



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE GENES
RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE DE
Solea senegalensis FRENTE A *Photobacterium damsela*
SUBSP. *piscicida*. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
INMUNOGÉNICAS DEL PATÓGENO

TRANSCRIPTIONAL STUDY OF *Solea senegalensis* IMMUNE
RELATED GENES IN RESPONSE TO *Photobacterium damsela* SUBSP.
piscicida. IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC PROTEINS OF THE
PATHOGEN

TESIS DOCTORAL

José Alberto Núñez Díaz

PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

2017

DIRECTORES


Dra. María Carmen Balebona Accino

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: José Alberto Núñez Díaz

 <http://orcid.org/0000-0001-5215-0877>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Estudio transcriptómico de genes relacionados con la respuesta inmune de *Solea senegalensis* frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identificación de proteínas inmunogénicas del patógeno

Memoria presentada por D. José Alberto Núñez Díaz para optar al grado de Doctor con Mención de Doctorado Europeo.

Directores

Dra. María Carmen Balebona Accino

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Junio 2017



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

D. JUAN JOSÉ BORREGO GARCÍA, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

INFORMA QUE:

Don José Alberto Núñez Díaz ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste expido el presente informe,

Málaga, Junio de 2017

Fdo: Juan José Borrego García



INFORME DE LOS DIRECTORES

La presente Tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, bajo la dirección de la Dra. María Carmen Balebona Accino, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Málaga, y el Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Málaga, que dan su conformidad a la memoria de la Tesis titulada: “Estudio transcriptómico de genes relacionados con la respuesta inmune de *Solea senegalensis* frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identificación de proteínas inmunogénicas del patógeno” presentada por el Doctorando Don José Alberto Núñez Díaz para optar al Título de Doctor con Mención de Doctorado Europeo por la Universidad de Málaga.

Durante la realización de este trabajo de investigación se ha llevado a cabo el aprendizaje de técnicas útiles para dicha Tesis en los siguientes laboratorios:

- Grupo de Inmunología y Vacunología de peces, Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) (Oporto, Portugal), bajo la dirección del Dr. N.M.S. dos Santos (de enero a abril de 2014).

Málaga, Junio de 2017

Fdo: María Carmen Balebona Accino

Fdo: Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez



Los ensayos realizados en esta Tesis han sido financiados por la Junta de Andalucía a través de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia y fondos FEDER en el marco del proyecto “Aplicación de la tecnología de antígenos inducidos *in vivo* (IVIAT) a la identificación de proteínas antigénicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* durante la infección de lenguado senegalés (*Solea Senegalensis*)” (P10-RNM-6338).

El Doctorando ha sido becario del plan de Personal Investigador en Formación (P.I.F.) con cargo a los incentivos concedidos a proyectos de investigación de excelencia de las universidades y organismos de investigación de Andalucía durante el periodo 2012-2016.

Parte de los resultados obtenidos en la presente Tesis han sido publicados y comunicados en las siguientes revistas y congresos:

Publicaciones:

- Núñez-Díaz, JA, Fumanal, M, Mancera, JM, Moriñigo, MA, Balebona, MC (2016) Two routes of infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are effective in the modulation of the transcription of immune related genes in *Solea senegalensis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 179:8–17.

- Núñez-Díaz, JA, Fumanal, M, Viguera, E, Moriñigo, MA, Balebona, MC (2017) Use of *in vivo* induced technology to identify antigens expressed by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* during infection of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 64:446–456.

- Núñez-Díaz, JA, García de la Banda, I, Lobo, C, Moriñigo, MA, Balebona, MC (2017) Transcription of immune related genes in *Solea senegalensis* vaccinated against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identification of surrogates of protection. *Fish & Shellfish Immunology*, 66:455-465.

Congresos internacionales:

- Núñez-Díaz, JA, Fumanal, M, Mancera, JM, Moriñigo, MA, Balebona, MC. Hepatic gene expression in *Solea senegalensis* during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. Aquaculture Europe. San Sebastián, Spain, 2014.

- Núñez-Díaz, JA, Fumanal, M, García de la Banda, I, Moriñigo, MA, Balebona, MC. Use of *in vivo*-induced antigen technology to identify bacterial genes expressed during *Solea senegalensis* infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquaculture Europe. Edinburgh, Scotland, U.K., 2016.

Congresos nacionales:

- Lobo, C, Núñez, JA, Arijo, S, García de la Banda, I, Gutiérrez, JR, Moreno-Ventas, X, Balebona, MC. Vacunación de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con y sin adyuvante de Freund: Efectos a nivel de respuesta inmune y de crecimiento. V Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura (FIRMA). Cádiz, 2012.

- Fumanal, M, Núñez-Díaz, JA, Medina, A, García de la Banda, I, Lobo, C, Mancera, JM, Moriñigo, MA, Balebona, MC. Detección de componentes inmunogénicos para lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup) en los productos extracelulares de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. XIV Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón, 2013.

A mamá y papá



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a María Carmen Balebona y Miguel Ángel Moríñigo la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Agradeceremos el apoyo, los consejos, las críticas, la paciencia y el obligarme a salir de mi zona de confort, algo que me ha hecho crecer no solo como investigador, sino también como persona. A Eduardo Martínez por tener siempre una palabra amable para todos y a Salvador Arijo por sus estimulantes preguntas.

Mi agradecimiento al Director del Departamento, Juan José Borrego, así como al resto de sus componentes, María Carmen Alonso, Dolores Castro, Esther García, Antonio de Vicente, Alejandro Pérez, Francisco Cazorla, Carmen Vila y María Muñoz.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Alberto Medina y Silvana Tapia, así como a aquellos que ya se fueron, Francisco Javier Montilla, Beatriz Gil, Sara Vidal y Rosa María Rico, por acompañarme durante este trayecto y por perder parte de su tiempo en enseñarme durante mis inicios en el mundo de la investigación. Muchas gracias a Milena Fumanal, por convertir cada día en el laboratorio en una divertida aventura de descubrimiento, esta Tesis aún no habría visto la luz de no ser por tu incombustible ayuda día tras día.

Dar las gracias a Inés García de la Banda y Carmen Lobo, del Instituto Español de Oceanografía de Santander, y a Juan Miguel Mancera, de la Universidad de Cádiz, por su participación en la realización de los experimentos.

Os meus agradecimentos aos Doutores Nuno dos Santos e Ana do Vale por me terem dado a oportunidade de traballar e aprender no seu laboratorio no Porto. Aos meus colegas Rute Pinto, Inês Rodrigues e Maria Pereira por todo o apoio que me deram e por terem tornado a minha estadia mais agradável.

Gracias a los profesores Enrique Viguera y Javier Ruiz, del Departamento de Genética, por resolver las numerosas dudas surgidas durante el desarrollo de la presente Tesis y su colaboración.

Agradecer a los diferentes compañeros que han pasado por los laboratorios 1 y 2 del Departamento de Microbiología por nunca dar un no por respuesta cuando de ayudar se trataba (Claudia Escaño, Eva Arrebola, Álvaro Polonio, Francesca Aprile, Estefanía

Jiménez, Alejandro Labella, Benjamín López, Ana María Podadera, Daniel Álvarez, Rocío Leiva, Lisandro Vieytes, Carlos Carballo...).

A mis padres, a mi hermana, a mi mujer, cualquier palabra que escriba aquí resultaría insignificante para agradeceros todo lo que habéis hecho para que este día llegase.

