerio*) también se ha

sugerido la presencia de inmunoglobulinas secretoras de la clase IgT/IgZ (Salinas *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato es de gran importancia a la hora de combatir las infecciones en peces, debido, básicamente, a la ineficiencia intrínseca de la respuesta inmunitaria adquirida de peces y a su naturaleza poiquiloterma. Esto resulta en un repertorio de anticuerpos, afinidad de maduración y memoria limitadas y una lenta proliferación de linfocitos. La respuesta inmunitaria adquirida de peces es, por tanto, lenta en comparación con la instantaneidad y relativa independencia de la temperatura de la respuesta inmunitaria innata (Alexander *et al.*, 1992; Ellis, 2001)

La activación de los componentes de reconocimiento innatos, a través del reconocimiento de los PAMPs por los correspondientes receptores PRRs (Dixon *et al.*, 2001; Boltaña *et al.*, 2011;), induce la activación de diversas poblaciones de leucocitos, con estimulación de la fagocitosis y de la actividad citotóxica natural, producción de citoquinas y de quimioquinas, y la activación del sistema del complemento y de otros productos con actividad microbicida, y varios receptores celulares (Magnadóttir, 2006).

La inmunidad innata se divide tradicionalmente en tres compartimentos: barreras físicas, factores humorales y componentes celulares.

Barreras físicas

Las escamas, el mucus de las superficies de las branquias y la epidermis actúan como la primera barrera frente a la infección (Shephard, 1994; Ellis, 2001). Además de su eficiencia a la hora de atrapar y eliminar los patógenos, el mucus de los peces contiene parámetros inmunitarios como las lectinas, pentraxinas, lisozima, proteínas de complemento, péptidos antibacterianos e Igs (Alexander *et al.*, 1992; Rombout *et al.*, 1993; Aranishi *et al.*, 1997).

Factores humorales

En las respuestas innatas intervienen una serie de factores solubles, cuyas concentraciones varían en respuesta a infecciones o daños tisulares, afectando a distintos procesos de la fase aguda de respuesta. La clasificación de los factores humorales se basa normalmente en sus patrones específicos de reconocimiento o en sus funciones efectoras (Magnadóttir, 2006; Zhu *et al.*, 2012), destacando, agentes microbicidas (Nakanishi *et al.*, 2011; Rieger *et al.*, 2011) como la lisozima, el sistema del complemento (Nakao *et al.*, 2011), proteína-C-reactiva, quitinasas, péptidos antimicrobianos, hemolisinas; productos bacteriostáticos, como la transferrina, lectinas (Vasta *et al.*, 2011) y α -precipitina; antiproteasas como la α 2-macroglobulina; los anticuerpos naturales, producidos en ausencia de reorganización génica y sin la estimulación aparente de ningún antígeno específico; y las citoquinas, principalmente factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 1 (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6) y quimioquinas.

Componentes celulares

Las células clave en el sistema inmunitario innato son las células fagocíticas (neutrófilos y monocito/macrófago) y las células citotóxicas no específicas (NCCs) (Frøystad *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 2011). Además, otros leucocitos (dependiendo de la especie de teleosteo), como trombocitos y granulocitos acidófilos (Ainsworth, 1992), y células granulares eosinófilas/células cebadas (Press *et al.*, 1994; Silphaduang *et al.*, 2001), intervienen en estas respuestas con actividades microbicidas y/o proinflamatorias. Además, se ha considerado que las células epiteliales y las células dendríticas también participan en la defensa innata en peces (Press *et al.*, 1994; Ganassin *et al.*, 1996).

Sistema inmunitario adaptativo

La respuesta inmunitaria adaptativa engloba una red compleja de mecanismos que se caracterizan por su especificidad para distinguir determinantes antigénicos y la facultad de elaborar memoria inmunológica frente a los mismos. En

ella participan una serie de células especializadas, proteínas, genes y mensajes bioquímicos que proporcionan los medios necesarios para que el organismo reconozca y responda específicamente frente a los antígenos (Uribe *et al.*, 2011).

Al igual que en mamíferos, en teleósteos la inmunidad adaptativa comprende dos tipos de respuestas: la respuesta humoral, mediada por linfocitos-B, que producen anticuerpos, y desarrollada básicamente en el medio extracelular, y la respuesta celular, mediada por linfocitos-T, incluyendo linfocitos T-colaboradores (Th) y citotóxicos (Tc) (Bernstein *et al.*, 1998; Nakanishi *et al.*, 2011). También, para la mayoría de los antígenos, el desarrollo de respuestas antígeno-específicas requieren de la presencia de APCs que actúan como procesadoras y presentadoras de los antígenos (Vallejo *et al.*, 1992a; Vallejo *et al.*, 1992b). De forma semejante, la generación de las respuestas inmunohumorales en peces está mediada por la cooperación entre linfocitos-B y linfocitos-Th (Miller *et al.*, 1998; Warr, 1998; Watts *et al.*, 2001; Laing *et al.*, 2011).

La existencia de memoria inmunológica en peces se pone de manifiesto por el hecho de que sea posible inmunizar o vacunar a los peces frente a diversos agentes infecciosos. Este proceso permite al organismo producir una respuesta inmunitaria mucho más rápida y eficaz en el segundo o posteriores encuentros con el antígeno. En general la respuesta secundaria es más débil en peces que en mamíferos, pero los títulos de anticuerpos en esta segunda respuesta alcanzan niveles entre 2 y 8 veces superiores a los de la primera, y la cantidad de antígeno necesaria para desencadenarla es menor (Arkoosh *et al.*, 1991). No obstante, la producción de una respuesta secundaria está condicionada por numerosos factores, como la dosis de inmunización primaria, la ruta de administración, y el tiempo transcurrido entre los dos contactos con el antígeno.

Los linfocitos-B de teleósteos poseen receptores superficiales para determinantes antigénicos (BCR) capaces de reconocer directamente algunos antígenos (como LPS de bacterias gram negativas) proliferando de forma policlonal, pero generalmente se requiere la colaboración entre linfocitos-B y -T para generar

respuestas inmunitarias humorales óptimas (Kaattari, 1992). La especificidad antigénica de los BCR y de las inmunoglobulinas generadas frente a los antígenos es debida a procesos de reordenación y mutación somática de los genes de las regiones variables de las Igs, mediada por la acción de diversos mecanismos, incluyendo las enzimas de recombinación Rag-1 y Rag-2 (Hansen *et al.*, 1995; Hansen, 1997). En salmónidos se ha indicado que los linfocitos-B se generan fundamentalmente en el pronefros, existiendo diferencias funcionales entre las poblaciones de estas células y de las células plasmáticas derivadas de ellas que se alojan en otros órganos (bazo, mesonefros, MALT) o en la sangre (Ye *et al.*, 2011).

Los teleósteos poseen una clase principal de inmunoglobulina efectora, la IgM sérica, formada por tetrámeros del monómero compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L), pero existe una considerable heterogeneidad inter- e intraespecífica, pudiendo encontrar distintos tipos de cadenas pesadas y ligeras. Los teleósteos también poseen IgD, una clase de inmunoglobulina que está presente en todos los vertebrados a excepción de las aves (Bengtén *et al.*, 2002; Edholm *et al.*, 2010), a la que se ha atribuido, además de funcionar como receptor antigénico, el estar implicada en las respuestas inmunitarias frente a ciertos patógenos y ser mediadora de la respuesta inmunitaria innata (Chen *et al.*, 2009). Por otra parte, en el pez cebra, *D. rerio* y en *O. mykiss* se ha descrito la presencia de la denominada clase IgZ/IgT, cuyas características físicoquímicas y funcionales aun no han sido estudiadas en profundidad, excepto en trucha arcoíris (Zhang *et al.*, 2010), donde la IgT sérica se presenta como un monómero y a la que se ha atribuido un papel en la defensa humoral específica secretora (Salinas *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Una característica de la memoria inmunológica humoral adaptativa de teleósteos es la no existencia de un cambio de clase de inmunoglobulina en las respuestas secundarias, de forma que se ha atribuido la mayor eficiencia de estas respuestas a que se alcanza más rápidamente una mayor concentración de anticuerpos, fundamentalmente IgM, los cuales presentan, además, una mayor afinidad por el antígeno (Edholm *et al.*, 2011; Salinas *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011).

La presencia de linfocitos-T en peces y de sus capacidades funcionales, como la citotoxicidad antígeno-específica (Nakanishi *et al.*, 2011) y la cooperación entre linfocitos Th y linfocitos-B (Miller *et al.*, 1985), son hechos demostrados, aunque hasta muy recientemente no se ha contado con los medios o reactivos necesarios para su caracterización, la cual todavía es muy incompleta (Laing *et al.*, 2011). Los linfocitos-T de peces expresan el receptor celular T (TCR), el marcador CD3 y las moléculas accesorias CD4 y CD8 (Laing *et al.*, 2011; Toda *et al.*, 2011). Fundamentalmente, los linfocitos-T de teleósteos se desarrollan en el timo, a partir de precursores procedentes del pronefros (Bowden *et al.*, 2005).

Uno de los aspectos menos caracterizados de las respuestas inmunitarias adaptativas celulares de teleósteos es la existencia o no de subpoblaciones de linfocitos Th, que generen respuestas de perfiles semejantes a las de tipo Th1/Th2/Th17 de mamíferos. Estudios genómicos y transcripcionales, incluyendo la identificación de los factores de transcripción maestros de Th1 (T-bet), Th2 (GATA3) y Th17 (ROR γ t) (Laing *et al.*, 2011), así como la identificación de algunas citoquinas e interleuquinas (IL) características de las respuestas Th1, como IL-2, interferon (IFN)- γ y el factor de la necrosis tumoral (TNF)- α , o de respuestas Th17 (como la IL-17) (Secombes *et al.*, 2011), indican esta posibilidad. No obstante, la no identificación de genes ortólogos o de actividades funcionales de interleuquinas características de los linfocitos Th2, como IL-4, IL-13 (en teleósteos existen dos genes parálogos de estos, denominados IL-4/IL-13A e IL-4/IL-13B, pero de función desconocida) o IL-5, así como los escasos métodos de detección y ensayos funcionales de la citoquinas, han impedido avanzar más en la delineación de estas subpoblaciones y de sus respuestas. La **Figura 4** muestra un esquema de la situación comparada entre mamíferos y teleósteos respecto a los perfiles de respuestas tipo Th1/Th2/Th17.

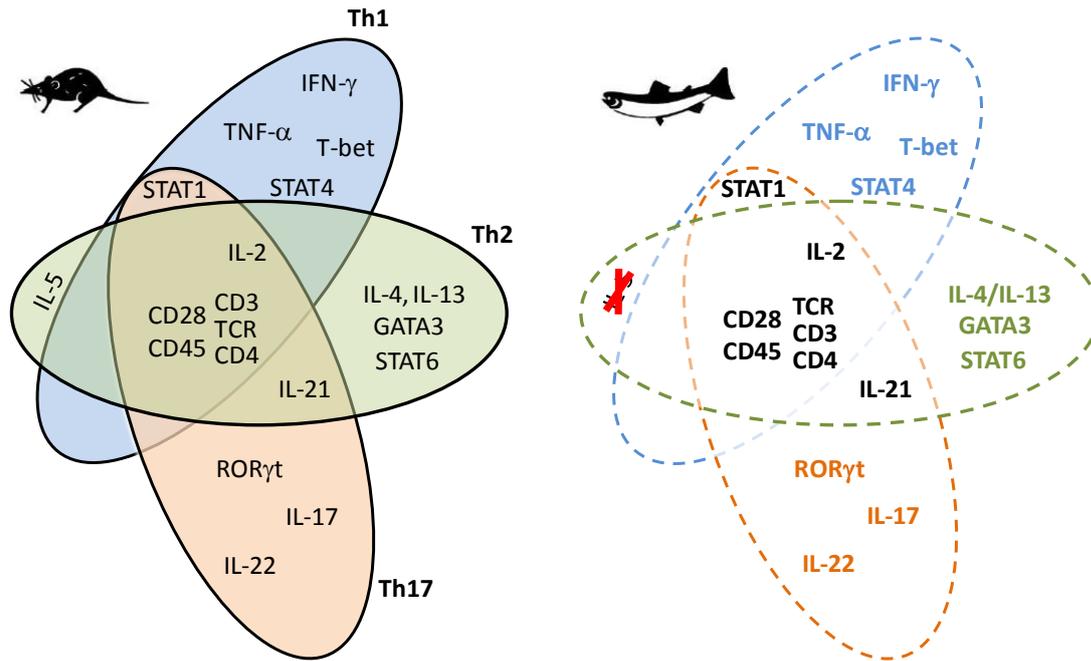


Figura 4. Situación comparada entre mamíferos y teleosteos respecto a los perfiles de respuestas tipo Th1/Th2/Th17. Se muestran las moléculas características de cada subpoblación celular y las que comparten con otras poblaciones, así como los factores de transcripción propios de cada una de ellas. La existencia en peces de estas subpoblaciones de células T aun no está clara, sin embargo se han identificado muchos genes ortólogos a los de mamíferos. El ortólogo de IL-5 aun no identificado en teleosteos aparece tachado por un aspa roja. Modificado de Laing *et al.*, 2011.

Como se ha indicado, en peces la generación de anticuerpos, así como la inducción de respuestas T-citotóxicas específicas, requieren de la participación de APCs, tales como macrófagos, células dendríticas o linfocitos-B (Vallejo *et al.*, 1992b; Bassity *et al.*, 2012;), que capturan y procesan los antígenos para presentarlos a los linfocitos-T en asociación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La primera evidencia de la existencia de MHC en peces se describió en 1990 en carpa y desde entonces se ha demostrado en gran variedad de especies, incluido el salmón atlántico y la trucha arcoíris, la existencia de genes y moléculas del MHC-I (Grimholt *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1999) y MHC-II (Hordvik *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1998).

En mamíferos, MHC-I se expresa en todas las células nucleadas del organismo, está asociado a la respuesta celular y presenta antígenos de origen intracelular a las células Tc CD8 (Bjorkman *et al.*, 1990; Okamura *et al.*, 1993), mientras que MHC-II se expresa, principalmente, en la superficie de APCs y está asociado a una respuesta humoral, presentando antígenos de origen extracelular procedentes de bacterias, virus, etc. (Juul-Madsen *et al.*, 1992; Godwin *et al.*, 1997). En teleósteos, aunque las poblaciones de linfocitos-T están poco caracterizadas (Laing *et al.*, 2011), se ha demostrado que los procesos de presentación antigénica son esencialmente semejantes (Vallejo *et al.*, 1992b; Nakanishi *et al.*, 2011).

Los principales tipos de APCs, particularmente monocito/macrófagos, tienen también un papel fundamental en el inicio y regulación de las respuestas de tipo Th1/Th2/Th17. Así, en mamíferos, los macrófagos activados presentan también perfiles tipo Th1 (o M1), caracterizado por la producción de IL-12, y Th2 (o M2) en el cual estas células producen IL-10. En teleósteos se ha propuesto también la existencia de tres tipos de fenotipos de macrófagos activados (Forlenza *et al.*, 2011), incluyendo: **a)** macrófagos activados de forma innata (“innate activated macrophages”), a través del reconocimiento de PAMPs por receptores PRRs, que tienen intensa actividad fagocítica, de producción de radicales oxidativos de oxígeno (ROS) y alta expresión del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y producción de óxido nítrico (NO); **b)** macrófagos activados de forma clásica (“classically activated macrophages”) en respuesta a la exposición combinada a IFN- γ , a PAMPs, y a TNF- α , que son activos secretores de citoquinas asociadas al perfil de respuesta inmunitaria Th1 (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α), así como de producción de ROS, y tienen alta expresión de iNOS y de moléculas asociadas a la presentación antigénica vía MHC-II; y **c)** macrófagos activados alternativamente (“alternatively activated macrophages”), que se producen en presencia de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-13) y que se caracterizan por la expresión del enzima arginasa, lo que resulta en la producción de urea y L-ornitina y con baja expresión de NO. La **Figura 5** muestra un esquema de estos fenotipos.

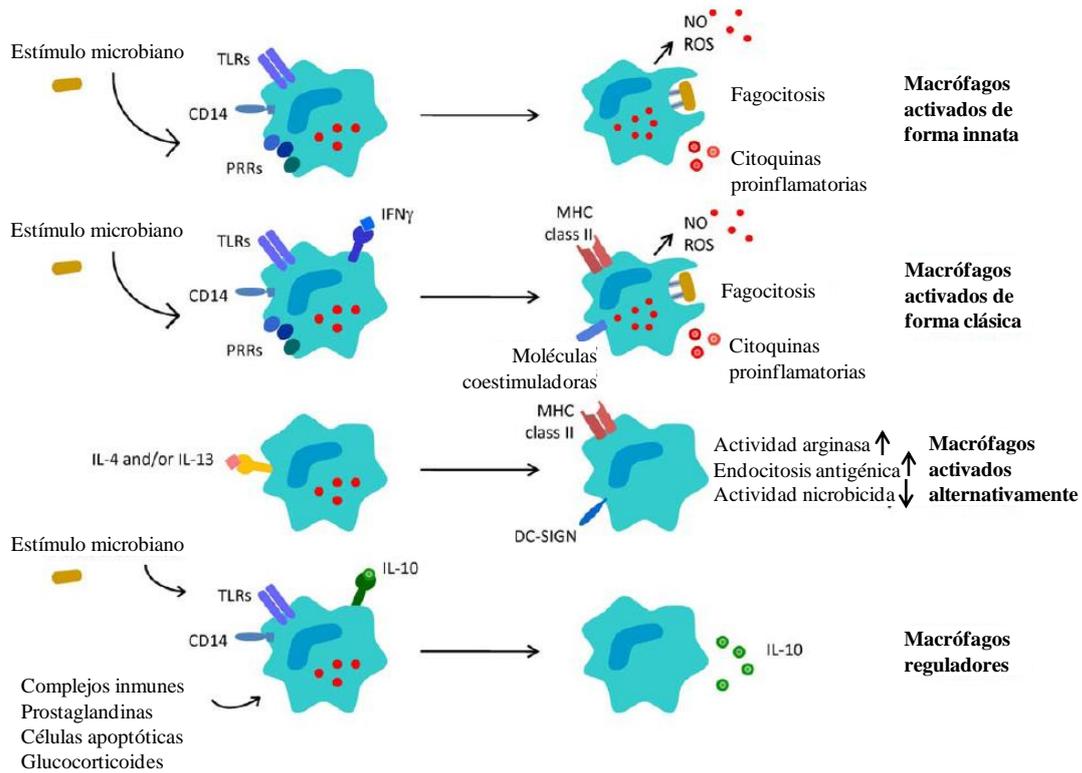


Figura 5. Activación de macrófagos. La estimulación con antígenos microbianos provoca la activación innata de los macrófagos. Un estímulo microbiano en combinación con IFN- γ induce la activación por la vía clásica. Los macrófagos activados alternativamente se desarrollan en presencia de las citoquinas IL-4 y/o IL-13. Los macrófagos reguladores se manifiestan en respuesta a IL-10 o por estimulación microbiana en combinación con una segunda señal, por ejemplo complejos inmunes. Modificado de Forlenza *et al.*, 2011.

RESPUESTA INFLAMATORIA

Generalmente, la primera respuesta del sistema defensivo de los vertebrados a la exposición a un elemento extraño, como puede ser un patógeno, induce una cascada de reacciones tisulares y humorales, en las que interviene el sistema inmunitario innato, pero no únicamente, que desembocan en una respuesta de tipo inflamatorio (Medzhitov, 2008). La inflamación es un proceso complejo, marcado por la intervención de numerosas enzimas presentes en la sangre, células del sistema inmunitario, el sistema de coagulación sanguíneo y el sistema del complemento,

cuyo fin es la eliminación o contención de la dispersión del agente extraño (Whyte, 2007; Nakao *et al.*, 2011).

Los mecanismos que median los procesos inflamatorios en los peces son menos conocidos que en los mamíferos, fundamentalmente por la falta de herramientas tales como anticuerpos o la disponibilidad de factores purificados, pero se considera que comparten con ellos muchas características (Plouffe *et al.*, 2005; Koppang *et al.*, 2007). Así, aun con ciertas lagunas, el inicio y resolución de las respuestas inflamatorias en los teleósteos parece estar mediado por un conjunto de factores humorales, incluyendo citoquinas y metabolitos enzimáticos, originados a partir de leucocitos (macrófagos, granulocitos, células granulares eosinófilas y, probablemente, trombocitos) y de otras células, principalmente de las barreras físicas y del tejido conjuntivo (Tort *et al.*, 2003; Magnadóttir, 2006; Whyte, 2007; Nakao *et al.*, 2011). Algunos de estos factores tienen actividad proinflamatoria y se liberan en la fase inicial de la respuesta, mientras que otros promueven la resolución del proceso inflamatorio.

A continuación, se repasan los principales factores proinflamatorios que han sido caracterizados, génica o funcionalmente, en teleósteos y que se han utilizado en este trabajo. Para otras citoquinas no citadas aquí pueden verse otras revisiones (Alejo *et al.*, 2011; Secombes *et al.*, 2011; Wiens *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011).

Citoquinas

Las citoquinas son péptidos/glicopéptidos de bajo peso molecular, que sirven de factores de señalización a las células del sistema defensivo, pero que también tienen dianas fuera de este, incluyendo los sistemas nervioso y endocrino. Se consideran tres grupos fundamentales de citoquinas: **a)** interleuquinas, liberadas por leucocitos activados, principalmente linfocitos-T y macrófagos, pero no únicamente, y que tienen funciones reguladoras de las células inmunitarias (Secombes *et al.*, 2011); **b)** quimioquinas, que incrementan la motilidad celular y/o tienen función quimiotáctica y son liberadas por numerosas células inmunitarias o no (Alejo *et al.*, 2011); y **c)** interferones, que incluyen factores que tienen una

función de estimulación de la resistencia antiviral y son secretados por la mayoría de las células del organismo (interferones tipo I) y otros específicamente producidos por linfocitos-T y con función activadora de la actividad citotóxica mediada por linfocitos-Tc y macrófagos (interferones tipo II y III) (Zou *et al.*, 2011).

Los estudios genómicos, especialmente en pez cebra y en pez globo (*Takifugu rubripes*), y en menor medida los de clonación de los genes, producción de citoquinas recombinantes y, en algunos casos, ensayos biológicos, han permitido describir y caracterizar mejor los diversos grupos de citoquinas de teleósteos (Whyte, 2007; Alejo *et al.*, 2011; Secombes *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). Estos estudios han demostrado que, en general, los teleósteos poseen una red de citoquinas comparable a la de los mamíferos. No obstante, en muchos casos existe una baja homología entre las secuencias génicas de citoquinas que se consideran ortólogas, o no se han identificado en peces los genes de algunas citoquinas importantes, y aunque se han descrito homologías génicas para otras citoquinas no se ha podido clonar o determinar su función en peces (Secombes *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

Durante las respuestas inmunitarias innatas, se libera una cascada de citoquinas, inicialmente proinflamatorias, que incluyen algunas interleuquinas (IL-1, IL-6, TNFs), quimioquinas (IL-8, MCP-1, CXCL8, CCL2, CCL3), que es seguida por la liberación de citoquinas reguladoras del proceso inflamatorio, como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (Magnadóttir, 2006; Whyte, 2007; Alejo *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). En la **Figura 6** se presenta un esquema de la red de citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria en teleósteos.

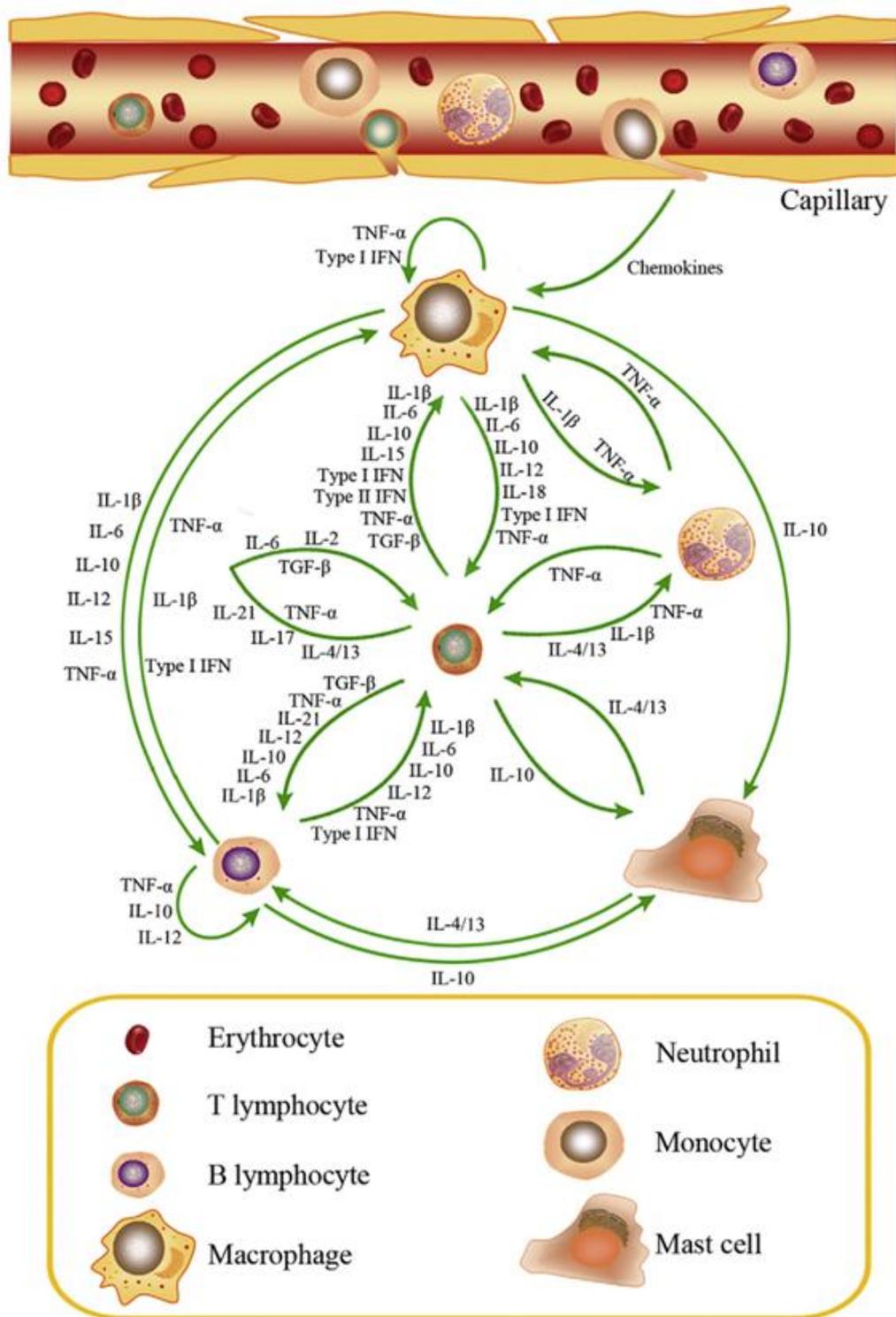


Figura 6. Esquema de la red de citoquinas inmunorreguladoras en teleósteos. Tomado de Zhu *et al.*, 2012.

Interleuquina-1

El término interleuquina-1 comprende una familia de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α (IL-1F1), IL-1 β (IL-1F2), receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra/IL-1F3), IL-18 (IL-1F4), IL-1F5-10 y IL-33 (IL-1F11)) (Dinarello *et al.*, 2010), fundamentales en la respuesta inmunitaria temprana y que inducen una cascada de efectos, muchos de ellos mediados por otras citoquinas, de modo indirecto, a través de un incremento o una inhibición en su expresión, que llevan a la inflamación (Dinarello, 1997). De esta familia, solamente se han descrito IL-1 β e IL-18 en peces (Secombes *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

La IL-1 α y la IL-1 β fueron los primeros miembros de la familia de la IL-1 descubiertos (March *et al.*, 1985). Comparten un receptor en las células diana y por tanto muchos efectos biológicos, aunque la IL-1 β es más potente a la hora de activar las respuestas humorales inmunitarias (Nakae *et al.*, 2001).

IL-1 α y IL-1 β son sintetizadas principalmente en monocitos, pero también en macrófagos activados, neutrófilos periféricos, células endoteliales, fibroblastos, células de Langerhans de la piel, células de la microglía y muchos otros tipos celulares. Ambas se producen en respuesta a muchos estímulos, incluyendo lipopolisacárido bacteriano (LPS), otros productos microbianos, citoquinas (TNF, IFN- γ , GM-CSF, IL-2) y complejos inmunes (Stylianou *et al.*, 1998).

En mamíferos, tanto la IL-1 α como la IL-1 β , son sintetizadas como moléculas precursoras de 31 kDa, pero sólo la IL-1 β es procesada por la enzima procesadora de interleuquina-1 (ICE) para convertirse en péptido maduro con actividad biológica (Thornberry *et al.*, 1992). Sin embargo, en peces, los precursores de IL-1 β clonados no presentan un sitio claro de corte de caspasa 1 (Zou *et al.*, 1999a; Fujiki *et al.*, 2000).

La actividad de la IL-1 se desencadena como consecuencia de la unión a su receptor (IL-1R) en la superficie celular de las células diana. La unión de la IL-1 a

su receptor desencadena una red compleja de respuestas celulares que provoca la activación de nuevos genes o la modificación de proteínas (Scapigliati *et al.*, 2004).

La IL-1 β se ha identificado en 13 especies de teleósteos en los que desempeña un papel en la inmunorregulación a través de la estimulación de células T de modo análogo a lo que hace en mamíferos (Mathew *et al.*, 2002). En algunas especies de teleósteos la IL-1 β se expresa constitutivamente en macrófagos y neutrófilos (Engelsma *et al.*, 2001; Fast *et al.*, 2007) hecho observado en repetidas ocasiones en animales que no demuestran tener estimulación inmunitaria (Huising *et al.*, 2004).

La expresión del receptor de IL-1 β en salmón parece ser constitutiva en todos los tejidos analizados y estaba sobre expresada en el pronefros, bazo, hígado y branquias tras la estimulación con LPS y TNF- α lo que sugiere la existencia de un papel del receptor de IL-1 en la regulación de IL-1 β durante la respuesta inflamatoria (Sangrador-Vegas *et al.*, 2000; Subramaniam *et al.*, 2002).

Factor de la necrosis tumoral α

Diversos productos de la familia del factor de la necrosis tumoral, incluyendo, entre otros TNF- α , TNF- β , ligando de FAS, ligando 4-1BB, ligando CD27, ligando CD40 7 y TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*), tienen actividades defensivas, incluyendo proinflamatorias y proapoptóticas (Ware, 2003).

Comparaciones de la estructura génica, así como análisis filogenéticos de las secuencias de aminoácidos, han demostrado que varias especies de teleósteos (*C. carpio*, *D. rerio*, *O. mykiss*, *Psetta máxima*, *Siniperca chuatsi*) presentan diversas formas de genes homólogos del TNF de mamíferos, pero que están más próximos al TNF- α que al TNF- β (Goetz *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2012). A diferencia de lo que pasa en mamíferos, en teleósteos existen múltiples isoformas de TNF- α (Zou *et al.*, 2002; Saeij *et al.*, 2003a; Wiens *et al.*, 2011;). El TNF- α se ha clonado y caracterizado en varios peces teleósteos, incluyendo trucha arcoíris (Laing *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002) y carpa (Saeij *et al.*, 2003a), entre otros.

El TNF- α tiene funciones diversas que incluyen inflamación, apoptosis, proliferación celular y la estimulación de distintos aspectos del sistema inmunitario (Goetz *et al.*, 2004). El TNF- α es una potente citoquina proinflamatoria liberada por distintos tipos celulares durante la infección o daño tisular y está implicada en distintas condiciones inflamatorias, infecciosas y malignas (Roca *et al.*, 2008; Wiens *et al.*, 2011). Probablemente, una de las principales funciones del TNF- α sea la regulación de las interacciones entre el endotelio y los leucocitos a través del incremento de la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales, selectinas P y E y la ICAM-1, lo que provoca una reducción de la velocidad de los leucocitos en las vénulas poscapilares y su subsecuente extravasación (Mulligan *et al.*, 1993; Henninger *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1997).

En mamíferos el TNF- α es secretado por macrófagos, monocitos, neutrófilos, células citotóxicas naturales (NK) y células T tras su estimulación por el lipopolisacárido bacteriano (Whyte, 2007). En peces, se ha descrito que TNF- α presenta una alta expresión constitutiva en diferentes tejidos de peces sanos y que la expresión tras la realización de desafíos *in vitro* e *in vivo* apenas se ve incrementada (Laing *et al.*, 2001; Garcia-Castillo *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003b; Praveen *et al.*, 2006; Sepulcre *et al.*, 2007). Pero la diferencia más llamativa con respecto a lo que ocurre en mamíferos está relacionada con el débil efecto que se da sobre fagocitos en estudios *in vitro* (Roca *et al.*, 2008).

Estudios con TNF- α recombinante de trucha han demostrado un incremento en la fagocitosis y quimiotaxis de los leucocitos de pronefros de trucha arcoíris, así como una inducción de la expresión de numerosos genes implicados en la respuesta inmunitaria, incluyendo IL-1 β , IL-8 y el enzima ciclooxigenasa (COX)-2 (Zou *et al.*, 2003b).

Quimioquinas: Interleuquina-8

Las quimioquinas son una superfamilia de citoquinas, producidas por distintos tipos celulares, que regulan la migración celular de las células del sistema inmunitario tanto durante procesos inflamatorios como en situaciones fisiológicas

normales. Presentan propiedades quimioatrayentes estimulando el reclutamiento, activación y adhesión de los linfocitos a los sitios donde se da la infección o el daño (Kunkel *et al.*, 1995; Esche *et al.*, 2005). Las quimioquinas juegan un papel clave en el movimiento de las células efectoras inmunitarias a los sitios de infección y se las considera un puente de unión entre las respuestas innata y adaptativa (Whyte, 2007). Se caracterizan por la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados y se dividen en cuatro subfamilias dependiendo de la posición de los dos primeros de estos residuos en su secuencia: CXC (α), CC (β), C (γ) y CX₃C (δ) (Bacon *et al.*, 2002).

Los teleósteos presentan, al menos a nivel de ortólogos genómicos, numerosas quimioquinas, pero sus funciones fisiológicas, incluyendo su participación en las respuestas inmunitarias, son desconocidas en la mayor parte de los casos (Alejo *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). De ellas, la IL-8 fue la primera quimioquina descrita en peces (Lee *et al.*, 2001) y está presente en todas las especies de teleósteos estudiadas y es de la que mejor se conoce su función (Montero *et al.*, 2008).

La IL-8, perteneciente a la subfamilia CXC, atrae neutrófilos, linfocitos T y basófilos *in vitro*, aunque no a los macrófagos y monocitos. Muchos tipos celulares, incluyendo los macrófagos, producen IL-8 en respuesta a variedad de estímulos (LPS, citoquinas y virus) (Tafalla *et al.*, 2005; Corripio-Miyar *et al.*, 2007; Fast *et al.*, 2007). Los efectos biológicos de la IL-8 en los neutrófilos incluyen el incremento de los niveles de calcio citosólico, estallido respiratorio, un cambio en la forma de los neutrófilos y quimiotaxis (Whyte, 2007).

La expresión de IL-8 se ha demostrado en varias especies de teleósteos, por ejemplo, en trucha arcoíris, en respuesta a la vacunación con antígenos bacterianos, tras la infección con bacterias, virus y parásitos, así como en respuesta a un estímulo inflamatorio (Sigh *et al.*, 2004a; Tafalla *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Corripio-Miyar *et al.*, 2007; Fast *et al.*, 2007).

Factor de crecimiento transformante β

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una potente citoquina reguladora con una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, migración y apoptosis bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Li *et al.*, 2006). Dependiendo del tipo celular y de las diferentes condiciones, el TGF- β puede tener efectos estimulantes o inhibidores en las células inmunitarias (Li *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). A esta familia también pertenecen otras proteínas incluyendo activinas/inhibinas, proteínas morfogénicas de hueso y factores de diferenciación del crecimiento (Chang *et al.*, 2002). En mamíferos se han identificado 3 isoformas de TGF- β (1-3) siendo el TGF- β 1 el que predomina en el sistema inmunitario (Govinden *et al.*, 2003), pero las tres isoformas presentan propiedades similares *in vitro* (Li *et al.*, 2006).

En peces, se ha demostrado que existen tres isoformas distintas de TGF- β (Zhu *et al.*, 2012) y han sido clonadas en distintas especies. El gen TGF- β 1 se ha clonado en trucha arcoíris (Hardie *et al.*, 1998), pez cebra, carpa y lubina rayada híbrida (Harms *et al.*, 2000; Zhan *et al.*, 2000). TGF- β 2 se ha aislado en carpa común (Sumathy *et al.*, 1997) y TGF- β 3 se ha aislado en trucha arcoíris, anguila europea y esturión siberiano (Laing *et al.*, 2000).

En general, el TGF- β inhibe la proliferación de células T mediante el bloqueo de la producción de IL-2 y la expresión de ciclina (Li *et al.*, 2006). Además, también bloquea la diferenciación celular de las células efectoras Th-1 y Th2 e inhibe el desarrollo de células T-citotóxicas (Li *et al.*, 2007). Además, el TGF- β también lleva a cabo múltiples efectos en células B, macrófagos, células NK y células dendríticas, incluyendo la regulación de la quimiotaxis, activación y supervivencia de estas células (Yang *et al.*, 2012).

Aún no se conoce muy bien la función de esta citoquina en peces, pero existen algunas evidencias que sugieren que puede tener un papel similar al que desempeña en vertebrados superiores (Zhu *et al.*, 2012). Así, se ha demostrado en trucha que la adición de TGF- β 1 de mamíferos inhibe significativamente el estallido

respiratorio en macrófagos (Jang *et al.*, 1994) y la producción de factores activadores de macrófagos por leucocitos de pronefros (Jang *et al.*, 1995). En mamíferos, esta molécula está implicada en remodelación de tejidos, desarrollo y hematopoyesis, inhibiendo el crecimiento y proliferación celular y desactivando los macrófagos (Lawrence, 1996). Se sabe que inhibe el efecto positivo del IFN- γ en la producción de radicales de oxígeno y de nitrógeno en macrófagos, y por tanto su producción puede ser perjudicial cuando la protección es mediada por estos radicales (Bermudez, 1993). Aunque principalmente tiene un papel inhibitorio, se sabe que el TGF- β 1, en estadios iniciales de la infección, puede facilitar las respuestas de linfocitos-T CD8⁺, así como la diferenciación y la secreción de IL-2 (Suda *et al.*, 1992).

Interferón y proteínas Mx

El IFN es una familia multigénica de citoquinas inducibles que poseen actividad antiviral y juegan un papel importante en la defensa frente a virus en los vertebrados. Son proteínas de secreción que inducen a las células de vertebrados a un estado de actividad antiviral mediante la transcripción de varios cientos de genes estimulados por IFN (ISGs) (Samuel, 2001).

En mamíferos, se distinguen tres subfamilias de IFNs, el tipo I, II y III, basándose en los receptores a los que se unen y la subsecuente respuesta inmunitaria que inician, así como en su estructura génica y las células que los producen (Zou *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2011). Dentro de los IFNs tipo I o IFN viral se encuentran el IFN- α (producido por leucocitos) y el IFN- β (producido por fibroblastos), que son inducidos por virus en la mayoría de las células. El IFN tipo II conocido también como IFN inmunitario, está representado por el IFN- γ y es producido por células citotóxicas naturales y linfocitos-T en respuesta a IL-12, IL-18, mitógenos o antígenos (Børre, 2006). El IFN tipo III actúa también en respuesta a virus, siendo su principal representante el IFN- λ .

La actividad antiviral del IFN tipo I esta mediada por proteínas inducidas por ISGs, siendo las proteínas Mx las más estudiadas (Goodbourn *et al.*, 2000),

habiéndose establecido que estas proteínas Mx por si solas son capaces de bloquear la replicación de virus en ausencia de cualquier otra proteína inducible por IFN α/β (Haller *et al.*, 1998). Las proteínas Mx se encuentran altamente conservadas y se han encontrado en peces teleósteos, aves y mamíferos (Horisberger *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2011).

Además de la inducción de la actividad antiviral celular, los IFN- α/β de mamíferos presentan un gran número de efectos moduladores tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la adaptativa. Así, promueven un incremento de la actividad de las células citotóxicas naturales para eliminar células infectadas con virus (Biron *et al.*, 1999), aumentan la expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo I para promover la presentación antigénica (Fellous *et al.*, 1982), promueven la supervivencia de las células T (Marrack *et al.*, 1999) y estimulan la maduración de las células dendríticas (Buelens *et al.*, 2002), median en la apoptosis de las células infectadas con virus (Samuel, 2001) e inhiben la proliferación celular (Stark *et al.*, 1998).

Las primeras secuencias de IFNs de peces teleósteos, implicados en la inmunidad innata frente a virus, fueron publicadas en 2003 en pez cebra (Altmann *et al.*, 2003), pez globo (Lutfalla *et al.*, 2003) y salmón atlántico (Robertsen *et al.*, 2003). Además, también se han clonado muchos ISGs de salmónidos, aunque sólo las proteínas Mx han demostrado tener actividad antiviral (Verrier *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la trucha arcoíris presenta al menos tres tipos distintos de genes IFNs (Zou *et al.*, 2007). El gen para IFN1 de trucha (rtIFN1) y el rtIFN2 presentan una alta similitud de secuencia con el IFN- α 1 y el IFN- α 2 de salmón atlántico. Mientras que el rtIFN3 presenta más afinidad con el IFN- α de mamíferos y peces. Ensayos con rtIFN1 y rtIFN2 recombinantes demostraron un aumento de la expresión de las proteínas Mx e inhibición de la replicación del virus VHSV en células RTG-2. Sin embargo, el rtIFN3 apenas inducía la expresión de Mx y la actividad antiviral. Además, se vio una expresión diferencial en células y tejidos de

los tres rIFNs (Zou *et al.*, 2007). Por tanto, estos rIFNs presentan distintas funciones en el sistema inmunitario de la trucha.

Enzimas con funciones regulatorias de la inflamación

Enzima ciclooxigenasa 2

Las prostaglandinas están implicadas en todas las etapas de la inflamación. Estas se producen tras la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. A continuación, el ácido araquidónico es metabolizado por la enzima ciclooxigenasa, que es la enzima limitante en la producción de prostaglandinas. La prostaglandina-H₂ producida por la actividad de la COX es después metabolizada por gran variedad de enzimas para producir prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Rowley *et al.*, 1995), siendo la PGE₂ la prostaglandina más relevante en el proceso inflamatorio (Knight *et al.*, 1995).

La enzima ciclooxigenasa tiene dos isoformas, una que se expresa constitutivamente y que se localiza en la mayoría de células y tejidos (COX-1) y otra inducible (COX-2) que se expresa en células endoteliales, fibroblastos y macrófagos. En estos últimos la COX-2 se expresa en respuesta a varias señales inflamatorias, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y LPS (Salvemini *et al.*, 1993).

En peces, al igual que en mamíferos, se ha visto que la liberación de PGE₂ por parte de macrófagos modula la reactividad inmunitaria y la respuesta inflamatoria (Knight *et al.*, 1995; Rowley *et al.*, 1995). Así por ejemplo, en trucha arcoíris se ha visto que la PGE₂ reprime la explosión respiratoria de los macrófagos e inhibe la proliferación de leucocitos de pronefros (Secombes, 1994a; Novoa *et al.*, 1996). La existencia de un homólogo de COX en peces se confirmó con la clonación del cDNA de COX-2 en trucha arcoíris y trucha común (Zou *et al.*, 1999b; Roberts *et al.*, 2000).

Enzima nítrico óxido sintasa inducible

Las enzimas nítrico óxido sintasas (NOS) están presentes en todos los organismos vivos, incluidas las bacterias. Estas enzimas catalizan la oxidación de la L-arginina a óxido nítrico y citrulina (Hibbs *et al.*, 1987). El óxido nítrico producido es una molécula de vida corta que tiene una gran importancia biológica, participando en transducción de señales, neurotransmisión y en la defensa del organismo (Nathan, 1992). La actividad de NOS ha sido descrita en muchos organismos desde mohos unicelulares (Werner-Felmayer *et al.*, 1994), hasta humanos (Nozaki *et al.*, 1997), pasando por los peces (Ostholt *et al.*, 1994).

En los mamíferos se han identificado tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (Knowles *et al.*, 1994). Dos de ellas se expresan constitutivamente, principalmente en el cerebro (nNOS) (Bredt *et al.*, 1990) y en las células endoteliales (eNOS) (Janssens *et al.*, 1992). Estas isoformas son Ca^{+2} /calmodulina dependientes, permitiendo una respuesta rápida y con la producción de unos niveles bajos de NO. La tercera isoforma es inducible (iNOS), y está presente principalmente en macrófagos, pero también puede encontrarse en hepatocitos, condrocitos, células renales epiteliales y osteoblastos. Esta isoforma es Ca^{+2} /calmodulina independiente y requiere un estímulo por parte de productos bacterianos o citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ) para expresarse (Stuehr *et al.*, 1985; Nussler *et al.*, 1993). A diferencia de las nNOS y eNOS, la iNOS actúa más lentamente (porque se tiene que activar la expresión génica) pero produce unos niveles de NO más altos.

La expresión de iNOS parece tener un papel en la vasodilatación bajo ciertas condiciones patológicas (Moncada *et al.*, 1993) y juega un papel importante en la inmunidad frente a ciertos patógenos, como se ha visto con *Leishmania major*, y frente a células tumorales (Liew *et al.*, 1990). Durante los ataques antimicrobianos y antitumorales, enzimas implicadas en las vías respiratorias y en la síntesis de DNA del organismo invasor son inhibidas mediante la combinación de NO con sus fracciones contenedoras de hierro.

En peces, la presencia de NOS se ha demostrado en tejidos nerviosos de diversas especies, como carpa (Hylland *et al.*, 1995) y salmón atlántico (Ostholtm *et al.*, 1994). La presencia de un enzima NOS inducible se ha demostrado en leucocitos de pez gato procedentes de desafíos con *Edwardsiella ictaluri* (Schoor *et al.*, 1994) y líneas celulares de macrófagos de carpín dorado tras la estimulación con LPS o sobrenadantes de leucocitos estimulados (Neumann *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995).