ABREVIATURAS

A₂₆₀: absorbancia a 260 nm

A₂₈₀: absorbancia a 280 nm

ADNc: ADN complementario

AIF: adyuvante incompleto de Freund

ANOVA: análisis de la varianza

APS: persulfato de amonio

ARNm: ARN mensajero

ARNnc: ARN no codificante

BCP: 1-bromo-3-cloropropano

BSA: albúmina sérica bovina

CD(n): clúster de diferenciación (número)

Ct: ciclo umbral de detección

DEPC: dietil pirocarbonato

DL-50: dosis letal 50

D.O._{600nm}: densidad óptica a 600 nm

ECPs: productos extracelulares

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FCS: suero fetal bovino

IgM: inmunoglobulina M

IP: intraperitoneal

IM: inmersión

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Ivi: inducido *in vivo*

Kan: kanamicina

L-15: Leibovitz

LB: Luria-Bertani

MOPS: ácido 3-n-morfolino-propanosulfónico

NLR: receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: PBS con Tween 20

PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PRR: receptor de reconocimiento de patrones
qPCR: PCR cuantitativa
OPD: o-fenilendiamina dihidrocloruro
ROS: especies reactivas de oxígeno
RNA-seq: secuenciación de ARN
RNS: especies reactivas de nitrógeno
SDS: dodecilsulfato sódico
SNP: polimorfismos de un único nucleótido
SOB: caldo súper óptimo
SOC: caldo súper óptimo con represión catabólica
TBE: tampón tris-borato-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFB1: tampón de transformación 1
TFB2: tampón de transformación 2
TLR: receptores de tipo Toll
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TSA: agar triptona soja
TSB: caldo triptona soja
TSBs: caldo triptona soja salino
ufc: unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN	7
1. LA ACUICULTURA: HISTORIA Y ESTADO DEL SECTOR	9
1.1. La acuicultura a nivel mundial	9
1.2. La acuicultura española	11
2. EL CULTIVO DEL LENGUADO SENEGALÉS	13
2.1. Importancia comercial y nutricional	13
2.2. Factores limitantes en el cultivo de <i>S. senegalensis</i>	13
3. <i>Photobacterium damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i>	13
3.1. Características, sintomatología de la fotobacteriosis y modo de transmisión	13
3.2. Factores de virulencia de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	16
3.2.1. Adherencia e invasión celular	16
3.2.2. Exotoxinas	17
3.2.3. Cápsula	18
3.2.4. Captación de hierro	19
4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN <i>in vivo</i> DE GENES IMPLICADOS EN LA INFECCIÓN	20
4.1. Técnicas de identificación de genes implicados en la patogénesis	20
4.1.1. Etiquetado de transposones (STM)	21
4.1.2. Microarray	22
4.1.3. Secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-seq)	22
4.1.4. Inducción fluorescente diferencial (DFI)	24
4.1.5. Tecnología de expresión <i>in vivo</i> (IVET)	25
4.1.6. Tecnología de expresión <i>in vivo</i> basada en recombinasa (RIVET)	26
4.1.7. Tecnología de antígenos inducidos <i>in vivo</i> (IVIAT)	27
5. SISTEMA INMUNE DE TELEÓSTEOS	30
5.1. Sistema inmune innato	31
5.1.1. Barreras físicas	31
5.1.2. Factores humorales	32
5.1.2.1. Citoquinas	32
5.3.2.2. Lisozimas	33
5.1.2.3. Sistema del complemento	34
5.1.2.4. Proteínas de choque térmico	34
5.1.2.5. Proteínas de fase aguda implicadas en la biodisponibilidad de hierro	35
5.1.3. Factores celulares	36
5.1.3.1. Receptores de reconocimiento de patrones	36
5.1.3.2. Fagocitosis	39
5.1.3.3. Citotoxicidad celular inespecífica	40

5.2. Sistema inmune adaptativo	41
5.2.1. Factores humorales	42
5.2.1.1. Linfocitos B y anticuerpos	42
5.2.2. Factores celulares	44
5.2.2.1. Linfocitos T citotóxicos	44
5.2.2.2. Linfocitos T colaboradores	45
5.3. Estimulación del sistema inmune mediante vacunas	46
5.3.1. Vacunas frente <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	47
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE <i>S. senegalensis</i> TRAS LA INFECCIÓN Y VACUNACIÓN FRENTE A <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i>	63
1.1. Condiciones experimentales	63
1.1.1. Infección de ejemplares juveniles de <i>S. senegalensis</i> con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	63
1.1.2. Vacunación de ejemplares juveniles de <i>S. senegalensis</i> frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	65
1.1.3. Infección con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> de los lenguados vacunados	67
1.2. Extracción de ARN y reversotranscripción a ADNc	68
1.3. Elección de genes de referencia	68
1.4. Cuantificación de la transcripción relativa mediante qPCR	69
1.5. Tratamiento de los datos mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	70
1.6. Determinación de anticuerpos en el suero mediante ELISA	71
1.7. Análisis estadístico	72
2. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE IVIAT DE ANTÍGENOS DE <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i> EXPRESADOS <i>in vivo</i>	72
2.1. Construcción de la genoteca	72
2.1.1. Microorganismos empleados	72
2.1.2. Extracción de ADN	73
2.1.3. Fragmentación hidrodinámica del ADN	73
2.1.4. Preparación de células competentes	76
2.1.5. Ligación del ADN	77
2.1.6. Transformación en <i>E. coli</i>	78
2.2. Obtención de suero con anticuerpos frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> a partir de ejemplares de <i>S. senegalensis</i> sometidos a infección	79
2.3. Determinación de anticuerpos en el suero mediante ELISA	79
2.4. Adsorción del suero	79

2.5. Análisis de la genoteca con sueros de <i>S. senegalensis</i> mediante dot blot	80
2.6. Extracción del vector recombinante y secuenciación	82
2.7. Visualización de proteínas recombinantes en geles de acrilamida mediante SDS-PAGE – Western blot	82
3. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE GENES DE <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	85
3.1. Incubación de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en condiciones limitantes de hierro	85
3.2. Incubación de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en condiciones de estrés oxidativo	85
3.3. Transcripción de genes de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> durante la infección <i>ex vivo</i> de riñón cefálico de <i>S. senegalensis</i>	86
3.4. Extracción de ARN y reverso-transcripción a ADNc	87
3.5. Cuantificación de la transcripción mediante qPCR	87
3.6. Tratamiento de los datos mediante el método $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$	89
3.7. Análisis estadístico	89
RESULTADOS	91
1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE <i>S. senegalensis</i> A LA INFECCIÓN Y VACUNACIÓN FRENTE A <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	93
1.1. Infección de ejemplares juveniles de <i>S. senegalensis</i> con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	93
1.1.1. Detección de anticuerpos específicos mediante ELISA	94
1.1.2. Transcripción génica	94
1.2. Vacunación de ejemplares de <i>S. senegalensis</i> frente a <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	101
1.2.1. Detección de anticuerpos específicos mediante ELISA	101
1.2.2. Transcripción génica tras 90 días de la vacunación	102
1.2.3. Infección experimental	104
1.2.4. Expresión génica tras la infección	105
2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i> EXPRESADAS <i>in vivo</i> EN <i>S. senegalensis</i>	109
2.1. Preparación de los sueros para la identificación de antígenos expresados <i>in vivo</i>	109
2.2. Identificación de los antígenos expresados <i>in vivo</i> por <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	110
3. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE GENES SELECCIONADOS DE <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i>	116
3.1. Transcripción de genes de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en condiciones limitantes de hierro y estrés oxidativo	116
3.2. Transcripción de genes de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> durante la infección <i>ex vivo</i> de riñón cefálico de <i>S. senegalensis</i>	121
3.2.1. Supervivencia bacteriana en contacto con células de riñón cefálico de <i>S. senegalensis</i>	121
3.2.2. Cuantificación de la transcripción relativa de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células de riñón de <i>S. senegalensis</i>	122