En trucha, la enzima iNOS es inducible, tanto *in vitro*, en respuesta a LPS, como *in vivo*, como demuestran los análisis de RT-PCR de macrófagos de riñón y de branquias de truchas desafiadas con una cepa atenuada de *A. salmonicida* (Laing *et al.*, 1996; Laing *et al.*, 1999).

En peces, al igual que en mamíferos, se ha descrito una asociación entre la expresión de iNOS y del enzima arginasa que compite con ella por la arginina como sustrato (Vincendeau *et al.*, 2003; Joerink *et al.*, 2006a; Joerink *et al.*, 2006b), y el fenotipo de diversas subpoblaciones de macrófagos activados, que presentan funciones distintas en las respuestas defensivas, como se ha indicado anteriormente en relación con las respuestas inmunitarias de tipo Th1/Th2/Th17, y en la reparación tisular (Gordon *et al.*, 2005; Hanington *et al.*, 2009).

ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS DE PECES POR ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.

Uno de los problemas esenciales para la caracterización de las respuestas inmunitarias en peces es la falta de herramientas adecuadas para los estudios funcionales, principalmente anticuerpos que reconozcan marcadores celulares específicos, para caracterizar subpoblaciones de leucocitos, y mediadores humorales como citoquinas, así como de ensayos biológicos adaptados a las diversas especies. Esto crea serios problemas, no solo para el estudio del sistema inmunitario de teleósteos, sino también para el desarrollo de medidas inmunoprolácticas eficaces contra las enfermedades infecciosas para la acuicultura intensiva. En palabras de Sunyer (Sunyer, 2011):

“A good knowledge of fish immunity is a fundamental requirement for the rational design of novel fish vaccines, immunostimulants and other immunotherapeutics. ... Yet, while advances in the field have been tremendous in the last decade, the field still lacks a long list of research tools that thwart its development in many areas. For example, with a few exceptions, fish immunologists lack antibodies against crucial cell markers for dendritic cells, macrophages, T and B cells, NK cells, among other important cell types. We lack also standardized protocols to measuring a number of cell immune responses (e.g., protocols to assess antigen-specific proliferation). Most research is carried out with the use of heterozygous fish, which introduce a lot of variability in the results, and preclude experimentation involving cell transfers from donor to recipient fish (e.g., leukocyte homing and migration studies). In addition, we still lack strategies to rationally produce knockout fish.”

No obstante, la disponibilidad creciente de datos obtenidos a partir de estudios genómicos, incluyendo la secuenciación completa del genoma de varias especies de teleósteos, entre los cuales destaca el del pez cebra, está permitiendo identificar los genes de moléculas clave del sistema inmunitario de peces, homólogos en muchos casos de los de mamíferos (Laing *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

Estos conocimientos genómicos permiten también el estudio de los fenómenos que suceden en los peces durante el desarrollo de las respuestas defensivas, tanto innatas como adquiridas, en respuesta a inoculaciones experimentales con patógenos o a la inmunización. Así, el estudio del transcriptoma, mediante el uso de la técnica de retrotranscripción (RT) de mRNA seguida de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite seguir variaciones en la expresión génica de mediadores de las respuestas inmunitarias (por ejemplo, citoquinas) y caracterizar – hasta cierto punto – la presencia de determinados tipos celulares a partir de la amplificación de transcritos de marcadores específicos (Martin *et al.*, 2006; Mu *et al.*, 2011; Raida *et al.*, 2011).

A pesar de ser un método indirecto, ya que las intensidades de variaciones en la expresión de un cierto gen no se corresponde siempre con la producción de la proteína correspondiente, debido a procesos de regulación postranscripcional, como

no traducción, degradación o maduración alternativa de los transcritos (Alberts *et al.*, 2002), este tipo de estudios mediante RT-PCR, especialmente cuando se usa la técnica de PCR cuantitativa (qPCR, también conocida como PCR a tiempo real), proporciona resultados que pueden ser valiosos. Esto especialmente cierto en el caso de no disponer de herramientas como anticuerpos para la identificación directa y cuantificación de las moléculas de interés. Así, el método de RT-PCR se ha usado y se sigue utilizando actualmente en numerosos estudios de las respuestas inmunitarias de teleósteos. En las **Tabla 3** y **Tabla 4** se muestran ejemplos de los mismos, con particular atención a los referidos a las respuestas a infecciones experimentales y la inmunización.

Espece	Estímulo	Genes	Referencia
<i>O. mykiss</i>	Vacunación con Ergosan	IL-1 β , IL-8, TNF- α	(Peddie <i>et al.</i> , 2002b)
<i>C. carpio</i>	Infección con <i>T.borrelia</i>	IL-1 β , TNF- α , MHC-II, CXCR, C3...	(Saeij <i>et al.</i> , 2003b)
<i>O. mykiss</i>	Infección con <i>I.multifiliis</i>	IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-1RII	(Sigh <i>et al.</i> , 2004a)
<i>S.salar</i> L.	Vacuna experimental multivalente	β 1-M tipo1/2, IL- β 1, Mx-1, MHC-II β	(Haugland <i>et al.</i> , 2005)
<i>O. mykiss</i>	Infección con VHSV	IL-1 β , IL-8, MHC-II, TGF- β , iNOS	(Tafalla <i>et al.</i> , 2005)
<i>O. mykiss</i>	Vacunación y desafío con <i>Y.ruckeri</i>	Quimioquinas	(Wiens <i>et al.</i> , 2006)
<i>O. gorbusha</i> <i>O. keta</i>	Vacunación con bacterina de <i>A.salmonicida</i>	IL-1 β , IL-8, TNF- α	(Fast <i>et al.</i> , 2007)
<i>O. mykiss</i>	Vacunación y desafío con <i>Y.ruckeri</i>	IL-1, IL-6, IL-10, TGF, IFN- γ , TNF- α , IL-8, MHC-II...	(Raida <i>et al.</i> , 2008a)
<i>Gadus morhua</i>	Vacunación con bacterina de <i>L.anguillarum</i>	IL-1 β , IL-8, transferrina, Apo-A, lisozima	(Caipang <i>et al.</i> , 2008)
<i>O.mykiss</i>	Infección con VHSV; vacuna de DNA; quimioquinas	IL-8R	(Montero <i>et al.</i> , 2008)
<i>Puntius sarana</i>	Infección con <i>A.hydrophila</i>	C3, transferrina, lisozima, IL-1 β , IL-8	(Das <i>et al.</i> , 2011)
<i>I. punctatus</i>	Vacunación con <i>A.hydrophila</i> atenuada y desafío con <i>A.hydrophila</i>	IL-1 β , IL-10, TLR-5, CXCL10...	(Mu <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 3. Algunos estudios transcriptómicos realizados para analizar respuestas defensivas/inmunitarias en peces

Línea	Especie	Estímulo	Genes	Referencia
Leucocitos	<i>O. mykiss</i>	LPS	IL-1 β	(Zou <i>et al.</i> , 2000)
RTS-11	<i>O. mykiss</i>	LPS	COX-2, IL-1 β , TGF- β	(Brubacher <i>et al.</i> , 2000)
Cultivos primarios de pronefros y RTS-11	<i>O. mykiss</i>	LPS y rIL-1 β	TNF- α	(Laing <i>et al.</i> , 2001)
RTS-11	<i>O. mykiss</i>	rTNF- α	IL-1 β , IL-8, TNF- α , COX-2	(Zou <i>et al.</i> , 2003a)
SHK-1	<i>S. salar</i>	LPS y PGE ₂	IL-1 β , MHC-I/II, TNF- α , COX-2, TGF- β	(Fast <i>et al.</i> , 2005)
TO	<i>S. salar</i>	LPS	MHC-I/II, IL-1 β , IL-10, TCR, IFN- α/γ , Mx	(Pettersen <i>et al.</i> , 2008)
Scavenger endothelial cells	<i>G. morhua</i>	Oligonucleótidos-CpG, poly I:C y LPS	IL-1	(Martin-Armas <i>et al.</i> , 2008)
Células adherentes de pronefros	<i>G. morhua</i>	Infección vírica, LPS y poly I:C	IL-1 β , IL-8, IL-10	(Seppola <i>et al.</i> , 2008)
RTS-11	<i>O. mykiss</i>	Infección con VHSV, vacuna de DNA y quimioquinas	IL-8R	(Montero <i>et al.</i> , 2008)
Células epiteliales de branquia	<i>G. morhua</i>	<i>V. anguillarum</i> y <i>A. salmonicida</i>	Genes de defensa bacteriana, interleuquinas, quimioquinas	(Caipang <i>et al.</i> , 2010)
RTG-2, RTGill, RTL y RTS11	<i>O. mykiss</i>	<i>S. parassitica</i>	IL-1 β , IL-8, IL-11, TNF- α , COX-2...	(de Bruijn <i>et al.</i> , 2012)

Tabla 4. Algunos estudios transcriptómicos realizados para analizar respuestas defensivas/inmunitarias en cultivos celulares de peces.

—Justificación y Propósito —

En los últimos años, los métodos de la Biología Molecular, así como la secuenciación de genomas de algunas especies de teleósteos, bien de interés como modelos de biomedicina, como el pez cebra, o bien de interés comercial, como el pez fugu, han permitido caracterizar algunas de las citoquinas (interleuquinas, quimioquinas, factores de crecimiento...) y de otros productos (como enzimas y factores de transcripción) que intervienen en el control de las respuestas inmunitarias de peces, estudiar su expresión génica y, en algunos casos, obtener dichos productos como proteínas recombinantes (Alejo *et al.*, 2011; Secombes *et al.*, 2011; Verrier *et al.*, 2011; Wiens *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2011). Estos conocimientos y métodos han abierto la puerta al estudio de los mecanismos que regulan en los peces el inicio, la intensidad y la duración de los diversos tipos de respuestas inmunitarias innatas y adquiridas que se inducen frente a distintos tipos de antígenos, así como analizar en detalle los procesos inflamatorios.

Una aplicación de estos conocimientos y herramientas de trabajo es el desarrollo racional de vacunas más eficaces para la acuicultura, para lo cual existe un gran interés en dilucidar las correlaciones entre las respuestas inflamatorias y el perfil de citoquinas inducido a tiempos cortos tras la vacunación, que también condicionan el tipo de inmunidad adquirida que se desarrolla (Zygmunt *et al.*, 2011). Para un tipo dado de vacuna, la efectividad (protección) depende de que se induzca el tipo de respuesta inmunitaria celular o humoral apropiado, lo que depende de la generación de respuestas tipo Th1 o Th2 (Harun *et al.*, 2011).

En diversos estudios, nuestro grupo de investigación demostró que la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* es muy efectiva en trucha arcoíris contra las infecciones producidas por cepas patógenas de esta especie, así como que confiere una protección cruzada significativa contra infecciones de cepas de *A. salmonicida* (Vivas *et al.*, 2004a). Los estudios realizados por Vivas se centraron en la caracterización de la eficacia de esa vacuna, la persistencia del mutante *aroA* en los tejidos del pez y en la inducción de la respuesta inmunitaria (Vivas *et al.*, 2005), en la influencia del medio y condiciones de cultivo del mutante en la eficacia de la vacuna (Vivas *et al.*, 2005), así como en el estudio del comportamiento del mutante

en microcosmos acuáticos (Vivas *et al.*, 2004b). Todo ello estaba dirigido a establecer las bases de conocimiento sobre la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* que pudieran ser usadas para el desarrollo de una fórmula comercial de esta vacuna, atendiendo al marco regulatorio para la licencia de este tipo de vacunas (EMEA 2004; Directiva 2009/9/CE; Woodland, 2011).

Siguiendo esa línea de trabajo, en el proyecto de esta tesis nos propusimos profundizar en el conocimiento de la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación intraperitoneal con el mutante *aroA* de *A. hydrophila* y su relación con la protección obtenida, que en el caso de la protección cruzada contra *A. salmonicida* parece debida a mecanismos de inmunidad innata. Para ello, abordamos la caracterización transcriptómica de la respuesta temprana del sistema inmunitario de *O. mykiss* a la vacunación con el mutante *aroA* de *A. hydrophila*.

Pero además, dado que – al igual que sucede en mamíferos – en los pocos estudios realizados en peces las vacunas vivas atenuadas, tanto bacterianas (Vaughan *et al.*, 1993; Norqvist *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1997; Thune *et al.*, 1999) como virales (Yanong, 2008), obtenidas bien mediante métodos tradicionales o bien por manipulación génica, son más eficaces que las vacunas homólogas inactivadas y, a veces, las únicas que proporcionan una protección suficiente, en términos de grado y duración de la respuesta protectora, resultaba interesante analizar de forma comparada el tipo de respuesta producido por la vacunación con una vacuna frente a la misma vacuna inactivada.

Por otra parte, el uso de métodos *in vitro* para desarrollar ensayos fisiológicos, especialmente los basados en cultivos celulares, que sean una alternativa a los estudios *in vivo*, se considera un requisito deseable para el futuro desarrollo de la experimentación clínica y farmacéutica humana y veterinaria, que está siendo fuertemente impulsada por numerosos organismos internacionales de investigación, incluyendo la Comisión Europea (Directiva 2010/63/EU; Stokes *et al.*, 2011a; Stokes *et al.*, 2011b; Woodland, 2011). Además, en el caso de los peces, los ensayos *in vivo* son particularmente complicados, por sus variaciones inter- e

intraespecíficas y su susceptibilidad al estrés y a cambios ambientales, por lo que resultaría muy ventajoso disponer de modelos *in vitro* que facilitasen, al menos, estudios preliminares en cualquier campo de interés para la acuicultura comercial intensiva (Villena, 2003).

En ese sentido, el grupo de investigación en “Inmunología Comparada” de la Universidad de León, en el que se ha realizado esta tesis doctoral, tiene una amplia experiencia en el establecimiento de cultivos celulares de trucha arcoíris y de su utilización para su aplicación a estudios de caracterización del sistema inmunológico (Diago *et al.*, 1993; Diago *et al.*, 1995; Diago, 1996; Carracedo, 2003), de patogenia y respuestas defensivas (Flaño, 1995; Flaño *et al.*, 1996; Flaño *et al.*, 1997; McIntosh *et al.*, 1997) y, más recientemente, del uso de líneas celulares de estroma linfohematopoyético para analizar las respuestas a inmunoestimulantes (Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012).

Considerando lo expuesto, el propósito de esta tesis doctoral es:

1. Obtener nuevos conocimientos referidos a los mecanismos proinflamatorios y de regulación inmunitaria que median las respuestas que se desarrollan tras la vacunación i.p. de *O. mykiss* con una vacuna viva atenuada y su homóloga inactivada, y que puedan contribuir a esclarecer los mecanismos inmunológicos que subyacen a la mejor protección conferida por las vacunas vivas en peces y, por tanto a mejorar o desarrollar nuevas vacunas “clásicas” o recombinantes que tengan un comportamiento semejante a las anteriores en su capacidad de inducir respuestas inmunitarias eficaces y protectoras.
2. Seguir desarrollando modelos de estudio *in vitro*, que utilicen cultivos celulares de peces y puedan ayudar al cribado preliminar de candidatos de vacunas más eficaces para la acuicultura, contribuyendo así a la estrategia de reemplazamiento de los ensayos con animales.

Para ello se han utilizado dos modelos experimentales, empleando en ambos casos la misma metodología de análisis transcriptómico de la expresión de genes inmunorreguladores relacionados con las respuestas inflamatoria e inmunitaria tras la inoculación con la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* viva o formalinizada, para alcanzar los siguientes

OBJETIVOS:

1. La caracterización de la respuesta transcriptómica en bazo y en pronefros de *O. mykiss* de los genes de las citoquinas IL-1 β 1, IL-8, TNF- α 1, TGF- β , de la proteína Mx-1, los de las enzimas COX-2 e iNOS y el de la cadena β del MHC-II tras la vacunación intraperitoneal con la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* viva o formalinizada, en comparación con truchas control, inoculadas también intraperitonealmente con la solución salina tamponada utilizada para preparar las vacunas.
2. La caracterización de la respuesta transcriptómica de los mismos genes indicados en el objetivo anterior en dos líneas celulares de *O. mykiss*, una derivada del estroma de bazo (línea TSS) y la otra del estroma de pronefros (línea TPS-2), expuestas a la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* viva o formalinizada, en comparación con cultivos control, a los que solo se añadió el medio de cultivo utilizado para resuspender las bacterias.

La elección de la vacuna formada por la cepa *aroA* de *A. hydrophila* y de estos dos modelos experimentales se fundamenta en los siguientes antecedentes:

- a) En el caso de la vacuna *aroA* y de la vacunación i.p. de *O. mykiss*, estudios previos, llevados a cabo en colaboración con el equipo dirigido por el Dr. German Naharro (Dpto. de Sanidad Animal de la Universidad de León), demostraron que esta vacuna es segura y eficaz en trucha arcoíris contra desafíos de otra cepa (PPD 70/91) virulenta de *A. hydrophila*, (Hernanz-Moral *et al.*, 1998), así como también era capaz de conferir cierto grado de protección cruzada contra una cepa virulenta de *A. salmonicida* (Vivas,

2003; Vivas *et al.*, 2004a), induciendo la activación de mecanismos inmunológicos innatos, con incremento de actividades microbidas (Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a), así como de la inmunidad adquirida con producción de anticuerpos específicos contra *A. hydrophila* (Hernanz-Moral *et al.*, 1998).

- b) Estudios previos de J. Vivas (Vivas, 2003) en los que se comparó la efectividad de la vacuna aroA viva con la de la formalinizada, usando como cepa de desafío la PPD 70/91 de *A. hydrophila*, y que demostraron que la protección conferida por la vacuna aroA viva era mayor ($RPS_{60} = 46,9\%$) que la producida por la vacuna formalinizada ($RPS_{60} = 30,7\%$).
- c) En cuanto al uso de las líneas celulares TSS y TPS-2 de estroma linfohematopoyético de *O. mykiss* para los estudios *in vitro*, en la demostración de que estas dos líneas, obtenidas por nuestro grupo (Carracedo, 2003), son capaces de expresar genes inmunorreguladores, tales como IL-1 β , IL-8, TNF- α , Mx-1, COX-2, iNOS, Arginasa-2 y MHC-II β , y factores de la respuesta inflamatoria (NO, ROS), tras su estimulación con PAMPs (LPS, poly I:C) o el inmunoestimulante levamisol (Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012)

Por otra parte, la elección de los genes que se han estudiado (*IL-1 β* , *IL-8*, *TNF- α* , *TGF- β* , *Mx-1*, *COX-2*, *iNOS* y *MHC-II β*) se realizó en función de su expresión en los dos modelos experimentales utilizados, a fin de que se pudieran llevar a cabo comparaciones entre ambos. El modelo limitante, en cuanto a este aspecto, era el uso de las líneas TSS y TPS-2, razón por la cual no se incluyeron en este estudio algunos genes, como son los de IFN-II, IL-2, IL-6, IL-17 o los factores de transcripción T-bet, GATA3, todos ellos expresados por linfocitos-T y que regulan el perfil Th1/ Th2 / Th17 de las respuestas inmunitarias adquiridas (Laing *et al.*, 2011; Secombes *et al.*, 2011).

—Material y Métodos —

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para los ensayos de vacunación realizados en la Universidad de León se utilizaron alevines de trucha arcoíris (n=90), *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), procedentes de la piscifactoría “Los Leoneses” (Castrillo del Porma, León). Los alevines se pesaron y midieron individualmente, arrojando un peso medio de $48,2 \pm 11,7$ g y una longitud media de $16,2 \pm 1,2$ cm.

Las truchas se alojaron en el acuario de Patología Infecciosa del Departamento de Biología Molecular (Área de Biología Celular), en la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León. Se dispusieron en grupos de 40 individuos, en tanques de polietileno de 300 litros de capacidad, a los que se les suministraba de modo continuo agua no clorada procedente de un pozo artesiano situado en el Campus de Vegazana (León). Esta instalación dispone de un sistema de esterilización del agua efluente por ozonización.

La temperatura del agua se termostató a 14 ± 2 °C y el fotoperiodo se mantuvo constante en un régimen de 12h luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados cada 48 horas con pienso comercial granulado Trouw T-6 classic 3P (Trouw España S.A.), compuesto por un 40 % de proteína, 21 % grasa, 16 % de carbohidratos, 8 % de cenizas y 1,5 % de fibras.

Previo a la realización de cualquier ensayo, los animales pasaron por un periodo de aclimatación de 2 semanas y fueron examinados diariamente, eliminándose cualquier individuo con signos de enfermedad.

Para los ensayos de seguridad de la vacunación y de eficacia de la vacuna con bacterias vivas de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* realizados en Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, Escocia, Reino Unido, se utilizaron 240 truchas con un peso medio de $9 \pm 0,5$ g y una longitud media de $10 \pm 0,5$ cm que fueron mantenidas en el acuario del instituto en tanques de polietileno de 300 litros de capacidad con una temperatura constante de 14 ± 2 °C.

Para llevar a cabo los diferentes experimentos, los animales fueron anestesiados mediante inmersión en MS-222 (metil sulfonato de tricaina, Sigma) a una concentración de 60 mg/l para anestesiarse o de 200 mg/l para el sacrificio por sobreenestesia.

Todos los restos orgánicos y materiales de desecho procedentes de los ensayos de vacunación fueron esterilizados por autoclavado antes de su eliminación.

LÍNEAS CELULARES

Para los ensayos *in vitro* se han utilizado dos líneas celulares de trucha arcoíris derivadas del estroma del bazo y del pronefros, principales órganos linfohematopoyéticos de teleósteos, que fueron obtenidas en nuestro laboratorio.

Línea TSS: esta línea celular, obtenida por Carracedo (Carracedo, 2003), se obtuvo a partir de subcultivos de explantes de bazo de *O. mykiss* y está formada por una población heterogénea de células del estroma esplénico, predominando las células epitelioides (**Figura 7**). Las células de esta línea se caracterizan por su alta capacidad endocítica, mostrando actividades enzimáticas lisosomales, así como marcaje positivo para la lectina de *Ulex europaeus* (UEAI), por lo que contiene células que se asemejan a células endoteliales de tipo sinusoidal (Bachetti *et al.*, 2000; Scoumanne *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 2002).

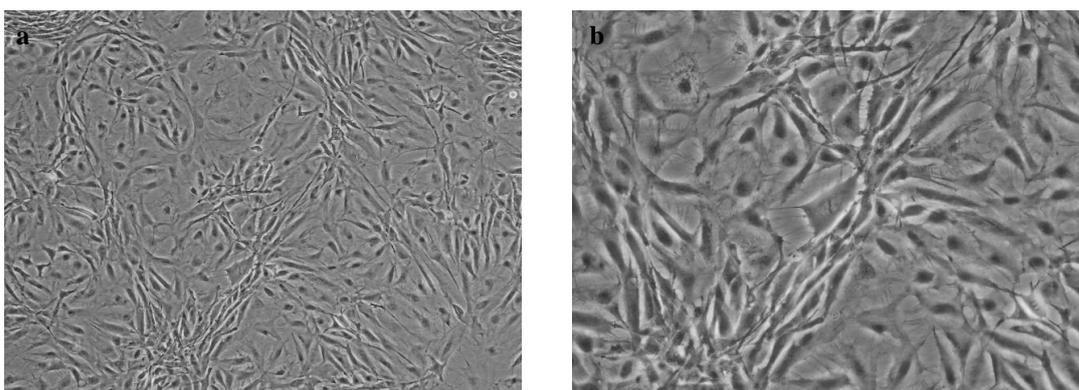


Figura 7. Microfotografías en contraste de fases de cultivos de la línea celular TSS de bazo de trucha arcoíris en el pase 40 tras 5 días de cultivo. **a)** 100x y **b)** 200x.

Línea TPS-2: es una línea celular obtenida también por Carracedo (Carracedo, 2003) a partir de subcultivos de explantes de pronefros de *O. mykiss* y contiene diversas poblaciones del estroma hematopoyético de ese órgano, que se considera equivalente a la médula ósea de mamíferos (Zapata, 1979). Los cultivos de la línea TPS-2 contienen predominantemente células del sistema retículo endotelial (RES), incluyendo células epitelioides, células fibroblásticas y gigantes (**Figura 8**), las cuales presentan actividades enzimáticas lisosomales (Carracedo, 2003). Esta línea celular se asemeja a la línea TPS obtenida y descrita por Diago (Diago *et al.*, 1995), pero se distingue de ella por contener un menor número de células gigantes.

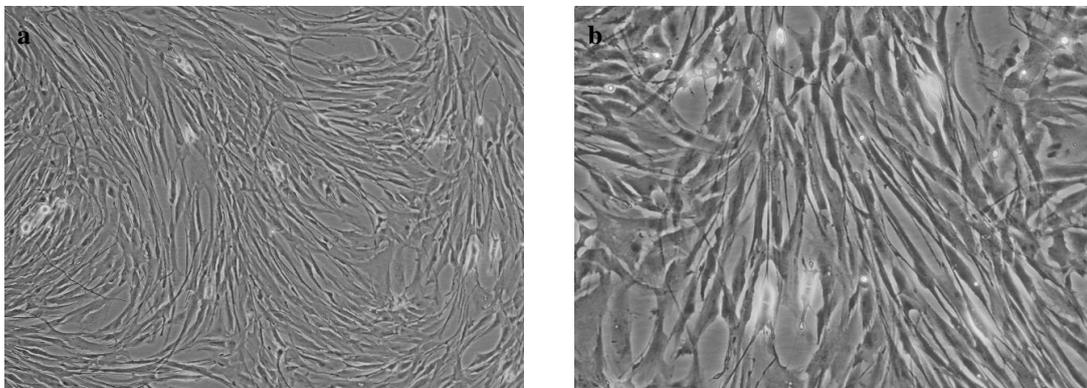


Figura 8. Microfotografías en contraste de fases de cultivos de la línea celular TPS-2 de pronefros de trucha arcoíris en el pase 42 tras 5 días de cultivo. **a)** 100x y **b)** 200x.

Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para los ensayos se utilizaron pases jóvenes (30-40 pases) de las líneas celulares, procedentes de semillas madre almacenadas en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron en un baño a 37 °C, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/cm² en frascos de 25 cm² de superficie (Costar). Estos se mantuvieron a 18 °C en atmósfera de aire y humedad a saturación en un incubador termostatzado (modelo MPR 161D, Sanyo).

Tras la descongelación, las células se subcultivaron varias veces para amplificar la población, mediante disgregación enzimática con una solución de tripsina/EDTA (Biochrom) al 0,05-0,02 % en tampón fosfato salino (PBS) 0,16 M, libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Tras un tiempo de incubación de unos 2-3 min en la solución enzimática, se añadió medio de cultivo completo con suero fetal bovino para inactivar la tripsina y las células se lavaron a 300 g durante 10 min a 4 °C. Tras esto, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se determinó la viabilidad mediante el método de exclusión con azul tripán al 0,1 %. Se sembraron 5×10^5 células viables en frascos de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio.

Medio de cultivo de las líneas celulares

Se utilizaron los siguientes medios para el cultivo de las líneas TSS y TPS-2:

- a. Medio de cultivo rutinario (TCMD) descrito por Diago *et al.* (Diago *et al.*, 1993; Diago *et al.*, 1995), semejante al utilizado por Mishell y Dutton (Mishell *et al.*, 1967) pero modificado por Carracedo (Carracedo, 2003) para sustituir el suero de trucha por suero bovino fetal, cuya formulación se muestra en la **Tabla 5**.
- b. Medio de estimulación de los cultivos, que se uso para los bioensayos de exposición a los preparados vacunales, cuya composición se muestra en la **Tabla 6**. Este medio se caracteriza por la ausencia de rojo fenol y contener un porcentaje de suero bovino fetal del 2%, para evitar la estimulación inespecífica de las células cultivadas.

<i>Solución stock</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen para 100 ml</i>
Suero fetal (FCS) (Cultek)	20% v/v	20 ml
L-Glutamina 200 mM (Biochrom)	2 mM	1 ml
Piruvato sódico 100 mM (Merck)	2,5 mM	2,5 ml
2-Mercaptoetanol 50 mM (Merk)	50 μ M	0,1 ml
Mezcla de nucleósidos (Sigma)	0,1% p/v	2,5 ml
<i>Adenosina</i>	$9,4 \times 10^{-2}$ mM	
<i>Citosina</i>	$22,5 \times 10^{-2}$ mM	
<i>Guanosina</i>	$8,8 \times 10^{-2}$ mM	
<i>Uridina</i>	$10,2 \times 10^{-2}$ mM	
Gentamicina 100 mg/ml (Gibco)	50 μ g/ml	500 μ l
Anfotericina 250 μ g/ml (Gibco)	2 μ g/ml	880 μ l
RPMI-1640 con HEPES 25 mM y L-Glutamina 2 μ M (Gibco)		Hasta 100 ml
<i>El pH se ajustó a 7,2-7,4 y el medio se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 μm) y se almacenó a 4°C.</i>		

Tabla 5. Formulación del medio de cultivo TCMD.

<i>Solución stock</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen para 100 ml</i>
Suero fetal (FCS) (Cultek)	2 % v/v	2 ml
Gentamicina 10mg/ml (Gibco)	50 μ g/ml	500 μ l
Anfotericina 250 μ g/ml (Gibco)	2 μ g/ml	880 μ l
RPMI-1640 sin rojo fenol, con HEPES 25 mM y L-Glutamina 2 μ M (Gibco)		Hasta 100 ml
<i>El pH se ajustó a 7,2-7,4 y el medio se esterilizó por filtración (filtro de 0,22 μm) y se almacenó a 4°C.</i>		

Tabla 6. Formulación medio de estimulación de las líneas celulares usado para bioensayos.

VACUNAS *aroA* DE LA CEPA *aroA* DE *Aeromonas hydrophila*

Se han utilizado dos tipos de vacunas, preparadas como se indica posteriormente, de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* (vacunas *aroA*):

- Vacuna viva, consistente en bacterias viables, que habían sido cultivadas en medio líquido, recogidas y lavadas por centrifugación con PBS y resuspendidas en el mismo tampón para su uso.
- Vacuna formalinizada, en la que las bacterias recogidas del cultivo fueron lavadas por centrifugación con PBS, inactivadas por exposición a formaldehído y, posteriormente, resuspendidas en PBS para su uso.

Como se ha indicado en la introducción, la cepa *aroA* de *A. hydrophila* es mutante para el gen *aroA* de la cepa AG2 de *A. hydrophila*, obtenida a partir de la cepa silvestre AG2 mediante la inserción de un casete de resistencia al antibiótico kanamicina en el gen *aroA*, que codifica el enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa, esencial en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Hernanz-Moral, 2001).

Confirmación de la identidad de la cepa bacteriana

Para confirmar la identidad de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* utilizada para obtener las vacunas se llevaron a cabo dos tipos de procedimientos, según lo indicado por Vivas (Vivas, 2003):

- Identificación fenotípica y bioquímica, incluyendo la tinción de Gram y un test API 20E™.
- Identificación por PCR para la amplificación específica del gen *aroA*, utilizando los cebadores descritos por Cascón y cols. (Cascon *et al.*, 1996), que permiten detectar la interrupción del gen debida a la inserción del casete de resistencia a kanamicina. De esa forma, mientras que en la cepa silvestre AG2 el tamaño del amplicón es de 1238 pb, en el mutante

el tamaño es de 2638 pb (Hernanz-Moral, 2001). En este estudio se utilizaron los cebadores descritos en el trabajo original (Hernanz-Moral, 2001):

Delantero: PF1 5' - TTT GGA ACC CAT TTC TCG TGT GGC -3'

Reverso: PR1 5' - TCG AAG TAG TCC GGG AAG GTC TTG G -3'

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mini Cyclor™ (MJ Research) empleando un kit de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención del DNA molde necesario para la realización de la PCR se siguió el protocolo que se describe a continuación:

1. A partir de cultivo en placa, se resuspendieron varias colonias en 300 µl de agua MilliQ estéril.
2. Para romper las bacterias, la suspensión se dejó hervir durante 15 min e inmediatamente después se congeló a -20 °C durante 10 min.
3. Se centrifugó la suspensión de células fragmentadas a 13000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante que contiene el DNA que se utilizó como molde.

El volumen final de la mezcla de reacción de PCR fue de 50 µl, que contenían los reactivos indicados en la **Tabla 7**.

	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen</i>
Tampón 10X Taq polimerasa		5 µl
Cebador 5'	10 µM	2,5 µl
Cebador 3'	10 µM	2,5 µl
Mezcla dNTPs	10 µM	1,2 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/ µl	0,3 µl
MgCl ₂	50 mM	2 µl
cDNA		5 µl
Agua estéril		Hasta 50 µl

Tabla 7. Formulación de la mezcla de reacción de la PCR para amplificación del gen *aroA*.

Las condiciones de la PCR que se utilizaron para la amplificación del gen *aroA* fueron las siguientes (**Tabla 8**):

<i>Ciclo</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
Desnaturalización inicial	2,5 min	94°C
Amplificación 38 ciclos	Desnaturalización	0,5 min
	Anillamiento	0,5 min
	Extensión	2 min
Extensión final	10 min	72°C

Tabla 8. Condiciones utilizadas para la amplificación del gen *aroA*.

Los productos de las amplificaciones fueron visualizados en geles de agarosa de baja electroendósmosis (Agarose D-1 low EEO, Pronadisa) al 1,5 % en tampón TAE pH=8,0 con 0,5 µl/ml de bromuro de etidio (Fluka). Los amplicones obtenidos se mezclaron con tampón de carga y 16 µl de esta mezcla fueron sometidos a electroforesis a 100 v durante 1 hora. Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz UV conectado a una cámara fotográfica digital.

Preparación de la vacunas

Las vacunas se obtuvieron a partir de un stock de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* congelado a -80 °C. Para su descongelación, los viales se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente y las bacterias se sembraron en placas de Petri con medio Agar de Soja Triptona (TSA, Cultimed), suplementado con los antibióticos Ampicilina (Amp, Sigma) y Kanamicina (Ka, Sigma) a una concentración de 200 y 50 µg/ml respectivamente. Las colonias fueron subcultivadas un máximo de 2 veces en TSA + Amp + Ka durante un periodo máximo de 2 semanas.

Para obtener un número suficiente de bacterias para preparar las vacunas, se inoculó una colonia aislada de la cepa *aroA*, procedente de placas de TSA, en 100 ml de medio Caldo de Soja Triptona (TSB, Cultimed) y se incubó a 25 °C en agitación a 140 rpm durante 12 horas, hasta alcanzar una $OD_{600}=0,8$. A partir de este cultivo, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con PBS, resuspendiéndolas a continuación en ese mismo tampón a una concentración de 10^9 CFUs/ml. A continuación, se tomaron 100 µl de dicha suspensión y se inocularon en matraces que contenían 200 ml de TSB, que se incubaron a 25 °C en agitación a 140 rpm.

Puesto que, según resultados previos (Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a), la producción de anticuerpos específicos contra *A. hydrophila* tras la vacunación i.p. con la vacuna *aroA* viva es mayor cuando esta se prepara a partir de bacterias recogidas de cultivos en la fase estacionaria, previamente a la preparación de las vacunas, se determinó la curva de crecimiento de la cepa *aroA* en medio TSB a 25 °C y en agitación (140 rpm). Además, se estableció la relación entre la OD_{600} y el número de CFUs/ml para facilitar la preparación de las vacunas.

Para ello, se realizaron ensayos divididos en dos tramos, uno desde tiempo 0 hasta las 12 horas y otro desde las 12 a las 24 horas. En cada tramo se tomaron muestras (700 µl) de los matraces a intervalos regulares de tiempo (2 horas) y se determinó la OD_{600} en un espectrofotómetro GeneQuant (Amersham Pharmacia

Biotech), así como el número de CFUs/ml mediante recuento en placas de TSA, tras un periodo de incubación de 24 horas.

Los resultados de estos estudios metodológicos se muestran en la **Figura 9**.

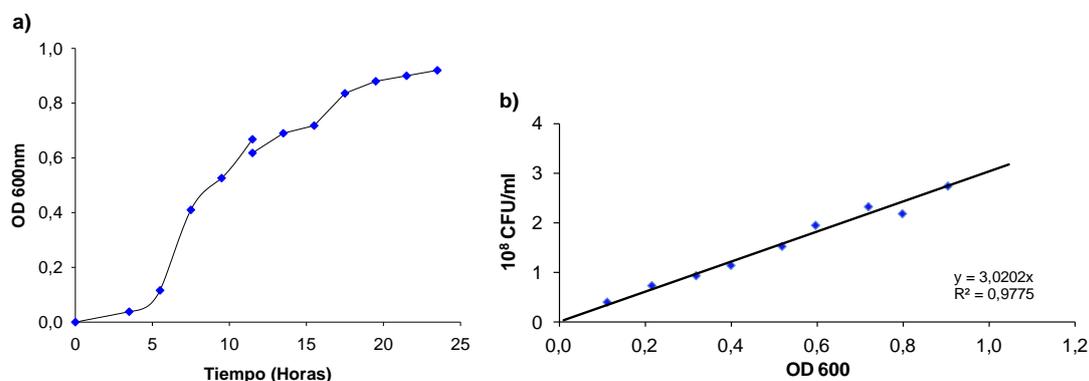


Figura 9. a) Crecimiento de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* en medio TSB a 25°C. **b)** Curva estándar de relación OD600 – CFUs/ml para la cepa *aroA*.

Vacuna *aroA* viva

Tras una incubación de 14-15 horas, en las condiciones anteriormente expuestas, se recogió el cultivo bacteriano y se lavó 3 veces en PBS mediante centrifugación (1600 g, 20 min, 4°C).

Las bacterias se resuspendieron en PBS para la vacunación de las truchas o en medio RPMI-1640 para los estudios de exposición de las líneas celulares, en los dos casos a una concentración de 10^8 CFUs/ml.

Ensayo de seguridad de la vacuna viva

Para confirmar la seguridad de la vacuna *aroA* viva se llevó a cabo un estudio de supervivencia de peces inoculados i.p. con dicha vacuna. Este ensayo se realizó en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, Escocia. Se utilizaron dos lotes de peces, uno utilizado como control (n=10) y otro como grupo experimental (n=10). A los peces del grupo control se les inyectó i.p. 0,1 μ l de PBS mientras que los del grupo experimental fueron inyectados i.p. con 10^7 CFUs/pez en

0,1 µl de PBS. Los peces fueron controlados 3 veces al día durante 20 días para comprobar si existían signos de infección o mortalidad.

Vacuna aroA formalinizada

El protocolo seguido para la inactivación de la cepa por formalinización fue el siguiente:

1. Tras una incubación de 14-15 horas, en las condiciones anteriormente expuestas, se recogieron las bacterias mediante centrifugación a 1600 g, 20 min a 4° C.
2. Se lavó el pellet 3 veces con PBS por centrifugación y se resuspendió el pellet en un volumen aproximado del 1 % (1 ml de pellet en 99 ml de líquido) en una solución al 8 % de formol-PBS. Esta solución se mantuvo en incubación en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, a 4° C durante 48 horas.
3. A continuación se lavó con PBS tres veces por centrifugación a 4 °C, con un volumen 10 veces superior al del pellet.
4. Finalmente, las bacterias formalinizadas se resuspendieron en 10 volúmenes de PBS, se añadió 0,025 % de acida sódica, y se almacenaron a 4 °C.

Para comprobar la inactivación de las bacterias por la formalinización, se sembraron alícuotas de 100 µl de las bacterias formalinizadas en placas de TSA y se incubaron a 25°C, comprobando que no existía crecimiento bacteriano.

Estudio comparado de la eficacia de la vacunas

Se realizó un estudio de la eficacia de la vacuna aroA viva respecto a la formalinizada, en un ensayo de vacunación-desafío, utilizando como patógeno para el desafío la cepa IOA de *A. hydrophila* (aislada en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling). Este ensayo se realizó en el Instituto de Acuicultura de la

Universidad de Stirling, Escocia. Se utilizaron un total 180 truchas divididas en nueve lotes de 20 peces cada uno, tres fueron utilizados como control, otros tres para la vacunación con la vacuna *aroA* viva y otros tres para la vacunación con la vacuna *aroA* formalinizada. A los peces del grupo control se les inyectó i.p. 0,1 µl de PBS mientras que los de los grupos experimentales fueron inyectados i.p. con 10⁷ CFUs/pez en 0,1 µl de PBS, bien vivas o formalinizadas. Los peces fueron controlados 3 veces al día durante 20 días para comprobar si existían signos de infección o mortalidad. Pasados 30 días se procedió con el desafío de los animales vacunados mediante la inyección i.p. de 5x10⁶ CFUs/pez de la cepa IOA de *A. hydrophila* en PBS estéril. Los peces fueron controlados 3 veces al día durante 20 días para comprobar si existían signos de infección o mortalidad. El Porcentaje de Supervivencia Relativa (RPS) se calculo según la siguiente fórmula:

$$\text{RPS} = 100 \times \frac{\% \text{ de mortalidad en peces vacunados}}{\% \text{ de mortalidad en peces control}}$$

Estudio de la resistencia de *A. hydrophila* a gentamicina en medio TCMD

Aunque previamente se había determinado que la cepa *aroA* de *A. hydrophila* es sensible a la gentamicina (Vivas, 2003) cuando crece en medio de cultivo bacteriano (TSA), para los estudios de exposición de los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 a la vacuna *aroA* viva, se estudió su resistencia a ese antibiótico en el medio de cultivo de las líneas celulares TCMD. El propósito de este estudio era determinar si la concentración de la gentamicina en este medio es suficiente para evitar la proliferación de las bacterias que pudieran permanecer en el sobrenadante de los cultivos celulares, una vez pasado el tiempo inicial de exposición.

Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

1. En una placa de 96 pocillos, se sembraron 5×10^7 CFUs/ml de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* en 100 μ l de medio TCMD por pocillo en la siguiente configuración experimental (n=8):
 - Control negativo: medio TCMD con 50 μ g/ml de gentamicina
 - TCMD con 50 μ g/ml de gentamicina + bacterias
 - TCMD con 100 μ g/ml de gentamicina + bacterias
 - Control positivo: bacterias en TSB
2. La placa se incubó durante 24 horas a 25° C.
3. Se recogieron los 100 μ l de cada pocillo y se sembraron en placas de TSA + Amp + Ka.

ENSAYOS DE VACUNACIÓN INTRAPERITONEAL

Para los ensayos de vacunación de truchas utilizando los dos tipos de vacunas *aroA*, las truchas fueron divididas en tres grupos de 30 animales cada uno, que se sometieron a los tratamientos que se indican a continuación:

- Vacunación i.p. con la vacuna viva.
- Vacunación i.p. con la vacuna formalinizada
- Administración i.p. de PBS estéril (grupo control).

Las truchas de los grupos vacunados recibieron una dosis de 10^7 CFUs/pez, en 0,1 ml de PBS, de la vacuna correspondiente. Los peces del grupo control fueron inyectados con 0,1 ml de PBS estéril. En el caso de la vacuna viva, Vivas (Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a) demostró que esa dosis es suficiente para inducir un protección elevada frente a cepas virulentas de *A. hydrophila*, con un porcentaje de supervivencia relativa superior al 60%.

El proceso de vacunación se llevo a cabo por inyección intraperitoneal, utilizando una jeringa repetidora SOCOREX (Mod.187) de 1 ml de capacidad, provista de agujas estériles de calibre 25G, desechables. Antes de cada uso la jeringa repetidora se esterilizó en autoclave y la aguja se cambió tras inyectar un máximo de 10 individuos.

Todas las experiencias de vacunación se llevaron a cabo en las instalaciones del acuario de Patología Infecciosa de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, en las condiciones de estabulación, suministro y eliminación de agua, alimentación, manejo y anestesia indicadas anteriormente. Tras la vacunación, los animales se mantuvieron en los tanques del acuario controlando la aparición de individuos enfermos o que mostrasen lesiones cutáneas o un comportamiento alterado.

A las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posinyección se recogieron cuatro truchas de cada uno de los grupos de peces vacunados y tres del grupo control, que fueron sacrificadas por sobrianestesia en MS-222. De cada uno de ellos se tomaron muestras de bazo y pronefros, que fueron pesadas, congeladas inmediatamente mediante inmersión en nitrógeno líquido y, posteriormente, almacenadas a -80 °C hasta el momento de su procesado.

ENSAYOS DE EXPOSICIÓN *IN VITRO*

Para los ensayos de exposición *in vitro* de las líneas celulares TSS y TPS-2 a las vacunas aroA, se consideraron también los grupos de tratamiento formados por cultivos celulares expuestos a la vacuna viva o la vacuna formalinizada, así como cultivos control no expuestos a las vacunas.

El protocolo seguido para la exposición de los cultivos de las líneas celulares a las vacunas fue el siguiente:

1. Se sembraron 8×10^5 células/frasco en frascos de cultivo de 25 cm² (Costar) 48 horas antes de la realización del ensayo, para permitir que las células se adhiriesen bien a la superficie.
2. A continuación, se retiró el medio, se lavó el cultivo con PBS y se añadieron 5 ml de RPMI-1640 sin rojo fenol conteniendo las bacterias, bien vivas o bien formalinizadas, en una proporción de 50 bacterias por célula sembrada. En el caso de los controles sólo se añadió RPMI-1640 sin rojo fenol.
3. Inmediatamente después, se centrifugaron los frascos a 300 g durante 5 min, para que las bacterias contactasen con las células, y se incubaron los frascos durante 1 hora a 18 °C.
4. Cumplido ese tiempo, se retiró el sobrenadante con las bacterias y los frascos se lavaron 3 veces con RPMI-1640 sin rojo fenol + gentamicina para eliminar las bacterias no endocitadas o fuertemente adheridas.
5. A continuación se añadió medio TCMD y se prosiguió la incubación de los cultivos a 18 °C en atmósfera de aire.

A las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición se utilizaron cuatro frascos de cada uno de los tratamientos con las vacunas *aroA* y cuatro de los controles para la extracción del RNA, como se indica posteriormente, que fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

ENSAYOS DE EXPLOSIÓN RESPIRATORIA

Como un indicador del efecto de la exposición de las líneas celulares TSS y TPS-2 a las vacunas *aroA* se utilizó un bioensayo para medir la activación de la explosión respiratoria, puesto que ambas presentan este tipo de respuesta inmunitaria innata cuando son estimuladas por PAMPs (Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012).

Para ello se midió la producción de O_2^- utilizando el método de la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT), que detecta la presencia intracelular de O_2^- (Rook *et al.*, 1985). La especificidad del método se demostró utilizando la enzima superóxido dismutasa (SOD) exógena, que convierte el O_2^- en H_2O_2 .

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Costar) a una densidad de 2×10^4 células/pocillo para la línea TSS y de 3×10^4 células/pocillo para la línea TPS-2 en medio TCMD. Las placas se incubaron a 18 °C y 24 horas antes del ensayo se lavaron con RPM-1640 para eliminar las células no adheridas y se añadió medio de estimulación fresco conteniendo solo un 2 % de suero para evitar la estimulación debida al suero.

El protocolo seguido para la realización del ensayo fue el siguiente:

1. Se lavó la placa con solución salina Hanks (HBSS 10X).
2. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 μ l de RPMI-1640 sin rojo fenol que contenían 1 mg/ml de NBT y el correspondiente preparado vacunal (vacuna formalinizada o viva) en una proporción de 50 bacterias por célula, utilizando 8 pocillos para cada preparado. A los pocillos utilizados como control se les añadió únicamente el medio de incubación. Como blanco para las medidas espectrofotométricas se dispuso una columna más con los pocillos sin células a los que se añadió medio sin bacterias.
3. Se incubó la placa durante 1 hora a 18 °C.
4. Tras el periodo de incubación se retiró la solución de los pocillos y se fijó con metanol (Merk) durante 15 min.
5. Se hizo un lavado con metanol al 70% y se dejó secar al aire.
6. Una vez seco se añadieron 120 μ l de KOH (Panreac) 2 M y 140 μ l de DMSO (Sigma) a cada pocillo para disolver los depósitos de formazán reducido en las células.

7. Finalmente se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-Tek) a 620 nm de longitud de onda frente al blanco con KOH/DMSO.

Los resultados se expresaron como “índice de estimulación” frente a los controles, calculados siguiendo la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Índice de estimulación} = \frac{\bar{X} \text{ experimental} - \bar{X} \text{ blanco}}{\bar{X} \text{ control} - \bar{X} \text{ blanco}} - 1$$

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INMUNORREGULADORES

El análisis de la expresión de genes inmunorreguladores, relacionados con las respuestas inmunitarias innata y específica tempranas que se indican en la **Tabla 9**, se realizó mediante la determinación del número de transcritos de los mismos utilizando el método de la retrotranscripción (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizaron dos métodos de RT-PCR:

- a. RT seguida de PCR semicuantitativa, que comprendió la visualización del resultado de la PCR en geles de agarosa con bromuro de etidio y cuantificación por densidad óptica (Sambrook *et al.*, 2001). Este método se utilizó inicialmente para poner a punto los métodos de amplificación y confirmar la detección de la expresión de los genes, así como que si su expresión variaba en respuesta a las condiciones experimentales.

Gen	Cebador	Secuencia	Tamaño amplicón	Referencia
β-actina	Actin F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	543 pb	(Bridle <i>et al.</i> , 2006)
	Actin R	CTCCTTAATGTCACGCACGATTT C		
β-actina*	β-actin F	ATGGAAGGTGAAATCGCC	260 pb	(Lindenstrøm <i>et al.</i> , 2004)
	β-actin R	TGCCAGATCTTCTCCATG		
IL1-β1	IL-1 F10	GGATTCACAAGAACTAAGGAC	399 pb	(Brubacher <i>et al.</i> , 2000)
	IL-1 R5	ACTGTGATGTACTGCTGAAC		
IL-8	IL-8 F3	GAATGTCAGCCAGCCTTGTC	226 pb	(Laing <i>et al.</i> , 2002)
	IL-8 R3	TCCAGACAAATCTCCTGACCG		
TNF-α1	TNFα1 F	AGCATGGAAGACCGTCAACGAT	131 pb	(Purcell <i>et al.</i> , 2004)
	TNFα1 R	ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT		
TGF-β1	TGF-β F5	GAAGAAACGACAAACCACTAC	365 pb	(Bridle <i>et al.</i> , 2006)
	TGF-β R8	GACATGTGCAGTAATTCTAGC		
TGF-β*	TGF-β F	GGAAGAAACGACAAACCACTAC TGA	70 pb	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
	TGF-β R	GTTTTTCGCACACAGCAACTCT		
Mx-1	Mx-1	ATGAATAATACGCTCAACCAAC ATTA	1852 pb	(Fierro-Castro, 2009)
	Mx-1	CTAGAACTCAACTAGGTAGC		
Mx-1*	Mx-1	GGTTGTGCCATGCAACGTT	102 pb	(Purcell <i>et al.</i> , 2004)
	Mx-1	GGCTTGGTCAGGATGCCTAAT		
COX-2	COX-2 F6	ATCCTTACTCACTACAAAGG	386 pb	(Zou <i>et al.</i> , 1999b)
	COX-2 R3	GCTGGTCCTTTCATGAAGTCTG		
iNOS	iNOS F4	CATACGCCCCCAACAAACCAAGT GC	746 pb	(Lindenstrøm <i>et al.</i> , 2004)
	iNOS R5	CCTCGCCTTCTCATCTCCAGTGT C		
iNOS*	iNOS F	CCAACCATGCACATCAAAAGTT	98 pb	(Fierro-Castro, 2009)
	iNOS R	CCTGAGGTAGGATTTCAAGAGT AGAAA		
MHC-IIβ	OMNY F	ATGTCGATGCCAATTGCCTTCTA	336 pb	(Glamann, 1995)
	OMNY R	TGTCTTGTCCAGTATGGCGCT		
MHC-IIβ*	OMNY F	GTCGATGCCAATTGCCTTCTA	84 pb	(Fierro-Castro, 2009)
	OMNY R	ACCGATGTTCAAAATATCCATCT GT		

Tabla 9. Secuencia de oligonucleótidos utilizados como cebadores para la detección por RT-PCR semicuantitativa y por qPCR de la expresión de genes. Estas secuencias fueron diseñadas o tomadas a partir de las secuencias y datos indicados en las referencias bibliográficas que se muestran y sintetizados por Invitrogen. *Cebadores específicos para qPCR.

- b. RT seguida de PCR cuantitativa (qPCR o PCR a tiempo real), una técnica altamente sensible que permite la cuantificación de transcritos raros y de pequeños cambios en la expresión de genes (Pfaffl, 2001). Este método se utilizó para evaluar los cambios en la expresión de los genes a lo largo del tiempo posvacunación en los peces o posexposición en las líneas celulares.

En ambos casos, el gen utilizado como referencia para la normalización de los datos de expresión de un gen dado fue el de la β -actina, que se expresa de modo constitutivo en los tejidos y células analizados.

A continuación se describen los métodos utilizados en cada caso.

Extracción de RNA

En las muestras de pronefros y de bazo y en las células cultivadas se llevó a cabo la extracción del RNA total, para lo cual se utilizó el reactivo TRIZOL® Reagent (Invitrogen) siguiendo las directrices del fabricante. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Homogenización del tejido o células:
 - a. Tejidos: se tomaron un mínimo de 30 mg de tejido y se sumergieron en 1 ml de Trizol en un tubo Eppendorf de 2 ml, homogeneizando a continuación el tejido mediante el uso de un Politrón (T10 Basic Homogenizer Workcentre, IKA®). Este homogeneizado se incubó durante 5 min a temperatura ambiente antes de seguir el procesado.
 - b. Células: se eliminó el medio de cultivo de los frascos y se añadió 1 ml de Trizol a cada uno. Inmediatamente después, se recogió el Trizol conteniendo el disgregado celular y se pasó a un tubo Eppendorf de 2 ml, que se incubó durante 5 min a temperatura ambiente antes de seguir el procesado.

2. A cada tubo conteniendo el homogenizado se añadieron 200 μ l de cloroformo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron a 12000 g, 15 min a 4 °C.
3. Se recogió la fase acuosa, donde se encuentra el RNA, y se pasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadió la misma cantidad de isopropanol (Sigma) frío. Se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4 °C.
4. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el “pellet” con etanol al 75 % en agua DPEC centrifugando a 7600 g, 5 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar el pellet al aire y se resuspendió en 30 μ l de agua libre de RNasas (Sigma).

El RNA obtenido se cuantificó utilizando un equipo NanoDrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies) considerándose como aceptables aquellas muestras que presentaban unos ratios 260/280 entre 1,5-2.

Además se determinó la integridad del RNA obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, como se describe más adelante. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la **Figura 10**.

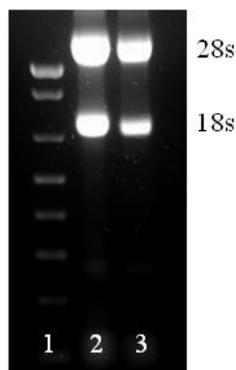


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA obtenidas del pronefros de truchas control (carriles 2 y 3). En el carril 1 se cargó un marcador de peso molecular (1Kb).

Retrotranscripción

Para poder llevar a cabo los análisis de expresión génica mediante PCR se realizó una retrotranscripción de los RNAs obtenidos previamente, obteniéndose el cDNA que sirvió como molde de la reacción. Para ello se utilizó la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) y como cebadores oligo-dT (Invitrogen). El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Desnaturalización del RNA, añadiendo a un tubo libre de RNasas los siguientes reactivos
 - a. RNA molde: 5 μ g
 - b. 1 μ l de oligo-dT (Invitrogen)
 - c. 1 μ l de dNTPs Mix (Invitrogen)
 - d. Agua libre de RNasas (Sigma) suficiente para ajustar el volumen de la reacción hasta 12 μ l.

La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5 min y continuación se puso el tubo en hielo durante al menos 1 min para evitar que el RNA se replegase.

2. Síntesis del cDNA, añadiendo a la mezcla anterior:
 - a. 4 μ l de buffer de reacción 5X de la retrotranscriptasa (Invitrogen)
 - b. 2 μ l de DTT (dithiothreitol, Invitrogen)
 - c. 1 μ l de RNasaOUT (Invitrogen)
 - d. 1 μ l de M-MLV RT (Invitrogen)

La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora y a continuación se mantuvo a 72°C durante 15 min para parar la reacción.

Las muestras de cDNA se diluyeron 10 veces y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

PCR semicuantitativa

Las reacciones de PCR semicuantitativa se llevaron a cabo en un termociclador Mini Cycler™ (MJ Research), empleando un kit con Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y siguiendo un protocolo general de PCR que comprendía la mezcla de reacción indicada en la **Tabla 10**, con un volumen final de 25 µl, en tubos Eppendorf de 0,6 ml, y siguiendo las condiciones de amplificación indicadas en la **Tabla 11**.

<i>Solución stock</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen</i>
Tampón 10X Taq polimerasa		2,5 µl
Cebador 5'	10 µM	1,25 µl
Cebador 3'	10 µM	1,25 µl
Mezcla de dNTPs	10 µM	0,75 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	0,15 µl
MgCl ₂	50 mM	1 µl
cDNA		1,1 µl
Agua estéril		Hasta 25 µl

Tabla 10. Formulación general de la mezcla de reacción para la PCR semicuantitativa.

PROTOCOLO PCR SEMICUANTITATIVA				
Gen	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	Nº de ciclos
β-actina	94°C/5min	-	-	1
	94°C/1min	55°C/1min	72°C/1min	30
	-	-	72°C/8min	1
IL-1β1	94°C/5min	-	-	1
	94°C/4s	59°C/45s	72°C/1min	35
	-	-	72°C/7min	1
IL-8	94°C/3min	-	-	1
	94°C/45s	59°C/45s	72°C/45s	35
	-	-	72°C/5min	1
TNF-α1	94°C/4min	-	-	1
	94°C/4 s	58°C/45s	72°C/45s	30
	-	-	72°C/7min	1
TGF-β1	94°C/5min	-	-	1
	94°C/45s	58°C/45s	72°C/1min	35
	-	-	72°C/8min	1
Mx-1	94°C/1min	-	-	1
	94°C/30s	50°C/30s	72°C/1min	35
	-	-	72°C/10min	1
COX-2	94°C/5min	-	-	1
	94°C/45s	60°C/45s	72°C/45s	38
	-	-	72°C/10min	1
iNOS	94°C/4min	-	-	1
	94°C/1min	62°C/1min	72°C/2min	35
	-	-	72°C/5min	1
MHC-IIβ	94°C/5min	-	-	1
	94°C/1min	54°C/1min	72°C/2min	30
	-	-	72°C/5min	1

Tabla 11. Condiciones de amplificación para la PCR semicuantitativa de los genes indicados en la tabla.

En todos los casos se utilizaron controles negativos, a los que no se añadía cDNA, y un control del origen del DNA molde consistente en muestras de RNA procesadas para RT-PCR en paralelo con las otras muestras, pero a las que no se había añadido la retrotranscriptasa (controles RT-), para observar si había contaminación por DNA genómico.

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos obtenidos de las PCRs se visualizaron en geles de agarosa de baja electroendosmosis (Agarose D-1 low EEO Pronadisa) al 1,5 % en tampón TAE pH 8,0 (**Tabla 12**) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Fluka). En los geles se cargaron las muestras de los amplicones obtenidos de cada gen a estudiar en las diversas condiciones experimentales, junto con los amplicones del gen de la β-actina correspondientes, a fin de evitar variaciones inter-geles en la semicuantificación por densitometría.

Los geles se cargaron con 12 µl de la PCR del gen objeto de estudio junto con 6 µl de la amplificación de β-actina. A las muestras a cargar en el gel se les añadió tampón de carga, 2 µl por pocillo del gel, para dar densidad a las muestras y visualizarlas en el mismo. En cada gel se incluyeron marcadores de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen) en el rango de 100 pb a 12 Kb.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE mediante la aplicación de un diferencial de potencial de entre 1 y 5 V/cm y se detuvo cuando el frente de avance, marcado por el azul de bromofenol, se aproximó a final del gel.

<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>
TAE 50X	57 ml de ácido acético glacial 100 ml de EDTA 0,5 pH8 242 g de Tris base Agua destilada hasta 1litro
Tampón de carga	12,5 mg de azul de bromofenol (0,025%) 25 ml de glicerol Agua destilada hasta 50 ml

Tabla 12. Composición de los tampones utilizados para la electroforesis en geles de agarosa.

Análisis densitométrico

Para el análisis densitométrico, los geles se fotografiaron usando el sistema Uvitec (Witel LTD), que consta de un transiluminador con luz UV, cámara fotográfica digital y analizador de imagen. La intensidad de las bandas fue analizada usando el programa Quantity One (BioRad). La estimación de los niveles de expresión de los genes de interés fue expresada como la expresión relativa respecto a la del gen de la β -actina usando la siguiente fórmula (Sigh *et al.*, 2004a):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(\text{densidad del gen de interés} - \text{densidad del fondo})}{(\text{densidad del gen de } \beta\text{-actina} - \text{densidad del fondo})}$$

PCR cuantitativa

Los análisis de expresión se llevaron a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando como marcador fluorescente SYBR Green (Brilliant Sybr Green QPCR Master Mix, Strategene) siguiendo el protocolo del fabricante y según se indica en la **Tabla 13**. Los experimentos se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León.

<i>Solución stock</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Volumen</i>
2X Master Mix Sybr Green	2X	12,5 μ l
Cebador 5'	10 μ M	0,5 μ l
Cebador 3'	10 μ M	0,5 μ l
Reference dye	(1:50)	0,375 μ l
cDNA	(1:10)	2 μ l
Agua estéril		Hasta 25 μ l

Tabla 13. Formulación general de la mezcla de reacción para la qPCR.

Las condiciones de la PCR se indican en la **Tabla 14**.

<i>Ciclo</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
Desnaturalización inicial	10 min	95°C
Amplificación 45 ciclos	Desnaturalización	15 s
	Anillamiento	30 s
	Extensión	30 s
Curva de disociación		

Tabla 14. Condiciones de amplificación de la qPCR.

Para determinar los niveles de expresión relativa de los genes estudiados con respecto a la β -actina se empleó el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{target}} (\text{control-experimental})}}{(E_{\beta\text{actina}})^{\Delta\text{Ct}_{\beta\text{actina}} (\text{control-experimental})}}$$

Donde Ct es el ciclo umbral en el cual la intensidad de fluorescencia de nuestro gen es mayor que la fluorescencia del background. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde, de modo que cuanto mayor sea nuestra cantidad de cDNA inicial antes se dará un incremento significativo de la fluorescencia de modo que obtendremos un valor de Ct menor. ΔCt es igual al valor de Ct obtenido en la muestra control menos el valor de Ct de la muestra experimental.

La eficiencia de amplificación (E) para cada cebador fue determinada usando diluciones seriadas (1, 10, 100, 1000) siendo la dilución madre una mezcla de todos los cDNAs obtenidos de las muestras control y de las muestras experimentales. La eficiencia fue calculada como $E=10^{(-1/m)}$ donde m es la pendiente de la recta que se genera al representar el logaritmo de las concentraciones de los cDNAs diluidos frente a los Ct obtenidos para estos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis de los resultados del estudio de vacunación-desafío se realizó mediante un test ANOVA, seguido de un test de Fisher, considerando la existencia de diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$.

En el estudio de la expresión cuantitativa por qPCR de los genes así como en los ensayos de explosión respiratoria, para comprobar si existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos empleados se utilizó un test de ANOVA seguido de un análisis posthoc de Tukey, considerándose que existían diferencias significativas para valores $p < 0,05$ y altamente significativas para valores de $p < 0,01$.

En ambos casos se utilizó el programa estadístico SPSS 10.0.

———— **Resultados** ————

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SEGURIDAD DE LA VACUNA

Como ensayos previos a la realización de las vacunaciones de trucha arcoíris y de las exposiciones de las líneas celulares TSS y TPS-2 a las vacunas *aroA* se realizaron diferentes comprobaciones relacionadas con la identificación bacteriana de la cepa *aroA* de *Aeromonas hydrophila* así como de su seguridad a la hora de ser utilizada como vacuna viva.

Confirmación de la identidad de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*

La identificación de la cepa *aroA* se realizó tanto fenotípica y bioquímicamente como molecularmente. Los resultados de la identificación fenotípica se muestran en la **Tabla 15**. La correcta identificación de las especies de *Aeromonas* es complicada mediante el uso de tests como el API 20E y en nuestro caso este test sólo nos permitió identificar nuestra cepa como una aeromonas móvil, pero la identificación a nivel de especie no es concluyente. Por ello llevamos a cabo una identificación molecular mediante un análisis de PCR semicuantitativa para detectar la presencia del gen *aroA* de *A. hydrophila*.

Características fenotípicas	<i>aroA</i>
Tinción de Gram	Negativa
Motilidad	+
Oxidasa	+
Test O-F	Fermentativo

Tabla 15. Características fenotípicas de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*.

En la **Figura 11** se ve claramente la diferencia de tamaño del amplicón del gen *aroA* entre la cepa AG2, donde el gen tiene un tamaño de 1238 pb, y la cepa *aroA*, cuyo gen presenta un tamaño mayor (2638 pb) debido a la inserción del casete de resistencia a kanamicina.

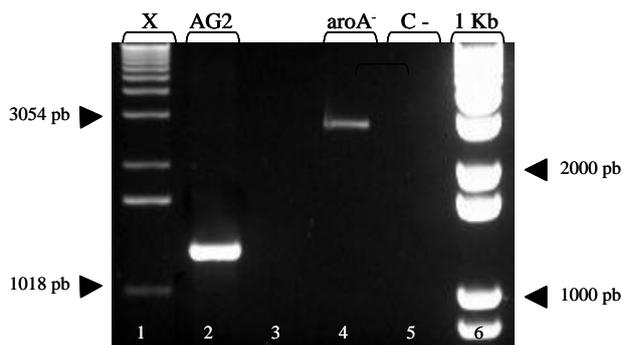


Figura 11. Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen *aroA* de distintas cepas de *A. hydrophila*. Los carriles 1 y 6 corresponden a dos marcadores de peso molecular: X (0,07 – 12,2 kpb) y 1 Kb (0,1 – 12 kpb). En el carril 2 muestra de DNA de la cepa AG2 (1238 pb) y el carril 4 muestra de DNA de la cepa *aroA*⁻ (2638 pb). Carril 5 control negativo.

Ensayo de la seguridad y eficacia de la vacuna

Para corroborar la seguridad de la vacuna *aroA* viva descrita por Vivas (Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a) se realizó un test de seguridad de la vacuna que reportó unos datos de supervivencia de los animales vacunados del 100%. Así mismo, durante los ensayos de vacunación ningún animal presentó signos de enfermedad.

Además, se realizó un estudio de la eficacia de la vacuna *aroA* viva respecto a la formalinizada, en un ensayo de vacunación-desafío, utilizando como patógeno para el desafío la cepa IOA de *A. hydrophila* (aislada en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling) (**Figura 12**). Aunque durante este ensayo se presentó un problema de mortalidad no esperada en todos los peces, los resultados obtenidos indicaron la existencia de una protección significativamente mayor ($p=0,036$) de la vacuna *aroA* viva frente a la formalinizada. En las condiciones ensayadas, el porcentaje de supervivencia relativa (RPS) fue del 36% para la vacuna *aroA* viva y del 4% para la vacuna formalinizada.

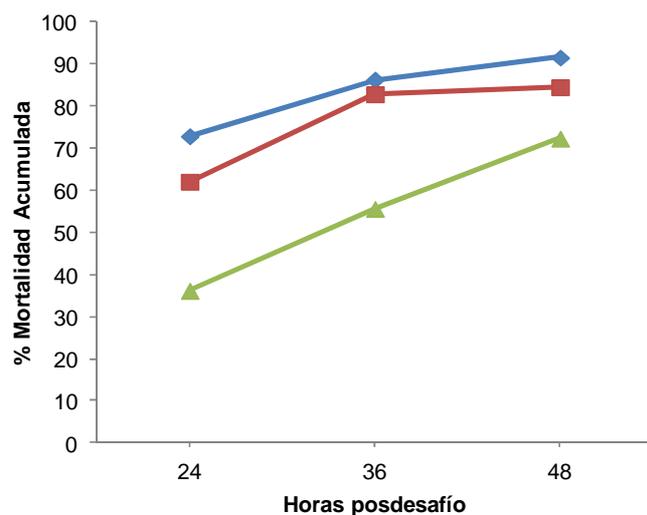


Figura 12. Mortalidades en truchas control (◆) y vacunadas con 10^7 CFUs/pez de la vacuna aroA formalinizada (■) y viva (▲) y desafiadas i.p. con 5×10^7 CFUs/pez de la cepa IOA de *A. hydrophila* un mes después de la vacunación.

ENSAYOS *IN VIVO*

Expresión de genes inmunorreguladores tras la vacunación: análisis semicuantitativo

Antes de proceder con los ensayos de expresión utilizando la técnica de qPCR se llevaron a cabo ensayos de PCR semicuantitativa con el fin de comprobar que existía expresión de los genes de estudio en los tejidos y células analizados, así como para comprobar que se daban diferencias en expresión como consecuencia del uso de los distintos preparados vacunales.

A modo de ejemplo, en la **Figura 13** se muestran imágenes de algunos geles de agarosa obtenidos para cada uno de los genes estudiados tras realizar PCR semicuantitativa de los mismos, acompañados siempre de la β -actina como gen de referencia.

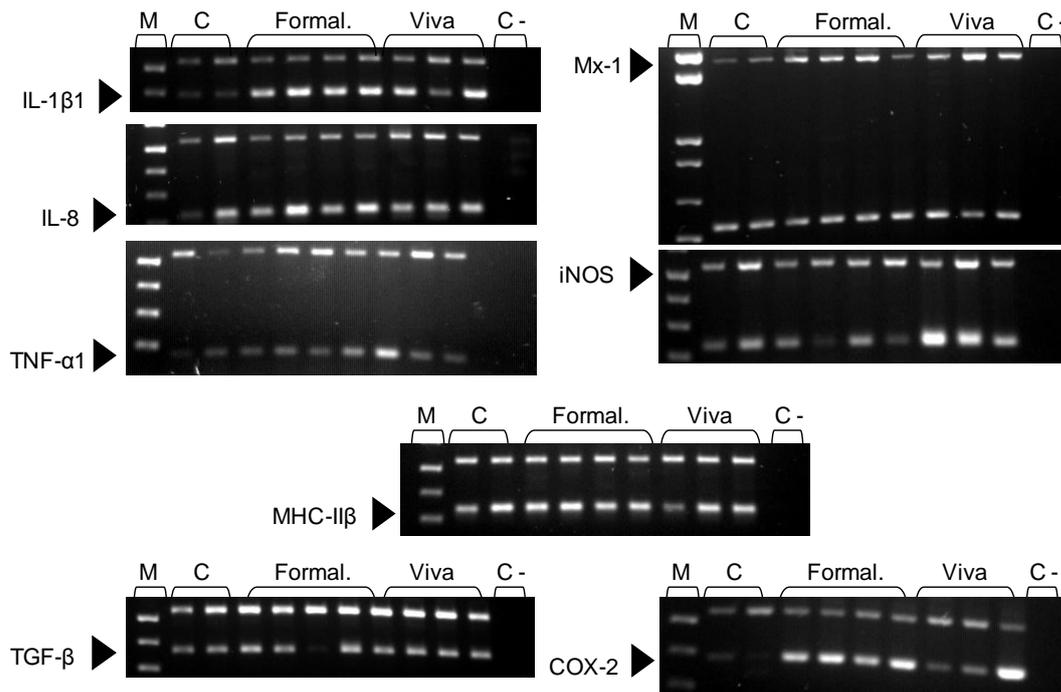


Figura 13. Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR de los genes *IL-1β1*, *IL-8*, *TNF-α1*, *Mx-1*, *iNOS*, *MHC-IIβ*, *TGF-β* y *COX-2*, utilizando como gen de referencia la *β-actina* (543pb). M: marcador de peso molecular de 1 Kb (0,1 – 12 kpb); C: controles; Formal.: vacuna formalinizada; Viva: vacuna viva; C-: control negativo.

Expresión de genes inmunorreguladores tras la vacunación: análisis cuantitativo

Se describen a continuación los resultados obtenidos para los estudios de expresión de los genes de citoquinas (*IL-1β1*, *IL-8*, *TNF-α1*, *TGF-β*, *Mx-1*), de las enzimas *COX-2* e *iNOS* así como del *MHC-IIβ* en el bazo y pronefros de truchas vacunadas con los preparados vacunales de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*, a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas tras la vacunación.

En primer lugar, como referencia del valor de la expresión de dichos genes en los animales no vacunados (control) usados en los experimentos, la **Figura 14** muestra los resultados de los ensayos de qPCR en las muestras de bazo y pronefros de dichos animales, expresados como valores de ciclo umbral (Ct). Se observó expresión basal de todos los genes estudiados en los peces control.

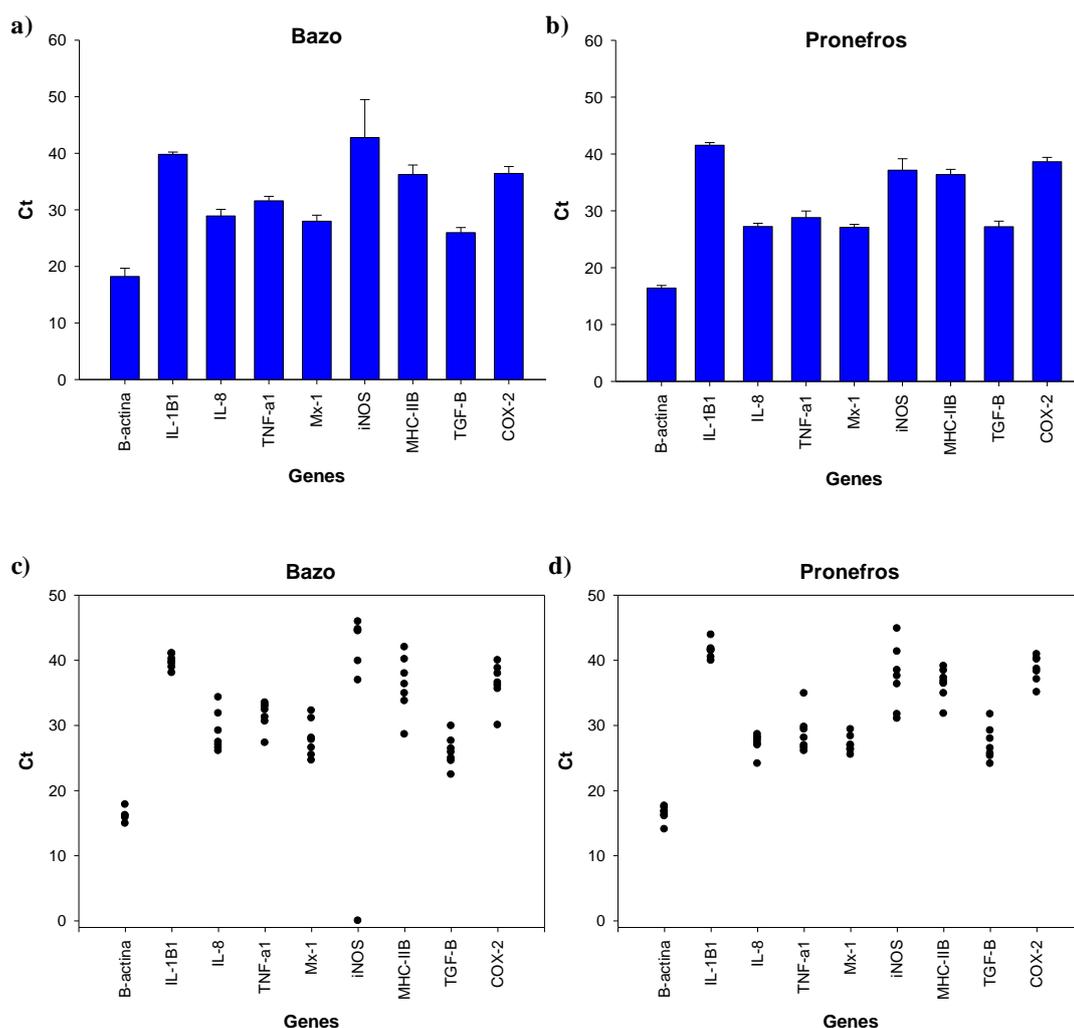


Figura 14. Expresión de los genes considerados en el estudio, incluyendo el gen normalizador β -actina, en el bazo (a,c) y pronefros (b,d) de los animales no vacunados (control). Se representa la media de los valores de Ct, calculada a partir de los datos de todos los animales (n= 21) más el error estándar, obtenidos en los ensayos de qPCR (a,b) y la dispersión de los datos (c,d).

Los resultados de los ensayos comparativos entre animales vacunados y no vacunados se muestran como las medias de las ratios de la expresión del gen objeto de estudio, normalizadas respecto al gen de la β -actina aplicando la fórmula de Pfaffl (ver apartado “PCR cuantitativa”, pág. 93), en la que las muestras de animales vacunados proporcionan los datos experimentales y las muestras de los no vacunados los datos control. De esta forma, en las gráficas la media de la ratio de expresión de un gen dado en los animales no vacunados tiene un valor igual a uno.

Expresión del gen *IL-1 β*

Tras la vacunación, tanto con la vacuna viva como con la formalinizada, se observaron cambios en la expresión del gen de *IL-1 β* en el bazo y en el pronefros de los animales vacunados, que siguieron patrones de variación a lo largo del tiempo semejantes para ambos tratamientos, con un valor máximo de ratio de aproximadamente 120.000 veces el control (**Figura 15**).

Bazo

En el caso del bazo (**Figura 15a**), tanto tras el tratamiento con la vacuna viva como con la formalinizada, las medias de las ratios de expresión de este gen frente a los controles eran muy bajas a las 4 horas posvacunación y se elevaron bruscamente a las 8 horas, cuando se alcanzaron los máximos valores para ambos tipos de tratamiento. Desde las 12 horas posvacunación hasta las 24 se produjo un notable descenso, seguida de una moderada recuperación a las 36 horas y posterior descenso hasta las 72 horas. En todos los casos, a excepción de las 4 horas posvacunación, y para ambos tratamientos, se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los correspondientes controles.

Comparando las respuestas a ambos tipos de vacunas, las diferencias principales se observaron entre las 8 y 24 horas posvacunación, tiempos en los que se obtuvieron valores más altos de expresión del gen en los animales vacunados con la vacuna viva (**Figura 15a**).

Pronefros

Para el pronefros (**Figura 15b**), las medias de las ratios de expresión del gen *IL-1 β* se elevaron más rápidamente, y alcanzaron valores superiores, que en el bazo. Así, a las 4 horas posvacunación se observó una expresión alta, especialmente tras el tratamiento con la vacuna viva. Los valores máximos de expresión también se alcanzaron a las 8 horas, especialmente para la vacuna viva (100.000 veces respecto al control). Para este órgano, en ambos tratamientos y a excepción de 4 horas

posvacunación para la vacuna formalinizada, se obtuvieron diferencias significativas respecto a los controles en todos los puntos estudiados.

En el pronefros, excepto a las 12 y 72 horas posvacunación, se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, con mayores diferencias a las 4 y 36 horas posvacunación, tiempos en los que la vacuna viva indujo una expresión mucho mayor del gen *IL-1 β* que la formalinizada (**Figura 15b**).

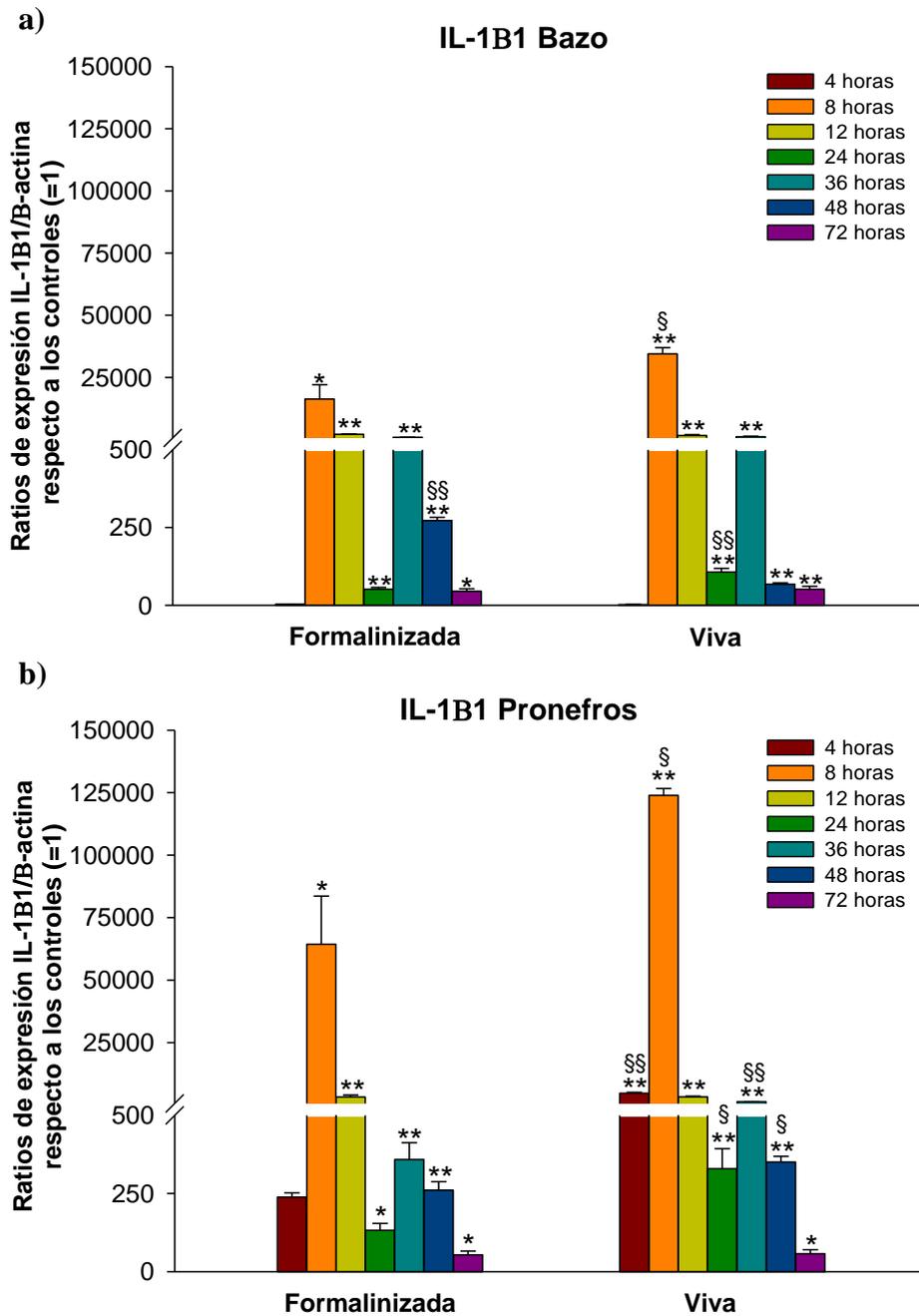


Figura 15. Expresión del gen *IL1-β1* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión IL1-β1/β-actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *IL-8*

Se observaron cambios en la expresión del gen *IL-8* en el bazo y en el pronefros de los animales vacunados, tanto con la vacuna viva como con la formalinizada, con patrones de variación a lo largo del tiempo semejantes para ambos tratamientos. El valor máximo alcanzado fue de aproximadamente 290 veces el control (**Figura 16**).

Bazo

En el bazo (**Figura 16a**), tanto tras el tratamiento con la vacuna viva como con la formalinizada, las medias de las ratios de expresión de este gen frente a los controles eran muy bajas a las 4 horas posvacunación y se elevaron bruscamente a las 8 horas, cuando se alcanzaron los máximos valores para ambos tipos de tratamiento, con diferencias significativas frente a los controles. A partir de las 12 horas posvacunación los valores sufrieron un notable descenso para ambos tratamientos, pero a las 72 horas aún existían diferencias significativas en la expresión respecto a los controles.

Para el bazo, las principales diferencias entre los dos tratamientos se observaron a las 8 horas, tiempo en el que la media de la expresión de *IL-8* en las muestras de bazo de peces vacunados con la vacuna viva alcanzó un valor 3 veces superior al de los que recibieron la vacuna formalinizada (**Figura 16a**). También se obtuvieron valores de expresión significativamente más altos para la vacuna viva a las 24, 36 y 72 horas posvacunación.

Pronefros

En el pronefros las medias de las ratios de expresión del gen *IL-8* alcanzaron también su máximo valor a las 8 horas posvacunación (130 veces con respecto al control), con un acusado descenso a tiempos posteriores (**Figura 16b**). Esta expresión fue significativamente más alta que en los controles para ambos tratamientos a las 8, 12, 24 y 48 horas posvacunación.

La comparación entre los dos tipos de tratamiento en las muestras del pronefros mostró que en los animales que recibieron la vacuna viva la expresión de IL-8 se iniciaba antes, ya a las 4 horas había diferencias significativas frente a la vacuna formalinizada, y a tiempos posteriores a las 8 horas se mantenía más elevada, especialmente a las 12-24 horas (**Figura 16b**).

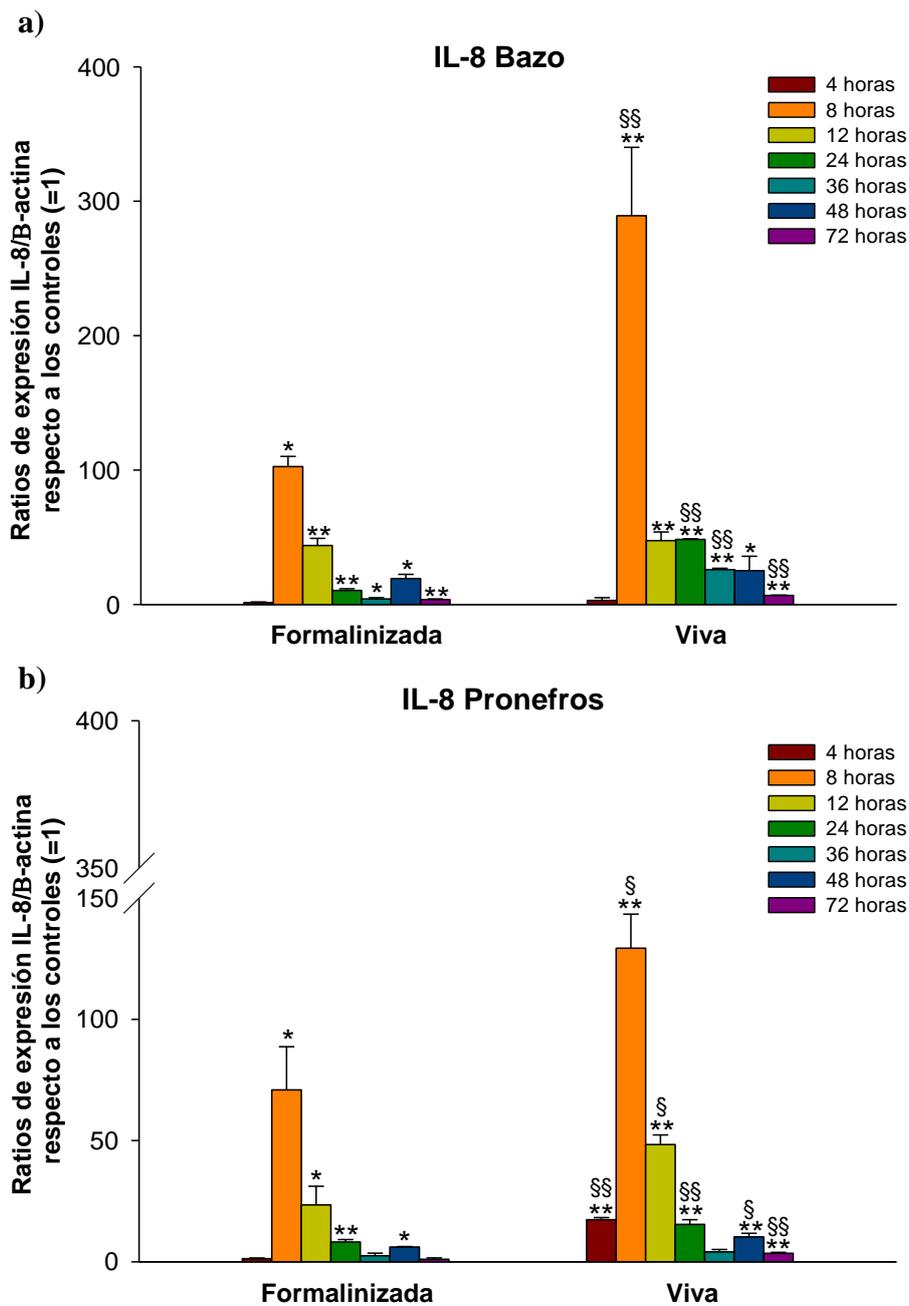


Figura 16. Expresión del gen *IL-8* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión IL-8/ β -actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$) y entre ambos tratamientos (§ = $p < 0,05$; §§ = $p < 0,01$).

Expresión del gen *TNF- α 1*

La expresión del gen *TNF- α 1* se vio aumentada en las muestras de bazo y de pronefros de los animales vacunados, pero con diferencias entre ambos órganos y entre los dos tipos de vacunas en el perfil de expresión a lo largo del tiempo, siendo el valor máximo alcanzado de aproximadamente 80 veces el control (**Figura 17**).

Bazo

En las muestras de bazo (**Figura 17a**), tanto tras el tratamiento con la vacuna viva como con la formalinizada, las medias de las ratios de expresión de este gen frente a los controles eran muy bajas a las 4 horas posvacunación y se fueron elevando hasta alcanzar los máximos valores a las 12 horas. A partir de las 24 horas posvacunación los valores de expresión sufrieron un notable descenso para ambos tratamientos, que en el caso de los animales vacunados con la vacuna viva se extendió, con diferencias significativas frente a los controles, hasta las 72 horas posvacunación.

Cuando se comparan ambos tratamientos, las principales diferencias entre ambos tratamientos se observaron a 8 y 12 horas posvacunación (Fig. 3a), pero en las muestras de truchas tratadas con la vacuna viva las medias de las ratios de expresión de *TNF- α 1* fueron significativamente más elevadas que en las de los animales tratados con la vacuna formalinizada en todos los tiempos, excepto a las 48 horas.

Pronefros

En el caso del pronefros (**Figura 17b**), los valores máximos de las ratio de expresión del gen *TNF- α 1* se obtuvieron a las 8 horas posvacunación para ambos tratamientos y se mantuvieron significativamente más elevados frente a los controles a las 8 y 12 horas para la vacuna formalinizada y a las 8, 12, 24 y 72 horas para la vacuna viva.

La expresión del gen *TNF- α* fue significativamente mayor a las 8, 12, 24 y 72 horas posvacunación en las muestras de pronefros de peces vacunados con la vacuna viva que en las procedentes del tratamiento con la formalinizada. Esta diferencia se prolongó en el tiempo, con repuntes de expresión a las 24 y 48 horas (**Figura 17b**).