DISCUSIÓN	127
1. RESPUESTA INMUNE DE <i>S. senegalensis</i> A LA INFECCIÓN FRENTE A <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i>	129
2. RESPUESTA INMUNE DE <i>S. senegalensis</i> A LA VACUNACIÓN FRENTE A <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i>	137
2.1. Transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en los peces vacunados	137
2.2. Transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en los peces supervivientes a la infección con <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	140
3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS EXPRESADAS POR <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i> EN <i>S. senegalensis</i>	145
4. TRANSCRIPCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE <i>P. damsela</i> SUBSP. <i>piscicida</i> EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO	152
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	163
ANEXO I	197
SUMMARY	203
CONCLUSIONS	229
SECCIÓN DE ARTÍCULOS – ARTICLE SECTION	235
1. Two routes of infection with <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> are effective in the modulation of the transcription of immune related genes in <i>Solea senegalensis</i>	237
2. Transcription of immune related genes in <i>Solea senegalensis</i> vaccinated against <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . Identification of surrogates of protection	247
3. Use of <i>in vivo</i> induced technology to identify antigens expressed by <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> during infection of Senegalese sole (<i>Solea senegalensis</i>)	259
4. Influence of growth conditions on the transcription of genes encoding virulence factors in <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	271



INTRODUCCIÓN

1. LA ACUICULTURA: HISTORIA Y ESTADO DEL SECTOR

1.1.- La acuicultura a nivel mundial

La acuicultura incluye la cría de peces, moluscos, crustáceos y plantas, ya sea en aguas dulces, saladas o salobres, mediando la intervención humana para incrementar la producción (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1988).

La industria acuícola ha experimentado una gran expansión en las últimas décadas (Figura 1). Siendo el sector relacionado con la producción animal que más crece, alcanzó una producción de cerca de 74 millones de toneladas en 2014 (FAO, 2016) y representa el 44% del suministro mundial de especies acuáticas (Tabla 1).

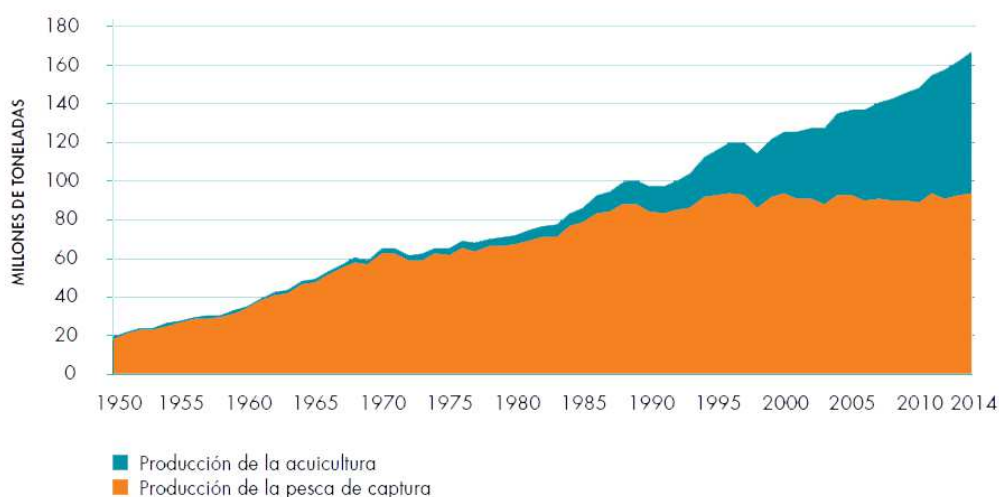


Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura (FAO 2016).

Introducción

Tabla 1. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo (en millones de toneladas) (FAO, 2014; 2016).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PRODUCCIÓN								
Pesca de captura								
Continental	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marina	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7	81,0	81,5
Acuicultura								
Continental	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9	44,8	47,1
Marina	20,0	20,5	21,4	22,3	23,3	24,7	25,5	26,7
PRODUCCIÓN TOTAL	140,7	143,1	145,8	148,1	155,7	158,0	162,9	167,2
UTILIZACIÓN								
Consumo humano	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2	141,5	146,3
Usos no alimentarios	23,4	22,2	22,1	19,9	24,5	21,7	21,4	20,9
Población (miles de millones)	6,7	6,8	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2	7,3
Peces comestibles per cápita (kg)	17,6	17,9	18,1	18,5	18,7	19,2	19,7	20,1

La zona Asia-Pacífico es la principal productora en la industria acuícola mundial, con aproximadamente el 89% de la producción total. En esta región, China es el motor global con una producción de alrededor de 45 millones de toneladas que representan el 61,7% de la producción total. Norteamérica, Caribe y América Latina acumulan el 5% de la producción del sector destacando especialmente esta última con Chile como país de referencia. En estas zonas predomina el cultivo de salmónidos, pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) y langostinos, aunque la producción de este tipo de crustáceo se ha visto mermada en los últimos años debido a episodios epizooticos (FAO, 2016).

El continente africano suma al aporte mundial un 2% de la producción mundial acuícola. En la zona norte y del Cercano Oriente Egipto es, con mucha diferencia, el principal motor de la producción (67% del total continental), siendo el primer productor mundial de lisas y el segundo de tilapias, solo por detrás de China. El África

subsahariana cuenta con una industria acuícola cuyo estado podría catalogarse de “fase inicial” a pesar de su potencial por tamaño y recursos naturales. De esta zona, Nigeria es uno de los países de mayor diversificación en la producción con cultivos de pez gato y tilapia, entre otros peces de agua dulce. Por su parte, en Madagascar o Mozambique se está apostando fuertemente por el cultivo de langostino jumbo (*Penaeus monodon*) cuyo potencial de crecimiento es enorme (FAO, 2016).

Europa representa el 4% de la producción acuícola mundial con 2,9 millones de toneladas. En el conjunto de los países miembros de la Unión Europea esta producción se encuentra estancada desde el periodo 1990-2014, con 1-1,2 millones de toneladas. En el Reino Unido y Noruega la mayor parte de la producción se debe a salmónidos, en Grecia, lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*), y el cultivo de moluscos bivalvos (mejillón, ostra y almeja) predomina en Francia, España e Italia. El cultivo de crustáceos, algas y otros invertebrados es muy reducido (Figura 2) (FAO, 2016).

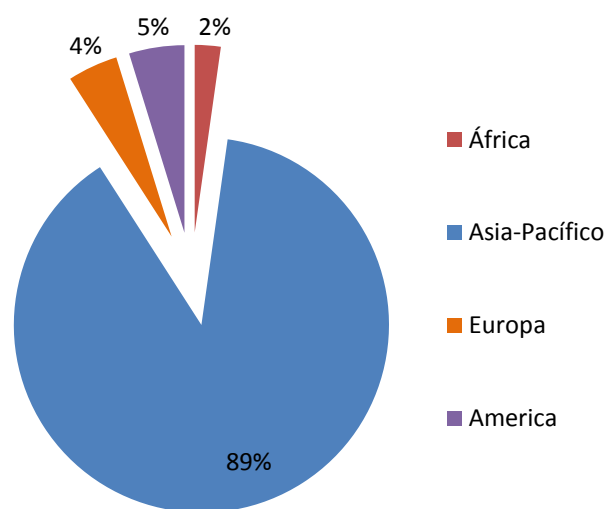


Figura 2. Producción acuícola por región: porcentaje del total mundial de producción (FAO 2016).