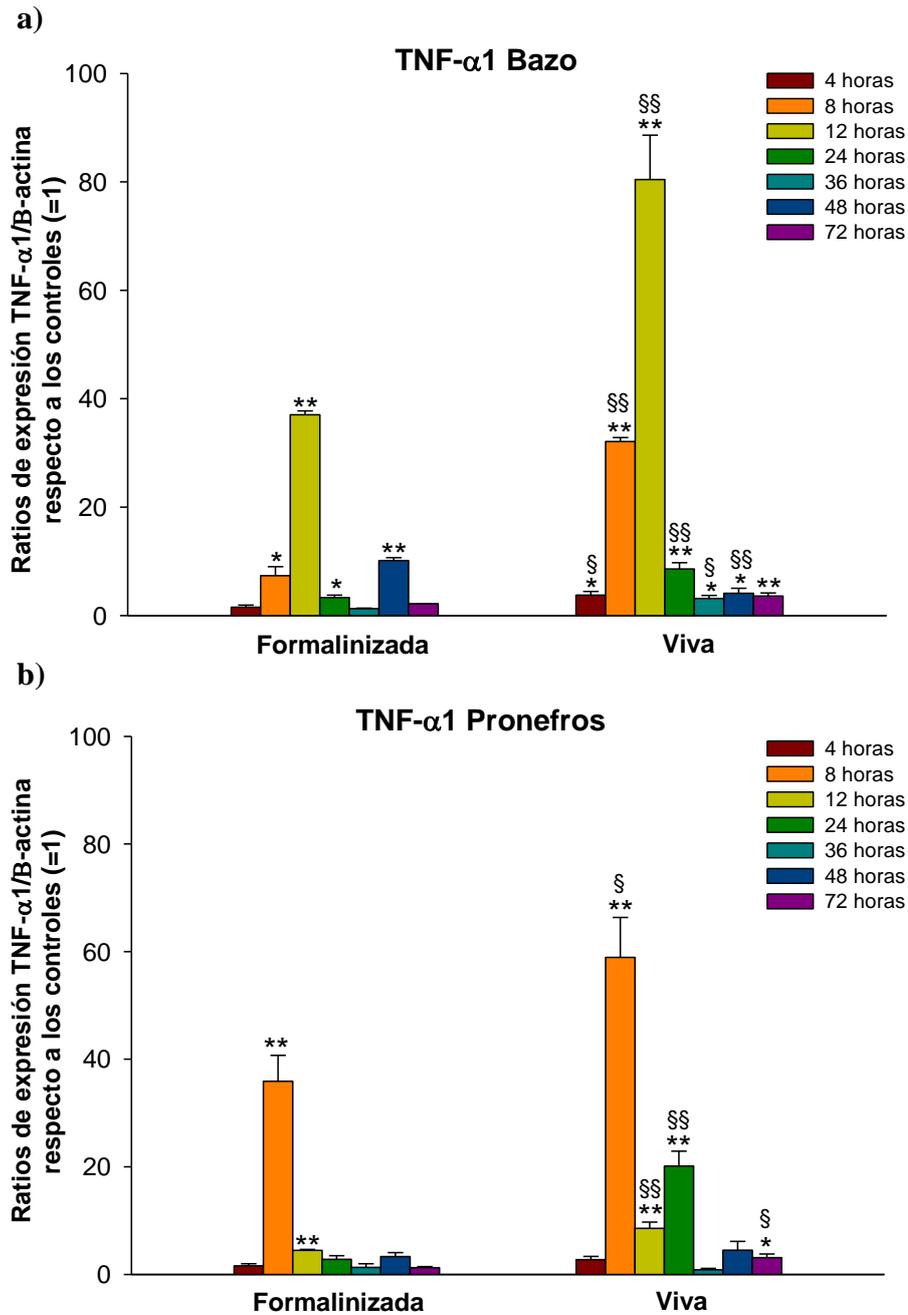


Figura 17. Expresión del gen *TNF-α1* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión TNF-α1/β-actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *Mx-1*

Tras la vacunación, se observaron incrementos en la expresión del gen de *Mx-1* en ambos órganos, con valores que en la mayoría de los casos no superaban 5 veces a los de los controles, existiendo grandes variaciones entre las muestras, y los valores más elevados se observaron en el pronefros, especialmente para la vacuna viva, con un máximo de aproximadamente 11 veces el control (**Figura 18**).

Bazo

En el caso del bazo (**Figura 18a**), en general, tras la vacunación la expresión del gen *Mx-1* se incrementó entre 2 y 4 veces respecto a los controles, con variaciones no significativas en el tiempo, excepto a las 24 horas, para ambos tipos de vacunas.

De igual forma, al comparar ambos tratamientos en las muestras de bazo, solamente existían diferencias significativas a las 24 horas posvacunación, con un mayor incremento en el caso de la vacuna viva (**Figura 18a**).

Pronefros

Para el pronefros (**Figura 18b**), las medias de las ratios de expresión del gen *Mx-1* en los individuos tratados con la vacuna formalinizada se incrementaron frente a los controles, con valores más altos a las 72 horas, pero solamente existían diferencias significativas a las 8 y 48 horas posvacunación. Por el contrario, en el caso de la vacuna viva, excepto a las 12 y 36 horas, la expresión del gen *Mx-1* era significativamente más elevada que en los controles (**Figura 18b**). Para este tipo de vacuna, la expresión se incrementaba rápidamente y luego descendía, con repunte moderado a las 24 horas y mucho más elevado a las 72 horas posvacunación.

Comparando los resultados obtenidos entre los dos tratamientos, la expresión del gen *Mx-1* fue significativamente superior en las muestras de pronefros de peces vacunados con la vacuna viva a las 4 y 72 horas (**Figura 18b**).

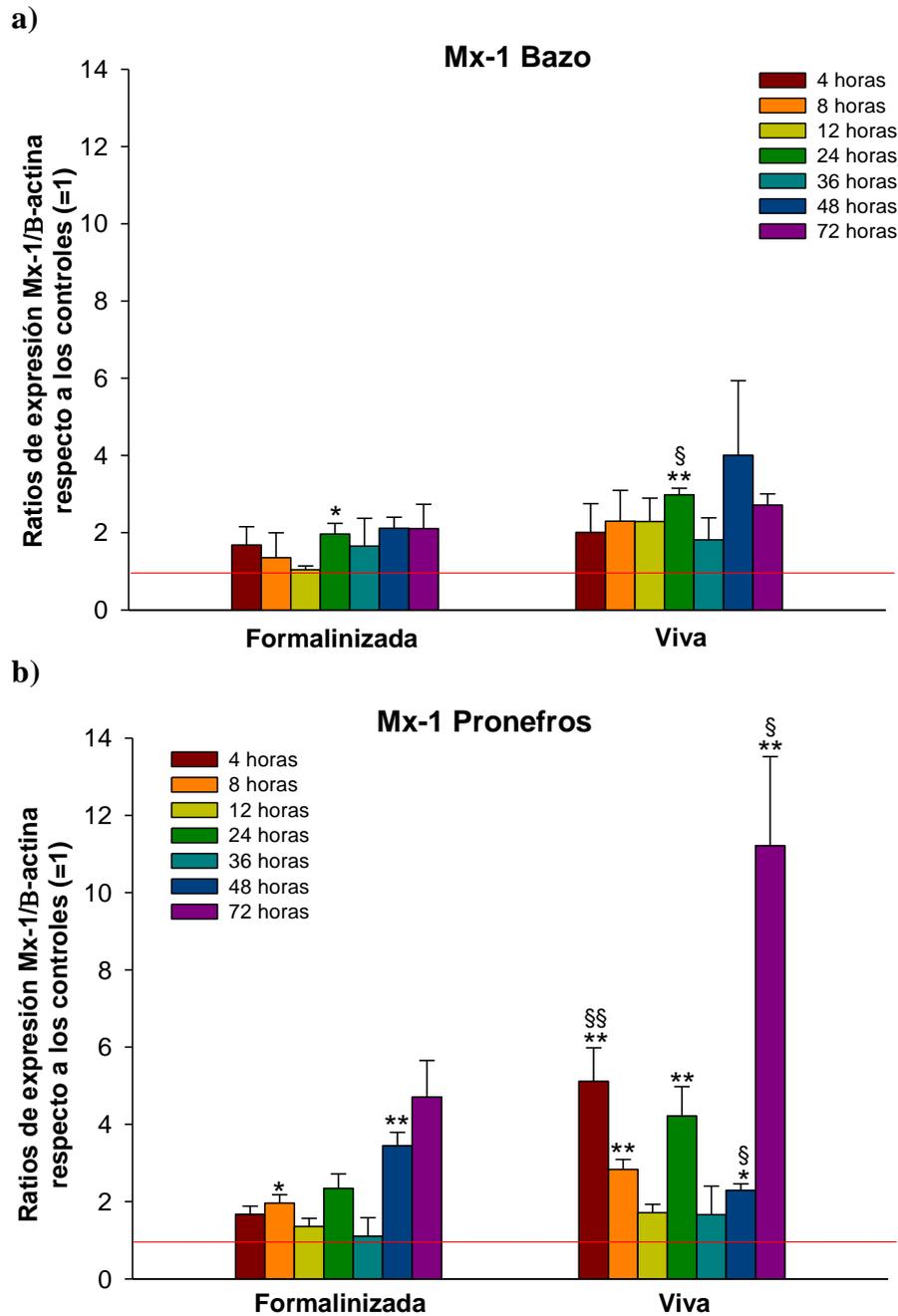


Figura 18. Expresión del gen *Mx-1* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra los ratios de expresión *Mx-1*/ β -actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *iNOS*

Tras la vacunación, se observaron cambios en la expresión del gen *iNOS* en el bazo y en el pronefros de los animales vacunados, que siguieron patrones de variación a lo largo del tiempo muy diferentes en ambos órganos y para los dos tipos de vacunas, con picos de expresión mucho más altos en el pronefros (hasta casi 6000) y para la vacuna viva (**Figura 19**).

Bazo

En lo que se refiere al bazo (**Figura 19a**) y en el caso de la vacuna formalinizada, a las 4 horas no se detectó expresión de *iNOS* en ningún caso y las medias de las ratios de expresión de *iNOS* frente a los controles fueron siempre bajas, con valores no superiores a 5. Las únicas diferencias significativas frente a los controles se encontraron a las 12 horas, con un valor inferior al de los controles, y a las 72 horas, con sobreexpresión frente a ellos. Para la vacuna viva, tampoco se detectó expresión de *iNOS* a las 4 horas y a las 12 horas también existía un descenso significativo respecto a los controles (**Figura 19a**). A las 36 horas posvacunación con la vacuna viva la expresión de *iNOS* mostró una fuerte elevación, para posteriormente descender, pero siempre con valores significativamente más elevados respecto a los controles.

Para el bazo existían diferencias significativas para la expresión de *iNOS* entre los dos tratamientos a las 36, 48 y 72 horas posvacunación, con valores mayores en las muestras de los animales tratados con la vacuna viva (**Figura 19a**).

Pronefros

Respecto al pronefros (**Figura 19b**), las medias de las ratios de expresión del gen *iNOS* en las muestras correspondientes a la vacuna formalinizada mostraron una tendencia a aumentar gradualmente a lo largo del tiempo, pero sin diferencias significativas respecto a los controles hasta las 72 horas, tiempo en el que aparecía un pico de expresión, que alcanzaba un valor superior a 200 veces el de los controles. En el caso de la vacuna viva las ratios de expresión de *iNOS* frente a los

controles fueron siempre significativamente mayores, excepto a las 36 horas, y se alcanzó un elevado pico de expresión a las 48 horas (5800 veces superior).

En cada uno de los tiempos considerados, las muestras del pronefros de peces tratados con la vacuna viva presentaron valores de expresión mayores que las correspondientes a la vacuna formalinizada, observándose la diferencia más notable a las 48 horas posvacunación (**Figura 19b**).

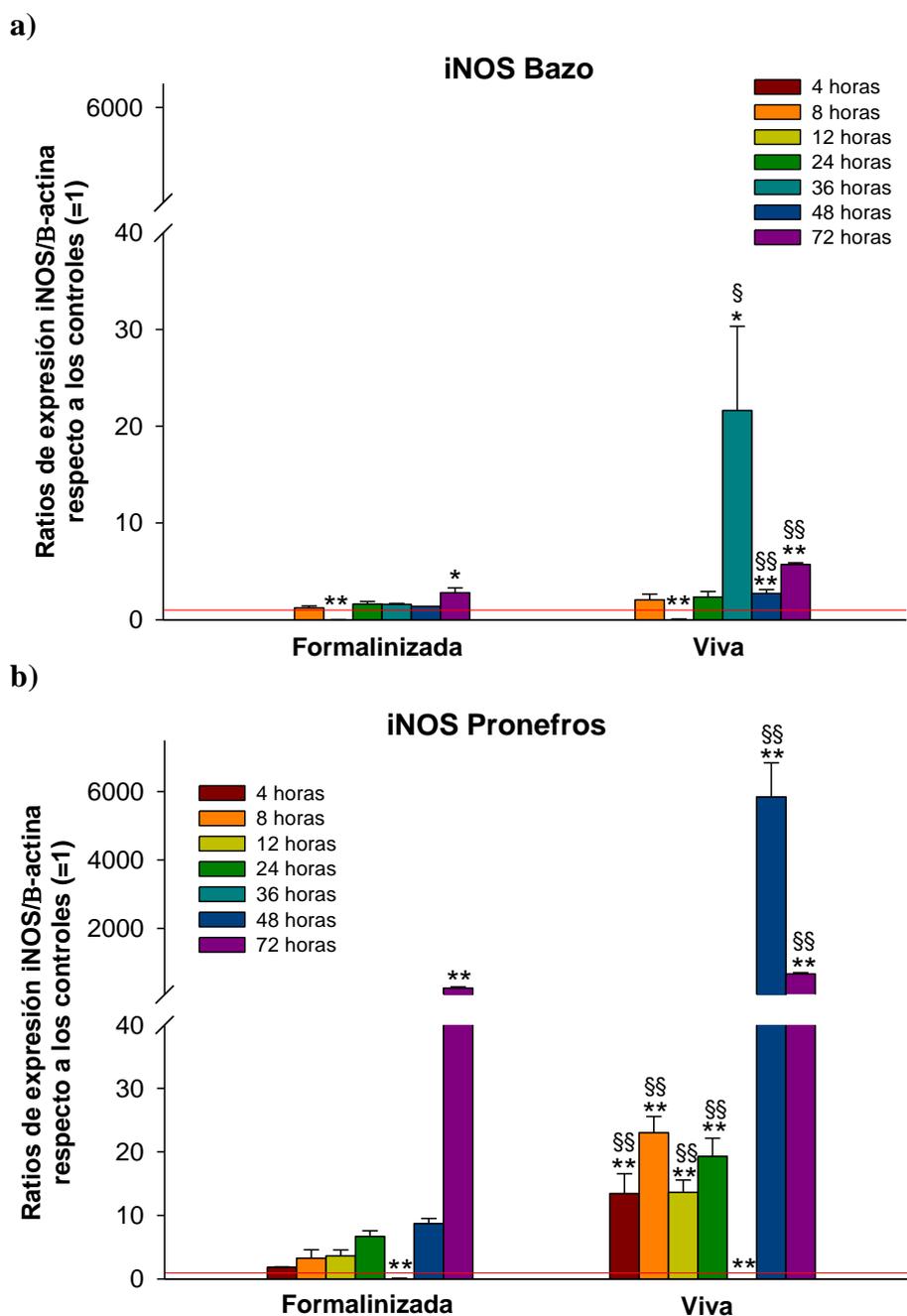


Figura 19. Expresión del gen *iNOS* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión iNOS/ β -actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *MHC-II β*

La expresión del gen *MHC-II β* también presentó modificaciones a lo largo del tiempo tras la vacunación, con perfiles diferentes entre los dos órganos y ratios muy variables a lo largo del tiempo, tanto para la vacuna viva como con la formalinizada, con valores máximos no superiores a 12 veces el control (**Figura 20**).

Bazo

Considerando el bazo (**Figura 20a**), la expresión del gen *MHC-II β* en las muestras de las truchas vacunadas presentó un perfil de expresión a lo largo del tiempo semejante para ambos tipos de vacunas. Así, tanto para la vacuna viva como para la formalinizada, la expresión se elevaba rápidamente frente a los controles a las 4 horas posvacunación, descendiendo por debajo del valor de los controles a las 8 horas y elevándose posteriormente hasta las 24 horas, para volver a descender finalmente. Sin embargo, en el caso de la vacuna formalinizada las diferencias frente a los controles solo fueron significativas a las 4 y 24 horas, mientras que en el caso de la vacuna viva lo fueron a las 4, 24, 36 y 72 horas (**Figura 20a**).

Comparando las respuestas a ambos tratamientos en las muestras de bazo, las diferencias principales se observaron a las 24, 36 y 72 horas posvacunación, tiempos en los que se obtuvieron valores más altos de expresión de *MHC-II β* para la vacuna viva (**Figura 20a**).

Pronefros

Los perfiles de expresión de *MHC-II β* a lo largo del tiempo en las muestras de pronefros también fueron semejantes para ambos tipos de vacunas (**Figura 20b**). La expresión de este gen se elevaba respecto a los controles a las 4 horas posvacunación y seguía un patrón de altibajos, con incrementos a las 12, 36 y 72 horas para los dos tipos de vacunas. No obstante, los valores eran más elevados en el caso de la vacuna viva y las diferencias significativas frente a los controles se encontraron a todos los tiempos, menos a las 8 horas, mientras que para la formalinizada lo fue solo a 36 horas (**Figura 20b**).

La intensidad de la respuesta, en cuanto a la expresión de MHC-II β , en las muestras de pronefros fue siempre significativamente mayor para la vacuna viva que para la formalinizada, particularmente a las 36 y 72 horas posvacunación (**Figura 20b**).

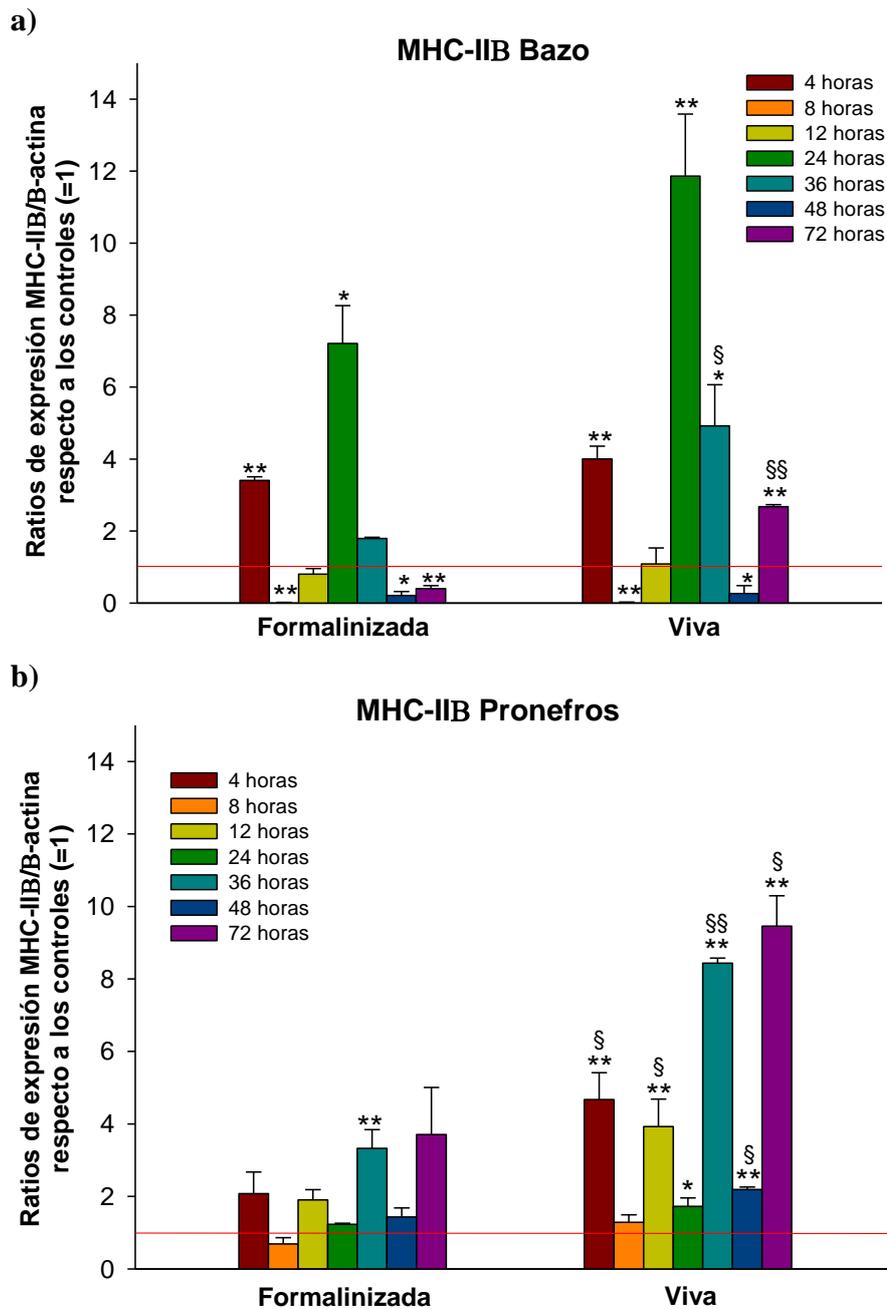


Figura 20. Expresión del gen *MHC-IIβ* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión MHC-IIβ/β-actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *TGF-β*

Tras la vacunación, en ambos órganos la expresión del gen *TGF-β* se vio poco modificada, con valores medios de ratio *TGF-β*/*β-actina* inferiores a 5 veces sobre los controles en la mayoría de los casos, y en algunos tiempos se observaron valores inferiores a 1, indicando en este caso una represión de la expresión en el bazo y pronefros de las truchas vacunadas. El valor máximo alcanzado fue de aproximadamente 12 (**Figura 21**).

Bazo

Ese patrón de baja inducción de la expresión del gen *TGF-β* fue general en las muestras de bazo, en todos los tiempos estudiados y tanto para la vacuna viva como para la formalizada (**Figura 21a**). A las 36 horas posvacunación la expresión de este gen en los peces vacunados, independientemente del tipo de vacuna, fue significativamente inferior a la encontrada en los controles. A tiempos posteriores, solo se observó un incremento significativo de la expresión para la vacuna viva a las 72 horas.

En el bazo, solo se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos a las 72 horas, con una mayor expresión para la vacuna viva (**Figura 21a**).

Pronefros

En las muestras de pronefros (**Figura 21b**) se observaron diferencias claras entre ambos tratamientos, de forma que mientras que para la vacuna formalinizada el perfil de expresión del gen *TGF-β* era semejante al descrito para el bazo, tras la vacunación con la vacuna viva la media de la ratio de expresión del gen se incrementó significativamente a las 4 horas, alcanzando un máximo de expresión a las 12 horas, y se mantenía así hasta las 24 horas posvacunación. A las 36 horas para la vacuna viva y para ambos tratamientos a las 72 horas se observó un descenso significativo de la expresión en las truchas vacunadas frente a los controles (**Figura 21b**).

La comparación entre ambos tratamientos, en el pronefros, demostró que la expresión del gen *TGF-β* se incrementaba significativamente en los peces vacunados con la vacuna viva frente a la observada para la vacuna formalinizada, a las 4, 8 y 12 horas posvacunación (**Figura 21b**).

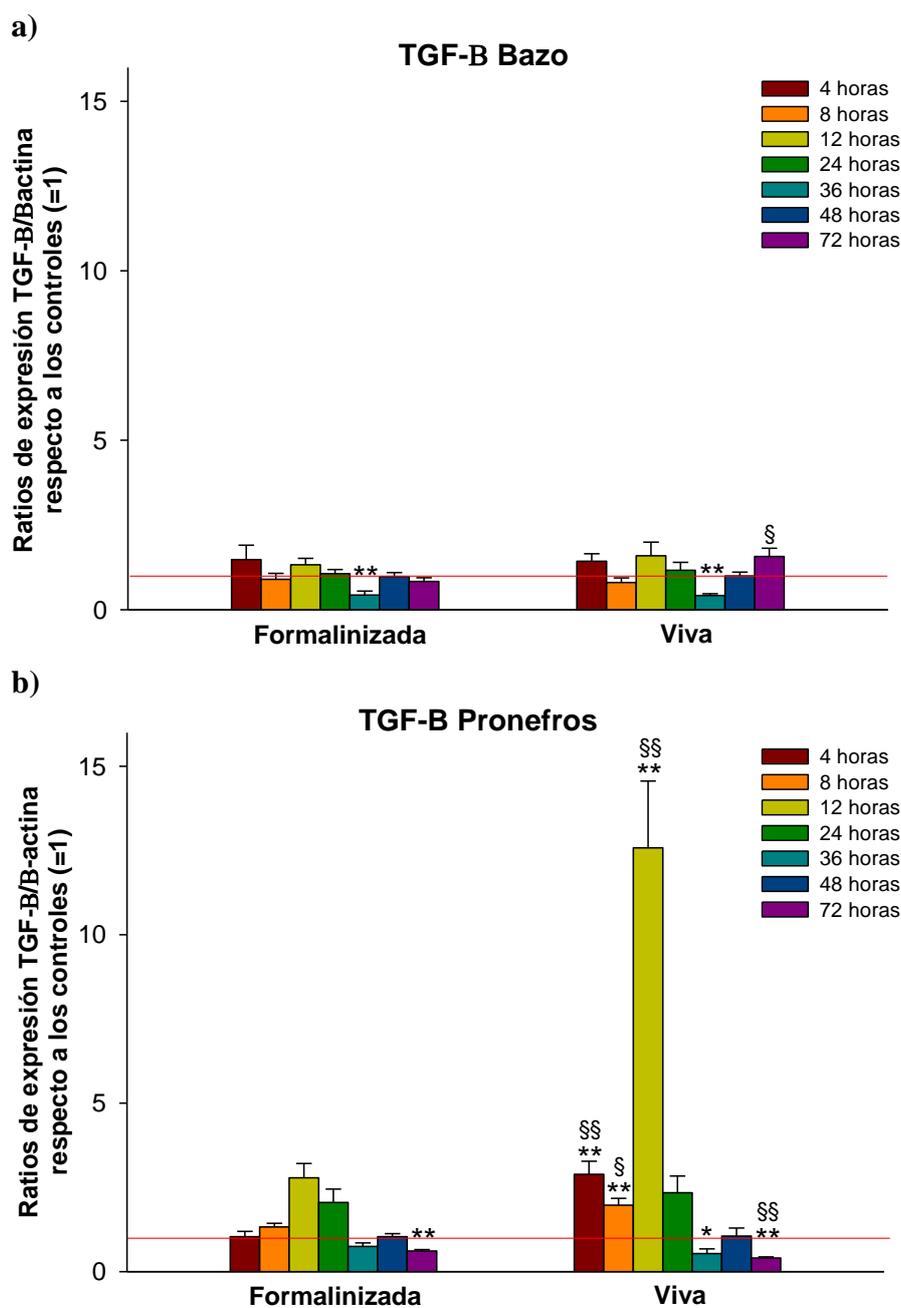


Figura 21. Expresión del gen *TGF- β* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión TGF- β / β -actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *COX-2*

El gen *COX-2* presentó un fuerte incremento en su expresión tras la vacunación, con ratios medias máximas superiores a las 1500 veces frente a los controles en las muestras de ambos órganos, pero con valores más elevados y sostenidos en el tiempo para la vacuna viva en el bazo (**Figura 22**).

Bazo

En este órgano (**Figura 22a**), la expresión de *COX-2* mostraba un perfil de cambio frente a los controles a lo largo del tiempo semejante para ambos tipos de vacunas, aunque con valores más elevados para la vacuna viva, de forma que se incrementaba rápidamente y se mantenía elevada hasta las 48 horas posvacunación, descendiendo a las 72 horas. Las diferencias respecto a los controles fueron significativas a todos los tiempos, excepto para la vacuna formalinizada a las 4 y 8 horas.

Comparando las respuestas a ambos tipos de vacunas en el bazo, los valores obtenidos para la vacuna viva fueron significativamente mayores, excepto a las 36 horas posvacunación, con valores mucho más altos a las 48 y 72 horas (**Figura 22a**).

Pronefros

El patrón de expresión del gen *COX-2* en el pronefros fue marcadamente distinto del observado en el bazo, ya que los valores máximos, para ambos tratamientos, se encontraron a las 8 horas, descendiendo bruscamente a las 12 horas y manteniéndose bajos hasta las 72 horas posvacunación (**Figura 22b**). Para la vacuna formalinizada las diferencias frente a los controles fueron significativamente distintas a las 8, 12, 24 y 36 horas, mientras que para la vacuna viva lo fueron a todos los tiempos.

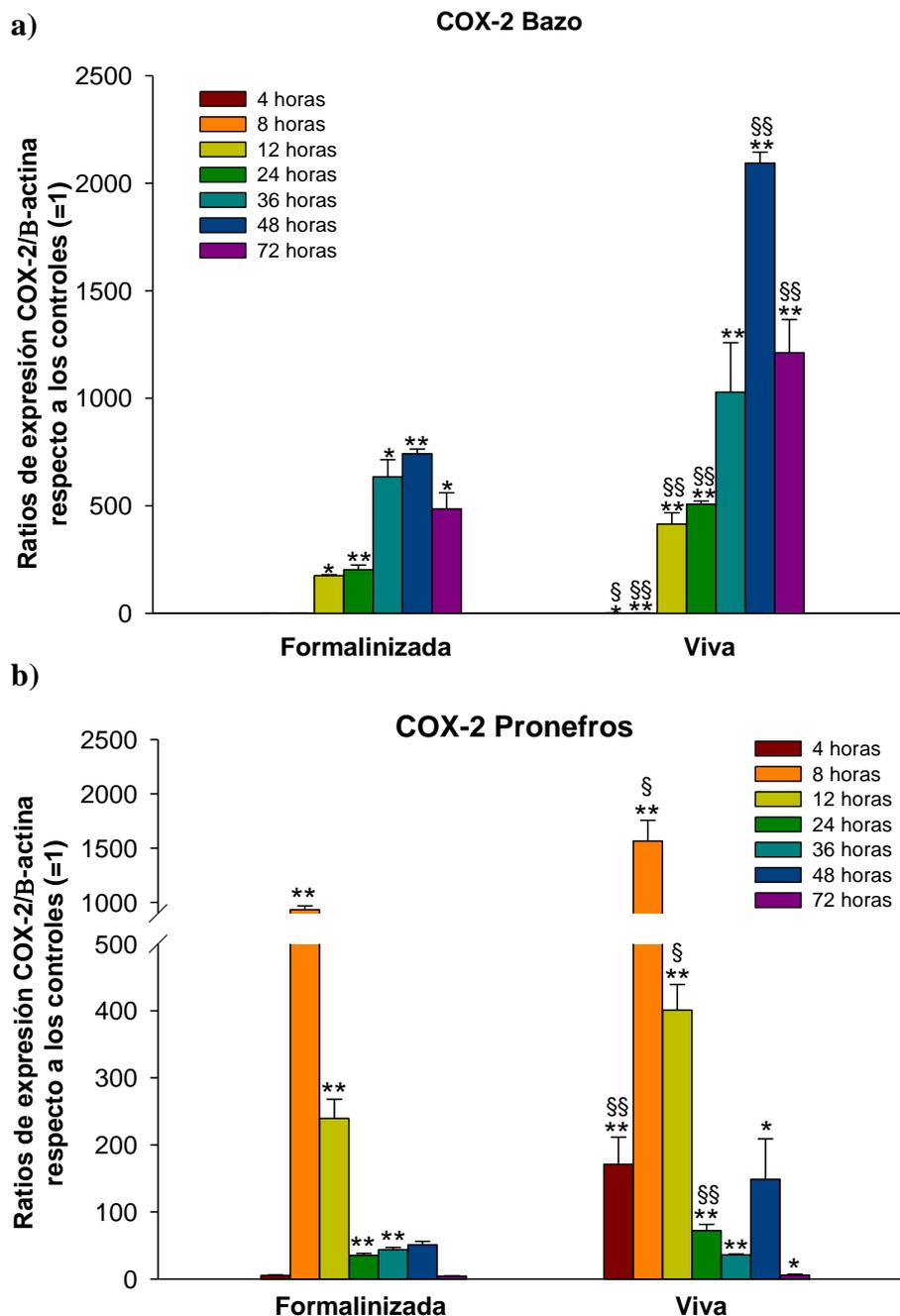


Figura 22. Expresión del gen *COX-2* en muestras de bazo (a) y de pronefros (b) recogidas a las 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 horas posvacunación de truchas vacunadas i.p. con la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de las ordenadas muestra las ratios de expresión *COX-2*/ β -actina respecto a la expresión en los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$) y entre ambos tratamientos (§ = $p < 0,05$; §§ = $p < 0,01$).

El estudio de las diferencias entre ambos tratamientos en las muestras del pronefros reveló que los valores de expresión del gen *COX-2* fueron significativamente más elevados para la vacuna viva, con diferencias estadísticamente significativas entre las 4 y las 24 horas posvacunación, ambas inclusive (**Figura 22b**).

ENSAYOS *IN VITRO*

Para el estudio del efecto de la exposición a los preparados vacunales en la expresión de los genes estudiados en las líneas celulares TSS y TPS-2, cultivos de estas células se incubaron con una concentración de bacterias de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*, bien viables (vacuna viva) o inactivadas (vacuna formalinizada) equivalente a una multiplicidad de infección (M.O.I.) 50, durante 1 hora. A continuación, se lavaron los cultivos con medio, para eliminar las bacterias libres. Posteriormente, se procedió a extraer el RNA a los tiempos posexposición de 4, 8, 12 y 24 horas.

Para evitar el crecimiento de las bacterias de la vacuna viva, que hubieran podido permanecer en los cultivos tras el lavado, el medio de cultivo TCMD contenía 50µg/ml del antibiótico gentamicina. Esta concentración del antibiótico impide el crecimiento de la cepa *aroA* en dicho medio, como demostró el ensayo de inhibición del crecimiento que realizamos (**Tabla 16**).

<i>Tratamiento</i>	<i>N° de CFUs/ml</i>	
	<i>12 h</i>	<i>24 h</i>
TCMD	0	0
TCMD(50µg/ml)+aroA	0	0
TCMD(100µg/ml)+aroA	0	0
TSB+aroA	1,0x10 ⁸	3,87x10 ⁸

Tabla 16. Ensayo de inhibición del crecimiento de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* en el medio TCMD en presencia de 50 µg/ml de gentamicina. El ensayo se realizó sembrando 5×10^7 CFUs/ml en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 µl de medio TCMD conteniendo 50 µg/ml de gentamicina, a 25°C.

Efectos de la exposición de los cultivos a las vacunas *aroA*

En primer lugar se estudio el efecto de la presencia de las bacterias vivas o formalinizadas sobre la morfología de los cultivos de ambas líneas. En comparación con los cultivos control, que no estaban expuestos a las bacterias, no se observaron cambios apreciables en los cultivos de las dos líneas inoculados con bacterias *aroA* de *A. hydrophila*, independientemente de si eran formalinizadas o vivas, ni tampoco a lo largo del tiempo de estudio (**Figura 23** y **Figura 24**)

No obstante, a las 24 y 48 horas, en los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 que contenían bacterias se pudo observar frecuentemente que grupos de éstas aparecían en contacto con la superficie de las células o internalizadas (**Figura 23** inset, **Figura 24** inset).

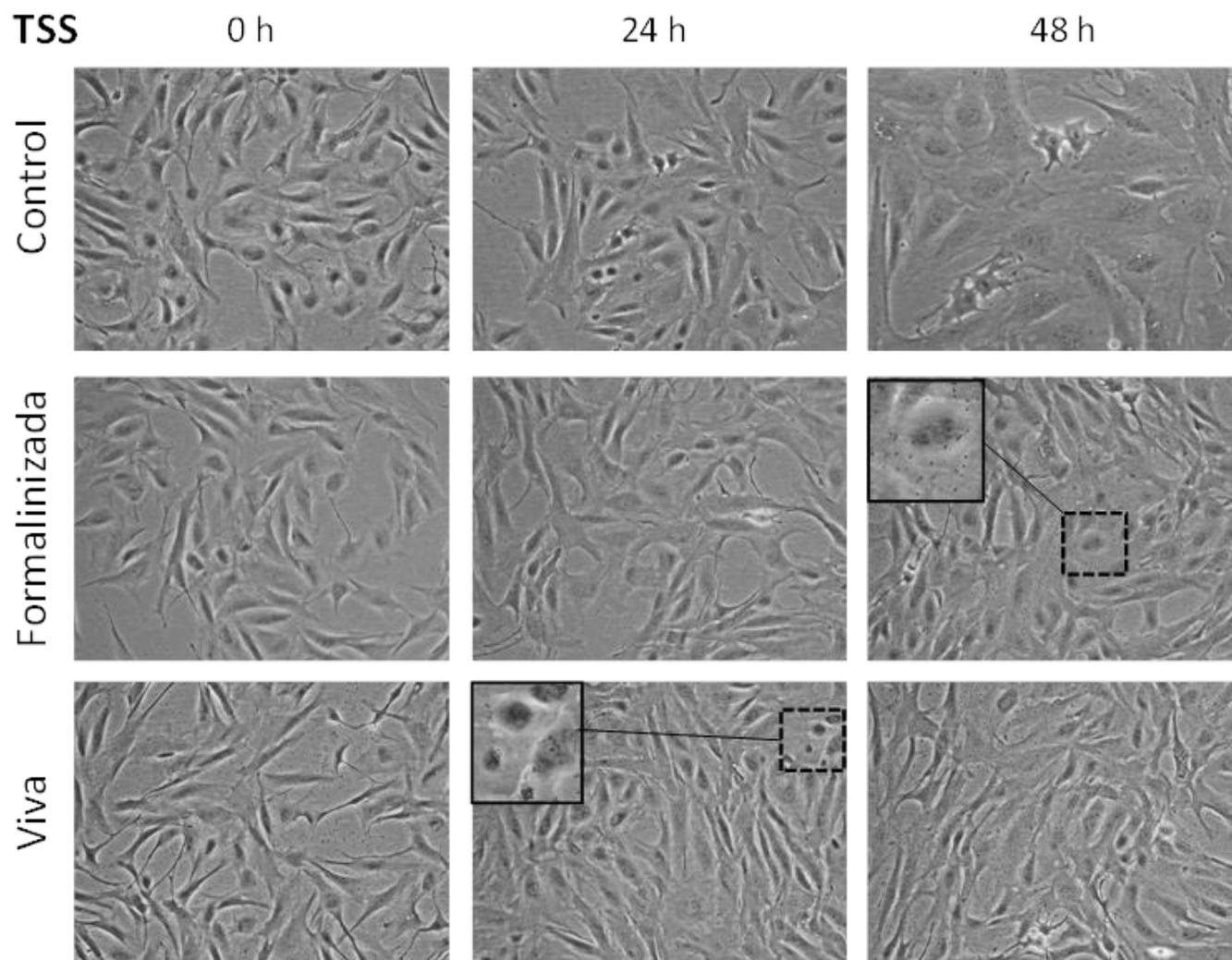
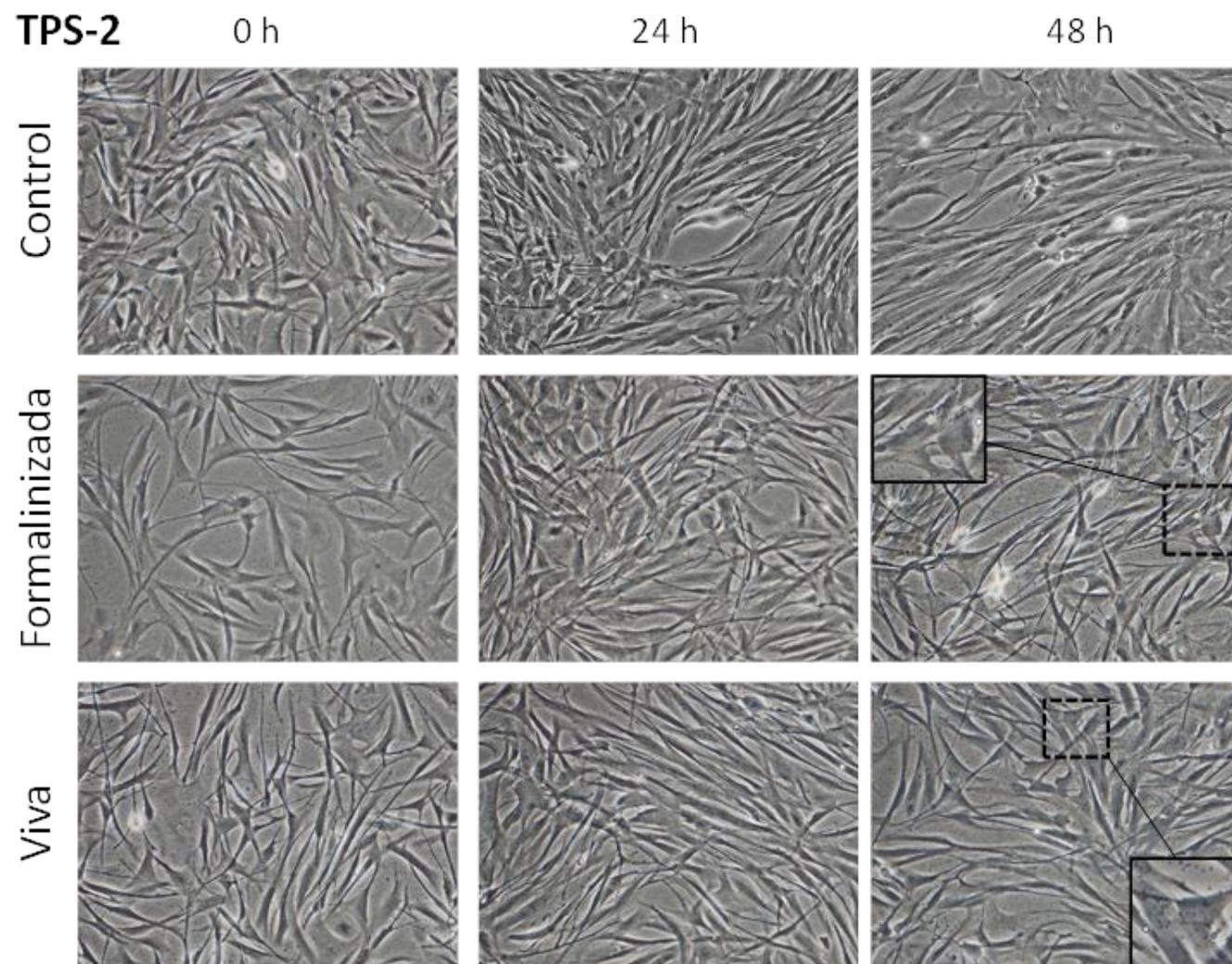


Figura 23. Microfotografías de cultivos de la línea celular TSS de bazo de trucha arcoíris en contraste de fases (200x) expuestos a los distintos preparados vacunales (formalinizada y viva), y cultivos control, a las 0, 24 y 48 horas posexposición. Los insets de las fotografías correspondientes a las 48 horas de exposición a la vacuna formalinizada y de 24 h con la vacuna viva muestran a mayor aumento la presencia de bacterias en contacto con la superficie de las células o internalizadas.

Figura 24. Microfotografías de cultivos de la línea celular TPS-2 de bazo de trucha arcoíris en contraste de fases (200x) expuestos a los distintos preparados vacunales (formalinizada y viva), y cultivos control, a las 0, 24 y 48 horas posexposición. Los insets de las fotografías correspondientes a las 48 horas de exposición a la vacuna formalinizada y viva muestran a mayor aumento la presencia de bacterias en contacto con la superficie de las células o internalizadas



Ensayo de explosión respiratoria

Utilizando la técnica de la reducción del NBT, tras una hora de incubación con cualquiera de los preparados vacunales, los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 experimentaron incrementos en los índices de estimulación de la explosión respiratoria (**Figura 25**).

En la línea TSS, el incremento del índice de estimulación era estadísticamente significativo, tanto en los cultivos expuestos a la vacuna formalinizada como en los expuestos a la vacuna viva (**Figura 25**).

Sin embargo, en la línea TPS-2 tan solo se observaron diferencias significativas en la respuesta a la vacuna viva (**Figura 25**).

En todos los casos, el índice de estimulación fue mayor en los cultivos tratados con la vacuna viva que en aquellos tratados con la vacuna formalinizada, pero existían diferencias significativas entre tratamientos en el caso de la línea TSS (**Figura 25**).

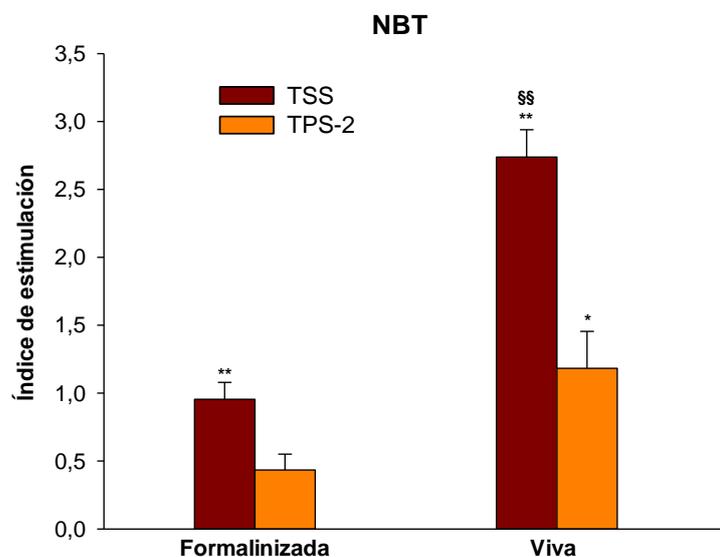


Figura 25. Efecto de los distintos preparados vacunales sobre la reducción de NBT en cultivos de las líneas celulares TSS y TPS-2. En la gráfica se muestran los índices de estimulación obtenidos en los ensayos tras la exposición a las vacunas durante 1 hora. Cada columna representa la media aritmética de 8 pocillos más el error estándar. Las diferencias significativas con respecto a los controles se representan como: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Las diferencias significativas entre los distintos preparados vacunales se representan como: § $p < 0,05$ y §§ $p < 0,01$.

Expresión de genes inmunorreguladores en los cultivos expuestos a las vacunas

Se describen a continuación los resultados obtenidos para los estudios de expresión de los genes de citoquinas (IL-1 β 1, IL-8, TNF- α 1, TGF- β , Mx-1), de las enzimas COX-2 e iNOS, así como del MHC-II β en las líneas celulares de trucha TSS y TPS-2 expuestas a los preparados vacunales de la cepa aroA de *A. hydrophila*, a las 4, 8, 12 y 24 horas tras la exposición. Los cebadores utilizados en los ensayos de PCR son los indicados en la **Tabla 9** del apartado de Material y Métodos.

Como referencia del valor de la expresión de dichos genes en los cultivos control de las líneas celulares, es decir, no expuestos a los preparados vacunales, la

Figura 26 muestra los resultados de los ensayos de qPCR en dichos cultivos, expresados como valores de ciclo umbral (Ct). Todos los genes mostraron expresión basal en las dos líneas celulares.