1.2. La acuicultura española

El consumo de productos pesqueros en España ha sido elevado tradicionalmente, sufriendo en los últimos años un incremento. Así, en la actualidad España está entre los 10 países del mundo en importaciones de pescado y productos pesqueros, siendo el 4º país mundial en volumen de importación de este tipo de productos (FAO, 2016). Se

Introducción

alcanzaron los 26,4 kg de consumo y 199,5 € de gasto per cápita de productos pesqueros (MERCASA, 2015).

Por otro lado, España es el primer productor acuícola de los países miembros de la Unión Europea, siendo su principal cultivo el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), con el 78% de la producción total estatal. En cuanto al cultivo de peces en España, está centrado en dorada, lubina y rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lo que ha causado cierta saturación en el mercado nacional. En los últimos años se ha intentado aumentar la oferta en el mercado mediante el impulso del cultivo de nuevas especies con potencial comercial (Tabla 2) (APROMAR, 2015; 2016).

Tabla 2. Datos de producción de pescado de crianza en España (en toneladas) (APROMAR 2015; 2016).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Dorada	20.220	22.320	23.930	23.690	20.360	16.930	19.430	16.795	16.230	16.231
Lubina	8.930	10.480	9.840	13.840	12.495	14.367	14.270	14.707	17.376	21.324
Rodaballo	5.815	6.080	7.870	8.320	6.910	7.755	7.970	6.814	7.808	7.815
Anguila	328	360	470	510	446	505	460	315	366	380
Besugo	134	194	200	185	185	200	187	228	172	104
Corvina	845	810	1.300	1.660	3.250	2.880	1.640	89	1.090	1.642
Lenguado	80	60	55	188	204	110	194	343	786	664
Langostino	45	42	45	48	38	32	30	0	4	ND
Trucha	25.401	29.059	24.359	23.232	17.600	16.818	18.612	16.787	15.111	ND

*ND: no disponible

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una de las especies cuyo cultivo ha experimentado un claro crecimiento en los últimos años por las buenas perspectivas comerciales en el mercado español, sus beneficiosos efectos para la salud debido a su moderado contenido calórico y a la presencia de ácidos grasos omega 3.

La importancia comercial de esta especie radica en su apreciado sabor y popularidad entre los consumidores españoles. Se trata de un pescado de carne blanca, magra, de muy bajo valor calórico, fácil de asimilar y digerir. A nivel nutricional cuenta con proteínas de elevado valor biológico, ácidos grasos omega 3, minerales como el sodio, el potasio, el fósforo, el magnesio y vitaminas del grupo B (B1, B2, B3, B6, B12) (JACUMAR, 2006).

2. EL CULTIVO DEL LENGUADO SENEGALÉS

2.1. Importancia comercial y nutricional

España es el primer país en importancia en el cultivo de lenguado a nivel europeo y mundial con una producción cercana al 80% del total, y Andalucía es la segunda comunidad autónoma productora de lenguado senegalés dentro del mercado español. La necesidad de recurrir a las importaciones para cubrir la demanda interna (Ministerio de Agricultura, 2015) ha impulsado el cultivo del lenguado en España. Así, gracias a los avances en investigación y la apertura de nuevas piscifactorías, se espera que sea una de las especies que más aumente su producción en años venideros (APROMAR, 2016).

2.2. Factores limitantes en el cultivo de *S. senegalensis*

La irrupción de patologías en cualquiera de las etapas del cultivo del lenguado senegalés, se ha traducido en pérdidas económicas para el sector acuícola e inclusive el cierre de piscifactorías (García de la Banda, 2011). Una de las patologías que más perjuicios provoca en esta especie es la pseudotuberculosis (también denominada fotobacteriosis o pasteurelisis) causada por la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Zorrilla *et al.*, 1999; Magariños *et al.*, 2003). La región mediterránea es especialmente sensible a estos brotes epizooticos que pueden llegar a originar mortandades cercanas al 100% de los individuos afectados, con las consiguientes pérdidas económicas para la industria (Andreoni y Magnani, 2014).

3. *Photobacterium damsela* SUBSP. *piscicida*

3.1. Características, sintomatología de la fotobacteriosis y modo de transmisión

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es una bacteria Gram-negativa de morfología bacilar (0,8-1,3 x 1,4-4 µm de tamaño) y halófila, pudiendo crecer en medios con una concentración de 1,5-2% de NaCl. Presenta tinción bipolar y

Introducción

pleomorfismo según las condiciones de crecimiento o la fase del cultivo (Díaz-Rosales, 2006). Carece de movimiento asociado a la presencia de flagelos, si bien se ha descrito su capacidad de translocación en medio sólido o semi-sólido (twitching) por un mecanismo mediado por pili tipo IV (Remuzgo-Martínez *et al.*, 2014). Se trata de un bacilo oxidasa y catalasa positivo, fermentativo y anaerobio facultativo, con actividades enzimáticas lipasa y fosfolipasa (Magariños *et al.*, 1992). Presenta resistencia a antibióticos tales como estreptomicina, eritromicina y kanamicina (Zorrilla *et al.*, 1999). Su rango de temperatura de crecimiento oscila entre los 15-30 °C, siendo su óptimo en torno a los 25 °C (Rivas, 2012). Por este motivo, la incidencia de la fotobacteriosis aumenta en los meses estivales con temperaturas del agua más elevadas (por encima de 22 °C).

Los estudios serológicos de distintas cepas de este patógeno muestran una gran homogeneidad en sus propiedades fenotípicas y antigénicas independientemente del hospedador y origen geográfico (Magariños *et al.*, 1992; 1996c). Por otro lado, si bien los ensayos inmunológicos con LPS muestran similitud entre diferentes cepas, se ha detectado cierta variabilidad genética a partir de los perfiles obtenidos mediante las técnicas de ribotipado y RAPD (Magariños *et al.*, 1997; 2000; Mancuso *et al.*, 2007), esto ha permitido el establecimiento de dos líneas clonales: una constituida por cepas de Europa y Estados Unidos y otra formada por aislados procedentes de Japón, las cuales presentan diferencias en el contenido plasmídico (Magariños *et al.*, 1992). Hasta el momento, los aislados precedentes de brotes de fotobacteriosis en lenguado poseen un alto grado de homogeneidad a nivel antigénico, como indican los ensayos de caracterización inmunológica de sus LPS y proteínas de membrana (Magariños *et al.*, 2003). Además, los estudios genéticos muestran que pertenecen a la línea clonal europea, representada por la mayoría de los aislados procedentes de dorada y lubina (Magariños *et al.*, 2003).

En cuanto al hospedador, se trata de un patógeno de carácter oportunista, que ocasiona patologías en especies marinas tanto cultivadas como salvajes, lo que indica ausencia de especificidad por un hospedador determinado. Fue aislado por primera vez en 1963 en la Bahía de Chesapeake (Estados Unidos) durante un brote epizoótico que causó mortalidades masivas en perca (*Roccus americanus*) (Snieszko *et al.*, 1964). Afecta a multitud de especies salvajes y de cultivo alrededor del mundo, como lubina (Magariños y Romalde, 1997), besugo (*Pagrus pagrus*) (Rodgers y Furones, 1998),

dorada (Magariños *et al.*, 2001), lenguado senegalés (Zorrilla *et al.*, 1999; Magariños *et al.*, 2003), medregal del Japón (Kusuda y Yamaoka, 1972) y mero de pintas rojas (*Epinephelus akaara*) (Ueki *et al.*, 1990), entre otros.