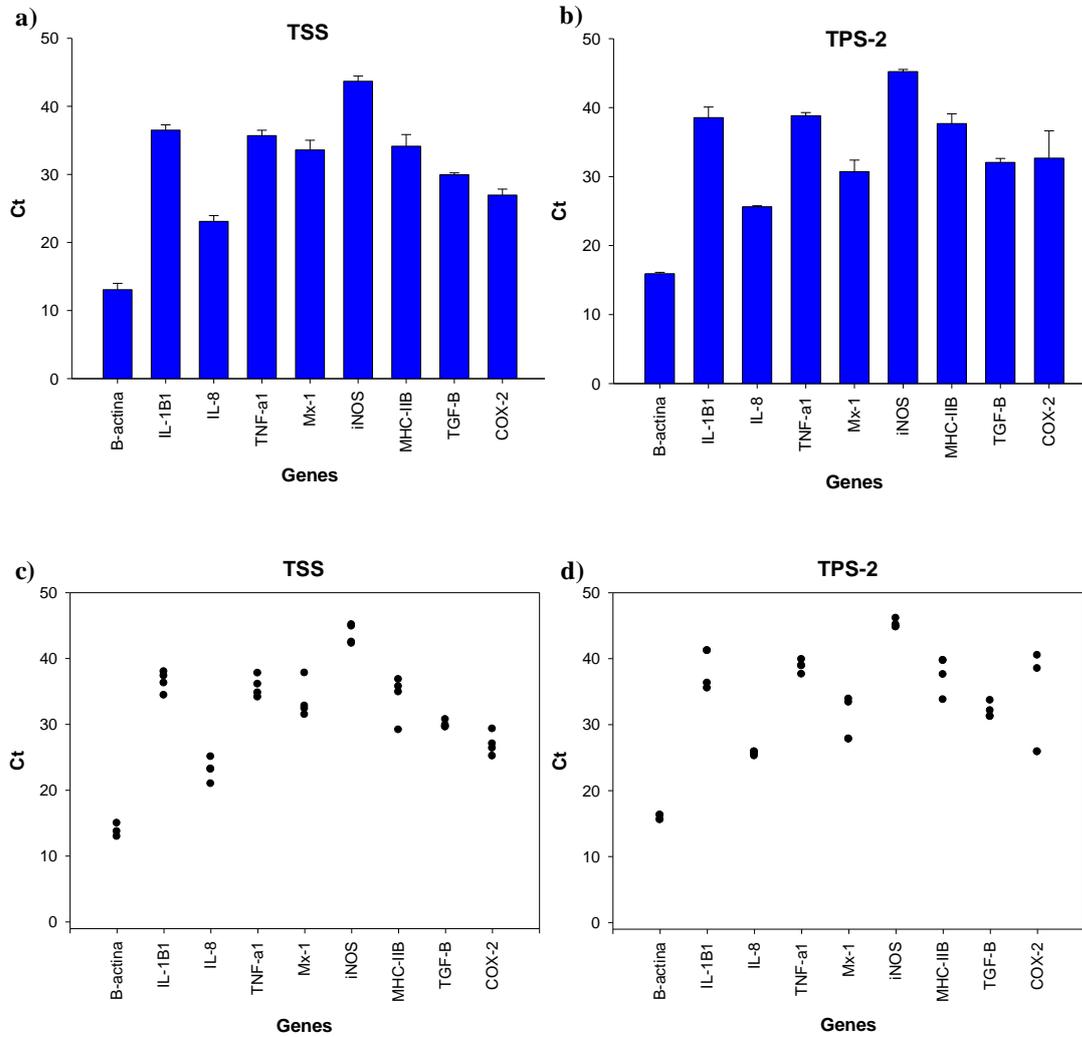


Figura 26. Expresión de los genes considerados en el estudio, incluyendo el gen normalizador β -actina, en los cultivos control de las líneas celulares TSS (a,c) y TPS-2 (b,d). Se representa la media de los valores de Ct, calculada a partir de los datos de los cultivos control (n=16) más el error estándar (a,b) y la dispersión de los datos (c,d).

Los cambios en la expresión génica en los ensayos se muestran como las medias de las ratios de la expresión del gen objeto de estudio, normalizada respecto

al gen de la β -actina aplicando la fórmula de Pfaffl (ver apartado “PCR cuantitativa” pág. 93), en la que los datos experimentales corresponden a los de los cultivos celulares expuestos a los preparados vacunales y los datos control a los de los cultivos no expuestos. De esta forma, en las gráficas la media de la ratio de expresión de un gen dado en los cultivos no expuestos tiene un valor igual a 1.

Expresión del gen *IL-1 β*

La expresión de la *IL-1 β* se vio aumentada en los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 tras la exposición a los preparados vacunales, especialmente en el caso de la vacuna viva alcanzándose un valor máximo de aproximadamente 100 (**Figura 27**). La respuesta a la vacuna formalinizada fue similar en ambas líneas, mientras que se dieron diferencias en el patrón de expresión frente a la vacuna viva a lo largo del tiempo (**Figura 27**).

Línea celular TSS

En la línea TSS, la exposición a la vacuna formalinizada no indujo cambios estadísticamente significativos en la expresión del gen *IL-1 β* , en ninguno de los tiempos considerados (**Figura 27a**). No obstante, a las 4 horas se observó un pequeño incremento de la ratio de expresión (aproximadamente 4 veces mayor que en los controles), que retornaba a valores muy próximos a los de controles en el resto de los tiempos (**Figura 27a**).

En cambio, en esta línea celular el tratamiento con la vacuna viva produjo un notable incremento de la expresión del gen *IL-1 β* , con valores estadísticamente significativos más altos que los de los controles, en todos los tiempos posexposición (**Figura 27a**). La media de la ratio de expresión se elevaba bruscamente ya a las 4 horas, con valores de aproximadamente 30 veces los de los controles, alcanzando un valor máximo (aproximadamente 100 veces el control) a las 8 horas, para descender notablemente a tiempos posteriores.

Comparando la respuesta a ambos tipos de preparados vacunales en la línea TSS, las medias de las ratios de expresión del gen *IL-1 β* fueron siempre significativamente mayores para la vacuna viva (**Figura 27a**).

Línea celular TPS-2

Los cultivos de la línea TPS-2 expuestos a la vacuna formalinizada presentaron una respuesta similar a la de la línea TSS en la expresión del gen *IL-1 β* , de forma que no existían diferencias significativas frente a los controles en ninguno de los tiempos ensayados (**Figura 27b**), observándose un pequeño aumento a las 4 horas (aproximadamente 2 veces el valor de los controles) y un retorno posterior a valores semejantes a los controles.

Sin embargo, tras la exposición a la vacuna viva la expresión del gen *IL-1 β* en la línea TPS-2 se incremento de forma relevante y estadísticamente significativa frente a los controles en todos los tiempos posexposición (**Figura 27b**). A lo largo del tiempo, la expresión del gen se elevó rápidamente, con valores aproximadamente 17 veces los de los controles a las 4 horas. A tiempos posteriores, se observo un brusco descenso en la expresión a las 8 horas y una recuperación a las 12 horas con valores semejantes a los observados a las 4 horas. La expresión volvía a descender a valores aproximadamente 5 veces los de los controles a las 24 horas posexposición (**Figura 27b**).

Comparando la respuesta a ambos tipos de tratamiento, en todas las horas estudiadas los niveles de expresión del gen *IL-1 β* siempre fueron significativamente mayores en los cultivos tratados con la vacuna viva (**Figura 27b**).

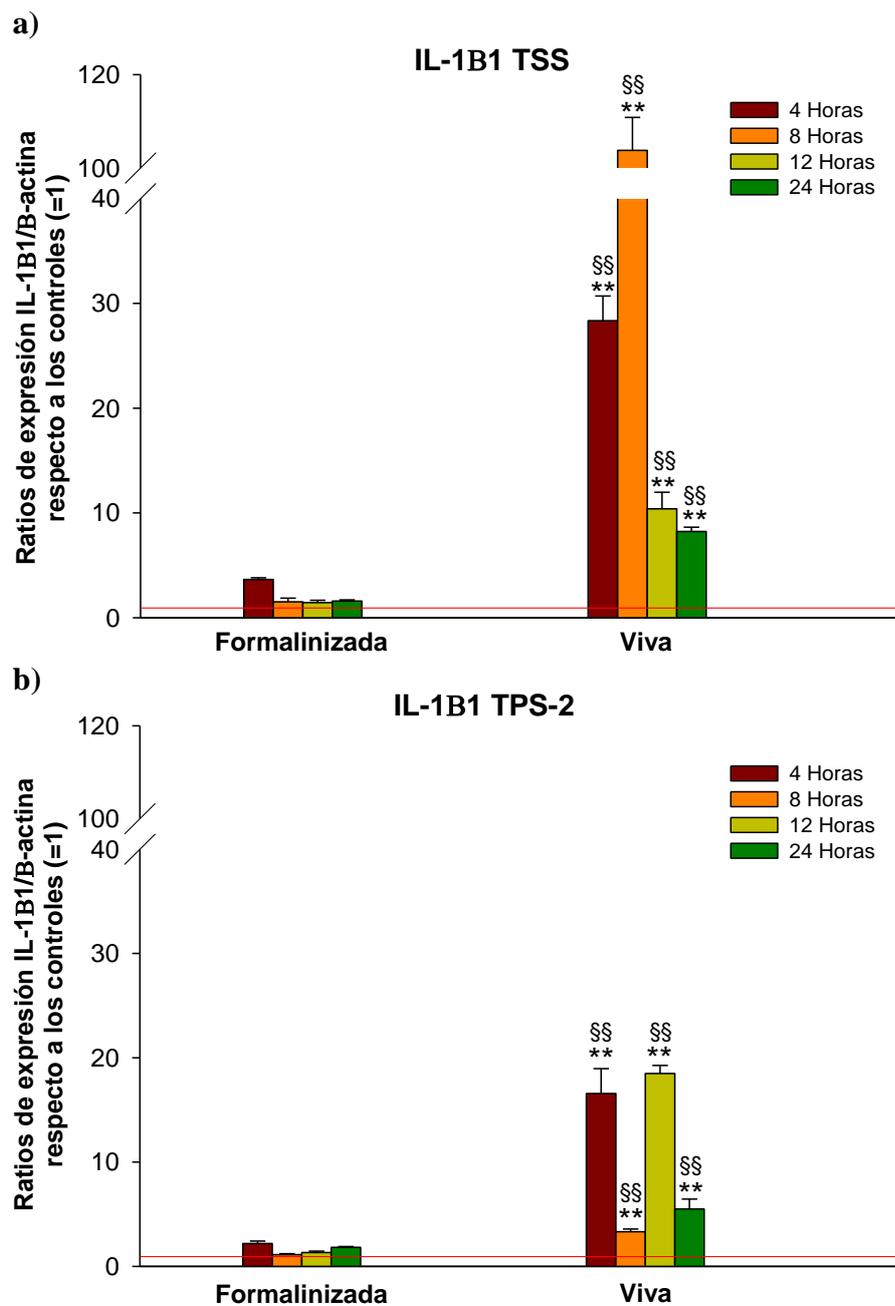


Figura 27. Expresión del gen *IL-1β1* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL1-β1/β-actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *IL-8*

La ratio de expresión del gen de *IL-8* se vio claramente incrementada en los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 tras la exposición a la vacuna viva, alcanzándose un valor máximo de 45 veces con respecto al control, mientras que para la vacuna formalinizada la respuesta fue mínima en ambas líneas celulares (**Figura 28**).

Línea celular TSS

Tras la exposición a la vacuna formalinizada, las medias de las ratios de expresión en los cultivos de la línea TSS no variaron significativamente frente a las de los controles a lo largo del tiempo (**Figura 28a**).

En los cultivos expuestos a la vacuna viva, por el contrario, la expresión del gen *IL-8* fue siempre significativamente más alta que en los controles, presentando ya a las 4 horas valores aproximadamente 12 veces superiores, alcanzándose un valor medio máximo de la ratio de expresión *IL-8*/ β -actina respecto a los controles de aproximadamente 25 veces a las 8 horas, con un retorno a valores próximos 10 a tiempos posteriores (**Figura 28a**).

Para este gen, los valores de expresión fueron siempre significativamente más altos tras la exposición a la vacuna viva que a la formalinizada (**Figura 28a**).

Línea celular TPS-2

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la expresión del gen *IL-8* en la línea TPS-2, tras la exposición a la vacuna formalinizada, no demostró diferencias significativas entre los valores de las muestras experimentales y los de la muestras control (**Figura 28b**).

Por otro lado, los cultivos de esta línea celular expuestos a la vacuna viva presentaron un marcado incremento de las medias de las ratios del gen *IL-8* frente a los controles, con valores significativamente más altos en todos los tiempos considerados (**Figura 28b**). Tras la exposición, la expresión se elevó ya a las 4

horas, con aproximadamente un valor medio 11 veces el del control, alcanzando un pico (aproximadamente 46 veces el control) a las 12 horas (**Figura 28b**).

El estudio comparativo del efecto de ambos tratamientos en la expresión del gen *IL-8* en la línea TPS-2 demostró que las medias de las ratio de expresión fueron siempre significativamente mayores para la vacuna viva (**Figura 28b**).

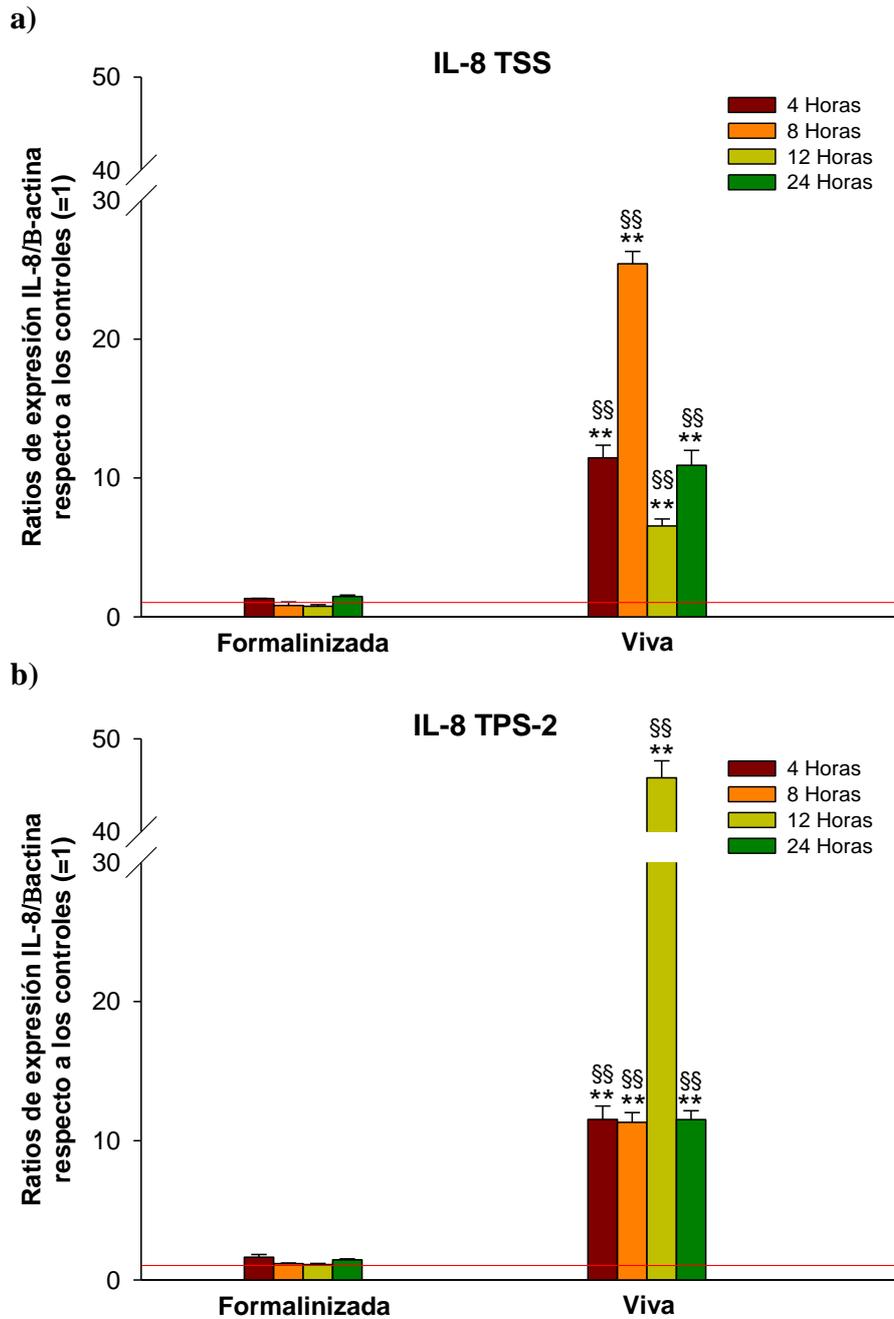


Figura 28. Expresión del gen *IL-8* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas post exposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL-8/ β -actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *TNF- α 1*

Tras la exposición *in vitro*, se observaron marcadas diferencias en las respuestas de ambas líneas celulares a los dos tipos de preparados vacunales (**Figura 29**). En ambas líneas celulares, las medias de las ratios de expresión del gen *TNF- α 1* fueron mayores para la vacuna viva, especialmente en la línea TPS-2, cuyo valor máximo fue de 18.

Línea celular TSS

En los cultivos de la línea TSS expuestos a la vacuna formalinizada, a las 4 horas posexposición se observó un pequeño descenso (aproximadamente 3 veces), pero estadísticamente significativo, de la expresión del gen *TNF- α 1* frente al control (**Figura 29a**). Posteriormente, las ratios de expresión del gen se recuperaron en los cultivos expuestos, alcanzando valores semejantes a las de los controles.

Por otro lado, las medias de las ratios de expresión de este gen en los cultivos tratados con la vacuna viva siempre fueron significativamente superiores a las de los controles, con un máximo de expresión (aproximadamente 6 veces sobre el control) a las 8 horas posexposición y un segundo repunte de esta a las 24 horas (**Figura 29a**).

La diferencia entre las respuestas a ambos tipos de preparados vacunales era patente en todos los tiempos estudiados, siendo siempre significativamente más alta la expresión de *TNF- α 1* en los cultivos de TSS expuestos a la vacuna viva (**Figura 29a**).

Línea celular TPS-2

Las medias de las ratios de expresión del gen *TNF- α 1* en los cultivos de TPS-2 expuestos a la vacuna formalinizada no mostraron diferencias significativas respecto a los controles a excepción de los cultivos de 24 horas que presentaron un máximo que fue significativamente mayor a sus controles (**Figura 29b**).

En el caso de los cultivos tratados con la vacuna viva, la expresión del gen *TNF- α 1* aumentó rápidamente, alcanzando un primer pico a las 8 horas postexposición y un segundo, más alto, a las 24 horas (**Figura 29b**). Las diferencias entre las muestras experimentales y los controles fueron siempre significativas.

Comparando la respuesta a los dos tipos de preparados vacunales en los cultivos de TPS-2, las medias de las ratios de expresión del gen *TNF- α 1* siempre fueron significativamente mayores en los cultivos tratados con la vacuna viva (**Figura 29b**).

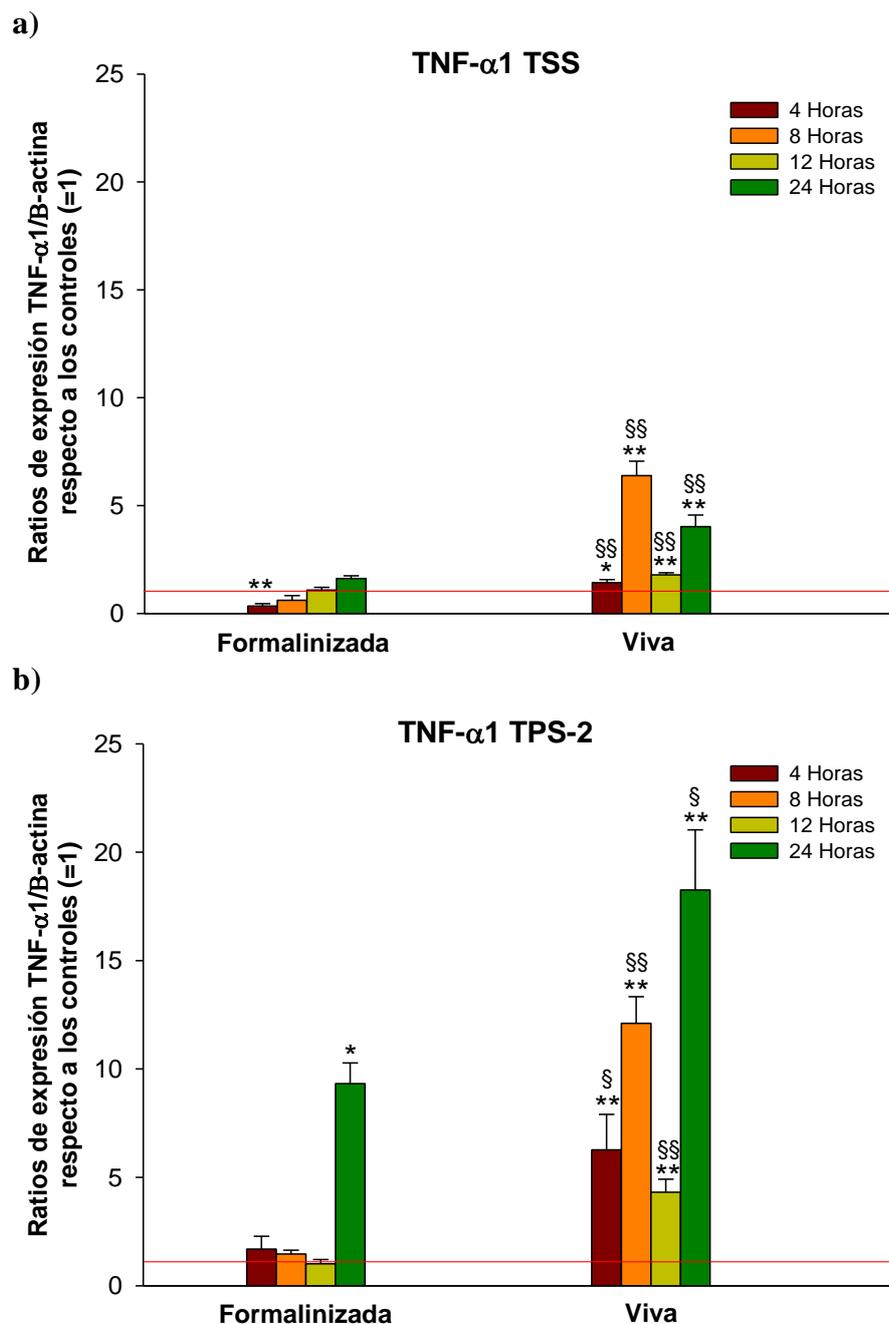


Figura 29. Expresión del gen *TNF- α 1* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas post exposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión TNF- α 1/ β -actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *Mx-1*

La media de la ratio de expresión del gen *Mx-1* en las líneas celulares TSS y TPS-2 se modificó tras la exposición a los dos tipos de vacunas aroA, presentando claras diferencias entre ambas líneas celulares y dependiendo del tipo de preparado vacunal (**Figura 30**). La máxima ratio de expresión se encontró en la línea TPS-2 expuesta a la vacuna viva, no superándose en ningún caso un valor medio de 15.

Línea celular TSS

En los cultivos de la línea TSS expuestos a la vacuna formalinizada (**Figura 30a**), la media de la ratio de expresión del gen *Mx-1* se incrementó respecto a la de los controles significativamente a las 4 horas (aproximadamente 4 veces mayor) y posteriormente descendió, presentando valores similares a los de los controles.

Por otro lado, los cultivos expuestos a la vacuna viva también mostraron un incremento (aproximadamente 7 veces sobre los controles) temprano de la expresión del gen *Mx-1*, pero esta mayor ratio de expresión se mantuvo significativamente más elevada con respecto a los controles hasta 24 horas posexposición (**Figura 30a**).

La comparación de las medias de las ratios de expresión del gen *Mx-1* en cultivos de la línea TSS expuestos a uno u otro tipo de preparado vacunal demostró que, a todos los tiempos analizado, los valores fueron significativamente mayores en los cultivos expuestos a la vacuna viva (**Figura 30a**).

Línea celular TPS-2

En la línea TPS-2, la exposición a la vacuna formalinizada no indujo cambios significativos frente a los controles en las ratios de expresión del gen *Mx-1*, a ningún tiempo posexposición (**Figura 30b**).

Tras 4 horas de exposición a la vacuna viva, se produjo un descenso significativo de la media de la ratio de expresión del gen *Mx-1* en la línea TPS-2 respecto a los controles, seguido de una recuperación a valores próximos a 1 y un

notable incremento (aproximadamente 14 veces mayor), con diferencias significativas frente al control, a las 24 horas (**Figura 30b**).

Solo se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamiento en las medias de las ratios de expresión del gen *Mx-1* en la línea TPS-2 a las 24 horas posexposición con valores mayores en los cultivos tratados con la vacuna viva (**Figura 30b**).

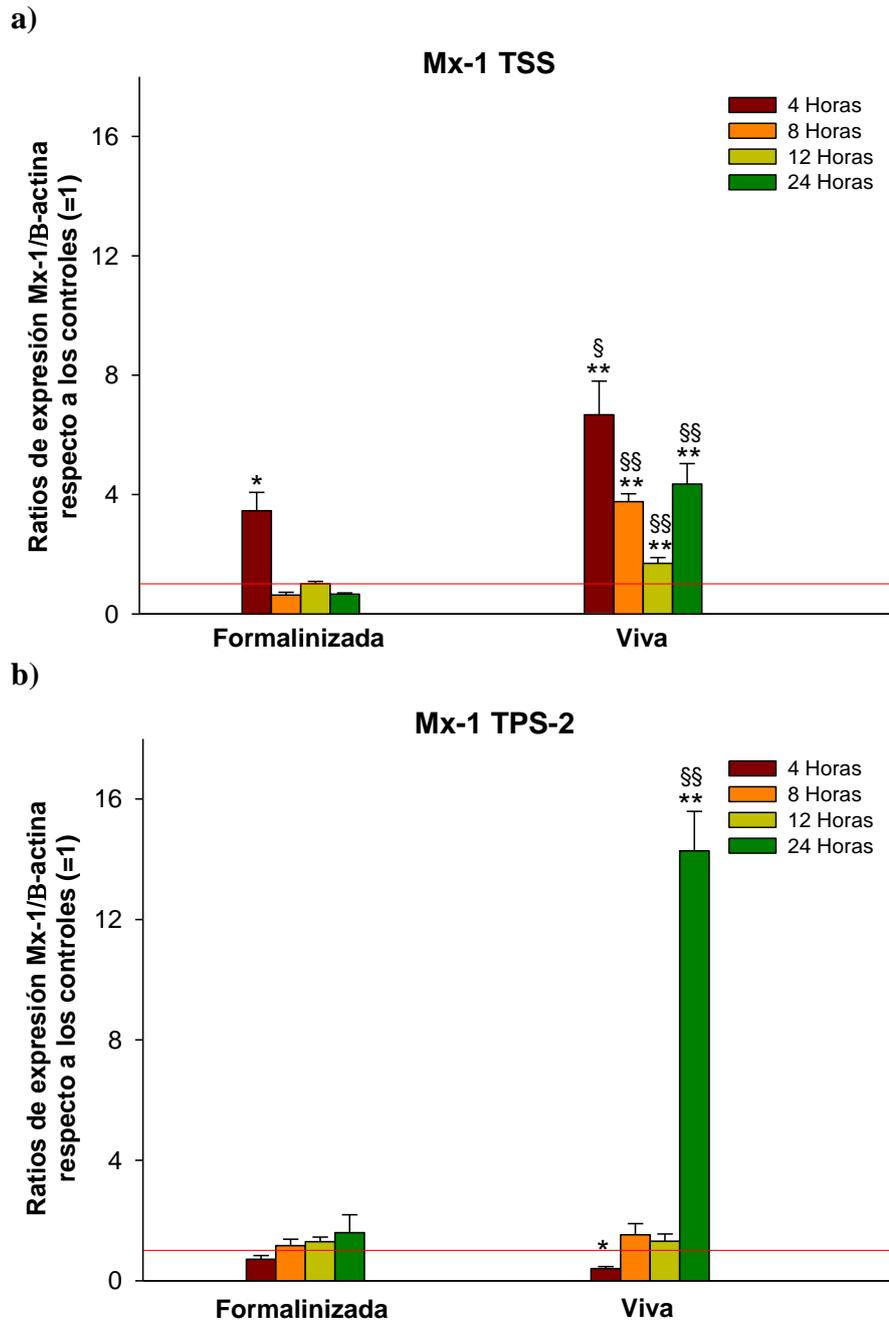


Figura 30. Expresión del gen *Mx-1* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión *Mx-1*/ β -actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$) y entre ambos tratamientos (§ = $p < 0,05$; §§ = $p < 0,01$).

Expresión del gen *iNOS*

Tras la exposición a los preparados vacunales de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*, la expresión del gen *iNOS* en las líneas celulares TSS y TPS-2 presentó marcadas variaciones a lo largo del tiempo, con notables incrementos sobre los controles para la vacuna viva y la línea TPS-2 y mucho menores para la formalinizada (**Figura 31**). Los valores medios máximos (145 veces el control) de las ratios de expresión de este gen se encontraron en la línea TPS-2, a las 8 horas posexposición a la vacuna viva.

Línea celular TSS

Para esta línea, la exposición a la vacuna formalinizada no produjo cambios notables en las medias de las ratios de expresión del gen *iNOS* y únicamente a las 4 horas posexposición existía un sobreexpresión significativamente mayor respecto al control, pero con un valor muy próximo al de este (**Figura 31a**).

En los ensayos de exposición a la vacuna viva, se observaron incrementos estadísticamente significativos de las medias de las ratio de expresión frente a los controles a las 4, 12 y 24 horas posexposición, pero no a las 8 horas (**Figura 31a**). La media de las ratios de expresión del gen *iNOS* se incrementaba con el tiempo, alcanzando su valor máximo (aproximadamente 20 veces sobre el control) a las 24 horas.

La comparación entre la respuesta a los tipos de preparados vacunales en la línea TSS indicó que las medias de las ratios de expresión del gen *iNOS* eran significativamente mayores en los cultivos expuestos a la vacuna viva a las 12 y 24 horas (**Figura 31a**).

Línea celular TPS-2

Respecto a la línea TPS-2, la exposición a la vacuna formalinizada no causó una variación significativa de las medias de las ratios de expresión del gen *iNOS* respecto a los controles hasta las 12 horas posexposición, tiempo en el que se elevó

leve (2,5 veces) pero significativamente sobre el control (**Figura 31b**). Los valores medios de la ratio de expresión descendieron a valores semejantes a los de los controles a tiempos posteriores.

En cambio, la exposición a la vacuna viva provocó incrementos significativos de la expresión de este gen en la línea TPS-2 a partir de las 8 horas posexposición (**Figura 31b**). A este tiempo se alcanzó el máximo valor (aproximadamente 150 veces mayor que el control), para luego descender a valores próximos a 4 veces sobre el control, siempre con diferencias significativas respecto a ellos.

El estudio de las diferencias entre ambos tipos de tratamientos demostró que las medias de las ratios de expresión fueron significativamente mayores en los cultivos de TPS-2 expuestos a la vacuna viva, a las 8, 12 y 24 horas posexposición (**Figura 31b**).

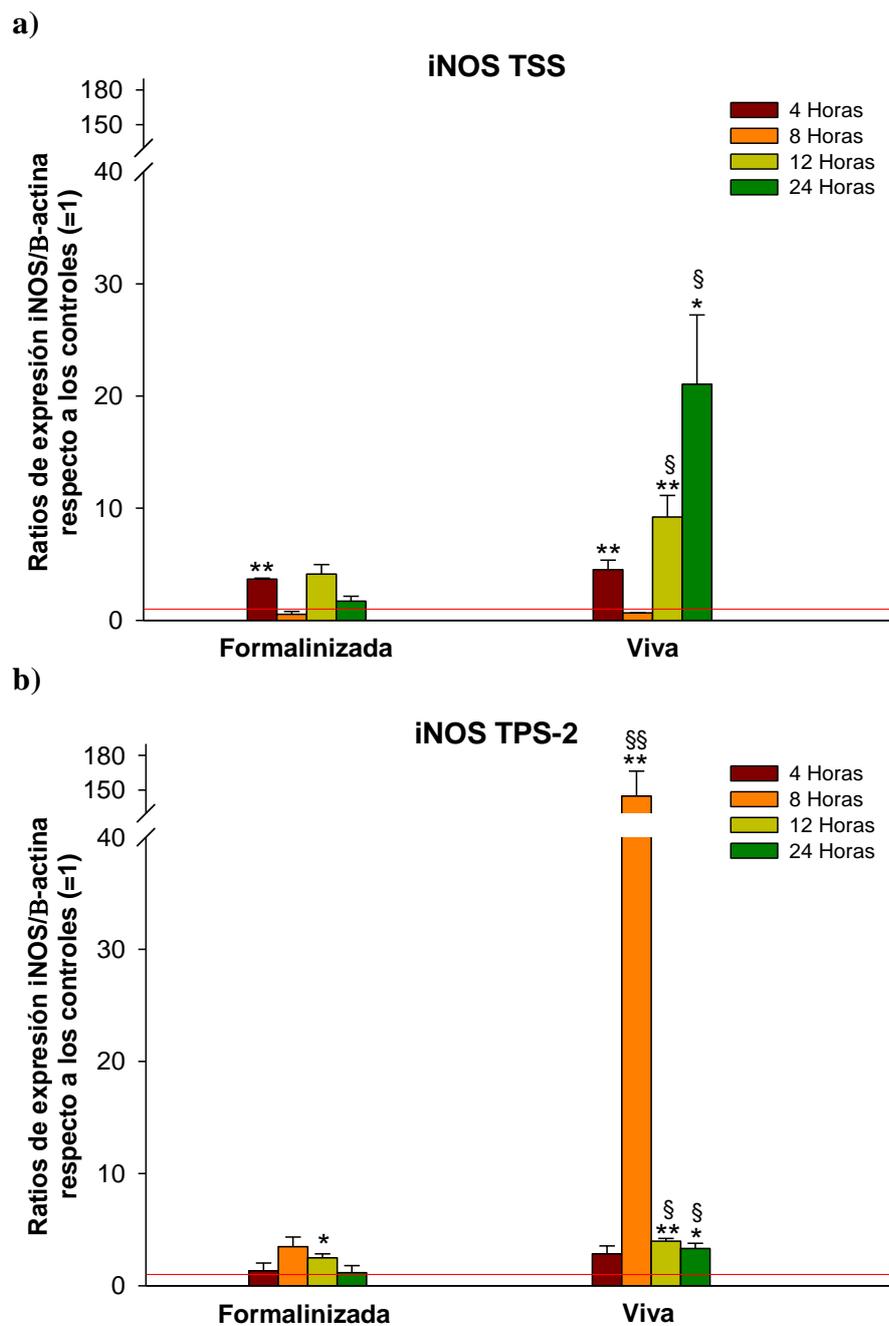


Figura 31. Expresión del gen *iNOS* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión *iNOS*/β-actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *MHC-II β*

La expresión del gen *MHC-II β* en los cultivos de las líneas celulares TSS y TPS-2 se vio modificada tras la exposición a los preparados vacunales, lo que indujo tanto aumentos como disminuciones de las medias de las ratios a lo largo del tiempo, con marcadas diferencias entre las dos líneas y entre los dos tipos de vacunas (**Figura 32**). El valor medio máximo de ratio de expresión se encontró en los cultivos de la línea TPS-2 expuestos a la vacuna viva, alcanzando un valor de aproximadamente 27 veces sobre el control.

Línea celular TSS

En esta línea celular, tras la exposición a la vacuna formalinizada, la única variación significativa frente a los controles se encontró a las 4 horas posexposición, con marcado descenso del valor medio de la ratio de expresión (10 veces inferior al control) de este gen (**Figura 32a**).

En los cultivos de la línea TSS expuestos a la vacuna viva también se produjo un descenso de la media de la ratio de expresión del gen *MHC-II β* , estadísticamente significativo frente al control, a las 4 horas posexposición (**Figura 32a**). Posteriormente la media de la ratio de expresión del gen se elevaba notablemente, alcanzando un pico a las 8 horas, y manteniéndose significativamente mayor a las 24 horas.

La media de la ratio de expresión del gen *MHC-II β* fue significativamente mayor en los cultivos de la línea TSS expuestos a la vacuna viva a las 8 y 24 horas posexposición (**Figura 32a**).

Línea celular TPS-2

En el caso de la línea TPS-2 (**Figura 32b**), la exposición a la vacuna formalinizada indujo una disminución pequeña (entre 2-3 veces), pero estadísticamente significativa, respecto a los controles de las medias de las ratios

expresión del gen *MHC-IIβ* a las 8 y 12 horas posexposición y un incremento, también significativo, a las 24 horas (**Figura 32b**).

En los cultivos expuestos a la vacuna viva la media de las ratios de expresión del gen *MHC-IIβ* se mantuvo sin cambios respecto a los controles hasta las 24 horas, tiempo en el cual la ratio se elevó notable (27 veces) y bruscamente por encima del control (**Figura 32b**).

Al comparar los resultados obtenidos con ambos tratamientos en los cultivos de la línea TPS-2, solo existían diferencias significativas entre los valores medios de las ratios de expresión del gen *MHC-IIβ* a las 24 horas posexposición, con valores 10 veces mayores para la vacuna viva (**Figura 32b**).

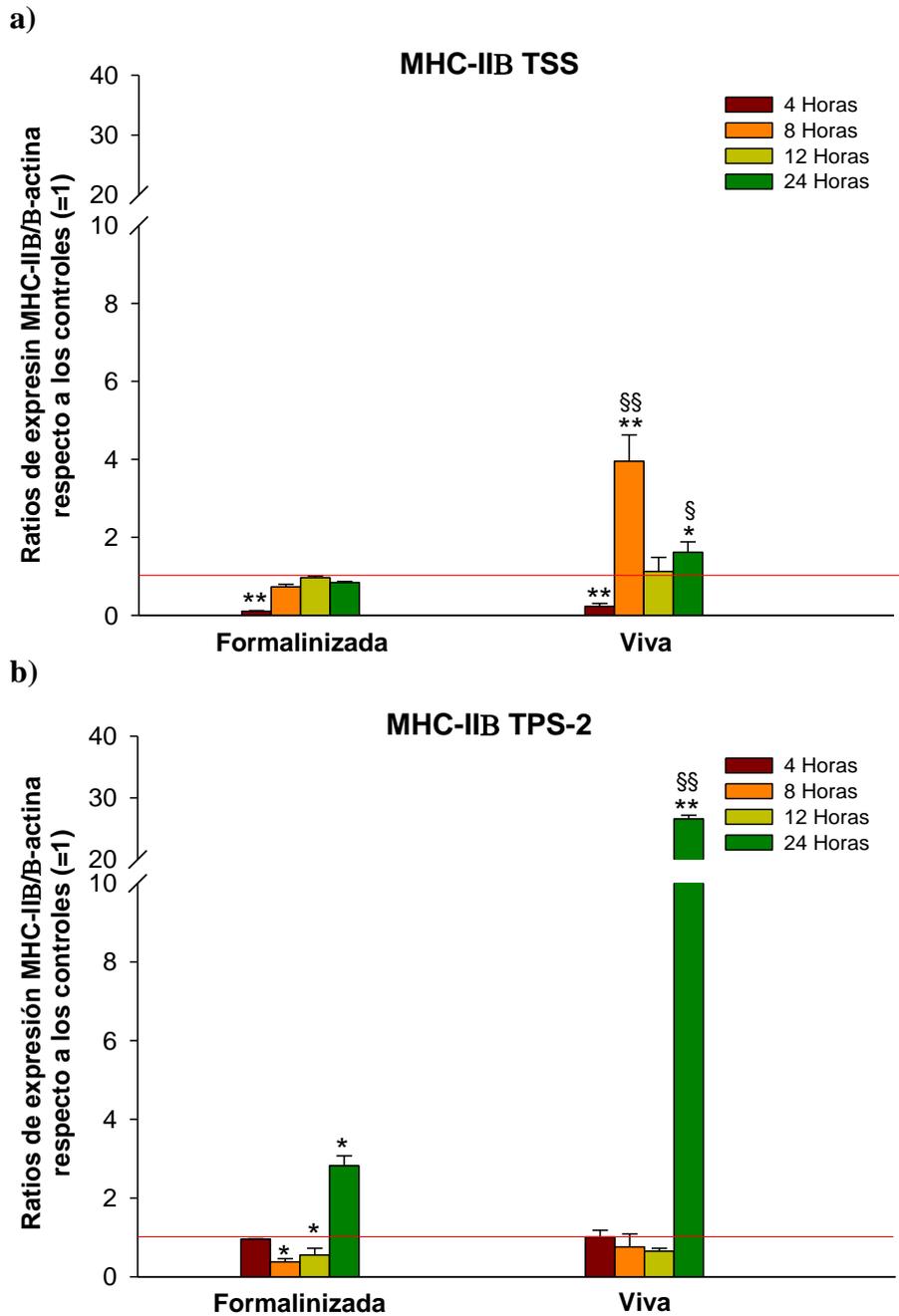


Figura 32. Expresión del gen *MHC-IIβ* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión MHC-IIβ/β-actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *TGF-β*

Las medias de las ratios de de expresión del gen *TGF-β* en los cultivos celulares de las líneas TSS y TPS-2 expuestos a las vacunas aroA se modificaron poco respecto a las de los cultivos control, presentando valores muy semejantes en ambas líneas celulares, así como para los distintos preparados vacunales (**Figura 33**). El valor medio máximo de la ratio de expresión de este gen no superó, en ningún caso, un valor de 2.

Línea celular TSS

Los cultivos de línea TSS expuestos a la vacuna formalinizada presentaron ratios de expresión del gen *TGF-β* muy próximos a uno, sin diferencias significativas respecto a los cultivos control (**Figura 33a**).

En aquellos cultivos expuestos a la vacuna viva, únicamente existían diferencias significativas frente a los controles a las 8 horas posexposición, cuando la medias de la ratio de expresión en los cultivos expuestos a la vacuna alcanzó un valor de aproximadamente 1,8 veces el de los controles (**Figura 33a**).

Al comparar los cambios en la expresión del gen *TGF-β* de la línea TSS tras la exposición a uno u otro de los dos tipos de preparados vacunales, solo había diferencias significativas entre ambos tratamientos a las 8 horas posexposición (**Figura 33a**).

Línea celular TPS-2

Las medias de las ratios de expresión del gen *TGF-β* en los cultivos de la línea TPS-2 expuestos a la vacuna formalinizada fueron muy similares a los de los controles, salvo a las 12 horas posexposición, punto en el que la ratio de expresión se reducía significativamente por debajo de la de los controles (**Figura 33b**).

En los cultivos de TPS-2 expuestos a la vacuna viva se produjo una respuesta semejante a la descrita en el párrafo anterior, entre la 4 y 12 horas posexposición incluyendo una disminución significativa de la expresión del gen *TGF-β* con

respecto a los controles a las 12 horas (**Figura 33b**). Por otra parte, se encontró un elevación significativa de la media de la ratio de expresión a las 24 horas posexposición (**Figura 33b**).

En esta línea celular, la única diferencia significativa encontrada al comparar las respuestas de expresión del gen *TGF- β* tras la exposición a los dos preparados vacunales se encontraron a las 24 horas posexposición, con una ratio media superior en los cultivos expuestos a la vacuna viva (**Figura 33b**).

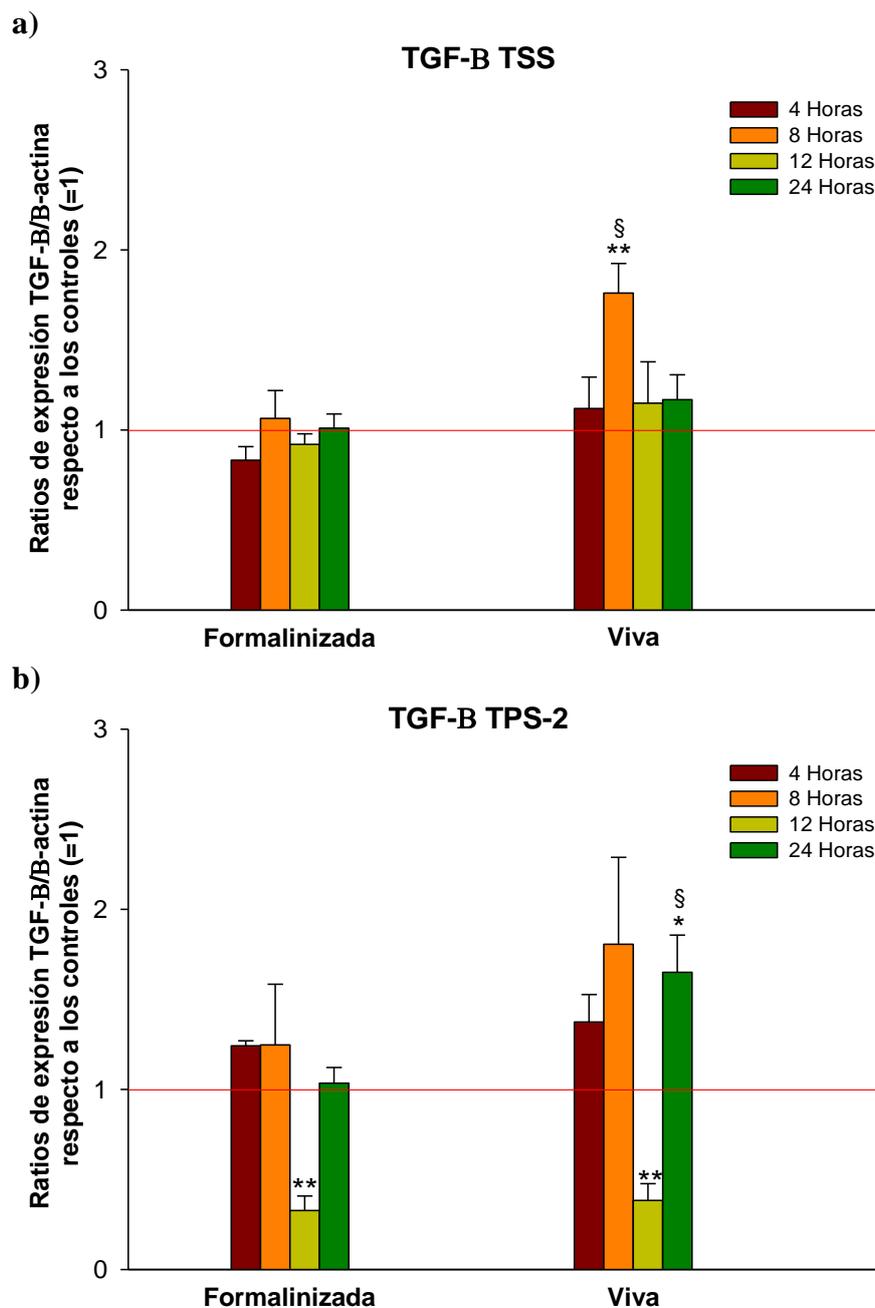


Figura 33. Expresión del gen *TGF-β* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas posexposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión TGF-β/β-actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Expresión del gen *COX-2*

La expresión del gen *COX-2* también se modificó en los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 expuestos a los preparados vacunales, pero con claras diferencias entre las dos líneas y entre la forma vacunal (**Figura 34**). Los valores más elevados de la media de la ratio de expresión para este gen se encontraron en los cultivos de la línea TPS-2 tras 8 horas de exposición a la vacuna viva (hasta 240 veces sobre el control).