La pseudotuberculosis provocada por *P. damsela* subsp. *piscicida* se caracteriza por la aparición de septicemia hemorrágica y formación de nódulos blanquecinos en órganos internos (hígado, riñón y bazo). Estos nódulos presentan apariencia de tubérculos, y contienen acumulaciones del patógeno, fagocitos necrotizados y granulomas (Do Vale *et al.*, 2007). Además, se puede observar la presencia de bacterias en los sinusoides y vasos hepáticos y aumento de tamaño del bazo (esplenomegalia) a causa de la infiltración de células sanguíneas junto con grupos de bacterias que bloquean capilares y espacios intersticiales (Toranzo *et al.*, 1991). A nivel externo los síntomas son poco evidentes y los peces afectados no suelen mostrar lesiones externas. Se han informado algunos casos de ligeras hemorragias en cabeza y branquias, exoftalmia y pigmentación anormal en la piel (Toranzo *et al.*, 1991; Avci *et al.*, 2013) e hinchazón de la región abdominal (Balebona *et al.*, 1992) de ejemplares de lubina y dorada.

Estudios en lubina y dorada indican una mayor susceptibilidad de los ejemplares jóvenes y de pequeño tamaño a padecer la enfermedad. Esto podría deberse a un sistema inmune que aún no se encuentra plenamente desarrollado, y a que la funcionalidad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos no es la óptima para hacer frente a la enfermedad (Skarmeta *et al.*, 1995; Noya *et al.*, 1995a; Noya *et al.*, 1995b).

P. damsela subsp. *piscicida* es capaz de sobrevivir en ambientes marinos (agua y sedimento) durante periodos que oscilan entre 6 y 12 días conservando su potencial como patógeno, lo que sugiere que el medio marino podría constituir un reservorio y vehículo de transmisión del mismo (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1994b; Magariños *et al.*, 2001; Díaz-Rosales, 2006). Por otro lado, el motivo de la mayor incidencia de la enfermedad en los meses de verano no se ha determinado, pero podría estar relacionado con un aumento en el crecimiento del patógeno en el medio acuático a temperaturas superiores. Cuando la temperatura es inferior, los peces quedarían en estado de portadores asintomáticos (Magariños *et al.*, 2001).

Se desconoce el modo de transmisión de la enfermedad, pero algunos autores consideran que ocurre por contacto entre los peces o a través del agua, invadiendo el patógeno los tejidos del hospedador a partir de las branquias y el tracto gastrointestinal

Introducción

(Sánchez y Muñoz-Cueto, 2014). El mucus que recubre la piel de los peces representa la primera barrera que el microorganismo debe superar para poder llevar a cabo la colonización. Estudios realizados con mucus de rodaballo, dorada y lubina indican que *P. damsela* subsp. *piscicida* es sensible a la acción bactericida del mucus de rodaballo y lenguado; sin embargo, muestra resistencia al mucus de dorada y lubina (Magariños *et al.*, 1995; Guardiola *et al.*, 2017).

3.2. Factores de virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*

3.2.1. Adherencia e invasión celular

La patogénesis es un proceso complejo en el que intervienen multitud de factores. Para que el patógeno la desarrolle, inicialmente debe adherirse a las células diana del hospedador y resistir la eliminación por parte de los distintos mecanismos del sistema inmunitario. *P. damsela* subsp. *piscicida* se adhiere débilmente a células de líneas celulares de peces, aunque se ha observado una alta capacidad adhesiva en intestinos de dorada, lubina y rodaballo (Magariños *et al.*, 1996b; Elkamel y Thune, 2003). Su capacidad de adhesión se ve inhibida por calor o adición de azúcares, mientras que no se ve afectada por la acción de proteasas o antisuero frente al lipopolisacárido de la bacteria, lo que indica que los ligandos implicados en el proceso de adhesión celular podrían ser glucoproteínas (Magariños *et al.*, 1996b).

Las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para llevar a cabo la invasión celular en el hospedador, incluyendo aquellas células que no son de naturaleza fagocítica, como son las epiteliales o endoteliales (Falkow *et al.*, 1992). Esto permite a los microorganismos acceder al torrente sanguíneo y diseminarse por diferentes partes del organismo. Además, el interior celular proporciona un ambiente idóneo para evadir las defensas del hospedador (Rivas, 2012). Esta invasión puede ser favorecida por la unión a receptores celulares (adhesinas/invasinas); por la translocación de proteínas bacterianas que son inyectadas por un mecanismo de secreción tipo III al interior celular; fimbrias o mediante proteínas que provocan reorganizaciones en la estructura de la membrana plasmática que facilitan al patógeno internalizarse en la célula hospedadora (He, 1998; Pizarro-Cerdá y Ossart, 2006). *P. damsela* subsp. *piscicida* cuenta con una potente capacidad para invadir fagocitos, quedar internalizado en

vacuolas e inhibir la fusión fago-lisosomal mientras se multiplica en el interior del fagocito para posteriormente provocar la apoptosis celular y liberar al exterior nuevas bacterias que infectan las células adyacentes (Elkamel *et al.*, 2003), contribuyendo a mantener un estado de infección crónica en el hospedador (Magariños *et al.*, 1996b; López-Dóriga *et al.*, 2000; Do Vale *et al.*, 2003; Elkamel y Thune, 2003).

3.2.2. Exotoxinas

Los productos extracelulares (ECPs) secretados por los patógenos representan importantes factores de virulencia que contribuyen de manera fundamental al desarrollo de la enfermedad o a combatir los mecanismos de defensa del hospedador. Entre estos productos se incluyen enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, proteasas, sideróforos, factores adhesivos y hemaglutininas. Algunos de ellos, como enterotoxinas, hemolisinas y citotoxinas causan efectos directos, mientras que otros como los sideróforos actúan de manera indirecta en el establecimiento de la infección (Rivas, 2012).

La importancia de los ECPs secretados por *P. damsela* subsp. *piscicida* ha sido ampliamente descrita (Balebona *et al.*, 1992; Magariños *et al.*, 1992; Noya *et al.*, 1995a; 1995b; Romalde, 2002; Do Vale *et al.*, 2005). Esta bacteria presenta una fuerte toxicidad, con actividad hemolítica, fosfolipasa y citotóxica (Magariños *et al.*, 1992; Osorio *et al.*, 2006; Do Vale *et al.*, 2007; Naka *et al.*, 2007).