Línea celular TSS

En la línea TSS la exposición a la vacuna formalinizada no indujo cambios estadísticamente significativos respecto a los controles en las medias de las ratios de expresión del gen *COX-2* (**Figura 34a**).

En cambio, la exposición a la vacuna viva produjo una respuesta temprana, con un aumento de las medias de las ratio de expresión del gen *COX-2* significativamente mayores que las de los controles a todos los tiempos (**Figura 34a**). En los cultivos expuestos a la vacuna viva, la ratio se elevó ya a las 4 horas y alcanzó su máximo valor (aproximadamente 5 veces sobre el control) a las 12 horas posexposición.

En todos los tiempos estudiados, las medias de las ratios de expresión del gen *COX-2* en los cultivos de la línea TSS expuestos a la vacuna viva fueron significativamente mayores que las de los expuestos a la formalinizada (**Figura 34a**).

Línea celular TPS-2

En la línea TPS-2, la exposición a la vacuna formalinizada solamente indujo ratios medias de expresión superiores a los de los controles a las 8 (hasta 80 veces el valor de los controles) y 12 horas posexposición (**Figura 34b**).

Los cultivos de la línea TPS-2 expuestos a la vacuna viva presentaron valores medios de ratios de expresión del gen *COX-2* significativamente superiores a los de

los controles a todos los tiempos, con valores muy altos a las 8 (aproximadamente 250 veces) y 12 horas, seguido de un brusco descenso a las 24 horas (**Figura 34b**).

Comparando las respuestas tras la exposición de los cultivos de la línea TPS-2 a los dos tratamientos, la vacuna viva inducía valores mayores que la formalinizada, con diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos (**Figura 34b**).

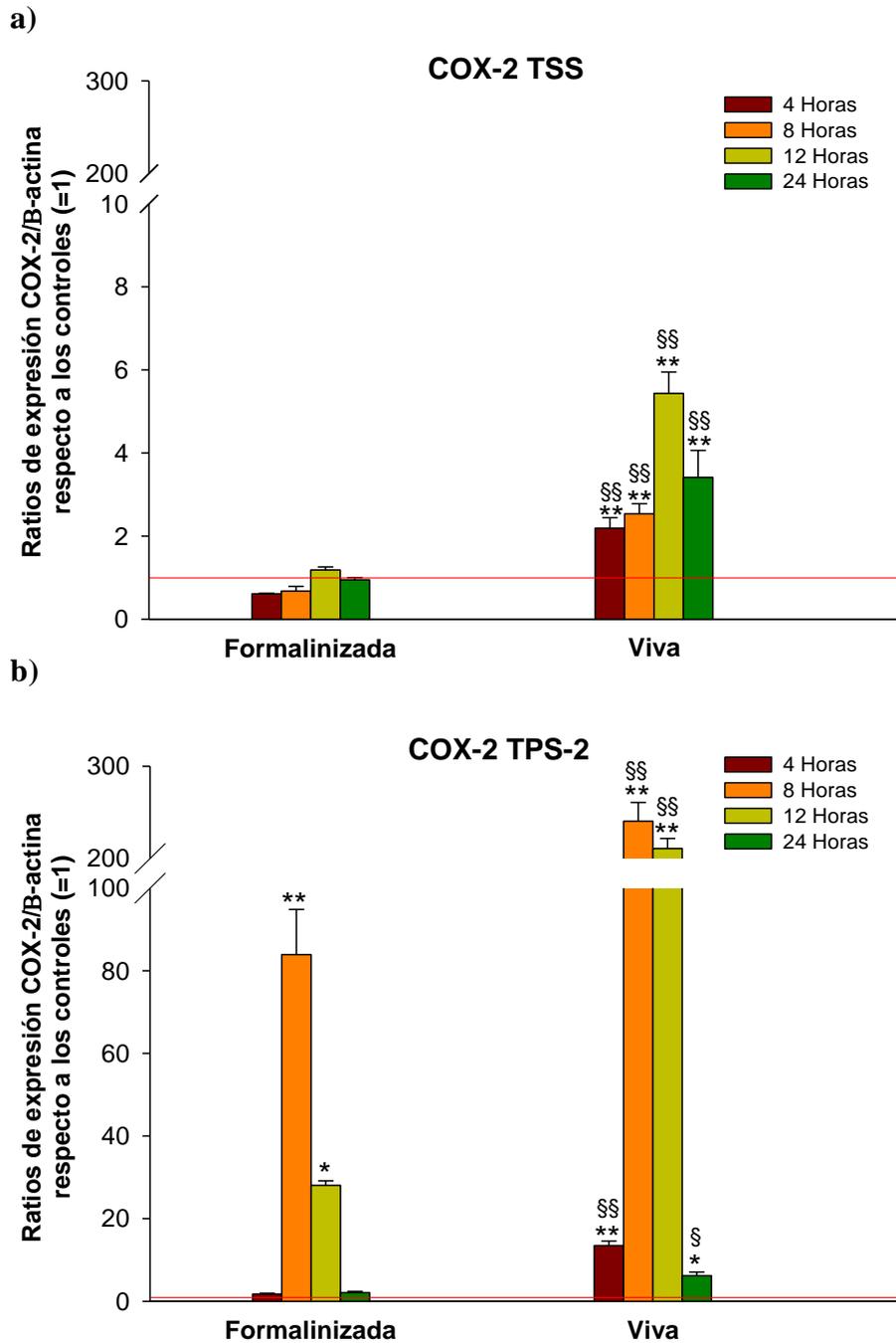


Figura 34. Expresión del gen *COX-2* en cultivos de las líneas TSS (a) y TPS-2 (b) recogidos a las 4, 8, 12 y 24 horas post exposición a la vacuna aroA formalinizada o viva. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión *COX-2*/ β -actina respecto a los controles (=1). Cada columna representa la media (n=4) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas con respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre ambos tratamientos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

———— Discusión ————

Uno de los propósitos generales de esta tesis es contribuir al conocimiento de los mecanismos inmunitarios que puedan explicar por qué una vacuna viva atenuada, en este caso formada por un mutante auxótrofo *aroA* de *A. hydrophila*, es capaz de inducir una respuesta defensiva más eficaz en trucha arcoíris (*O. mykiss*), en términos de protección frente a cepas virulentas de ese patógeno y también cruzada frente a otras bacterias del mismo género, como *A. salmonicida*, que la correspondiente vacuna inactivada formada por la misma cepa bacteriana formalinizada.

Aunque se han realizado algunos estudios con el propósito de analizar las respuestas a vacunas en peces atendiendo a la expresión de genes relacionados con la inflamación y la inmunidad, tanto con vacunas bacterianas (Martin *et al.*, 2006; Raida *et al.*, 2007; Caipang *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2011), como virales (Cuesta *et al.*, 2009; de las Heras *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010), y se han realizado comparaciones entre la eficacia (grado de protección en ensayos de vacunación–desafío) entre vacunas formadas por bacterinas o bacterias atenuadas por métodos de biología molecular de la misma especie y/o cepa (Locke *et al.*, 2010), en nuestro conocimiento, no se ha realizado una comparación entre el efecto de la misma vacuna viva e inactivada en cuanto a la expresión de genes inmunorreguladores.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en nuestro trabajo, poniendo el foco en las dos áreas de interés que hemos indicado como justificación de la Tesis. Por una parte, la posibilidad de que los conocimientos obtenidos en el estudio *in vivo* puedan contribuir a esclarecer los mecanismos inmunológicos que subyacen a la mejor protección obtenida con las vacunas vivas en peces y, también, al desarrollo de vacunas clásicas, formadas por bacterinas o por productos subcelulares, que iguallen la capacidad inmunoactivadora de la vacuna viva correspondiente. De esta forma, mientras se mantenga en vigor la normativa europea que prohíbe el uso de vacunas vivas atenuadas para uso comercial en acuicultura (EMA 2004; Directiva 2009/9/CE), estos conocimientos podrían contribuir a obtener vacunas clásicas más eficaces.

Por otra parte, la comparación entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* con los obtenidos utilizando los cultivos celulares puede ayudar al desarrollo de sistemas *in vitro* para el cribado preliminar de candidatos de vacunas e inmunostimulantes para peces, contribuyendo así a la estrategia de aplicación de métodos para reemplazar (así como de reducir y refinar) la utilización de animales vivos en procedimientos con fines científicos, que en el caso de los peces son particularmente complicados por su susceptibilidad al estrés y a cambios ambientales (Villena, 2003), por ensayos *in vitro*, tal como indica el considerando (10) de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo (Directiva 2010/63/EU).

COMPROBACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL MUTANTE *aroA* Y DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE LA VACUNA VIVA

Los primeros estudios que abordamos se dirigieron a comprobar la identidad del mutante *aroA* de *A. hydrophila* que se iba a utilizar en los diversos ensayos, lo cual se realizó confirmando sus características fenotípicas y la identificación mediante PCR del gen *aroA* de *A. hydrophila* mutado debido a la inserción del casete de resistencia a kanamicina. Los resultados obtenidos confirman que la cepa utilizada para preparar las vacunas y para inocular los cultivos de las líneas celulares es el mutante *aroA* de *A. hydrophila*, ya que todos ellos coinciden con los descritos en los trabajos previos de obtención y caracterización fenotípica y por PCR del mismo (Hernanz-Moral *et al.*, 1998; Vivas, 2003; Vivas *et al.*, 2004a).

Por otra parte, los resultados de los trabajos que realizados durante la estancia en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling (Escocia), que incluyeron un ensayo de bioseguridad y de eficacia de la vacuna *aroA* viva respecto a la formalinizada, ratifican que a la dosis de 10^7 CFUs/pez de esta vacuna es segura en *O. mykiss* y, además, que la vacuna viva confiere una protección significativamente mayor que la vacuna formalinizada frente a un desafío con la cepa virulenta IOA de *A. hydrophila*, distinta de la cepa PPD 70/91 de esta especie que se había utilizado en los estudios previos (Hernanz-Moral *et al.*, 1998; Vivas,

2003; Vivas *et al.*, 2004a; Vivas *et al.*, 2004b). De esta forma, nuestros resultados confirman también la capacidad de la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* para inducir protección frente a otras cepas de *A. hydrophila*.

EXPRESIÓN DE GENES INMUNORREGULADORES TRAS LA VACUNACIÓN

Atendiendo a sus funciones más reconocidas en la respuesta inmunitaria innata de teleósteos, los genes cuya expresión hemos analizado pueden agruparse en tres categorías:

1. Genes de productos con actividad proinflamatoria y/o microbicida, que se expresan en la fase temprana de la respuesta y que promueven o resultan de la activación y el reclutamiento de leucocitos, incluyendo las citoquinas IL-1 β IL-8 (revisado por Secombes *et al.*, 2011), el TNF- α 1, la proteína Mx-1 inducible por IFN-I (revisado por Secombes *et al.*, 2011 y Zhu *et al.*, 2012) y la enzima iNOS (Rieger *et al.*, 2011).
2. El gen de la cadena β del MHC-II, componente de las moléculas MHC-II que median el proceso de la presentación antigénica por esa vía, cuya expresión sucede durante la activación de células presentadoras de antígenos, incluyendo macrófagos que se activan de forma clásica cuando, además de PAMPs, se encuentra en un ambiente de factores asociados al perfil de respuesta inmunitaria tipo Th1 (revisado por Forlenza *et al.*, 2011).
3. Genes cuyos productos tienen una actividad anti-inflamatoria o inmunosupresora, incluyendo el TGF- β (Zhu *et al.*, 2012) y la enzima COX-2 (Ingerslev *et al.*, 2006), cuyas funciones atenúan la activación de los leucocitos activados, evitando así daños colaterales en los propios tejidos y órganos derivados de la liberación de productos microbicidas (ROS, NO, enzimas hidrolíticas...) e impidiendo la exacerbación de las respuestas inflamatoria e inmunitarias.

Las vacunas *aroA* inducen una respuesta proinflamatoria en *O. mykiss*.

En nuestro estudio, encontramos expresión basal de los genes para IL-1 β 1, IL-8, TNF- α 1, Mx-1 e iNOS en el bazo y el pronefros de los animales no vacunados. Aunque todos estos genes se consideran inducibles, un cierto nivel de expresión basal *in vivo* es esperable y así ha sido descrito en la mayoría de los estudios de vacunación o infección experimental en teleósteos (**Tabla 3**) en los que se ha analizado la expresión basal de genes inmunorreguladores en los animales control (ver, por ejemplo, Raida *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2011).

No obstante, la inoculación i.p. de bacterias de la cepa *aroA* de *A. hydrophila*, tanto vivas como formalinizadas, indujo incrementos de las ratios de expresión de esos genes, que median en mamíferos y en peces la respuesta proinflamatoria (Martin *et al.*, 2007b; Secombes *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011). Así, tras la vacunación con cualquiera de los dos preparados vacunales se observaron, tanto en el bazo como en el pronefros, incrementos significativos de la expresión de los genes de IL-1 β 1 (hasta 120.000 veces los controles para el pronefros), de IL-8 (hasta 290 veces el control en el bazo), de TNF- α 1 (hasta 80 veces el control en el bazo), de iNOS (hasta 6.000 veces los controles en el pronefros) y con menores diferencias, no siempre significativas, para el gen de Mx-1 (de hasta 11 veces los controles en el pronefros).

Además, estos incrementos en la expresión de los genes proinflamatorios se iniciaban a tiempos cortos tras la vacunación, particularmente para la vacuna viva, de forma que a las 4 horas ya se encontraban ratios de expresión significativamente elevados respecto a los controles de los genes de IL-1 β 1, Mx-1 e iNOS, todos ellos en el pronefros, y a las 8 horas de los genes de IL-8 (en bazo y pronefros) y TNF- α 1 (también en ambos órganos).

Más tardíamente, pasadas las 36 horas tras la vacunación, se observó una modulación de la intensidad de la respuesta inicial, que en términos de expresión génica estaba marcada por una extinción más temprana de la sobreexpresión de los

genes de las citoquinas, de forma que a las 48 horas las ratios de expresión de los genes de IL-1 β y del TNF- α 1 eran comparables, en bazo y pronefros, a los de los controles e igual sucedía para el gen de IL-1 β a las 72 horas. Por el contrario, la expresión de los genes de Mx-1 (en pronefros) y de iNOS (en ambos órganos) se mantenía por encima de los valores de los controles a las 72 horas, indicando que la expresión de los productos mediadores de la respuesta se mantiene más allá de la de los genes de las citoquinas inductoras de la misma.

Tanto la inducción de la expresión de esos genes, como su cinética, que observamos tras la vacunación con cualquiera de los dos tipos de vacunas aroA en *O. mykiss*, han sido también descritas en esta y en otras especies de teleósteos, bien tras la vacunación con vacunas clásicas o bien durante la infección con patógenos bacterianos o parasitarios, como se indica a continuación.

En cuanto al gen de IL-1 β , se ha descrito que su expresión se incrementaba en el bazo de *O. mykiss* a los 4 horas y en el pronefros a las 4 y 8 horas tras la vacunación con una bacterina de *Y. ruckeri* (Raida *et al.*, 2007; Harun *et al.*, 2011), a las 6 horas en el hígado y en pronefros de salmones *Oncorhynchus goshuscha* y *O. keta* tras la vacunación i.p. con una bacterina de *A. salmonicida* (Fast *et al.*, 2007) y en el pronefros del salmón atlántico (*S. salar*) a los dos días posvacunación con una vacuna comercial formada por *A. salmonicida* var *salmonicida*, *L. anguillarum* O1 y O2, y *M. viscosa* (Haugland *et al.*, 2005).

También, en cuanto a la respuesta a patógenos, en *O. mykiss* infectados i.p. con *Y. ruckeri* se observó un incremento significativo de la expresión de este gen en el bazo a las 6 horas posinoculación i.p. (Harun *et al.*, 2011) y en el hígado a los 3 días (Raida *et al.*, 2009). La infección con una cepa virulenta de *A. hydrophila* indujo un incremento de la expresión de IL-1 β en el pronefros del barbo *Puntius sarana* tras 1, 3 y 6 horas posinfección (Das *et al.*, 2011) y se ha descrito que la infección de trucha arcoíris con el parásito *I. multifiliis* (Sigh *et al.*, 2004a; Sigh *et al.*, 2004b) y de carpa común con *Trypanoplasma borreli* (Saeij *et al.*, 2003b) provoca el aumento de los niveles de expresión de esta citoquina a las 24 horas

posinoculación en piel, bazo, pronefros e hígado. En aquellos estudios en los que se analizó la expresión de este gen a tiempos comparables a los utilizados en este trabajo, también se describió un descenso de su expresión a tiempos posteriores a las 36 horas cuando el patógeno era eliminado del huésped, como por ejemplo, en modelos experimentales de vacunación-desafío (Harun *et al.*, 2011) o de reinfección de peces supervivientes con *Y. ruckeri* (Raida *et al.*, 2008b).

Respecto a la expresión temprana del gen de la IL-8, en otros estudios también se ha descrito este fenómeno a tiempos cortos tras la vacunación y/o la infección experimental de teleósteos, a veces de forma dependiente del patógeno y del tejido (Alejo *et al.*, 2011). Por ejemplo, la expresión del gen de la IL-8 se incrementaba en el pronefros y el bazo de *O. mykiss* tras la vacunación por baño con una bacterina de *Y. ruckeri* y/o inoculada con este patógeno, pero no si se inoculaba con el virus de la septicemia hemorrágica viral (Wiens *et al.*, 2006). Igualmente, en el bazo de *O. mykiss* la infección con *Y. ruckeri* provocaba un aumento de la expresión de IL-8 a las 8 horas posinfección (Raida *et al.*, 2008b).

El incremento de la expresión del gen de TNF- α 1 en el bazo y pronefros también se ha descrito en salmones (*O. gosbuscha* y *O. keta*) vacunados i.p. con una bacterina de *A. salmonicida* a las 6 horas posvacunación (Fast *et al.*, 2007) y a las 24 horas en el bazo de *O. mykiss* infectados i.p. con *Y. ruckeri* (Raida *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2011), así como en pez cebra tras la inoculación con bacterias vivas e inactivadas de *A. hydrophila* (Rodríguez *et al.*, 2008). Del mismo modo, se ha demostrado una expresión incrementada del gen de TNF- α durante infecciones con IHVN, *I. multifiliis* y *G. derjavini* en trucha arcoíris (Lindenstrøm *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2004; Sigh *et al.*, 2004a).

En referencia a la expresión de la proteína Mx-1, al igual que lo descrito en nuestro estudio, en distintos ensayos realizados en salmón atlántico, vacunados con una vacuna multivalente (con bacterinas de *A. salmonicida* var *salmonicida*, *L. anguillarum* O1 y O2 y *M. viscosa*), infectados con virus (ISAV o IPNV) o expuestos a poly I:C, se ha visto como la inducción de los genes de las proteínas Mx

se produce rápidamente, alcanzándose los máximos niveles de expresión en los primeros tiempos de muestreo (24-48 horas) (Jensen *et al.*, 2002a; Jensen *et al.*, 2002b; Haugland *et al.*, 2005). Así mismo, estos autores también observaron grandes diferencias interindividuales en los niveles de expresión de los genes de Mx, tanto en los individuos control como en los experimentales.

El papel de la enzima iNOS en trucha ha sido materia de discusión, porque los niveles de NO producidos por los leucocitos de esta especie son muy bajos (Bridle *et al.*, 2006). No obstante, tras su identificación (Laing *et al.*, 1999) y clonación del gen de iNOS en trucha *O. mykiss* (Wang *et al.*, 2001), se ha descrito su expresión en macrófagos estimulados con LPS (Laing *et al.*, 1999) y en pronefros y branquias de esta especie a las 48 horas tras la inoculación i.p. con una cepa atenuada de *A. salmonicida* (Laing *et al.*, 1999) y a las 24 horas tras la inoculación i.p. o por baño con *R. salmoninarium* (Campos-Perez *et al.*, 2000b).

En conjunto, podemos afirmar que, a tiempos entre 4 y 36 horas tras la inoculación i.p. con las vacunas aroA de *A. hydrophila*, los perfiles de expresión de los genes de las citoquinas IL-1 β 1, IL-8, TNF- α 1, de la proteína Mx-1 y de la enzima iNOS se corresponden con los descritos previamente para la inducción de una respuesta proinflamatoria, que participan en los mecanismos de la defensa inmunitaria innata, pero también de inducción de la respuesta inmunitaria específica (Forlenza *et al.*, 2011).

Así, el incremento temprano de la producción de IL-1 β 1, producida principalmente por macrófagos, es uno de los procesos claves en el inicio de la respuesta inflamatoria y junto con el TNF- α estimula la fagocitosis y el estallido respiratorio en macrófagos y granulocitos tras la exposición a LPS y bacterias gram negativas (Secombes *et al.*, 2001; Peddie *et al.*, 2002a). Además, se ha demostrado que la estimulación *in vitro* de leucocitos de pronefros de trucha arcoíris con IL-1 β recombinante aumenta la fagocitosis y la expresión de COX-2, lisozima y MHC-II β (Hong *et al.*, 2001).

Por su parte, al igual que en mamíferos, la actividad de la IL-8 en peces se ha asociado al reclutamiento de neutrófilos, y en menor medida de macrófagos y linfocitos-T, y a su activación y adhesión a los sitios de infección o daño (Zhang *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2006). Esto se ha demostrado *in vitro* utilizando leucocitos de *O. mykiss* estimulados con IL-8 recombinante (Harun *et al.*, 2011). Por otro lado, los neutrófilos, que son los leucocitos infiltrantes predominantes durante una respuesta inflamatoria aguda en la cavidad peritoneal de peces (Afonso *et al.*, 1998), también liberan IL-8, lo que incrementa el reclutamiento de más neutrófilos y así se refuerza la respuesta inflamatoria (Fast *et al.*, 2007).

En mamíferos, el TNF- α – para cuya producción se requiere del estímulo combinado de IFN- γ , producido por linfocitos Th1, y de algún tipo de PAMPs (Mosser *et al.*, 2008) – es uno de los factores clave para la activación de macrófagos por la vía clásica, los cuales son activos productores de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, además de potenciar la producción de más TNF- α (Forlenza *et al.*, 2011). En teleósteos se ha descrito el efecto de TNF- α y de IFN- γ recombinantes sobre la activación de macrófagos (revisado por Forlenza *et al.*, 2011). La actividad de IFN- γ solo o de este junto con TNF- α en la inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias, activación de la fagocitosis y de la producción de NO en macrófagos parece bastante comprobada, pero la del TNF- α solo parece ser mucho más débil, al menos en *C. carpio*, *D. rerio* y *S. aurata* (Roca *et al.*, 2008; Forlenza *et al.*, 2009).

Aunque en nuestro estudio no se ha incluido el estudio de la expresión del gen de IFN- γ , si que hemos observado incrementos significativos de la expresión del gen de la proteína Mx-1, que es un reflejo de la estimulación celular inducida por IFN-I (α/β), el cual – al menos en estudios *in vitro* en la línea de células de pronefros SHK-1 de salmón atlántico – es capaz de inducir la activación de genes para citoquinas y quimioquinas (Martin *et al.*, 2007a). A pesar de que Mx-1 se produce fundamentalmente en respuesta a infección viral y tiene una importante función antiviral, se ha descrito que la expresión de proteínas Mx también puede ser inducida tras la inyección de bacterinas de *Vibrio sp.*, de *L. anguillarum* y LPS en

salmón atlántico (Acosta *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2004; Haugland *et al.*, 2005). En esos casos, las moléculas responsables de la activación de la vía de IFN podrían ser tanto el LPS como el DNA bacteriano. Así, el DNA bacteriano presenta motivos CpG no metilados capaces de inducir IFN a través de la unión a TLR9, que está presente en teleósteos (Palti, 2011).

Por otra parte, mientras que el LPS bacteriano induce la producción de IFN en mamíferos a través del TLR4 (Kawai *et al.*, 2006), en la mayoría de los teleósteos, con la excepción de ciprínidos, no se ha encontrado un gen ortólogo de TLR4 (Palti, 2011) y en las especies en las que se ha descrito un parálogo de ese gen, como el pez cebra, la respuesta a LPS es independiente del mismo (Sepulcre *et al.*, 2009). No obstante, se ha indicado que la activación de macrófagos de trucha arcoíris con LPS, al menos *in vitro*, podría deberse a la presencia de pequeñas cantidades de peptidoglucanos en los preparados no ultrapurificados de LPS (MacKenzie *et al.*, 2010).

En cuanto a la expresión del gen de iNOS, esta es inducida en macrófagos y granulocitos por citoquinas proinflamatorias, tal como se ha demostrado en ciprínidos y en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) para IFN- γ , TNF- α , y la citoquina M17, miembro de la familia de IL-6 (Rieger *et al.*, 2011). La actividad de iNOS se ha asociado típicamente a respuestas defensivas frente a patógenos intracelulares, puesto que el NO tiene una potente actividad microbicida en macrófagos y granulocitos de peces contra patógenos bacterianos y virales (Campos-Perez *et al.*, 2000a) y revisado por (Rieger *et al.*, 2011). No obstante, al igual que en mamíferos, en peces el NO extracelular, además de poder producir daños en los tejidos cuando se libera en cantidades importantes, tiene importantes funciones mediadoras de la inflamación, incluyendo el aumento de la permeabilidad vascular (Eddy, 2005; Koppang *et al.*, 2007).

En conclusión, nuestros resultados referidos a la expresión de los genes IL-1 β 1, IL-8, TNF- α 1, Mx-1 e iNOS en *O. mykiss* tras la administración i.p. de las vacunas aroA de *A. hydrophila*, viva o formalinizada, coinciden con los descritos en

otros trabajos, tanto para trucha arcoíris como otras especies de teleósteos, en los que se analizó la expresión de esos genes tras la vacunación con bacterinas o la infección experimental con patógenos bacterianos o virales, en los cuales los cambios de intensidad de la expresión génica y sus patrones de variación temporal se interpretaron como reflejo de la inducción de una respuesta inflamatoria.

Expresión del gen de la cadena MHC-II β y su posible relación con la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa.

En nuestro estudio los peces control, no vacunados, mostraban expresión basal de gen de MHC-II β , pero en los vacunados – con cualquiera de las dos vacunas – se observaron incrementos significativos de la misma, tanto en el bazo como en el pronefros, con valores de hasta 12 veces (en el bazo) superiores a los de los controles. En ambos órganos, el incremento de la expresión en los peces vacunados ya ocurría a las 4 horas posvacunación, pero en el bazo la expresión mostró un patrón de subidas y bajadas alternadas a lo largo del tiempo, con picos de expresión a las 36 horas, mientras que en el pronefros el patrón tendía a ser en escalera con los valores más elevados a las 72 horas.

La expresión basal de moléculas MHC-II es un hecho descrito también en otros trabajos en los que se estudió su expresión en peces control, no vacunados ni inoculados experimentalmente con patógenos (Tafalla *et al.*, 2005; Raida *et al.*, 2008a; Raida *et al.*, 2008b), y se atribuye a la presencia en los órganos linfoides de diversas poblaciones de células presentadoras de antígenos, incluyendo, fundamentalmente, monocito-macrófagos (Rodrigues *et al.*, 1995) y células dendríticas (Koppang *et al.*, 2003), aunque también se puede inducir su expresión en otros tipos celulares, como las células endoteliales (Roca *et al.*, 2008).

Los incrementos en la expresión del gen de MHC-II también han sido descritos en otros trabajos tras la vacunación y/o la infección de peces. Así, la vacunación de trucha arcoíris con una bacterina de *Y. ruckeri* provocó un aumento de los niveles de expresión de MHC-II en el bazo en todos los tiempos

posvacunación analizados, desde las 8 hasta las 72 horas (Raida *et al.*, 2008a) y resultados semejantes se observaron en esa especie vacunada i.p con una cepa de *A. salmonicida* (Kollner *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha descrito que tras la vacunación de salmón atlántico con una vacuna multivalente formada por *A. salmonicida* var *salmonicida*, *L. anguillarum* O1 y O2, y *M. viscosa*, los niveles de MHC-II en pronefros no variaron entre los 2 y los 19 días posvacunación (Haugland *et al.*, 2005).

La alternancia entre picos y descensos en la expresión de este gen a lo largo del tiempo también ha sido descrita en el pronefros y bazo de trucha arcoíris infectadas con IHNV (Hansen *et al.*, 2002), en la sangre de salmón atlántico vacunadas con una vacuna multivalente formada por *A. salmonicida* var *salmonicida*, *L. anguillarum* O1 y O2, y *M. viscosa* (Haugland *et al.*, 2005) y en dorada (*S. aurata*) tras la inyección i.p. de cepas vivas de *L. anguillarum* (Chaves-Pozo *et al.*, 2005). En todos estos trabajos, las variaciones se atribuyeron a la migración de las células que expresan MHC-II (macrófagos activados, células dendríticas y otras células, como linfocitos-B) desde el punto de inoculación o hacia el mismo.

La expresión aumentada del MHC-II se relaciona con el potencial incremento de la estimulación antigénica de células Th, a través del fenómeno de la presentación antigénica vía MHC-II, y la consecuente inducción de una respuesta inmunitaria adquirida (Haugland *et al.*, 2005). No obstante, es interesante considerar el tipo de respuesta inducida en cuanto a los tipos Th1 y Th2 de respuesta inmunitaria adquirida, asociados a diferentes perfiles de expresión de citoquinas y el tipo de respuesta efectora. En mamíferos, las respuestas de tipo Th1 median fundamentalmente la inmunidad celular adquirida y están implicadas en las respuestas contra patógenos intracelulares, mientras que las de tipo Th2 se relacionan con la inmunidad humoral adquirida y tienen actividad antiparasitaria (Amsen *et al.*, 2009).

En las respuestas Th1 predomina la producción de IFN- γ y TNF- α , mientras que en las Th2 predominan IL-4, IL-5 y IL-13 (Zygmunt *et al.*, 2011). El origen de estas citoquinas son las propias células Th, pero la diferenciación de las mismas parece estar dirigida por las APCs, las cuales presentan también perfiles tipo Th1 (con producción de IL-12) y Th2 (que producen IL-10), además de células NK (que liberan IFN- γ) (Jankovic *et al.*, 2001; Manickasingham *et al.*, 2003).

En teleósteos la existencia de respuestas Th1 y Th2 parece demostrada, aunque no se han identificado subpoblaciones de linfocitos Th (Laing *et al.*, 2011) y no se conocen bien los detalles de la inducción de las mismas debido a que no se ha podido estudiar conclusivamente el efecto biológico de la citoquinas mediadoras de las mismas, bien porque no se han clonado o porque sus efectos no son tan claros y a veces son distintos según la especie utilizada (Secombes *et al.*, 2011). No obstante, se ha demostrado que en *O. mykiss* se expresan los genes de los factores de transcripción T-bet y GATA3 (Wang *et al.*, 2010; Laing *et al.*, 2011), que en mamíferos son reguladores maestros de las respuestas Th1 y Th2 respectivamente (Zheng *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo no hemos analizado la expresión de los genes de T-bet y GATA3 ni de IFN- γ , pero los resultados referidos a las citoquinas, aun indirectamente, indican que las vacunas aroA de *A. hydrophila* inducen una respuesta de tipo Th1 en *O. mykiss* cuando son administradas intraperitonealmente. Así, además de la expresión aumentada de los genes de TNF- α 1 y Mx-1 (este último como indicador de la activación de IFNs), el incremento en la expresión de iNOS y de MHC-II se puede relacionar con la activación clásica de macrófagos, que median respuestas de tipo Th1 (Forlenza *et al.*, 2011). En este sentido, cabe indicar que – como se ha expuesto anteriormente – la expresión de iNOS es inducida en peces por IFN- γ , TNF- α y IL-6 (Rieger *et al.*, 2011) y que la expresión de la cadena MHC-II β es inducida en trucha arcoíris, además de por IL-1 β recombinante (Hong *et al.*, 2001), por IFN- γ recombinante (Zou *et al.*, 2005). Todo ello sugiere que, muy probablemente, las vacunas aroA induzcan también la expresión de IFN- γ a tiempos tempranos tras la vacunación.

En cuanto a la hipótesis de la inducción de una respuesta Th1 tras la inoculación de *O. mykiss* con la cepa *aroA* de *A. hydrophila*, esto mismo se ha sugerido que sucede en trucha usando el modelo de vacunación – infección con *Y. ruckeri* (Harun *et al.*, 2011). En ese estudio los patrones de expresión temprana, hasta las 72 horas, de los genes de IFN- γ , T-bet y IL-2 se correlacionaban en los peces vacunados y posteriormente desafiados con *Y. ruckeri* se correspondían con los de una respuesta tipo Th1. Tanto para *Y. ruckeri* como para *A. hydrophila* este tipo de respuesta tiene sentido, dado que ambas son patógenos intracelulares facultativos, que pueden infectar a los macrófagos (Tan *et al.*, 1998; Ryckaert *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012) y frente a las cuales las respuestas de tipo Th1 son más eficaces para evitar la enfermedad (Harun *et al.*, 2011).

Por tanto, nuestros resultados referidos a la expresión del gen de la cadena β de MHC-II, combinados con los de la expresión del gen de iNOS y de TNF- α 1, apoyan que las vacunas *aroA* de *A. hydrophila* son capaces de estimular una respuesta inmunitaria que, a tiempos tempranos, tras la vacunación i.p. tiene un perfil de tipo Th1, lo cual podría resultar en la producción de una respuesta inmunitaria adaptativa celular de ese tipo, además de la producción de anticuerpos que ya se demostró en los estudios previos (Hernanz-Moral *et al.*, 1998; Vivas *et al.*, 2005).

Modulación de la respuesta proinflamatoria: expresión de los genes de TGF- β y de COX-2

En nuestros resultados observamos que, al igual que sucedía para la citoquinas proinflamatorias, los genes de TGF- β y de la enzima COX-2 presentaban expresión basal en el bazo y el pronefros de los peces control. No obstante, tras la vacunación, bien con uno u otro tipo de vacuna *aroA*, la expresión de estos genes presentaba cambios significativos respecto a los controles, distintos a lo largo del tiempo según el gen y el órgano, pero que se iniciaban a tiempos superiores a las 8 horas posvacunación, alcanzando picos de expresión entre las 12 y 36 horas, posteriores a los de los genes de las citoquinas proinflamatorias.

La expresión del gen de TGF- β estaba reprimida en el bazo de los peces vacunados con cualquiera de las vacunas aroA, mientras que se incrementaba en el pronefros con un pico de hasta 12 veces el valor del control a las 12 horas en el caso de la vacuna viva. Posteriormente, la expresión descendía en este órgano significativamente, incluso con una pequeña represión respecto al control.

Un perfil de respuesta parecido, incluyendo la expresión basal y un inicio de incremento de la expresión del gen de TGF- β más tardío que el de los genes de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β 1, IL-6, IL-11), se ha descrito en trucha en los modelos de infección-reinfección experimental y de vacunación-desafío con *Y. ruckeri* (Harun *et al.*, 2011) y de vacunación con una vacuna de DNA contra VHSV (Jimenez *et al.*, 2006). No obstante, a diferencia con nuestros resultados, en el modelo de vacunación – desafío con *Y. ruckeri* la expresión del gen de TGF- β , al igual que el de TNF- α , permanecía significativamente más elevada a las 72 horas en el bazo de los peces vacunados y desafiados (Harun *et al.*, 2011). Esto podría ser debido a la retención en ese órgano (principalmente en las áreas perielipsoidales) de complejos antígeno-anticuerpo, que se forman en los peces vacunados, lo cuales reestimularían de forma más persistentes la respuesta inmunitaria.

En cuanto a la expresión del gen de COX-2, en las truchas vacunadas con las vacunas aroA se alcanzaron picos de más de 2000 veces los controles en el bazo, pero en este órgano los picos se alcanzaba más tardíamente que en el pronefros, en el cual los valores descendían a partir de las 12 horas posvacunación. La expresión basal de este gen se ha descrito también en pronefros, bazo y branquias de individuos de *S. salar* “sanos” (Ingerslev *et al.*, 2006) y se incrementaba en leucocitos de pronefros de trucha tras ser desafiadas *in vivo* con la cepa atenuada aroA de *A. salmonicida* (Zou *et al.*, 1999b). Igualmente, la infección de truchas arcoíris con los parásitos *G. derjavini* (Lindenstrøm *et al.*, 2003) o *M. cerebralis* (Severin *et al.*, 2007) induce la expresión de COX-2 en piel, músculo y cartílago.

Tanto el TGF- β como COX-2 son productos con actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora (Raida *et al.*, 2008b), que también se han identificado en

teleósteos. El TGF- β presenta efectos pleiotróficos inmunosupresores y de inhibición de la activación celular de leucocitos (Ruscetti *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 1994; Severin *et al.*, 2007; Haddad *et al.*, 2008), especialmente de los obtenidos de pronefros de carpa (Yang *et al.*, 2012), mientras que la enzima COX-2 es la fuente de la prostaglandina H_2 , cuyos derivados, tanto prostaglandinas como tromboxanos reducen la expresión de los genes de IL-1 β , TNF- α e IL-8, inhiben la proliferación de leucocitos y el estallido respiratorio (Secombes *et al.*, 1994b; Novoa *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 2002;), así como la expresión de iNOS (Haddad *et al.*, 2008).

Por tanto, la expresión de esos genes se relaciona con el control de las respuestas inflamatorias e inmunitarias, cuya exacerbación puede producir efectos colaterales lesivos para el huésped (Finn *et al.*, 1971; Koppang *et al.*, 2007). Estos efectos incluyen daños celulares y tisulares (por liberación de radicales oxidativos y de enzimas hidrolíticas, así como por la inducción de apoptosis) y, finalmente, la aparición de granulomas asociados a hiperreactividad de la respuesta inmunitaria adquirida (Afonso *et al.*, 2005). El mismo tipo de daños colaterales lesivos, asociados a respuestas inflamatorias o de hiperinmunidad, se han observado en teleósteos, tanto en el curso de infecciones naturales o experimentales, especialmente con patógenos intracelulares como *R. salmoninarum* (Metzger *et al.*, 2010) o *Mycobacterium marinum* (Harms *et al.*, 2003; Swaim *et al.*, 2006), como tras la vacunación i.p. o intramuscular con vacunas que contienen agentes flogísticos (Poppe *et al.*, 1997; Evensen *et al.*, 2005; Mutoloki *et al.*, 2010).

Es interesante indicar que en el modelo de vacunación-desafío con *Y. ruckeri* en trucha (Harun *et al.*, 2011) se correlacionó los distintos perfiles de expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias y de TGF- β con un balance entre factores pro- y anti-inflamatorios, que reduzca los posibles efectos colaterales de una sobreexpresión de los genes con actividad proinflamatoria. Además, los autores de ese trabajo sugieren que ese patrón de expresión de genes inmunorreguladores contribuiría a una extinción temprana de la respuesta de perfil Th1, cuya exacerbación se ha relacionado con los síntomas asociados a la enfermedad de la boca roja (ERM) producida por *Y. ruckeri* (Raida *et al.*, 2008b).

En conclusión, nuestros resultados referidos a la expresión de los genes de TGF- β y de COX-2 son indicativos de la producción de una respuesta anti-inflamatoria, de forma semejante a lo que se ha descrito en otros estudios de infección natural o experimental y de vacunación en teleósteos, cuyo significado sería reprimir la producción de citoquinas proinflamatorias y evitar así una excesiva reacción inflamatoria y la posible generación de hiperreactividad inmunitaria.

RESPUESTAS DE LAS LÍNEAS CELULARES TSS Y TPS-2 A LAS VACUNAS aroA

En los vertebrados, generalmente se atribuye la producción de citoquinas y las actividades microbicidas que regulan y median las respuestas defensivas a las distintas poblaciones leucocitarias, especialmente macrófagos, granulocitos, células dendríticas y células linfoides (linfocitos-T y células NK) (Medzhitov, 2007). No obstante, otros tipos celulares también tienen capacidad de producir citoquinas proinflamatorias y manifestar actividades microbicidas cuando son expuestas a PAMPs.

Por ejemplo, diversas poblaciones celulares residentes (como fibroblastos) de los tejidos conectivos, incluyendo aquí conjuntivo, adiposo, cartílago y hueso en los vertebrados adultos producen IL-1 e IFN-I (Ibelgaufs, 2012). En ese sentido, se ha demostrado que tanto fibroblastos de la dermis de trucha arcoíris en respuesta a una lesión local, como una línea de fibroblastos derivada de la dermis (RTHDF) estimulada con LPS, eran capaces de producir IL-1 β , IL-8 e IL-10 (Ingerslev *et al.*, 2010). También, las células endoteliales son una fuente de estas interleuquinas y de otras citoquinas, lo cual sucede igualmente en teleósteos (Martin-Armas *et al.*, 2008; Roca *et al.*, 2008). Además, las células sinusoidales del tejido hematopoyético y de otros órganos como el hígado y, en los teleósteos, del endocardio, participan en respuestas antimicrobianas mostrando actividad fagocítica y de producción de radicales oxidativos de oxígeno y nitrógeno (Martin-Armas *et al.*, 2008; Roca *et al.*, 2008).

Como demostraron los estudios previos de nuestro grupo de trabajo, tanto morfológicos como funcionales (Diago *et al.*, 1993; Diago *et al.*, 1995; Diago, 1996; Carracedo, 2003; Fierro-Castro, 2009), las líneas celulares TPS-2 de pronefros y TSS de bazo que hemos utilizado en este trabajo contienen poblaciones celulares del estroma linfohematopoyético, incluyendo células reticulares y células sinusoidales. De esta forma, nuestra hipótesis de partida es que las respuestas que observaríamos en las líneas TSS y TPS-2 tras su exposición a las vacunas *aroA* deberían ser un reflejo, si bien parcial, de las respuestas *in vivo* de estos tipos celulares frente al mismo tipo de estímulos, en este caso PAMPs derivados de las bacterias *aroA*.

En primer lugar, a fin de estandarizar las condiciones de exposición de las líneas celulares a las vacunas *aroA*, demostramos que las bacterias de la vacuna viva no podían crecer en el medio de cultivo celular en presencia de una concentración de 50 µg/ml del antibiótico gentamicina. De esta forma, podemos afirmar que no hay proliferación significativa de las bacterias que permanecían en los cultivos tras el lavado posterior al inóculo. Si sucediera este crecimiento, incluso siendo limitado dado el carácter auxótrofo del mutante *aroA*, podría alterar la M.O.I. real entre unos pocillos y otros y, consecuentemente, la concentración de PAMPs (por ejemplo, LPS) a las que estuvieran expuestas la células.

A continuación, el estudio de las respuestas de las líneas celulares TSS y TPS-2 de *O. mykiss* expuestas a las vacunas *aroA* de *A. hydrophila* incluyó el análisis de los efectos en la morfología celular, en la activación de mecanismos microbicidas y en la expresión de los genes relacionados con las respuestas proinflamatoria e inmunitarias, incluyendo los genes de las citoquinas IL-1β, IL-8, TNF-α1 y TGF-β, de la proteína Mx-1, de las enzimas COX-2 e iNOS, así como de la cadena β del MHC-II.

Los resultados de esos ensayos demuestran que, aún con diferencias entre las dos líneas celulares, las vacunas *aroA* estimulan respuestas defensivas en ambas, que incluyen la activación de mecanismos microbicidas y de una respuesta

transcriptómica de tipo proinflamatoria y de regulación de las respuestas inmunitarias, como se discute posteriormente.

Antes de ello, como una reflexión general y en referencia a las diferencias observadas en los diversos ensayos entre las respuestas, bien cualitativas o cuantitativas, de las dos líneas celulares, como ya se indicó en trabajos previos de nuestro grupo con estas líneas celulares (Carracedo, 2003; Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012), las mismas pueden ser, inicialmente, atribuidas a las diferentes proporciones de los diversos tipos celulares que las forman, particularmente células reticulares y células sinusoidales, antes que a una o más características específicas presentes en una de ellas y ausente en la otra. Nuestros resultados demuestran que los cultivos control de las dos líneas celulares presentan niveles de expresión basal de los distintos genes analizados muy semejantes, lo que claramente apoya esa idea.

No obstante, es posible que también existan otras causas que contribuyan a esas diferencias en las respuestas de las dos líneas celulares tras la estimulación, incluyendo diferencias entre los tipos fenotípicamente semejantes (fibroblásticas o sinusoidales) dependientes del órgano de origen, o fenómenos de interacciones célula-célula o a través de factores liberados al medio de cultivo con efectos de retroalimentación positiva o negativa, como se ha indicado previamente (Fierro-Castro, 2009).

Las vacunas aroA activan respuestas microbidas en las líneas celulares TSS y TPS-2.

La exposición a uno u otro tipo de vacuna aroA no indujo cambios apreciables en la morfología celular de las líneas celulares TSS y TPS-2, pero a partir de las 24 horas se hizo evidente la presencia de bacterias que aparecían bien adheridas a la superficie celular o bien en grupos intracelulares, tanto en una línea celular como en la otra. Con la técnica utilizada es difícil asegurar si las bacterias son realmente intracelulares, aunque el aspecto de acúmulos compactos en el

citoplasma así lo sugiere y las dos líneas celulares tienen capacidad fagocítica y endocítica (Carracedo, 2003).