Se ha observado que la infección de lubina con cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida* produce la apoptosis de macrófagos peritoneales y neutrófilos (Do Vale *et al.*, 2003). El mecanismo de virulencia del patógeno que induce la destrucción de las células fagocíticas del hospedador reside en una exotoxina de 56 kDa llamada AIP56 (*apoptosis inducing protein*) (Do Vale *et al.*, 2005). Esta exotoxina es exclusivamente secretada por las cepas virulentas de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y está codificada en un plásmido de alto número de copias presente solo en dichas cepas (Do Vale *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010). Un aspecto relevante de este proceso es la gran reducción que sufre el hospedador en el nivel de fagocitos viables, con la consiguiente incapacidad del sistema inmunitario para hacer frente a la infección. Esto es ventajoso para el patógeno, que le permite extenderse por todo el hospedador. A esto hay que añadir que los macrófagos, además de tener actividad fagocítica antibacteriana, son los encargados de retirar cuerpos citotóxicos y neutrófilos apoptóticos del foco inflamatorio (Savill *et al.*,

Introducción

1989). La incapacidad de los macrófagos para retirar los neutrófilos que han sufrido apoptosis ocasiona una necrosis secundaria que culmina con una lisis de macrófagos, neutrófilos y cuerpos apoptóticos, liberándose un contenido altamente citotóxico para el hospedador (Do Vale *et al.*, 2003). En este proceso apoptótico producido por *P. damsela* subsp. *piscicida* participan rutas apoptóticas intrínsecas y extrínsecas, activación de caspasas (-3, -8 y -9), pérdida de potencial de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Costa-Ramos *et al.*, 2011).

3.2.3. Cápsula

La cápsula polisacáridica juega un papel importante en la virulencia de un amplio espectro de bacterias patógenas ya que permite el intercambio de sustancias entre el microorganismo y el ambiente que le rodea. Su implicación en la patogenicidad en las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* ha sido descrita en diversos estudios (Bonet *et al.*, 1994; Magariños *et al.*, 1996a; Magariños y Romalde, 1997).

Todas las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* sintetizan una exoestructura adicional en medio rico en glucosa, aunque solo las cepas virulentas sintetizan cápsula (Bonet *et al.*, 1994; Magariños *et al.*, 1996a). Esta cápsula les confiere resistencia a la inactivación por suero, aumenta el grado de virulencia y les otorga resistencia a la fagocitosis. La inducción de cápsula en cepas avirulentas produce una disminución significativa de la fagocitosis de la bacteria, resistencia al suero y reducción de su DL₅₀ en aproximadamente 4 unidades logarítmicas (Magariños *et al.*, 1996a; Arijo *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la expresión de material capsular es dependiente de la disponibilidad de hierro y la fase de crecimiento. Así, bacterias cultivadas bajo condiciones limitantes de hierro mostraron una significativa reducción de la cantidad de material polisacáridico en comparación a aquellas que crecieron con disponibilidad de hierro (Do Vale *et al.*, 2002). Esto podría explicarse por la necesidad de la bacteria de expresar sideróforos y receptores de hierro durante los primeros instantes en el interior del hospedador, lo que estaría afectado por una capsula gruesa, que además perjudicaría la colonización al dificultar la adhesión a las células a invadir (Magariños *et al.*, 1996a; López-Dóriga *et al.*, 2000). Una vez que el microorganismo alcanza diferentes tejidos, la cantidad de material capsular producido aumenta en respuesta a los mecanismos de defensa del hospedador (Romalde, 2002).

3.2.4. Captación de hierro

La capacidad de obtener hierro para emplearlo como nutriente es muy importante en los seres vivos, incluyendo los microorganismos. En patógenos es fundamental para el crecimiento en el interior de un hospedador y poder así causar infección. En animales, la mayor parte del hierro intracelular se halla unido a ferritina, hemosiderina o grupos hemo, y extracelularmente a proteínas con gran afinidad por el hierro como la transferrina. Por lo tanto hay gran abundancia de hierro en los fluidos corporales pero su presencia en forma libre es baja para sostener un crecimiento bacteriano (Griffiths, 1991; Rivas, 2012).

Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias en la obtención de hierro para poder llevar a cabo sus funciones. En el caso concreto de *P. damsela* subsp. *piscicida* todas las cepas producen sideróforos en condiciones limitantes de hierro. Se ha encontrado un sistema de incorporación de hierro mediado por sideróforos y, al menos, tres proteínas de membrana externa de alto peso molecular (Magariños *et al.*, 1994c). Además, estudios *in vitro* muestran que la regulación de la secreción de enzimas proteolíticas es dependiente de la cantidad de hierro presente en el medio de cultivo, y que únicamente las cepas cultivadas en condiciones limitantes de hierro hidrolizan caseína y gelatina (Magariños *et al.*, 1994c). *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de utilizar la hemoglobina y la hemina como fuente de hierro; así, inyecciones intraperitoneales de hemina previas a una infección experimental aumentan la virulencia del patógeno (Magariños *et al.*, 1994c). Los genes implicados en la captación y transporte de grupos hemo han sido descritos en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Juiz-Río *et al.*, 2005) y se ha demostrado la expresión *in vivo* de dos de ellos (HutC y HutD) en alevines de rodaballo durante la infección experimental (Osorio *et al.*, 2010).

Estudios de hibridación sustractiva entre una cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* y una cepa de *P. damsela* subsp. *damsela* han revelado la existencia de genes involucrados en la producción de un sideróforo llamado yersiniabactina que presenta similitud con proteínas responsables de la biosíntesis de sideróforos en especies de *Yersinia* (Osorio *et al.*, 2006). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran en un plásmido, (pPHDP70), y participan en la biosíntesis y transporte del sideróforo (denominado piscibactina), formando una isla de patogenicidad (HPI) (Osorio *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la piscibactina producida por *P. damsela* subsp. *piscicida* puede favorecer el crecimiento de *Yersinia enterocolitica* en

Introducción

condiciones limitantes de hierro (Osorio *et al.*, 2006), lo que indica que estructural y funcionalmente, yersiniabactina y piscibactina, estarían relacionados. Además, cepas carentes del plásmido pPHDP70 y que no producen piscibactina, presentan crecimiento deficiente en condiciones limitantes de hierro y un descenso de su virulencia (Osorio *et al.*, 2015).

Este grupo de genes es exclusivo de los aislados europeos de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2006), mientras que están ausentes en los aislados japoneses y americanos. Asimismo, el análisis de secuencias reveló la existencia de grupos de genes similares para la producción de sideróforos en *Photobacterium profundum* SS9 y *Vibrio cholerae* RC385 (Osorio *et al.*, 2006).

4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN *in vivo* DE GENES IMPLICADOS EN LA INFECCIÓN

4.1. Técnicas de identificación de genes implicados en la patogénesis

Todos los organismos, patógenos incluidos, tienen la capacidad de responder ante los estímulos del ambiente que les rodea, regulando la expresión génica para así poder optimizar sus capacidades de supervivencia y desarrollo.

A pesar de que se conoce una amplia variedad de factores de virulencia implicados en la patogenicidad de los microorganismos, estos datos se han obtenido fundamentalmente a partir de estudios realizados *in vitro*. Hay que tener en consideración que durante la infección, el patógeno se debe adaptar a un rango de condiciones tales como las superficies mucosas, sangre, escasez de nutrientes, etc., y sobrevivir en cualquiera de ellos, lo que requerirá la expresión de un conjunto de factores distintos. De esta forma, los genes que son regulados *in vivo* pueden desempeñar un importante papel en la enfermedad y ser determinantes de la virulencia.

Se han desarrollado distintas técnicas que permiten la identificación de genes bacterianos expresados específicamente *in vivo* durante el proceso infeccioso, los cuales pueden servir para desarrollar terapias antimicrobianas o vacunas (Kim *et al.*, 2003). Cada una de estas técnicas posee ventajas e inconvenientes, dependiendo del modelo o patógeno utilizado. Entre estas técnicas se incluyen el etiquetado de transposones

marcados (STM), microarray de ADN, secuenciación de ARN (RNA-seq), inducción fluorescente diferencial (DFI), la tecnología de expresión *in vivo* (IVET), la tecnología de expresión *in vivo* basada en recombinasa (RIVET) y la tecnología de antígenos inducidos *in vivo* (IVIAT), las cuales serán descritas a continuación.

4.1.1. Etiquetado de transposones (STM)

La técnica STM es un método de selección negativo desarrollado para identificar factores de virulencia bacterianos. En la STM, el transposón introducido en el genoma de cada mutante bacteriano afecta la transcripción y traducción de una proteína, pudiendo modificar su estructura y función. Este transposón está marcado con una secuencia única de ADN, la cual puede ser amplificada mediante PCR a partir de una muestra procedente de una población con diferentes mutantes. En la práctica, la genoteca de transposones se cultiva *in vitro*, y de ahí, se retira una fracción y se extrae su ADN. La fracción restante se expone a un ambiente *in vivo*, recuperándose los clones y extrayendo el ADN. Mediante PCR se identifican los clones presentes en ambas fracciones, cuando una secuencia se encuentra presente en la fracción que contenía los mutantes crecidos *in vitro*, pero no se halla en la fracción *in vivo*, nos indica que el gen es indispensable para el crecimiento en un ambiente *in vivo*, y accesorio para el crecimiento *in vitro*.

Esta técnica se desarrolló inicialmente para la identificación de genes de virulencia en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Hensel *et al.*, 1995), y posteriormente ha sido empleada tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas incluyendo a *Neisseria meningitidis* (Jamet *et al.*, 2013), *Listeria monocytogenes* (Cummins *et al.*, 2013), *Staphylococcus aureus* (Mei *et al.*, 1997), *Streptococcus agalactiae* (Jones *et al.*, 2000) o *S. pyogenes* (Kizy y Neely, 2009). Las genotecas de transposones son relativamente sencillas de elaborar, aunque requiere el almacenamiento de cientos de clones individuales para el proceso de cribado, lo que puede ser laborioso dado que la STM se trata de un método de selección negativo.

Introducción

4.1.2. Microarray

También conocidos como chips de ADN, es una técnica que permite el análisis de expresión de manera simultánea de miles de genes bajo diferentes condiciones experimentales (Schena *et al.*, 1995), detección de mutaciones y polimorfismos de un único nucleótido (SNP) (Irizarry *et al.*, 2000). El fundamento de los microarray de expresión consiste en la capacidad que tienen las moléculas complementarias de ADN de hibridar entre sí. Se coloca una matriz de dianas conocidas correspondientes a los genes que se quieren analizar sobre un soporte sólido. Sobre esta matriz se depositan muestras de ADNc (sondas) procedentes del organismo a analizar y se marcan con una molécula fluorescente. Estas sondas se enfrentan a las dianas del microarray, moviéndose cada una por difusión hasta quedar hibridada con su diana y quedar fijada allí. Tras un tiempo que permite la hibridación de las cadenas complementarias, el microarray se somete a una medición de la cantidad de ADN de la sonda que ha quedado fijada en cada diana (Moreno y Solé, 2004).

El primer organismo con su genoma dispuesto en un chip de ADN fue *Saccharomyces cerevisiae* (Lashkari *et al.*, 1997). Se han llevado a cabo estudios de expresión de genes de *Solea senegalensis* frente a estímulos alimentarios empleando esta tecnología (Jiménez-Fernández *et al.*, 2015; Montero *et al.*, 2015). La principal ventaja de este método es su capacidad para analizar la expresión génica de un organismo completo a partir de una única muestra de ARN, sin necesidad de generar una genoteca de clones. Las limitaciones de un microarray se basan en que solo pueden ser diseñados si las secuencias del genoma del organismo de estudio son conocidas. La gran cantidad de datos resultantes al analizar miles de genes representa un desafío estadístico, que, junto al elevado coste del equipo a utilizar, obligan a diseñar con cuidado el experimento.

4.1.3. Secuenciación masiva del transcriptoma (RNA-seq)

Se conoce como RNA-seq a la secuenciación masiva de ADNc. En lugar de identificar transcritos mediante hibridación como ocurre con los microarray, los transcritos son secuenciados y mapeados sin secuencias de referencia, creando un mapa de estructura y expresión génica. El ARN es convertido en ADNc, al que se le añaden adaptadores en sus extremos. Estos extremos permiten a los cebadores empleados en la

PCR reconocer secuencias conocidas. La muestra amplificada es secuenciada y cuantificada, relacionando el nivel de expresión génica con el número de lecturas realizadas de cada gen (Wang *et al.*, 2009). El conocimiento de la regulación del transcriptoma permite determinar la respuesta de distintos genes del organismo de estudio ante un estímulo (hospedador, mutaciones, fármacos, etc.), así como para identificar la existencia de patrones de regulación génica coordinada que revelen grupos de genes que actúan bajo unas condiciones específicas dadas (Creecy y Conway, 2015).

Las ventajas del RNA-seq con respecto a las técnicas de hibridación residen en una mayor sensibilidad en la detección de expresión génica, especialmente para transcritos poco abundantes, y su uso sin necesidad de conocer secuencias genómicas de referencia del organismo de estudio (Croucher y Thomson, 2010). Su rango de detección es mucho más amplio que el de los microarrays de ADN, los cuales se encuentran limitados cuando la expresión génica es extremadamente baja o elevada. Además, permite la localización de variaciones en las secuencias de nucleótidos en las regiones transcritas (SNP), fenómenos de fusión génica, splicing alternativo, ARN no codificante y la posibilidad de conocer las fronteras entre exones e intrones en eucariotas (Wang *et al.*, 2009). Del mismo modo, esta técnica se ha empleado para la identificación de genes inducidos por diferentes condiciones de crecimiento en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Kröger *et al.*, 2013). Una desventaja de los estudios basados en la búsqueda de genes bacterianos implicados en la patogénesis mediante la tecnología RNA-seq, es la imposibilidad de distinguir aquellos resultados positivos que producen la traducción de proteínas que originan una respuesta inmunogénica en el hospedador, de los que no. Esto cuenta con una gran importancia ya que el transcriptoma expresado en un momento dado por un organismo no siempre coincide con el proteoma debido a modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, afectando a la forma y estructura final de una proteína (Picard *et al.*, 2009; Grangeasse *et al.*, 2015). Otras desventajas de la técnica RNA-seq radican en su elevado coste y en el gran número de lecturas necesarias para cubrir el genoma. La generación de millones de archivos de lecturas mediante esta metodología implica el constante desarrollo de herramientas bioinformáticas potentes que permitan el análisis correcto de las mismas, un ensamblaje más sencillo, así como contar con un personal experto capaz de interpretar de manera correcta los resultados (Zhao *et al.*, 2014b; Hirsch *et al.*, 2015).

Introducción

4.1.4. Inducción fluorescente diferencial (DFI)

La base de la metodología DFI consiste en utilizar como marcador la proteína verde fluorescente (gfp) para monitorizar la actividad del promotor de un gen determinado. Para ello, la DFI precisa de una genoteca de clones que posean fragmentos aleatorios de ADN genómico del organismo de interés. En primer lugar se incubaba la mezcla de clones en condiciones *in vitro* para promover la activación de todos los promotores constitutivos, separándose éstos mediante citometría de flujo (clasificación de células activadas por fluorescencia FACS) de los inactivados. La mezcla restante de clones inactivados se incubaba bajo las condiciones de estudio deseadas (ejemplo: infección *in vivo*). Los clones con promotores activos bajo estas nuevas condiciones causarían la expresión de *gfp*, separándose de nuevo mediante FACS de los inactivos. La mezcla de clones activos se cultiva en placas para aislarlos e identificar mediante secuenciación los genes que activan los promotores (Valdivia y Falkow, 1996; Valdivia y Falkow, 1997; Schneider *et al.*, 2002).