Por otra parte, mientras que en el caso de los cultivos expuestos a la vacuna *aroA* formalinizada la presencia de bacterias intracelulares se debería, indudablemente, a su fagocitosis, en el caso de la vacuna viva podría atribuirse también a la capacidad infectiva de *A. hydrophila*, dado que la misma es un patógeno intracelular facultativo (Merino *et al.*, 1997a; Merino *et al.*, 1997b; Tan *et al.*, 1998). Aunque no podemos concluir que la presencia de las bacterias *aroA* de *A. hydrophila* vivas se deba a su capacidad infectiva, esta idea concuerda con los resultados de un trabajo previo de J. Vivas (Vivas, 2003), realizado con la línea TPS-2 expuesta a esa cepa, y en el que se utilizó una técnica de tinción fluorescente para diferenciar bacterias viables de las no viables (kit Live/Dead BacLight, Molecular Probes), que demostró que las mismas se adhieren y son internalizadas por las células TPS-2.

De cualquier forma, la exposición a las bacterias de la cepa *aroA*, especialmente en el caso de la vacuna viva, fue capaz de inducir de forma muy rápida la activación de la producción de radicales oxidativos en las dos líneas celulares, particularmente en la TSS (con un valor superior a 2,5 veces el del control a 1 hora posexposición). Esta respuesta es similar a la explosión respiratoria que sucede en macrófagos y granulocitos neutrófilos expuestos a PAMPs y que tiene naturaleza microbicida (Neumann *et al.*, 2001), lo que puede relacionarse con la actividad microbicida de las líneas TSS y TPS-2 contra la cepa silvestre AG-2 de *A. hydrophila* (Fierro-Castro *et al.*, 2012). Para las dos líneas celulares aquí utilizadas, la activación de este mecanismo probablemente suceda en las células de tipo sinusoidal, a través del reconocimiento de PAMPs presentes en las vacunas *aroA* de *A. hydrophila*, bien a nivel extracelular o intracelular, como indica el hecho de que la inducción de la producción de explosión respiratoria y de la actividad microbicida contra *A. hydrophila* en células de las líneas TSS y TPS-2 es estimulado por su exposición a LPS o poly I:C (Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012).

Además del reconocimiento directo de PAMPs de la cepa aroA de *A. hydrophila*, la activación del estallido respiratorio se ha atribuido también al efecto de citoquinas, como TNF- α e IL-8 (Rieger *et al.*, 2011), que como indican nuestros resultados de expresión génica, se producirían en los cultivos expuestos a las vacunas. En el caso del TNF-a, se ha indicado que este factor activa directamente el estallido respiratorio en las células endoteliales de peces (Roca *et al.*, 2008; Forlenza *et al.*, 2009).

De esa forma, la mayor producción de radicales oxidativos por la línea TSS puede ser atribuida a la mayor proporción de células sinusoidales que contiene esta línea celular (Carracedo, 2003; Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012). En cuanto a las diferencias entre la exposición a los dos tipos de vacuna, este aspecto se discute posteriormente (ver Apartado “**La vacuna aroA viva es más efectiva en la inducción de la respuesta proinflamatoria**”, pág. 185).

Como conclusión de este parte del trabajo, podemos afirmar que las líneas TSS y TPS-2 son capaces de responder a la exposición a las vacunas aroA de *A. hydrophila* mediante la activación de respuestas microbicidas, que incluyen la fagocitosis/internalización de las bacterias y la activación del mecanismo de explosión respiratoria.

Expresión de genes inmunorreguladores en las líneas celulares expuestas a las vacunas aroA.

Como se ha realizado anteriormente para los estudios de vacunación, se discuten a continuación los resultados de los estudios de expresión génica en las líneas celulares agrupando los genes considerados en tres grupos: a) Genes de productos con actividad proinflamatoria y/o microbicida (*IL-1 β 1*, *IL-8*, *TNF- α 1*, *Mx-1*, *iNOS*); b) el gen *MHC-II β* , implicado en la presentación antigénica; y c) genes con actividad anti-inflamatoria (*TGF- β* y *COX-2*).

Las vacunas aroA inducen la expresión de genes proinflamatorios en las líneas celulares TSS y TPS-2.

Las dos líneas celulares mostraban expresión basal de los genes de las citoquinas IL-1 β 1, IL-8 y TNF- α 1, de la proteína Mx-1 inducible por IFN y del enzima iNOS en los cultivos control, con valores semejantes entre ellas. Sin embargo, tras la exposición a las vacunas aroA se observaron cambios significativos en su expresión respecto a los controles, variables según la línea celular y el tipo de vacuna. Como ya se ha indicado, las diferencias observadas entre las líneas TSS y TPS-2 en cuanto a la expresión de los genes proinflamatorios debe atribuirse, en principio, a sus diferentes poblaciones celulares y a las interacciones entre ellas.

Un resultado característico es que únicamente para la vacuna viva se inducía una notable sobreexpresión de esos genes, con valores más elevados en la línea TPS-2 excepto para el gen de IL-8. Además, el inicio de la sobreexpresión era muy temprano (4 – 8 h) tras la exposición a la vacuna viva para todos los genes en las dos líneas, que en el caso de la vacuna formalinizada solo se observó para los genes de Mx-1 e iNOS en la línea TSS. Por tanto, la presencia de bacterias viables *aroA* de *A. hydrophila* es un hecho diferencial para la capacidad de inducción de una respuesta de tipo proinflamatoria en las líneas celulares, cuyo significado se discutirá posteriormente.

En cuanto a la capacidad de las líneas TSS y TPS-2 para incrementar la expresión de esos genes de productos con actividad proinflamatoria y microbicida, en respuesta a la exposición a las vacunas aroA, nuestros resultados concuerdan con los descritos por Fierro-Castro y colaboradores en estas mismas líneas celulares (Fierro-Castro, 2009; Fierro-Castro *et al.*, 2012). Estos autores demostraron que ambas líneas celulares expresan esos genes tras su exposición a LPS y poly I:C, y las vacunas aroA son una fuente de LPS y, seguramente, de otros tipos de PAMPs.

También en otras líneas celulares de teleósteos, bien derivadas de pronefros o de leucocitos de este órgano y con carácter fagocítico, como las líneas SHK-1 y TO de salmón atlántico y RTS-11 de trucha arcoíris, o bien no fagocíticas, como la línea

fibroblástica RTG-2, se ha demostrado expresión de IL-1 β (Brubacher *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Fast *et al.*, 2005; Pettersen *et al.*, 2008), IL-8 (Zou *et al.*, 2003a; Caipang *et al.*, 2010; de Bruijn *et al.*, 2012;), TNF- α (Fast *et al.*, 2005; Laing *et al.*, 2001), Mx (Trobridge *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2002a; Jensen *et al.*, 2002b; Tafalla *et al.*, 2007; Pettersen *et al.*, 2008; Tafalla *et al.*, 2008;) e iNOS (Saeij *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) en respuesta a la estimulación con diversos PAMPs o tras la exposición a patógenos bacterianos.

Por otra parte, la expresión de genes proinflamatorios en las líneas celulares macrofágicas de peces es semejante a la que sucede en cultivos primarios de leucocitos o de macrófagos purificados expuestos a patógenos bacterianos. Así, en cultivos de macrófagos de trucha arcoíris se han descrito incrementos en la expresión de genes de IL-1 β , iNOS y COX-2 cuando se inocularon con *R. salmoninarium* (Grayson *et al.*, 2002) y de TNF- α cuando se expusieron a *A. salmonicida* (Vanya Ewart *et al.*, 2008).

En resumen para este apartado, podemos afirmar que las líneas TSS y TPS-2 tienen la capacidad de responder a la exposición a las vacunas aroA de *A. hydrophila* desarrollando una respuesta transcripcional de tipo proinflamatorio.

Modulación de la expresión del gen *MHC-II β*

Ambas líneas celulares expresan niveles basales de la cadena β del MHC-II, que se modifican de forma parecida tras la exposición al mismo tipo de vacuna aroA. Aunque no todos los valores fueron estadísticamente significativos, la respuesta inicial tras la exposición a cualquiera de las vacunas era un descenso de la expresión respecto a los controles. A tiempos posteriores, mientras que para la vacuna formalinizada se recuperaban los valores basales y en el caso de la línea TPS-2 se producía un pequeño incremento, para la vacuna viva se producían incrementos de la expresión notables, particularmente en la línea TPS-2 (casi 40 veces el control a las 24 h).

Resulta llamativa la coincidencia en la existencia de fases de sobreexpresión alternadas con represión del gen *MHC-II β* tanto en nuestros resultados en bazo y pronefros de los peces vacunados, como en las líneas TSS y TPS-2. Además, este fenómeno también se ha descrito en la línea macrofágica SHK-1 tras su exposición a LPS de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, en la que se describió un notable descenso en la expresión de MHC-II a las 24 horas, seguido de un incremento a las 72 horas (Koppang *et al.*, 1999).

En ese sentido, como se ha discutido anteriormente (ver Apartado “**Expresión del gen de la cadena MHC-II β y su posible relación con la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa.**”, pág. 168) las variaciones alternadas de incrementos y decrementos en la expresión de ese gen en los órganos de peces vacunados o infectados experimentalmente (Hansen *et al.*, 2002; Chaves-Pozo *et al.*, 2005; Haugland *et al.*, 2005) se ha atribuido a la migración de células presentadoras de antígenos, como células dendríticas.

En las líneas celulares de teleósteos en las que hay expresión de MHC-II β , como en las líneas RTS-11 (Brubacher *et al.*, 2000), SHK-1 (Fast *et al.*, 2005) y TO (Pettersen *et al.*, 2008), también se ha atribuido esta expresión a que las mismas contienen células de tipo monocito/macrófago o dendríticas. Sin embargo, la modulación alternada de la expresión del gen MHC-II *in vitro* no puede ser atribuida a fenómenos de migración celular, lo que indicaría que ese proceso está bajo el control de otros factores, probablemente mecanismos de retroalimentación debidos a citoquinas y productos inmunodepresores. Así, en cultivos primarios de células de pronefros se ha visto que la exposición a IL-1 β e IFN- γ recombinantes provoca aumento en los niveles de expresión de MHC-II β (Peddie *et al.*, 2002a; Zou *et al.*, 2005), mientras que la represión de su expresión podría ser debida a la acción de TGF- β (Li *et al.*, 2006) y/o de productos derivados de la actividad de COX-2, como PGE₂, cuyos genes también son inducidos por IL-1 β (Hong *et al.*, 2001; Secombes *et al.*, 2011).

En cualquier caso, la inducción de la expresión del gen *MHC-II β* en las líneas celulares, particularmente TPS-2, tras la exposición a las vacunas aroA indica que contienen células capaces de procesar antígenos por la vía del MHC-II, probablemente las células sinusoidales, lo que podría servir para desarrollar ensayos funcionales *in vitro* relacionados con la presentación antigénica, incluidos los dirigidos a identificar determinantes antigénicos para el desarrollo de vacunas más efectivas.

Modulación de la respuesta de tipo proinflamatoria *in vitro*

En nuestros resultados, las líneas TSS y TPS-2 expresaron niveles basales de los genes de los productos inmunosupresores TGF- β y COX-2, que tras la exposición a las vacunas aroA presentaron perfiles de variación de su expresión claramente distintos entre sí, siempre más notables para la vacuna viva.

En el caso del gen de TGF- β , su expresión no se había estudiado previamente en las líneas TSS y TPS-2. A tiempos entre 8 a 24 h posexposición se observaron variaciones significativas en la expresión de este gen en ambas líneas, tanto de sobreexpresión como de represión, pero las mismas fueron siempre pequeñas, no superando un valor máximo de dos veces el control para la vacuna viva. La expresión basal del gen de TGF- β también se ha descrito en la línea celular macrofágica de trucha arcoíris RTS-11 (Brubacher *et al.*, 2000) y en la línea celular SHK-1 de salmón (Fast *et al.*, 2005). Además, de forma similar a lo que sucede en nuestros resultados para las vacunas aroA, en estas líneas la exposición a LPS no indujo cambios significativos en la expresión del gen de TGF- β (Brubacher *et al.*, 2000).

Para el gen de COX-2 se observó un incremento significativo en su expresión en ambas líneas ya a las 4 h posexposición a la vacuna viva, con valores crecientes hasta las 12 h (con un máximo de 200 veces el control para la línea TPS-2) y un posterior rápido descenso. La línea TPS-2, por otra parte, también mostró una patente sobreexpresión del gen *COX-2* tras la exposición a la vacuna formalinizada a las 8 horas, mientras que en la línea TSS no hubo respuesta frente a este tipo de

vacuna. Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente respecto a la expresión de niveles basales del gen *COX-2* en ambas líneas y, también, en cuanto al perfil de sus variaciones tras la exposición a LPS y particularmente a poly I:C (Fierro-Castro, 2009).

Por tanto, la exposición a las vacunas aroA, especialmente a la viva, induce cambios en la expresión de los genes con actividad anti-inflamatoria *TGF- β* y *COX-2* en las líneas TSS y TPS-2, que tanto cuantitativamente como en la cinética de la respuesta se asemejan a la observada tras la vacunación i.p. de truchas arcoíris con estas vacunas. Nuestros resultados, por tanto, demuestran que las células del estroma hematopoyético de *O. mykiss* están también implicadas en la regulación de la respuesta proinflamatoria, probablemente en la misma forma que los leucocitos y con el mismo significado funcional de evitar daños a los propios tejidos por exacerbación de las respuestas defensivas.

Además, el modelo experimental *in vitro* que hemos utilizado puede servir para predecir la respuesta *in vivo* a vacunas experimentales, adyuvantes e inmunoestimulantes para peces en cuanto a la posible atenuación de la respuesta defensiva inicial o, por el contrario, la producción de daños en los tejidos por la inducción de una respuesta inflamatoria excesiva.

COMPARACIÓN ENTRE LOS MODELOS DE VACUNACIÓN I.P. Y DE ENSAYO *IN VITRO*

Comparando las respuestas de expresión de genes proinflamatorios entre los dos modelos experimentales que hemos utilizado (vacunación i.p. y los ensayos *in vitro*), el perfil de la respuesta transcriptómica para esos genes en las líneas es semejante al observado tras la vacunación i.p. para la vacuna aroA viva (para la vacuna formalinizada las respuestas *in vitro* fueron generalmente pequeñas). Aunque existen lógicas diferencias en los valores de expresión y las cinéticas, en ambos modelos se aprecia una inducción de una respuesta de tipo proinflamatoria, marcada por incrementos tempranos, pero breves, en la expresión de los genes de IL-1 β y

IL-8 y con tendencia a ser algo más tardía y sostenida en el tiempo para los de TNF- α 1, Mx-1 e iNOS. En cuanto al gen *MHC-II β* , en ambos modelos también se observó una alternancia de fases con incremento en su expresión seguidas por otras de acusado descenso. Igualmente, en ambos sistemas la expresión de los genes inmunodepresores *TGF- β* y *COX-2* se incrementó a tiempos intermedios y tendía a descender posteriormente.

Por otra parte, atendiendo al órgano de origen de las líneas TSS y TPS-2, no es posible establecer una correlación entre las respuestas observadas en ellas y las que suceden en el bazo y en el pronefros de los peces vacunados. Antes que a diferencias cualitativas entre las poblaciones celulares de las líneas según el órgano de origen, creemos que el factor principal debe ser el efecto de las diferentes proporciones entre los tipos de células en ellas, que pueden modular significativamente las respuestas *in vitro*. Así, al igual que *in vivo*, en los cultivos celulares se pueden dar procesos de regulación de la expresión génica mediados por retroalimentación, bien inductores o supresores, debidos a la liberación de citoquinas al medio. De esta forma, se reproduciría el funcionamiento de las redes de citoquinas *in vivo*.

En apoyo de esto, se ha descrito que IL-1 β y TNF- α recombinantes provocan un aumento de la expresión de *IL-8* en la línea RTS-11 (Zou *et al.*, 2003a; Martin *et al.*, 2007b). También, el TNF- α recombinante incrementa la expresión del gen de *IL-8* en cultivos de células endoteliales cardíacas de dorada (Roca *et al.*, 2008). Y viceversa, *IL-8* recombinante es capaz de inducir la expresión de los genes de *IL-1 β* y de TNF- α en la línea celular RTS-11 (Montero *et al.*, 2008). De igual forma, el incremento de la expresión del gen de *COX-2* puede ser atribuido a la acción inductora de las citoquinas proinflamatorias, ya que se ha demostrado que *IL-1 β* recombinante de *O. mykiss* induce la expresión de *COX-2* en macrófagos *in vitro* (Secombes *et al.*, 2011).

En ese mismo sentido, en cultivos de las líneas TSS y TPS-2 se ha indicado también que los efectos observados en la expresión de genes inmunorreguladores

tras la exposición a LPS, poly I:C o levamisol también estaba modulada por la creación de redes de citoquinas *in vitro*, como demostraba el hecho de que los perfiles de expresión génica generados en estas líneas cuando son expuestas a PAMPs pueden ser reproducidos cuando son tratadas con medios condicionados de cultivos de macrófagos estimulados con LPS o poly I.C (Fierro-Castro, 2009).

Probablemente, la principal diferencia entre las respuestas a las vacunas aroA *in vitro* e *in vivo*, referido a los tipos celulares que se encuentran en las líneas TSS y TPS-2, sea que *in vitro* las células de las líneas no están bajo la influencia, tanto cualitativa como cuantitativamente, de otras citoquinas y de factores moduladores procedentes de otras poblaciones celulares (de su mismo tejido o de otros) del organismo, particularmente linfocitos y otros leucocitos, así como de hormonas cuyos niveles varíen en respuesta a la vacunación, como pueden ser las relacionadas con el estrés.

Lo que en principio sería una desventaja para la comparación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, tiene la ventaja de que una parte de las respuestas estén amplificadas *in vitro*, al no existir (tantas) influencias reguladoras/inhedoras y, por tanto, hace más fácil su identificación y explotación para caracterizarlas y establecer ensayos funcionales que den resultados más concluyentes que ensayos *in vivo*, especialmente en peces en los cuales las variaciones individuales, interespecíficas y las debidas a cambios estacionales y al estrés dificultan su repetitividad y estandarización (Villena, 2003).

LA VACUNA aroA VIVA ES MÁS EFECTIVA EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIA

Nuestro estudio demuestra que, tanto tras la vacunación i.p. como tras la exposición de las líneas celulares TSS y TPS-2, la vacuna aroA viva indujo los cambios más significativos para la mayoría de ensayos realizados. Así, a manera de resumen, cabe resaltar los siguientes resultados:

- En relación con la expresión de genes de productos proinflamatorios, en los dos modelos experimentales la vacuna viva indujo mayores variaciones, en la mayoría de los casos de incremento y más sostenidas en el tiempo, de las ratios de expresión de los genes de IL-1 β , IL-8, TNF- α 1, Mx-1 (con mayores diferencias en el pronefros y en la línea TPS-2), e iNOS que la vacuna formalinizada.
- En cuanto al gen de MHC-II β , implicado en la presentación antigénica, la vacuna viva indujo también cambios más pronunciados, con picos más altos – y más sostenidos en el tiempo para el pronefros – tras la vacunación i.p. y asimismo en las líneas celulares, que la vacuna formalinizada.
- De igual manera, respecto a los genes de productos inmunosupresores, tras la vacunación i.p. y en los ensayos *in vitro* la vacuna viva indujo variaciones más notables, bien de activación (en el pronefros) o de represión, de la expresión de TGF- β , así como mayores incrementos de las ratios de expresión de COX-2, que la formalinizada.

En conjunto, todos estos datos apoyan, como se ha discutido anteriormente, que la vacunación i.p. con la vacuna aroA viva induce una respuesta microbicida y proinflamatoria, marcada por una potente activación de la explosión respiratoria en las líneas celulares y por incrementos tanto *in vivo* como *in vitro* de la expresión temprana (entre 4 y 8 horas) de los genes de IL-1 β , IL-8, TNF- α 1 y de Mx-1 (reflejando esta última la activación de las vías de IFN), que son significativamente mayores que las producida por la vacuna formalinizada. Además, el perfil de expresión de genes de citoquinas, junto con el de los genes de MHC-II β y de iNOS, inducido por la vacuna aroA viva es compatible con una respuesta inicial inmunológica de tipo Th1 (Laing *et al.*, 2011; Zygmunt *et al.*, 2011), relacionada a su vez con la vía de activación clásica (o M1) de macrófagos por PAMPs intracelulares (Forlenza *et al.*, 2011). Por el contrario, el perfil de respuestas inducido por la vacuna aroA formalinizada se asemeja a la activación innata de

macrófagos, relacionada con el reconocimiento de PAMPs extracelulares (Forlenza *et al.*, 2011).

Considerando los resultados del estudio de la respuesta tras la vacunación i.p., y aunque como ya hemos indicado no se han incluido en este trabajo algunos genes claves para la caracterización de respuestas tipo Th1/Th2, como T-bet, GATA-3 o IL-2, el perfil general de expresión que hemos descrito para los genes de productos proinflamatorios y de activación de macrófagos, así como también de productos inmunosupresores, tras la vacunación i.p. con la vacuna aroA viva coincide con el descrito en el modelo de vacunación – desafío con *Y. ruckeri* (Harun *et al.*, 2011), una bacteria que al igual que *A. hydrophila* es un patógeno intracelular facultativo (Ryckaert *et al.*, 2010).

Lo anterior sugiere que el mayor efecto protector de la vacuna aroA viva de *A. hydrophila* administrada i.p. es debido a la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo Th1, que no se generaría por la vacunación con la vacuna formalinizada. Un hecho que apoya esta hipótesis es que la protección conferida por este tipo de vacunas atenuadas se ha correlacionado con la inducción de proliferación celular antes que con la producción de anticuerpos. Así, es interesante señalar que las respuestas Th1 son, inicialmente, respuestas inmunitarias mediadas celularmente, es decir con inducción de actividades citotóxicas y activadoras de mecanismos efectores, como la activación de macrófagos y neutrófilos, dirigidos a la destrucción de las células infectadas por virus y bacterias intracelulares (Kaiko *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010). A esta respuesta se sumaría la mediada por macrófagos activados por la vía clásica, los cuales muestran una potente actividad microbicida contra patógenos intracelulares, cuya activación es debida al reconocimiento de PAMPs bacterianos en presencia de un perfil de citoquinas de tipo Th1 (Forlenza *et al.*, 2011).

En ese sentido, datos previos referidos a la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación de teleósteos con vacunas vivas atenuadas, como las vacunas aroA de *A. hydrophila* (Vivas *et al.*, 2004a) y de *A. salmonicida* (Marsden *et al.*, 1996),

así como la vacuna VAN 1000 de *L. anguillarum* (Norqvist *et al.*, 1989), apoyan que estas vacunas inducen una respuesta inmunocelular más potente que la vacunas inactivadas, atendiendo a la respuesta proliferativa antígeno-específica de leucocitos, y que se correlacionan mejor con la protección resultante de la vacunación que la inmunohumoral.

Por tanto, este tipo de respuesta inicial sería más eficaz para la protección contra el desarrollo de la enfermedad producida por la infección por *A. hydrophila*, al igual que se ha indicado para *A. salmonicida* (Ellis, 1997) y *Y. ruckeri* (Harun *et al.*, 2011). Esto mismo se ha indicado para otros patógenos intracelulares en mamíferos, como *Mycobacterium* spp. (Lienhardt *et al.*, 2002), *Salmonella* spp. (de Jong *et al.*, 1998) o *Listeria monocytogenes* (Portnoy *et al.*, 2002).

Por otra parte, al menos en mamíferos, las respuestas de tipo Th1 también regulan el tipo de respuesta inmunitaria humoral adaptativa que se genera, de forma que los linfocitos Th1 cooperan con los linfocitos-B para la producción de IgM, IgG e IgA (pero no de IgE) (Kaiko *et al.*, 2008). En teleósteos, no hemos encontrado estudios acerca de si las respuestas Th1/Th2 regulan, y cómo, la respuesta inmunohumoral, pero debe tenerse en cuenta que en esta clase de vertebrados no hay cambio de clase de Igs y que en salmónidos la inmunoglobulina sérica predominante es la IgM, mientras que la función de la IgT no está totalmente aclarada, aunque se le ha atribuido una función de Ig secretada asociada al MALT (Zhang *et al.*, 2011; Salinas *et al.*, 2011). En este sentido es interesante señalar que en un estudio del efecto de la exposición de larvas y alevines de *O. mykiss* a *Y. ruckeri* por baño se encontró un aumento notable de IgT en el mucus de las branquias de los peces infectados (Chettri *et al.*, 2012).

No obstante, en el caso de la vacunación i.p. con vacunas inactivadas contra bacterias intracelulares, como *Aeromonas* spp o *Y. ruckeri*, la respuesta inmunohumoral sérica parece ser relativamente poco importante desde el punto de vista de la protección. Así, en muchos estudios no se ha encontrado una relación directa entre los títulos de anticuerpos séricos contra antígenos de esas bacterias y la

protección conferida por las correspondientes vacunas (Loghothetis *et al.*, 1994; Ellis, 1997; Raida *et al.*, 2008b). Esto también sucede para la vacunas vivas atenuadas formadas por cepas *aroA* de *A. salmonicida* (Marsden *et al.*, 1996) o de *A. hydrophila* (Hernanz-Moral *et al.*, 1998).

Lo discutido anteriormente para la inducción de una respuesta inicial de tipo Th1, con un componente inmunocelular relevante para la protección derivada de la vacunación, también puede relacionarse con la capacidad de las vacunas vivas atenuadas para inducir protección cruzada frente a otros serovares o cepas de la misma especie o incluso contra especies distintas, como se ha descrito para la vacuna *aroA* de *A. hydrophila* (esta tesis y Vivas *et al.*, 2004a) y para la vacuna VAN 1000 de *L. anguillarum* (Norqvist *et al.*, 1989; Norqvist *et al.*, 1994). Así, mientras que la producción de anticuerpos aglutinantes, con reactividad cruzada contra las diferentes cepas o especies contra las que la vacuna confiere protección, no siempre era relevante en esos estudios, la inducción de una respuesta inmunocelular de tipo Th1, tanto mediada por la vía innata (con activación de macrófagos y neutrófilos y, probablemente, de células citotóxicas naturales), como de la específica, quizá mediada por linfocitos Th de memoria, cuya existencia en teleosteos – aunque no demostrada – parecen sugerir estudios genómicos (Laing *et al.*, 2011), podría explicar mejor esa protección cruzada.

Para finalizar la discusión de nuestros resultados, creemos interesante resaltar que en los ensayos *in vitro* las diferencias entre las respuestas a los dos tipos de vacunas fueron mayores que las observadas tras la vacunación *i.p.*, de forma que la vacuna *aroA* formalinizada apenas indujo cambios en la expresión de los genes de productos proinflamatorios (*IL-1 β* , *IL-8*, *TNF- α 1* (salvo a 24 horas en TPS-2), *Mx-1* (salvo a 4h en TSS) e *iNOS*) y para los genes de *TNF- α 1* en la línea TSS y de *MHC-II β* en ambas líneas la exposición a la vacuna formalinizada indujo una significativa represión de su expresión temprana respecto a los controles y a la vacuna viva. Además, la intensidad de la explosión respiratoria inducida por la exposición a la vacuna formalinizada también fue muy moderada.

Estos resultados pueden reflejar el hecho de que en las líneas celulares TSS y TPS-2 faltan algunas capacidades para procesar los PAMPs presentes en la vacuna formalinizada de forma competente para la activación de las respuestas defensivas (microbicida e inflamatoria). Esas capacidades podrían estar mediadas por otros tipos celulares presentes en los tejidos *in vivo*, fundamentalmente monocito/macrófagos y células dendríticas, así como otros leucocitos. También, otra posible explicación sería la alteración de los PAMPs, como LPS, proteínas o DNA bacteriano por el proceso de formalinización (Ellis, 1997), que impidiese su reconocimiento por los PRRs correspondientes.

Pero, por otra parte, seguramente esas diferencias deban ser atribuidas también a la capacidad infectiva de las bacterias *aroA* de la vacuna viva. De esa forma, la internalización de las bacterias viables *aroA*, aunque incapaces de crecer de forma significativa, debe tener efectos biológicos muy distintos de la fagocitosis de la misma cepa formalinizada. Esto mismo se ha indicado para otras bacterias intracelulares, como *Mycobacterium* spp y *L. monocytogenes*, que son capaces de activar la producción de IL-12, una interleuquina fundamental para la polarización de los linfocitos Th hacia el fenotipo Th1 (Hsieh *et al.*, 1993) y cuya existencia se ha demostrado en teleósteos a nivel genómico y de expresión, pero cuya capacidad funcional no ha sido todavía demostrada (Secombes *et al.*, 2011).

En el caso de las bacterias intracelulares gram negativas, en mamíferos los PAMPs responsables de la activación de la vía de IFN, que es uno de los factores que polariza las respuestas hacia el perfil Th1 y hacia la vía de activación clásica de los macrófagos son tanto LPS y DNA bacteriano citosólicos o localizados en el compartimento endosomal, originados por la infección intracelular (Kawai *et al.*, 2009). En el caso de los teleósteos, el reconocimiento de LPS extracelular no ha sido totalmente elucidado ya que no expresan TLR4, pero los productos de la pared de bacterias gram negativas, como peptidoglucanos (Li *et al.*, 2007), y el DNA bacteriano intracelulares pueden ser reconocidos por proteínas receptoras de peptidoglucanos (PGRPs) y TLR9 respectivamente, que están presentes en teleósteos (Boltaña *et al.*, 2011) y median la inducción de IFN (Palti, 2011).

En conclusión, la comparación entre los efectos *in vivo* (tras la vacunación i.p. de trucha arcoíris) e *in vitro* (tras la exposición de las líneas celulares TSS y TPS-2), inducidos por las dos formas (viva y formalinizada) de la vacuna aroA de *A. hydrophila* muestra que la mayor eficacia, así como la capacidad de generar protección cruzada, de la vacuna viva es debida a que esta induce, en los dos sistemas experimentales, una respuesta proinflamatoria más potente y da lugar a un perfil de citoquinas compatible con la activación clásica de los macrófagos y con la polarización de la respuesta inmunitaria hacia el perfil Th1. La naturaleza de estos tipos de respuestas las hace más eficientes para la defensa contra patógenos intracelulares, como *A. hydrophila*.

———— Conclusiones ————

1. En *O. mykiss*, la vacunación intraperitoneal con vacunas aroA formadas por bacterias de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* vivas o formalinizadas produce cambios tempranos en la expresión de genes de productos con actividad proinflamatoria (*IL-1 β 1*, *IL-8*, *TNF- α 1*, *Mx-1* e *iNOS*), mediadores de la presentación antigénica (*MHC-II β*) y con actividad inmunosupresora (*TGF- β* y *COX-2*), que se corresponden con la inducción de respuestas proinflamatoria e inmunitarias y su posterior regulación.
2. Las líneas celulares TSS y TPS-2, derivadas del estroma del tejido linfohematopoyético de *O. mykiss*, son capaces de responder a la exposición a las vacunas aroA viva o formalinizada activando respuestas microbicidas y variaciones de la expresión de los genes de productos proinflamatorios, mediadores de la presentación antigénica e inmunosupresores, que son semejantes a los que *in vivo* median la inducción y regulación de las respuestas inflamatoria e inmunitarias.
3. La capacidad de las líneas celulares TSS y TPS-2 para desarrollar respuestas transcripcionales de genes inmunorreguladores de la inflamación y de la presentación antigénica tras su exposición a las vacunas aroA, que se asemejan a las observadas tras la vacunación, incluso respecto a las diferencias entre la vacuna viva y la formalinizada, permite afirmar que este modelo experimental puede ser utilizado para desarrollar ensayos funcionales *in vitro* con el fin de obtener vacunas más efectivas para la acuicultura de salmónidos.
4. La vacunación intraperitoneal de *O. mykiss* con la vacuna viva de la cepa *aroA* de *A. hydrophila* induce una respuesta proinflamatoria más potente que la vacuna formalinizada y da lugar a un perfil de expresión de citoquinas, de MHC-II β y de iNOS compatible con la activación clásica de los macrófagos y con la polarización de la respuesta inmunitaria hacia el perfil Th1, más eficientes para la defensa contra patógenos intracelulares, como es *A. hydrophila*.

Esos perfiles de respuesta inmunitaria y de activación de macrófagos, que no se observan para la vacunación con la vacuna aroA formalinizada, pueden explicar por qué la vacuna aroA viva de *A. hydrophila* confiere mejor protección contra desafíos con cepas patógenas de la misma especie o de *A. salmonicida*.

———— Bibliografía ————

- Acosta, F.**, Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F. y 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 Immunol.* 17, 255-263.
- Afonso, A.**, Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E. y Silva, M.T., 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 27-37.
- Afonso, A.**, Gomes, S., da Silva, J., Marques, F. y Henrique, M., 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 1-16.
- Ainsworth, A.J.**, 1992. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 123-148.
- Alberts, B.**, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P., 2002. Posttranscriptional Controls, in: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Alejo, A.** y Tafalla, C., 2011. Chemokines in teleost fish species. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1215-1222.
- Alexander, J.B.** y Ingram, G.A., 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 249-279.
- Allan, B.J.** y Stevenson, R.M., 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. J. Microbiol.* 27, 1114-1122.
- Altmann, S.M.**, Mellon, M.T., Distel, D.L. y Kim, C.H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.* 77, 1992-2002.
- Altwegg, M.** y Geiss, H.K., 1989. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* 16, 253-286.
- Alvarez-Pellitero, P.**, 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 171-198.
- Amsen, D.**, Spilianakis, C.G. y Flavell, R.A., 2009. How are TH1 and TH2 effector cells made? *Curr. Opin. Immunol.* 21, 153-160.
- Aranishi, F.** y Nakane, M., 1997. Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 471-478.

- Arkoosh, M.R.** y Kaattari, S.L., 1991. Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev. Comp. Immunol.* 15, 279-293.
- Austin, B.** y Austin, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer-Praxis series in aquacultured fisheries. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Azad, I.S.**, Shankar, K.M., Mohan, C.V., Kalita, B., 2000. Protective response of common carp orally vaccinated with biofilm and free cells of *Aeromonas hydrophila* challenged by injection and immersion routes. *J. Aquacult. Trop.* 15, 65-70.
- Baba, T.**, Imamura, J., Izawa, K. y Ikeda, K., 1988. Immune protection in carp, *Cyprinus carpio L.*, after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. *J. Fish Dis.* 11, 237-244.
- Bachetti, T.** y Morbidelli, L., 2000. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res.* 42, 9-19.
- Bacon, K.**, Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsang, M., Thorpe, R., Van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A. y Zoon, K., IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 1067-1068.
- Banerjee, C.**, Goswami, R., Verma, G., Datta, M. y Mazumder, S., 2012. *Aeromonas hydrophila* induced head kidney macrophage apoptosis in *Clarias batrachus* involves the activation of calpain and is caspase-3 mediated. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 323-333.
- Bassity, E.** y Clark, T.G., 2012. Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS ONE* . 7, e33196.
- Bengten, E.**, Quiniou, S.M., Stuge, T.B., Katagiri, T., Miller, N.W., Clem, L.W., Warr, G.W. y Wilson, M., 2002. The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD. *J. Immunol.* 169, 2488-2497.
- Bermudez, L.E.**, 1993. Production of transforming growth factor-beta by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN-gamma. *J. Immunol.* 150, 1838-1845.
- Bernstein, R.M.**, Schluter, S.F. y Marchalonis, J.J., 1998. Immunity, en: *The physiology of fishes*. Evans, D.H. (Ed.). CRC Press, USA, pp. 215-242.

- Biron, C.A.**, Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P. y Salazar-Mather, T.P., 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189-220.
- Bjorkman, P.J.** y Parham, P., 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 253-288.
- Bly, J.E.**, Quiniou, S.M. y Clem, L.W., 1997. Environmental effects on fish immune mechanisms. *Dev. Biol. Stand.* 90, 33-43.
- Boltaña, S.**, Roher, N., Goetz, F.W. y Mackenzie, S.A., 2011. PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1195-1203.
- Børre, R.**, 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 172-191.
- Borrego, J.J.**, Morinigo, M.A., Martínez-Manzanares, E., Bosca, M., Castro, D., Barja, J.L. y Toranzo, A.E., 1991. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* 35, 264-269.
- Bostock, J.**, McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I. y Corner, R., 2010. Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 2897-2912.
- Bowden, T.J.**, Cook, P. y Rombout, J.H.W.M., 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 413-427.
- Brattgjerd, S.** y Evensen, O., 1996. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Vet. Pathol.* 33, 55-65.
- Bredt, D.S.**, Hwang, P.M. y Snyder, S.H., 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347, 768-770.
- Bridle, A.R.**, Morrison, R.N. y Nowak, B.F., 2006. The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 346-364.
- Brubacher, J.L.**, Secombes, C.J., Zou, J. y Bols, N.C., 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 24, 565-574.

- Buelens, C.**, Bartholome, E.J., Amraoui, Z., Boutriaux, M., Salmon, I., Thielemans, K., Willems, F. y Goldman, M., 2002. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood* 99, 993-998.
- Caipang, C.M.**, Hynes, N., Puangkaew, J., Brinchmann, M.F. y Kiron, V., 2008. Intraperitoneal vaccination of Atlantic cod, *Gadus morhua* with heat-killed *Listonella anguillarum* enhances serum antibacterial activity and expression of immune response genes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 314-322.
- Caipang, C.M.**, Brinchmann, M.F. y Kiron, V., 2009. Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua* upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 153, 261-267.
- Caipang, C.M.**, Lazado, C.C., Brinchmann, M.F. y Kiron, V., 2010. Infection-induced changes in expression of antibacterial and cytokine genes in the gill epithelial cells of Atlantic cod, *Gadus morhua* during incubation with bacterial pathogens. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 156, 319-325.
- Campos-Perez, J.J.**, Ellis, A.E. y Secombes, C.J., 2000a. Toxicity of nitric oxide and peroxy-nitrite to bacterial pathogens of fish. *Dis. Aquat. Organ.* 43, 109-115.
- Campos-Perez, J.J.**, Ward, M., Grabowski, P.S., Ellis, A.E. y Secombes, C.J., 2000b. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology* 99, 153-161.
- Carracedo, B.**, 2003. Caracterización de cultivos celulares angiogénicos obtenidos de órganos linfoides de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Tesis Doctoral. Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales, Universidad de León.
- Cascon, A.**, Anguita, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Fernandez, M. y Naharro, G., 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1167-1170.
- Chang, H.**, Brown, C.W. y Matzuk, M.M., 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev.* 23, 787-823.
- Chaves-Pozo, E.**, Munoz, P., Lopez-Munoz, A., Pelegrin, P., Garcia Ayala, A., Mulero, V. y Meseguer, J., 2005. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res.* 320, 61-68.
- Chen, K.**, Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., Edholm, E.S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., Cattalini, M., Litzman, J., B Bussel, J., Huang,

- B., Meini, A., Riesbeck, K., Cunningham-Rundles, C., Plebani, A. y Cerutti, A., 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10, 889-898.
- Chen, L.**, He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J., Waldbieser, G., Wolters, W. y Liu, Z., 2005. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 135-142.
- Chettri, J.K.**, Raida, M.K., Kania, P.W. y Buchmann, K., 2012. Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 463-474.
- Chico, V.**, Ortega-Villaizan, M., Falco, A., Tafalla, C., Perez, L., Coll, J.M. y Estepa, A., 2009. The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine* 27, 1938-1948.
- Chilmonczyk, S.**, 1992. The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 181-200.
- Chilmonczyk, S.**, 1983. The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Light and electron microscopic study. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 59-68.
- Christie, K.E.**, 1997. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. *Dev. Biol. Stand.* 90, 191-199.
- Clem, L.W.**, Faulmann, E., Miller, N.W., Ellsaesser, C., Lobb, C.J. y Cuchens, M.A., 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of in vitro and in vivo temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 313-322.
- Corbeil, S.**, Lapatra, S.E., Anderson, E.D., Jones, J., Vincent, B., Hsu, Y.L. y Kurath, G., 1999. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39, 29-36.
- Corripio-Miyar, Y.**, Bird, S., Tsamopoulos, K. y Secombes, C.J., 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Mol. Immunol.* 44, 1361-1373.
- Cuesta, A.** y Tafalla, C., 2009. Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 27, 280-289.

- Dannevig, B.H.**, Lauve, A., Press, C.M. y Landsverk, T., 1994. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 3-18.
- Das, A.**, Sahoo, P.K., Mohanty, B.R. y Jena, J.K., 2011. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 207-218.
- de Bruijn, I.**, Belmonte, R., Anderson, V.L., Saraiva, M., Wang, T., van West, P. y Secombes, C.J., 2012. Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 44-54.
- de Jong, R.**, Altare, F., Haagen, I.A., Elferink, D.G., Boer, T., van Breda Vriesman, P.J., Kabel, P.J., Draaisma, J.M., van Dissel, J.T., Kroon, F.P., Casanova, J.L. y Ottenhoff, T.H., 1998. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 280, 1435-1438.
- de las Heras, A.I.**, Pérez Prieto, S.I. y Rodríguez Saint-Jean, S., 2009. *In vitro* and *in vivo* immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 120-129.
- Detmer, A.** y Glenting, J., 2006. Live bacterial vaccines: a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell. Fact.* 5, 23.
- Diago, M.L.**, Lopez-Fierro, M.P., Razquin, B. y Villena, A., 1993. Long-term myelopoietic cultures from the renal hematopoietic tissue of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W.: phenotypic characterization of the stromal cells. *Exp. Hematol.* 21, 1277-1287.
- Diago, M.L.**, López-Fierro, M.P., Razquin, B. y Villena, A., 1995. Establishment and characterization of a pronephric stromal cell line (TPS) from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 441-457.
- Diago, M.L.**, 1996. Estudio *in vitro* de la hematopoyesis de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*. Establecimiento de una línea celular de estroma de pronefros. Caracterización y análisis de su capacidad hematopoyética. Tesis Doctoral. Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales, Universidad de León .
- Dinarelli, C.A.**, 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 253-265.
- Dinarelli, C.**, Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L., Goldbach-Mansky, R., Pizarro, T., Hoffman, H., Bufler, P., Nold, M., Ghezzi, P., Mantovani, A., Garlanda, C., Boraschi, D., Rubartelli, A., Netea, M., van, d.M., Joosten, L., Mandrup-Poulsen, T., Donath, M., Lewis, E., Pfeilschifter, J., Martin, M., Kracht, M., Muehl, H., Novick, D., Lukic, M., Conti, B., Solinger,

- A., Peyman, K., van, d.V. y Gabel, C., 2010. IL-1 family nomenclature. *Nat. Immunol.* 11, 973-973.
- Directiva** 2009/9/CE de la Comisión de 10 de febrero de 2009, que modifica la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. DO L44/10 1402/2009.
- Directiva** 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. DOUE L 276/ de 20/10/2010.
- Dixon, B.** y Stet, R.J.M., 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 683-699.
- Dooley, J.S.** y Trust, T.J., 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *J. Bacteriol.* 170, 499-506.
- Edberg, S.C.**, Browne, F.A. y Allen, M.J., 2007. Issues for Microbial Regulation: *Aeromonas* as a Model. *Crit. Rev. Microbiol.* 33,89-100.
- Eddy, F.B.**, 2005. Role of nitric oxide in larval and juvenile fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 142, 221-230.
- Edholm, E.S.**, Wilson, M., Sahoo, M., Miller, N.W., Pilstrom, L., Wermenstam, N.E. y Bengten, E., 2009. Identification of Ig-sigma and Ig-lambda in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and Ig-lambda in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Immunogenetics.* 61, 353-370.
- Edholm, E.S.**, Bengten, E., Stafford, J.L., Sahoo, M., Taylor, E.B., Miller, N.W. y Wilson, M., 2010. Identification of two IgD+ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Immunol.* 185, 4082-4094.
- Edholm, E.**, Bengten, E. y Wilson, M., 2011. Insights into the function of IgD. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1309-1316.
- Ellis, A.E.**, 1989. The immunology of teleosts., in: Roberts, R.J. (Ed.), *Fish Pathology*. Baillière Tindall, London, pp. 135-152.
- Ellis, A.**, 1997. Immunization with bacterial antigens: furunculosis. *Dev. Biol. Stand.* 90, 107-116.
- Ellis, A.E.**, 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827-839.

- Elward, K.** y Gasque, P., 2003. “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* 40, 85-94.
- EMEA**, 2004. Guideline on live recombinant vector vaccines for veterinary use. EMEA/CVMP/004/04-FINAL .
- Engelsma, M.Y.**, Stet, R.J.M., Schipper, H. y Verburg-van Kemenade, B.M.L., 2001. Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 195-203.
- Esche, C.**, Stellato, C. y Beck, L.A., 2005. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* 125, 615-628.
- Evelyn, T.P.**, 1997. A historical review of fish vaccinology. *Dev. Biol. Stand.* 90, 3-12.
- Evensen, O.**, Brudeseth, B. y Mutoloki, S., 2005. The vaccine formulation and its role in inflammatory processes in fish-effects and adverse effects. *Dev. Biol. (Basel)*. 121, 117-125.
- Fang, H.M.**, Ge, R. y Sin, Y.M., 2004. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 645-658.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department**, 2005-2011. Programa de información de especies acuáticas. *Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas . Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. 2011.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es
- FAO Fisheries and Aquaculture Department**, 2005-2012. Visión general del sector acuicola nacional- España. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. 2011.
http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_spain/es
- FAO Fisheries and Aquaculture Department**, 2008. Glosario de acuicultura. <http://www.fao.org/fi/glossary/aquaculture>. 2012, 424.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department**, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2010. (SOFIA).
<http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf> . 2012, 242.
- FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service [FAO FIPS]**, 2011. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2009. [Booklet + CD-ROM]. ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2009/index.htm . 2012

- Fast, M.D.**, Ross, N.W. y Johnson, S.C., 2005. Prostaglandin E2 modulation of gene expression in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage-like cell line (SHK-1). *Dev. Comp. Immunol.* 29, 951-963.
- Fast, M.D.**, Johnson, S.C. y Jones, S.R.M., 2007. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β -1, TNF α -1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 403-407.
- Fearon, D.T.** y Locksley, R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53.
- Fearon, D.T.**, 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388, 323-324.
- Fellous, M.**, Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M. y Revel, M., 1982. Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3082-3086.
- Fierro-Castro, C.**, 2009. Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura. Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales, Universidad de León.
- Fierro-Castro, C.**, Barrioluengo, L., Lopez-Fierro, P., Razquin, B.E., Carracedo, B. y Villena, A.J., 2012. Fish cell cultures as *in vitro* models of pro-inflammatory responses elicited by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 389-400.
- Fijan, N.**, 1988. Vaccination against spring viraemia of carp, in: *Fish Vaccination*. Ellis, A.E. (Ed.), Academic Press, New York. USA, pp. 204-215.
- Finn, J.P.** y Nielson, N.O., 1971. The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 3, 463-478.
- Flajnik, M.F.** y Du Pasquier, L., 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* 25, 640-644.
- Flaño, E.**, 1995. Establecimiento y caracterización de cultivos de trucha arcoiris. Estudio *in vitro* de la infección con *Renibacterium salmoninarum*. Tesis Doctoral. Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales, Universidad de León.
- Flaño, E.**, López-Fierro, P., Razquin, B.E. y Villena, A., 1996. *In vitro* differentiation of eosinophilic granular cells in *Renibacterium salmoninarum*-infected gill cultures from rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 173-184.
- Flaño, E.**, López-Fierro, P., Razquin, B.E. y Villena, A., 1997. *In vitro* proliferation of eosinophilic granular cells in gill cultures from rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 519-521.

- Forlenza, M.,** Magez, S., Scharsack, J.P., Westphal, A., Savelkoul, H.F. y Wiegertjes, G.F., 2009. Receptor-mediated and lectin-like activities of carp (*Cyprinus carpio*) TNF-alpha. *J. Immunol.* 183, 5319-5332.
- Forlenza, M.,** Fink, I.R., Raes, G. y Wiegertjes, G.F., 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1246-1255.
- Frøystad, M.K.,** Rode, M., Berg, T. y Gjøen, T., 1998. A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 533-549.
- Fryer, J.L.,** Rohovec, J.S., Tebbit, G.L., McMichael, J.S. y Pilcher, K.S., 1976. Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathology* 10, 155-164.
- Fujiki, K.,** Shin, D., Nakao, M. y Yano, T., 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 229-242.
- Galindo-Villegas, J.** y Hosokawa, H., 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish, en: *Avances en Nutrición Acuicola*. Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. (Eds.), Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 279-319.
- Ganassin, R.** y Bols, N., 1996. Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 17-34.
- Garcia-Castillo, J.,** Pelegrin, P., Mulero, V. y Meseguer, J., 2002. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics.* 54, 200-207.
- Glamann, J.,** 1995. Complete coding sequence of rainbow trout Mhc II beta chain. *Scand. J. Immunol.* 41, 365-372.
- Godwin, U.B.,** Antao, A., Wilson, M.R., Chinchar, V.G., Miller, N.W., Clem, L.W. y McConnell, T.J., 1997. MHC class II B genes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 21, 13-23.
- Goetz, F.W.,** Planas, J.V. y MacKenzie, S., 2004. Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 487-497.

- Gomez-Casado, E.**, Estepa, A. y Coll, J.M., 2011. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*. 29, 2657-2671.
- Goodbourn, S.**, Didcock, L. y Randall, R.E., 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81, 2341-2364.
- Gordon, S.** y Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953-964.
- Govinden, R.** y Bhoola, K.D., 2003. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol. Ther.* 98, 257-265.
- Grace, M.F.** y Manning, M.J., 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* rich. 1836. *Dev. Comp. Immunol.* 4, 255-264.
- Grayson, T.H.**, Cooper, L.F., Wrathmell, A.B., Roper, J., Evenden, A.J. y Gilpin, M.L., 2002. Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology* 106, 273-283.
- Grimholt, U.**, Hordvik, I., Fosse, V.M., Olsaker, I., Endresen, C. y Lie, O., 1993. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 37, 469-473.
- Gudding, R.**, Lillehaug, A. y Evensen, Ø., 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 203-212.
- Haddad, G.**, Hanington, P.C., Wilson, E.C., Grayfer, L. y Belosevic, M., 2008. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 654-663.
- Haller, O.**, Frese, M. y Kochs, G., 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* 17, 220-230.
- Hanington, P.C.**, Tam, J., Katzenback, B.A., Hitchen, S.J., Barreda, D.R. y Belosevic, M., 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 411-429.
- Hansen, J.D.** y Kaattari, S.L., 1995. The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis. *Immunogenetics* 42, 188-195.
- Hansen, J.D.**, 1997. Characterization of rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues. *Immunogenetics* 46, 367-375.

- Hansen, J.D.** y La Patra, S., 2002. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenetics* 54, 654-661.
- Hardie, L.J.**, Laing, K.J., Daniels, G.D., Grabowski, P.S., Cunningham, C. y Secombes, C.J., 1998. Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine* 10, 555-563.
- Harms, C.A.**, Howard, K.E., Wolf, J.C., Smith, S.A. y Kennedy-Stoskopf, S., 2003. Transforming growth factor-beta response to mycobacterial infection in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 95, 155-163.
- Harms, C.A.**, Kennedy-Stoskopf, S., Horne, W.A., Fuller, F.J. y Tompkins, W.A., 2000. Cloning and sequencing hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) transforming growth factor-beta (TGF-beta), and development of a reverse transcription quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay to measure TGF-beta mRNA of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 61-85.
- Harris, S.G.**, Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. y Phipps, R.P., 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144-150.
- Harrison, J.A.**, Villareal-Ramos, B., Mastroeni, P., Demarco de Hormaeche, R. y Hormaeche, C.E., 1997. Correlates of protection induced by live Aro⁻ *Salmonella typhimurium* vaccines in the murine typhoid model. *Immunology* 90, 618-625.
- Hart, S.**, Wrathmell, A.B., Harris, J.E. y Grayson, T.H., 1988. Gut immunology in fish: A review. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 453-480.
- Harun, N.O.**, Wang, T. y Secombes, C.J., 2011. Gene expression profiling in naïve and vaccinated rainbow trout after *Yersinia ruckeri* infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. *Vaccine* 29, 4388-4399.
- Hashimoto, K.**, Okamura, K., Yamaguchi, H., Ototake, M., Nakanishi, T. y Kurosawa, Y., 1999. Conservation and diversification of MHC class I and its related molecules in vertebrates. *Immunol. Rev.* 167, 81-100.
- Hastein, T.**, Gudding, R. y Evensen, O., 2005. Bacterial vaccines for fish-an update of the current situation worldwide. *Dev. Biol. (Basel)* 121, 55-74.
- Haugland, Ø.**, Torgersen, J., Syed, M. y Evensen, Ø., 2005. Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination. *Vaccine* 23, 5488-5499.

- Henninger, D.D.**, Panes, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D.C. y Granger, D.N., 1997. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J. Immunol.* 158, 1825-1832.
- Hernanz-Moral, C.**, Flaño, E., Lopez-Fierro, P., Villena, A., Anguita, J., Cascon, A., Sanchez-Salazar, M., Razquin-Peralta, B. y Naharro, G., 1998. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infect. Immun.* 66, 1813-1821.
- Hernanz-Moral, C.**, 2001. Obtención de una vacuna viva atenuada de *Aeromonas hydrophila*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
- Herraez, M.P.** y Zapata, A.G., 1986. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12, 117-126.
- Hibbs, J.B., Jr.**, Taintor, R.R. y Vavrin, Z., 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 235, 473-476.
- Hiney, M.**, Smith, P. y Bernoth, E., 1997. 3 - Covert *Aeromonas salmonicida* Infections, en: Furunculosis. Eva-Maria Bernoth, Anthony E. Ellis, Paul J. Midtlyng, Gilles Olivier and Peter Smith (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 54-97.
- Hoiseth, S.K.** y Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
- Holt, G.**, 1994. *Aeromonas*. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 9th ed., 190-191.
- Hong, S.**, Zou, J., Crampe, M., Peddie, S., Scapigliati, G., Bols, N., Cunningham, C. y Secombes, C.J., 2001. The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β . *Vet Immunol Immunopathol.* 81, 1-14.
- Hordvik, I.**, Grimholt, U., Fosse, V.M., Lie, O. y Endresen, C., 1993. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II beta chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 37, 437-441.
- Horisberger, M.A.** y Gunst, M.C., 1991. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* 180, 185-190.
- Hsieh, C.S.**, Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. y Murphy, K.M., 1993. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.

- Huising, M.O.**, Stet, R.J.M., Savelkoul, H.F.J. y Verburg-van Kemenade, B.M.L., 2004. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 395-413.
- Hylland, P.** y Nilsson, G.E., 1995. Evidence that acetylcholine mediates increased cerebral blood flow velocity in crucian carp through a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 519-524.
- İbelgaufs, H.**, 2012. COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www.copewithcytokines.de> . 2012.
- Ingerslev, H.C.**, Cunningham, C. y Wergeland, H.I., 2006. Cloning and expression of TNF- α , IL-1 β and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 450-461.
- Ingerslev, H.C.**, Ossum, C.G., Lindenstrom, T. y Nielsen, M.E., 2010. Fibroblasts express immune relevant genes and are important sentinel cells during tissue damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One* 5, e9304.
- Ingilæ, M.**, Arnesen, J.A., Lund, V. y Eggset, G., 2000. Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 183, 31-44.
- Janda, J.M.** y Duffey, P.S., 1988. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 10, 980-997.
- Janda, J.M.** y Abbott, S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35-73.
- Janeway, C.A., Jr.** y Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jang, S.I.**, Hardie, L.J. y Secombes, C.J., 1994. Effects of transforming growth factor beta 1 on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 315-323.
- Jang, S.I.**, Hardie, L.J. y Secombes, C.J., 1995. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *J. Leukoc. Biol.* 57, 943-947.
- Jankovic, D.**, Liu, Z. y Gause, W.C., 2001. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 22, 450-457.

- Janssens, S.P.**, Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D.B. y Bloch, K.D., 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 14519-14522.
- Jensen, I.**, Albuquerque, A., Sommer, A.I. y Robertsen, B., 2002a. Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 311-326.
- Jensen, I.** y Robertsen, B., 2002b. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 221-241.
- Jiménez, N.**, Coll, J., Estepa, A. y Tafalla, C., 2005. Futuro de las vacunas ADN frente a virus en acuicultura. *Revista AquaTIC* 23, 25/06/2012.
- Jimenez, N.**, Coll, J., Salguero, F.J. y Tafalla, C., 2006. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 24, 5615-5626.
- Joerink, M.**, Forlenza, M., Ribeiro, C.M.S., de Vries, B.J., Savelkoul, H.F.J. y Wiegertjes, G.F., 2006a. Differential macrophage polarisation during parasitic infections in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 21, 561-571.
- Joerink, M.**, Savelkoul, H.F.J. y Wiegertjes, G.F., 2006b. Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: Structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Mol. Immunol.* 43, 1116-1128.
- Jørgensen, P.E.V.**, 1982. Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.* 5, 47-55.
- Jung, U.** y Ley, K., 1997. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation* 4, 311-319.
- Juul-Madsen, H.R.**, Glamann, J., Madsen, H.O. y Simonsen, M., 1992. MHC class II beta-chain expression in the rainbow trout. *Scand. J. Immunol.* 35, 687-694.
- Kaattari, S.L.** y Irwin, M.J., 1985. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Dev. Comp. Immunol.* 9, 433-444.

- Kaattari, S.L.**, 1992. Fish B lymphocytes: Defining their form and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 161-180.
- Kaiko, G.E.**, Horvat, J.C., Beagley, K.W. y Hansbro, P.M., 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.
- Kawai, T.** y Akira, S., 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7, 131-137.
- Kawai, T.** y Akira, S., 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21, 317-337.
- Knight, J.**, Stet, R.J.M. y Secombes, C.J., 1998. Modulation of MHC class II expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages by TNF α and LPS. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 545-553.
- Knight, J.** y Rowley, A.F., 1995. Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunology.* 85, 389-393.
- Knowles, R.G.** y Moncada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298 (Pt 2), 249-258.
- Kollner, B.** y Kotterba, G., 2002. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 35-48.
- Koppang, E.O.**, Dannevig, B.H., Lie, Ø., Rønningen, K. y Press, C.M., 1999. Expression of Mhc class I and II mRNA in a macrophage-like cell line (SHK-1) derived from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 473-489.
- Koppang, E.O.**, Hordvik, I., Bjerkas, I., Torvund, J., Aune, L., Thevarajan, J. y Endresen, C., 2003. Production of rabbit antisera against recombinant MHC class II beta chain and identification of immunoreactive cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* 14, 115-132.
- Koppang, E.O.**, Fischer, U., Satoh, M. y Jirillo, E., 2007. Inflammation in fish as seen from a morphological point of view with special reference to the vascular compartment. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3649-3655.
- Kunkel, S.L.**, Strieter, R.M., Lindley, I.J.D. y Westwick, J., 1995. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol. Today* 16, 559-561.
- Kurath, G.**, 2008. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.* 27, 175-196.

- Laing, K.J.**, Grabowski, P.S., Belosevic, M. y Secombes, C.J., 1996. A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunol. Cell Biol.* 74, 374-379.
- Laing, K.J.**, Hardie, L.J., Aartsen, W., Grabowski, P.S. y Secombes, C.J., 1999. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 71-85.
- Laing, K.J.**, Cunningham, C. y Secombes, C.J., 2000. Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 261-271.
- Laing, K.J.**, Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T. y Secombes, C.J., 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.* 268, 1315-1322.
- Laing, K.J.**, Zou, J.J., Wang, T., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T. y Secombes, C.J., 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 433-444.
- Laing, K.J.** y Hansen, J.D., 2011. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1282-1295.
- Lamers, C.H.J.**, de Hass, M.J.H. y van Muiswinkel, W.B., 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination: development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J. Fish Dis.* 8, 253-262.
- LaPatra, S.E.**, Plant, K.P., Alcorn, S., Ostland, V. y Winton, J., 2009. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 33, 143-151.
- Lawrence, D.A.**, 1996. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur. Cytokine Netw.* 7, 363-374.
- Lee, E.Y.**, Park, H.H., Kim, Y.T. y Choi, T.J., 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Gene* 274, 237-243.
- Lepa, A.**, Siwicki, A.K. y Terech-Majewska, E., 2010. Application of DNA vaccines in fish. *Pol. J. Vet. Sci.* 13, 213-215.
- Leung, K.Y.**, Yeap, I.V., Lam, T.J. y Sin, Y.M., 1995. Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. *J. Fish Dis.* 18, 511-518.

- Leung, K.Y.**, Wong, L.S., Low, K.W. y Sin, Y.M., 1997. Mini-Tn5 induced growth- and protease-deficient mutants of *Aeromonas hydrophila* as live vaccines for blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas). *Aquaculture* 158, 11-22.
- Li, M.**, Wang, Q., Lu, Y., Chen, S., Li, Q. y Sha, Z., 2012. Expression profiles of NODs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and channel catfish hemorrhage reovirus. *Fish Shellfish Immunol.* Online: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464812002501>
- Li, M.O.**, Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. y Flavell, R.A., 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99-146.
- Li, M.O.**, Wan, Y.Y. y Flavell, R.A., 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26, 579-591.
- Li, X.**, Wang, S., Qi, J., Echtenkamp, S.F., Chatterjee, R., Wang, M., Boons, G.J., Dziarski, R. y Gupta, D., 2007. Zebrafish peptidoglycan recognition proteins are bactericidal amidases essential for defense against bacterial infections. *Immunity* 27, 518-529.
- Lienhardt, C.**, Azzurri, A., Amedei, A., Fielding, K., Sillah, J., Sow, O.Y., Bah, B., Benagiano, M., Diallo, A., Manetti, R., Manneh, K., Gustafson, P., Bennett, S., D'Elis, M.M., McAdam, K. y Del Prete, G., 2002. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 32, 1605-1613.
- Liew, F.Y.**, Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M. y Moncada, S., 1990. Macrophage killing of Leishmania parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144, 4794-4797.
- Lin, O.E.**, Ohira, T., Hirono, I., Saito-Taki, T. y Aoki, T., 2005. Immunoanalysis of antiviral Mx protein expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 443-455.
- Lindenstrøm, T.**, Buchmann, K. y Secombes, C.J., 2003. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 107-115.
- Lindenstrøm, T.**, Secombes, C.J. y Buchmann, K., 2004. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 97, 137-148.
- Ljungh, Å.** y Wadström, T., 1981. Aeromonas toxins. *Pharmacol. Ther.* 15, 339-354.

- Locke, J.B.**, Vicknair, M.R., Ostland, V.E., Nizet, V. y Buchanan, J.T., 2010. Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion. *Dis. Aquat. Organ.* 89, 117-123.
- Loghothetis, P.N.** y Austin, B., 1994. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 239-254.
- Lopez-Doriga, M.V.**, Smail, D.A., Smith, R.J., Domenech, A., Castric, J., Smith, P.D. y Ellis, A.E., 2001. Isolation of salmon pancreas disease virus (SPDV) in cell culture and its ability to protect against infection by the 'wild-type' agent. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 505-522.
- Lorenzen, N.**, Olesen, N.J., Jorgensen, P.E.V., Etzerodt, M., Holtet, T.L. y Thogersen, H.C., 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *J. Gen. Virol.* 74, 623-630.
- Lutfalla, G.**, Roest Crolius, H., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K. y Monneron, D., 2003. Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 4, 29.
- MacKenzie, S.A.**, Roher, N., Boltaña, S. y Goetz, F.W., 2010. Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS. *Mol. Immunol.* 47, 1450-1457.
- Magnadóttir, B.**, 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137-151.
- Magnadóttir, B.**, 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.* (NY). 12, 361-379.
- Majumdar, T.**, Chattopadhyay, P., Saha, D.R., Sau, S. y Mazumder, S., 2009. Virulence plasmid of *Aeromonas hydrophila* induces macrophage apoptosis and helps in developing systemic infection in mice. *Microb. Pathog.* 46, 98-107.
- Manickasingham, S.**, Edwards, A., Schulz, O. y Sousa, C., 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur. J. Immunol.* 33, 101-107.
- March, C.J.**, Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R. y Grabstein, K., 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.

- Markestad, A.** y Grave, K., 1997. Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination. *Dev. Biol. Stand.* 90, 365-369.
- Marrack, P.**, Kappler, J. y Mitchell, T., 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J. Exp. Med.* 189, 521-530.
- Marsden, M.J.**, Vaughan, L.M., Foster, T.J y Secombes, C.J., 1996. A live (delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect. Immun.* 64, 3863-3869.
- Martin, S.A.M.**, Blaney, S.C., Houlihan, D.F. y Secombes, C.J., 2006. Transcriptome response following administration of a live bacterial vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Immunol.* 43, 1900-1911.
- Martin, S.A.**, Taggart, J.B., Seear, P., Bron, J.E., Talbot, R., Teale, A.J., Sweeney, G.E., Hoyheim, B., Houlihan, D.F., Tocher, D.R., Zou, J. y Secombes, C.J., 2007a. Interferon type I and type II responses in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) SHK-1 cell line by the salmon TRAITs/SGP microarray. *Physiol. Genomics.* 32, 33-44.
- Martin, S.A.**, Zou, J., Houlihan, D.F. y Secombes, C.J., 2007b. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. *BMC Genomics.* 8, 150.
- Martin-Armas, M.**, Zykova, S. y Smedsrød, B., 2008. Effects of CpG-oligonucleotides, poly I:C and LPS on Atlantic cod scavenger endothelial cells (SEC). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 100-107.
- Mathew, J.A.**, Guo, Y.X., Goh, K.P., Chan, J., Verburg-van Kemenade, B.M.L. y Kwang, J., 2002. Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1 β and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 85-95.
- Matzinger, P.**, 1998. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 10, 399-415.
- McGuinness, D.H.**, Dehal, P.K. y Pleass, R.J., 2003. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol.* 19, 312-319.
- McIntosh, D.**, Flaño, E., Grayson, T.H., Gilpin, M.L., Austin, B. y Villena, A.J., 1997. Production of putative virulence factors by *Renibacterium salmoninarum* grown in cell culture. *Microbiology* 143 (Pt 10), 3349-3356.
- McLauchlan, P.E.**, Collet, B., Ingerslev, E., Secombes, C.J., Lorenzen, N. y Ellis, A.E., 2003. DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 39-50.

- McMillan, D.N.** y Secombes, C.J., 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 527-541.
- Medzhitov, R.** y Janeway, C.A., Jr, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Medzhitov, R.**, 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R.**, 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Merino, S.**, Aguilar, A., Rubires, X., Abitiu, N., Regue, M. y Tomas, J.M., 1997a. The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 in the adherence to and invasion of fish cell lines. *Res. Microbiol.* 148, 625-631.
- Merino, S.**, Rubires, X., Aguilar, A. y Tomas, J.M., 1997b. The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 213-217.
- Meseguer, J.**, Esteban, M.A. y Agulleiro, B., 1991. Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.* 54, 299-309.
- Meseguer, J.**, Lopez-Ruiz, A. y Garcia-Ayala, A., 1995. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): an ultrastructural and cytochemical study. *Anat. Rec.* 241, 303-309.
- Metzger, D.C.**, Elliott, D.G., Wargo, A., Park, L.K. y Purcell, M.K., 2010. Pathological and immunological responses associated with differential survival of Chinook salmon following *Renibacterium salmoninarum* challenge. *Dis. Aquat. Organ.* 90, 31-41.
- Midtlyng, P.J.**, 1996a. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 553-565.
- Midtlyng, P.J.**, Reitan, L.J. y Speilberg, L., 1996b. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 335-350.
- Midtlyng, P.J.**, Reitan, L.J., Lillehaug, A. y Ramstad, A., 1996c. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 599-613.

- Midtlýng, P.J.** y Lillehaug, A., 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis. Aquat. Organ.* 32, 91-97.
- Midtlýng, P.J.**, 2006. Vaccines for rainbow trout. Some Norwegian experiences with Vaccination in the aquaculture industry. XIII S.I.P.I National Conference Abano Terme, Italia.
- Miller, N.W.**, Sizemore, R.C. y Clem, L.W., 1985. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for *in vitro* antibody responses of channel catfish leukocytes. *J Immunol.* 134, 2884-2888.
- Miller, N.**, Wilson, M., Bengten, E., Stuge, T., Warr, G. y Clem, W., 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunol. Rev.* 166, 187-197.
- Mishell, R.I.** y Dutton, R.W., 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* 126, 423-442.
- Mohammad, M.G.**, Chilmonczyk, S., Birch, D., Aladaileh, S., Raftos, D. y Joss, J., 2007. Anatomy and cytology of the thymus in juvenile Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *J. Anat.* 211, 784-797.
- Moncada, S.** y Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012.
- Montero, J.**, Estepa, A., Coll, J. y Tafalla, C., 2008. Regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-8 receptor (IL-8R) gene transcription in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), DNA vaccination and chemokines. *Fish. Shellfish. Immunol.* 25, 271-280.
- Moore, J.D.**, Ototake, M. y Nakanishi, T., 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 393-407.
- Mosser, D.M.** y Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958-969.
- Mu, X.**, Pridgeon, J.W. y Klesius, P.H., 2011. Transcriptional profiles of multiple genes in the anterior kidney of channel catfish vaccinated with an attenuated *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1162-1172.
- Mulligan, M.S.**, Vaporciyan, A.A., Miyasaka, M., Tamatani, T. y Ward, P.A., 1993. Tumor necrosis factor alpha regulates *in vivo* intrapulmonary expression of ICAM-1. *Am. J. Pathol.* 142, 1739-1749.
- Mutoloki, S.**, Cooper, G.A., Marjara, I.S., Koop, B.F. y Evensen, O., 2010. High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity

- of injection site reactions of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines. *BMC Genomics* 11, 336.
- Nakae, S.**, Asano, M., Horai, R. y Iwakura, Y., 2001. Interleukin-1beta, but not interleukin-1alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* 104, 402-409.
- Nakanishi, T.** y Ototake, M., 1997. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev. Biol. Stand.* 90, 59-68.
- Nakanishi, T.**, Toda, H., Shibasaki, Y. y Somamoto, T., 2011. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1317-1323.
- Nakao, M.**, Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T.K. y Somamoto, T., 2011. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1296-1308.
- Nathan, C.**, 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064.
- Neumann, N.F.**, Fagan, D. y Belosevic, M., 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 473-482.
- Neumann, N.F.**, Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J. y Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 807-825.
- Newman, S.G.**, 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 145-185.
- Noga, E.J.**, Ullal, A.J., Corrales, J. y Fernandes, J.M.O., 2011. Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 6, 44-54.
- Norqvist, A.**, Hagstrom, A. y Wolf-Watz, H., 1989. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1400-1405.
- Norqvist, A.**, Bergman, A., Skogman, G. y Wolf-Watz, H., 1994. A field trial with the live attenuated fish vaccine strain *Vibrio anguillarum* VAN1000. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.* 14, 156-158.
- Novoa, B.**, Figueras, A., Ashton, I. y Secombes, C.J., 1996. *In vitro* studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 207-216.

- Nozaki, Y.**, Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I. y Shimokata, K., 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 65, 3644-3647.
- Nussler, A.K.** y Billiar, T.R., 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54, 171-178.
- Okamura, K.**, Nakanishi, T., Kurosawa, Y. y Hashimoto, K., 1993. Expansion of genes that encode MHC class I molecules in cyprinid fishes. *J. Immunol.* 151, 188-200.
- Oliva-Teles, A.**, 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83-108.
- Ostholm, T.**, Holmqvist, B.I., Alm, P. y Ekstrom, P., 1994. Nitric oxide synthase in the CNS of the Atlantic salmon. *Neurosci. Lett.* 168, 233-237.
- Ototake, M.**, Moore, J.D. y Nakanishi, T., 1999. Prolonged immersion improves the effectiveness of dilute vibrio vaccine for rainbow trout. *Fish Pathol.* 34, 151-154.
- Palti, Y.**, 2011. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1263-1272.
- Paniagua, C.**, Rivero, O., Anguita, J. y Naharro, G., 1990. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* 28, 350-355.
- Parker, H.S.**, 2001. Aquaculture research is key to the future of U.S. fish farming. *Agricultural Research* 49, 2.
- Parker, J.L.** y Shaw, J.G., 2011. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J. Infect.* 62, 109-118.
- Pastoret, P.**, Griebel, P., Bazin, H. y Govaerts, A., 1998. Immunology of Fishes, en: *Handbook of Vertebrate Immunology*. Paul-Pierre Pastoret, Philip Griebel, Hervé Bazin, André Govaerts (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 3-62.
- Peddie, S.**, Zou, J. y Secombes, C.J., 2002a. A biologically active IL-1 β derived peptide stimulates phagocytosis and bactericidal activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), head kidney leucocytes *in vitro*. *J. Fish Dis.* 25, 351-360.
- Peddie, S.**, Zou, J. y Secombes, C.J., 2002b. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 101-113.

- Pettersen, E.F.**, Ingerslev, H., Stavang, V., Egenberg, M. y Wergeland, H.I., 2008. A highly phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 809-819.
- Pfaffl, M.W.**, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Plant, K.P.** y LaPatra, S.E., 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1256-1262.
- Plouffe, D.A.**, Hanington, P.C., Walsh, J.G., Wilson, E.C. y Belosevic, M., 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12, 266-277.
- Pollack, J.R.**, Ames, B.N. y Neilands, J.B., 1970. Iron transport in *Salmonella typhimurium*: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J. Bacteriol.* 104, 635-639.
- Poobalane, S.**, Thompson, K.D., Ardó, L., Verjan, N., Han, H., Jeney, G., Hirono, I., Aoki, T. y Adams, A., 2010. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine* 28, 3540-3547.
- Poppe, T.T.** y Breck, O., 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Dis. Aquat. Org.* 29, 219-226.
- Portnoy, D.A.**, Auerbuch, V. y Glomski, I.J., 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol.* 158, 409-414.
- Praveen, K.**, Evans, D.L. y Jaso-Friedmann, L., 2006. Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 43, 279-291.
- Press, C.M.**, Dannevig, B.H., Landsverk, T., 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 4, 79-93.
- Press, C.M.** y Evensen, Ø., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309-318.
- Purcell, M.K.**, Kurath, G., Garver, K.A., Herwig, R.P. y Winton, J.R., 2004. Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 447-462.

- Rahman, M.H.** y Kawai, K., 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 379-382.
- Raida, M.K.** y Buchmann, K., 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis. Aquat. Organ.* 77, 41-52.
- Raida, M.K.** y Buchmann, K., 2008a. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine.* 26, 1050-1062.
- Raida, M.K.** y Buchmann, K., 2008b. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 533-541.
- Raida, M.K.** y Buchmann, K., 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 35-45.
- Raida, M.K.,** Holten-Andersen, L. y Buchmann, K., 2011. Association between *Yersinia ruckeri* infection, cytokine expression and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1257-1264.
- Rieger, A.M.** y Barreda, D.R., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1238-1245.
- Roberts, S.B.,** Langenau, D.M. y Goetz, F.W., 2000. Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160, 89-97.
- Robertsen, B.,** Bergan, V., Rokenes, T., Larsen, R. y Albuquerque, A., 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 23, 601-612.
- Roca, F.J.,** Mulero, I., Lopez-Munoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw, S.A., Meseguer, J. y Mulero, V., 2008. Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *J. Immunol.* 181, 5071-5081.
- Rodrigues, P.N.,** Hermsen, T.T., Rombout, J.H., Egberts, E. y Stet, R.J., 1995. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 19, 483-496.
- Rodríguez, I.,** Novoa, B. y Figueras, A., 2008. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 239-249.

- Rombout, J.H.W.M.**, Taverne, N., van de Kamp, M. y Taverne-Thiele, A.J., 1993. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 17, 309-317.
- Ronen, A.**, Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. y Kotler, M., 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine.* 21, 4677-4684.
- Rook, G.A.W.**, Steele, J., Umar, S. y Dockrell, H.M., 1985. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by γ -interferon. *J. Immunol. Methods* 82, 161-167.
- Rowley, A.F.**, Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W. y Vickers, P.J., 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish—a brief overview. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 549-567.
- Ruscetti, F.W.** y Palladino, M.A., 1991. Transforming growth factor-beta and the immune system. *Prog. Growth Factor Res.* 3, 159-175.
- Ryckaert, J.**, Bossier, P., D'Herde, K., Diez-Fraile, A., Sorgeloos, P., Haesebrouck, F. y Pasmans, F., 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 648-655.
- Saeij, J.P.**, Stet, R.J., Groeneveld, A., Verburg-van Kemenade, L.B., van Muiswinkel, W.B. y Wiegertjes, G.F., 2000. Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. *Immunogenetics* 51, 339-346.
- Saeij, J.P.J.**, Stet, R.J.M., de Vries, B.J., van Muiswinkel, W.B. y Wiegertjes, G.F., 2003a. Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? *Dev. Comp. Immunol.* 27, 29-41.
- Saeij, J.P.J.**, Vries, B.J.d. y Wiegertjes, G.F., 2003b. The immune response of carp to *Trypanoplasma borreli*: kinetics of immune gene expression and polyclonal lymphocyte activation. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 859-874.
- Sakai, M.**, 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
- Salinas, I.**, Lockhart, K., Bowden, T.J., Collet, B., Secombes, C.J. y Ellis, A.E., 2004. An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 159-170.
- Salinas, I.**, Zhang, Y.A. y Sunyer, J.O., 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1346-1365.

- Salvemini, D.**, Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G. y Needleman, P., 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7240-7244.
- Sambrook, J.F.** y Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuel, C.E.**, 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778-809.
- Sangrador-Vegas, A.**, Martin, S.A.M., O’Dea, P.G. y Smith, T.J., 2000. Cloning and characterization of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur. J. Biochem.* 267, 7031-7037.
- Scapigliati, G.**, Costantini, S., Colonna, G., Facchiano, A., Buonocore, F., Bossù, P., Cunningham, C., Holland, J.W. y Secombes, C.J., 2004. Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 429-441.
- Schoor, W.P.** y Plumb, J.A., 1994. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 153-155.
- Scoumanne, A.**, Kalamati, T., Moss, J., Powell, J.T., Gosling, M. y Carey, N., 2002. Generation and characterisation of human saphenous vein endothelial cell lines. *Atherosclerosis* 160, 59-67.
- Secombes, C.J.** y Manning, M., J., 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 3, 399-412.
- Secombes, C.J.**, 1994a. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish. Immunol.* 4, 421-436.
- Secombes, C.J.**, Clements, K., Ashton, I., Rowley, A.F., 1994b. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 42, 367-378.
- Secombes, C.J.**, Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K.J., Cunningham, C. y Zou, J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 713-723.
- Secombes, C.J.**, Wang, T. y Bird, S., 2011. The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1336-1345.
- Seppola, M.**, Larsen, A.N., Steiro, K., Robertsen, B. y Jensen, I., 2008. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Mol. Immunol.* 45, 887-897.

- Sepulcre, M.P.**, Lopez-Castejon, G., Meseguer, J. y Mulero, V., 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol. Immunol.* 44, 2009-2016.
- Sepulcre, M.P.**, Alcaraz-Perez, F., Lopez-Munoz, A., Roca, F.J., Meseguer, J., Cayuela, M.L. y Mulero, V., 2009. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J. Immunol.* 182, 1836-1845.
- Severin V.I.** y El-Matbouli, M., 2007. Relative quantification of immune-regulatory genes in two rainbow trout strains, *Oncorhynchus mykiss*, after exposure to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *Parasitol. Res.* 101, 1019-1027.
- Shao, J.**, Liu, J. y Xiang, L., 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes *in vitro*. *Aquaculture* 229, 11-23.
- Shepherd, K.L.**, 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 401-429.
- Shoemaker, C.A.**, Klesius, P.H., Evans, J.J. y Arias, C.R., 2009. Use of modified live vaccines in aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 40, 573-585.
- Sigh, J.**, Lindenstrom, T. y Buchmann, K., 2004a. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 75-86.
- Sigh, J.**, Lindenstrøm, T. y Buchmann, K., 2004b. The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 27, 409-417.
- Silphaduang, U.** y Noga, E.J., 2001. Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414, 268-269.
- Smith, P.D.**, 2000. Vaccines and vaccination — a widening choice. *Fish Farmer* 23, 45-53.
- Smith, P.D.**, 2001. Adjuvants and their side effects. *Fish Farmer* 24, 44-45.
- Sommerset, I.**, Krosså, B., Biering, E. y Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert. Rev. Vaccines* 4, 89.
- Sorum, H.**, 1998. Mobile drug resistance genes among fish bacteria. *APMIS Suppl.* 84, 74-76.
- Spelid, S.**, Løkken, G.B., Steiro, K. y Bøgwald, J., 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 6, 95-110.

- Stark, G.R.**, Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. y Schreiber, R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stevenson, R.M.W.**, 1988. Vaccination against *Aeromonas hydrophila*, en: Fish Vaccination. Ellis, A.E. (Eds). Academic Press, London, pp. 112-123.
- Stokes, W.S.**, Brown, K., Kulpa-Eddy, J., Srinivas, G., Halder, M., Draayer, H., Galvin, J., Claassen, I., Gifford, G., Woodland, R., Doelling, V. y Jones, B., 2011a. Improving animal welfare and reducing animal use for veterinary vaccine potency testing: State of the science and future directions. *Procedia in Vaccinology.* 5, 84-105.
- Stokes, W.S.**, Kulpa-Eddy, J. y McFarland, R., 2011b. The international workshop on alternative methods to Reduce, Refine, and Replace the use of animals in vaccine potency and safety testing: introduction and summary. *Procedia in Vaccinology.* 5, 1-15.
- Stuehr, D.J.** y Marletta, M.A., 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7738-7742.
- Stylianou, E.** y Saklatvala, J., 1998. Interleukin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1075-1079.
- Subramaniam, S.**, Stansberg, C., Olsen, L., Zou, J., Secombes, C.J. y Cunningham, C., 2002. Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 415-431.
- Suda, T.** y Zlotnik, A., 1992. *In vitro* induction of CD8 expression on thymic pre-T cells. I. Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha induce CD8 expression on CD8- thymic subsets including the CD25+CD3-CD4-CD8- pre-T cell subset. *J. Immunol.* 148, 1737-1745.
- Sumathy, K.**, Desai, K.V. y Kondaiah, P., 1997. Isolation of transforming growth factor-beta2 cDNA from a fish, *Cyprinus carpio* by RT-PCR. *Gene.* 191, 103-107.
- Sunyer, J.O.**, 2011. Preface. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1193.
- Swaim, L.E.**, Connolly, L.E., Volkman, H.E., Humbert, O., Born, D.E. y Ramakrishnan, L., 2006. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.* 74, 6108-6117.
- Szabo, S.J.**, Sullivan, B.M., Peng, S.L. y Glimcher, L.H., 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 713-758.

- Tafalla, C.**, Coll, J. y Secombes, C.J., 2005. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 615-626.
- Tafalla, C.**, Chico, V., Pérez, L., Coll, J.M. y Estepa, A., 2007. *In vitro* and *in vivo* differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 210-221.
- Tafalla, C.**, Sanchez, E., Lorenzen, N., DeWitte-Orr, S.J. y Bols, N.C., 2008. Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11. *Mol. Immunol.* 45, 1439-1448.
- Tan, E.**, Low, K.W., Wong, W.S. y Leung, K.Y., 1998. Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. *Microbiology* 144 (Pt 2), 299-307.
- Temkin, R.J.** y McMillan, D.B., 1986. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Morphol.* 190, 9-26.
- Thompson, K.D.** y Adams, A., 2004. Current trends in immunotherapy and vaccines development for bacterial diseases in fish, en: Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases. Ka Yin, L. (Ed.). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 313-362.
- Thornberry, N.A.**, Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R. y Aunins, J., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Thornton, J.C.**, Garduno, R.A., Newman, S.G. y Kay, W.W., 1991. Surface-disorganized, attenuated mutants of *Aeromonas salmonicida* as furunculosis live vaccines. *Microb. Pathog.* 11, 85-99.
- Thune, R.L.**, Stanley, L.A. y Cooper, R.K., 1993. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 37-68.
- Thune, R.L.**, Fernandez, D.H. y Battista, J.R., 1999. An *aroA* mutant of *Edwardsiella ictaluri* is safe and efficacious as a live, attenuated vaccine. *J. Aquat. Anim. Health.* 11, 358-372.
- Toda, H.**, Saito, Y., Koike, T., Takizawa, F., Araki, K., Yabu, T., Somamoto, T., Suetake, H., Suzuki, Y., Ototake, M., Moritomo, T. y Nakanishi, T., 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 650-660.

- Tort, L.,** Balasch, J.C. y Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22, 277-286.
- Tort, L.,** 2011. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1366-1375.
- Trobridge, G.D.** y Leong, J.A., 1995. Characterization of a rainbow trout Mx gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 691-702.
- Tsujii, T.** y Seno, S., 1990. Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. *Anat. Rec.* 226, 460-470.
- Unger, R.E.,** Krump-Konvalinkova, V., Peters, K. y Kirkpatrick, C.J., 2002. *In vitro* expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.* 64, 384-397.
- Uribe, C.,** Folch, H., Enriquez, R. y Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56, 486-503.
- Vallejo, A.N.,** Miller, N.W. y Clem, L.W., 1992a. Cellular pathway(s) of antigen processing in fish APC: effect of varying *in vitro* temperatures on antigen catabolism. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 367-381.
- Vallejo, A.N.,** Miller, N.W. y Clem, L. W., 1992b. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 73-89.
- Vanya Ewart, K.,** Williams, J., Richards, R.C., Gallant, J.W., Melville, K. y Douglas, S.E., 2008. The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 380-390.
- Vasta, G.R.,** Nita-Lazar, M., Giomarelli, B., Ahmed, H., Du, S., Cammarata, M., Parrinello, N., Bianchet, M.A. y Amzel, L.M., 2011. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1388-1399.
- Vaughan, L.M.,** Smith, P.R. y Foster, T.J., 1993. An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infect. Immun.* 61, 2172-2181.
- Verrier, E.R.,** Langevin, C., Benmansour, A. y Boudinot, P., 2011. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1204-1214.

- Villena, A.J., 2003.** Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Rev. Fish Biol. Fish.* 111-140.
- Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouede, S., Moynet, D. y Mossalayi, M.D., 2003.** Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 19, 9-12.
- Vivas, J., 2003.** Optimización de una vacuna atenuada aroA de *Aeromonas hydrophila* para peces. Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales, Universidad de León.
- Vivas, J., Riaño, J., Carracedo, B., Razquin, B.E., Lopez-Fierro, P., Naharro, G. y Villena, A.J., 2004a.** The auxotrophic aroA mutant of *Aeromonas hydrophila* as a live attenuated vaccine against *A. salmonicida* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 16, 193-206.
- Vivas, J., Carracedo, B., Riano, J., Razquin, B.E., Lopez-Fierro, P., Acosta, F., Naharro, G. y Villena, A.J., 2004b.** Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2702-2708.
- Vivas, J., Razquin, B., Lopez-Fierro, P. y Villena, A.J., 2005.** Modulation of the immune response to an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in rainbow trout: effect of culture media on the humoral immune response and complement consumption. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 223-233.
- Walbaum, J.J., 1972.** Petri Artedi Sueci Genera piscium. In quibus Systema totum ichthyologiae proponitur cum classibus, ordinibus, generum characteribus, specierum differentiis, observationibus plurimis. Redactis speciebus 242 ad genera 52. *Ichthyologiae, pars iii. Artedi Piscium* 1-723. Citado en: *Catalog of Fishes.* California Academy of Science. 2002. <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/>
- Wang, R., Neumann, N.F., Shen, Q. y Belosevic, M., 1995.** Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 329-346.
- Wang, T., Ward, M., Grabowski, P. y Secombes, C.J., 2001.** Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* 358, 747-755.
- Wang, T., Johnson, N., Zou, J., Bols, N. y Secombes, C.J., 2004.** Sequencing and expression of the second allele of the interleukin-1 β gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): identification of a novel SINE in the third intron. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 335-358.
- Wang, T., Holland, J.W., Martin, S.A.M. y Secombes, C.J., 2010.** Sequence and expression analysis of two T helper master transcription factors, T-bet and

- GATA3, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and analysis of their expression during bacterial and parasitic infection. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 705-715.
- Ware, C.F.**, 2003. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 181-184.
- Warr, G.W.**, 1998. Immune mechanisms of aquaculture species, en: *Fish Vaccinology*. Gudding, R.E.A. (Ed.). Basel, Switzerland, pp. 15-21.
- Watts, M.**, Munday, B.L. y Burke, C.M., 2001. Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79, 570-574.
- Werner-Felmayer, G.**, Golderer, G., Werner, E.R., Grobner, P. y Wachter, H., 1994. Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*. *Biochem. J.* 304 (Pt 1), 105-111.
- Whyte, S.K.**, 2007. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1127-1151.
- Wiens, G.D.**, Glenney, G.W., Lapatra, S.E. y Welch, T.J., 2006. Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. *Immunogenetics* 58, 308-323.
- Wiens, G.D.** y Glenney, G.W., 2011. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1324-1335.
- Woodland, R.**, 2011. European regulatory requirements for veterinary vaccine safety and potency testing and recent progress towards reducing animal use. *Procedia in Vaccinology* 5, 151-155.
- Yang, M.**, Wang, X., Chen, D., Wang, Y., Zhang, A. y Zhou, H., 2012. TGF-beta1 exerts opposing effects on grass carp leukocytes: Implication in teleost immunity, receptor signaling and potential self-regulatory mechanisms. *PLoS One* 7, e35011.
- Yanong, R.P.E.**, 2008. Use of vaccines in finfish aquaculture. Program in fisheries and aquatic sciences, School of Forest Resources and Conservation, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. FA156.
- Ye, J.**, Kaattari, I. y Kaattari, S., 2011. Plasmablasts and plasma cells: Reconsidering teleost immune system organization. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1273-1281.
- Yu, H.B.**, Zhang, Y.L., Lau, Y.L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J.M., Howard, S.P. y Leung, K.Y., 2005. Identification and characterization of

- putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4469-4477.
- Zapata, A.**, 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 55-65.
- Zapata, A.**, 1981. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 685-690.
- Zapata, A.G.** y Cooper, E.L., 1990. The immune system: comparative histopathology. *Cell Biology International Reports*. J. Wiley and sons Ltd (Ed.), 15: 267.
- Zapata, A.G.**, Varas, A. y Torroba, M., 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today* 13, 142-147.
- Zhan, Y.** y Jimmy, K., 2000. Molecular isolation and characterisation of carp transforming growth factor beta 1 from activated leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 309-318.
- Zhang, H.**, Thorgaard, G.H. y Ristow, S.S., 2002. Molecular cloning and genomic structure of an interleukin-8 receptor-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 13, 251-258.
- Zhang, Y.A.**, Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J. y Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827-835.
- Zhang, Y.**, Salinas, I. y Sunyer, J.O., 2011. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 627-634.
- Zhang, Z.**, Swain, T., Børgwald, J., Dalmo, R.A. y Kumari, J., 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 677-684.
- Zheng, F.R.**, Sun, X.Q., Xing, M.Q. y Liu, H., 2010. Immune response of DNA vaccine against lymphocystis disease virus and expression analysis of immune-related genes after vaccination. *Aquacult. Res.* 41, 1444-1451.
- Zheng, W.** y Flavell, R.A., 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 89, 587-596.
- Zhu, J.** y Paul, W.E., 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* 20, 4-12.

- Zhu, L.,** Nie, L., Zhu, G., Xiang, L. y Shao, J., 2012. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* Online: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X12000729>
- Zou, J.,** Neumann, N.F., Holland, J.W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C.J. y Rowley, A.F., 1999a. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochem. J.* 340 (Pt 1), 153-159.
- Zou, J.,** Grabowski, P.S., Cunningham, C. y Secombes, C.J., 1999b. Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine* 11, 552-560.
- Zou, J.,** Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C. y Secombes, C.J., 2000. Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 575-582.
- Zou, J.,** Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., Soma, G., Ototake, M., Nakanishi, T., Ellis, A.E. y Secombes, C.J., 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 161-172.
- Zou, J.,** Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N.C., Ellis, A.E. y Secombes, C.J., 2003a. Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 813-822.
- Zou, J.,** Secombes, C.J., Long, S., Miller, N., Clem, L.W. y Chinchar, V.G., 2003b. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 27, 845-858.
- Zou, J.,** Carrington, A., Collet, B., Dijkstra, J.M., Yoshiura, Y., Bols, N. y Secombes, C., 2005. Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *J. Immunol.* 175, 2484-2494.
- Zou, J.,** Tafalla, C., Truckle, J. y Secombes, C.J., 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. *J. Immunol.* 179, 3859-3871.
- Zou, J.** y Secombes, C.J., 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1376-1387.
- Zygmunt, B.** y Veldhoen, M., 2011. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv. Immunol.* 109, 159-196.