La tecnología DFI ya ha sido ensayada con éxito en especies procariotas como *Salmonella typhimurium* (Valdivia y Falkow, 1996), *Staphylococcus aureus* (Schneider *et al.*, 2002) y *Streptococcus pneumoniae* (Marra *et al.*, 2002), entre otras. Los beneficios de la DFI incluyen la semi-automatización del proceso de cribado de clones y la posibilidad de modificar el nivel mínimo de detección de fluorescencia, tratándose de una técnica con una alta reproducibilidad. La proteína *gfp* cuenta con ventajas respecto a proteínas codificadas por otros genes indicadores, como su capacidad de detección al microscopio y su nula necesidad de cofactores (Allaway *et al.*, 2001; Rediers *et al.*, 2005). Sin embargo, las limitaciones de la técnica se encuentran en la separación celular mediante citometría de flujo, ya que en ocasiones pueden formarse agregados bacterianos, de macrófagos o afectar a la separación los ambientes en los que se encuentra la bacteria y que poseen fluorescencia natural intrínseca. Otra desventaja se encuentra al nivel de la *gfp*, ya que esta proteína está limitada por las condiciones de pH y de oxígeno. Además, debido a que la señal de fluorescencia no tiene naturaleza lineal, es preciso calibrar y determinar previamente el rango de señal para obtener una correcta cuantificación de la expresión génica (Allaway *et al.*, 2001; Rediers *et al.*, 2005).

4.1.5. Tecnología de expresión *in vivo* (IVET)

También conocida como IVET, se trata de una tecnología desarrollada para identificar genes bacterianos bajo la premisa de que la mayoría de los genes virulentos se encuentran inducidos durante un episodio infeccioso. Aunque ciertas condiciones ambientales pueden ser mimetizadas *in vitro* para inducir la expresión de algunos genes de virulencia, el repertorio completo solo sería expresado *in vivo* (Angelichio y Camilli, 2002).

El procedimiento IVET consiste en fragmentar el ADN genómico del organismo en estudio y construir fusiones de los genes a estudiar del patógeno con genes testigo que aportan resistencia a antibiótico o reversión de auxotrofia junto a actividad galactosidasa. La construcción posteriormente es introducida por conjugación en la bacteria patógena a estudiar de forma que se producirá recombinación homóloga entre las secuencias insertadas en el plásmido y que contiene bajo el mismo promotor los genes testigo, y la secuencia del gen del patógeno presente en su cromosoma. El patógeno se convierte así en una bacteria que habrá de expresar los genes testigo para sobrevivir en el hospedador y esto ocurrirá al expresar los genes inducidos *in vivo* potencialmente implicados en la virulencia. Las bacterias transformadas supervivientes son recuperadas del hospedador, siendo cribadas *in vitro* mediante la actividad de un gen testigo como *lacZ* y secuenciados los fragmentos de ADN del organismo de interés (Mahan *et al.*, 1993; Angelichio y Camilli, 2002).

La principal ventaja de la metodología IVET es su simplicidad, ya que únicamente precisa generar la genoteca de fusión en una cepa auxótrofa o sensible al antibiótico y posteriormente infectar al hospedador y puede identificar genes virulentos que no han sido caracterizados hasta la fecha previamente (Angelichio y Camilli, 2002). Una de las desventajas de la metodología IVET es la necesidad de emplear modelos animales de los que recuperar e identificar los genes inducidos *in vivo* (*ivi*) en el hospedador (Mahan *et al.*, 1993). Genes que se expresan *in vivo* en niveles bajos o solo de manera transitoria pueden escaparse de la detección porque no sean capaces de permitir la supervivencia y crecimiento bacteriano (Angelichio y Camilli, 2002). Esta técnica ya ha sido empleada con éxito en patógenos como *Salmonella typhimurium* (Mahan *et al.*, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Wang *et al.*, 1996a; Wang *et al.*, 1996b), *Yersinia enterocolitica* (Young y Miller, 1997; Gort y Miller, 2000), *Yersinia ruckeri* (Fernández *et al.*, 2004) o *Vibrio vulnificus* (Lee *et al.*, 2007).

4.1.6. Tecnología de expresión *in vivo* basada en recombinasa (RIVET)

En líneas generales, RIVET es una variación de la metodología IVET. Uno de los principales factores limitantes de la técnica IVET es su baja sensibilidad, especialmente frente aquellos genes *ivi* que muestran unos niveles bajos o transitorios de expresión. Para solucionar este problema, se usan fusiones transcripcionales para dirigir la expresión de una recombinasa de ADN, la cual cataliza la recombinación irreversible y hereditaria en sitios específicos, normalmente en genes que aportan resistencia a antibióticos. De esta forma la construcción es capaz de eliminar la resistencia natural bacteriana a cierto antibiótico (tetraciclina, kanamicina, etc.) cuando se expresa la recombinasa bajo el promotor del gen *ivi* (Camilli *et al.*, 1994). La mezcla de clones es incubada en primer lugar *in vitro* con antibiótico para eliminar aquellos clones que contengan genes expresados de forma constitutiva. Las colonias que crezcan serán aquéllas que poseen promotores inactivos, esto es, cuyos genes no son inducidos bajo condiciones *in vitro*. Dichas colonias se recogen y se inoculan posteriormente al organismo hospedador. Tras recuperar las células del hospedador, éstas serán ya sensibles a la acción del antibiótico al haber sido activados los promotores de los genes inducidos *in vivo*. Este método supone una mejora sobre los modelos que emplean IVET debido a que elimina los clones que poseen genes inducidos *in vitro* antes de realizar el ensayo *in vivo* en el hospedador (Camilli *et al.*, 1994; Camilli y Mekalanos, 1995).

El uso de la metodología RIVET para estudiar la virulencia de genes *in vivo* se encuentra limitada debido a dos factores: primero, únicamente se pueden detectar los genes que no se expresan *in vitro*, pues la inducción de los mismos conlleva la acción irreversible de la recombinasa, por lo que la expresión del mismo gen que ocurra posteriormente en los tejidos no podrá ser detectado; y segundo, la técnica no proporciona datos cuantitativos relativos a los niveles de expresión génica (Angelichio y Camilli, 2002).

La metodología RIVET ha sido empleada con éxito en especies como *Staphylococcus aureus* (Lowe *et al.*, 2016), *Vibrio cholerae* (Camilli y Mekalanos, 1995), *Enterococcus faecalis* (Frank *et al.*, 2012), *Streptococcus pyogenes* (Armstrong, 2015), *Bordetella pertussis* (Veal-Carr y Stibitz, 2004) o *Mycobacterium tuberculosis* (Saviola *et al.*, 2003), entre otras.

4.1.7. Tecnología de antígenos inducidos *in vivo* (IVIAT)

La tecnología (IVIAT) permite la identificación de genes bacterianos expresados específicamente durante la infección y cuyos productos son inmunogénicos.

En esta técnica se emplean los sueros de individuos infectados, que se mezclan y adsorben para ensayarse contra el patógeno seleccionado, cultivado bajo condiciones de laboratorio. Este paso de adsorción elimina los anticuerpos que unen los antígenos expresados durante el cultivo *in vitro*, mientras que se recuperan los anticuerpos retenidos, que reconocen antígenos específicamente expresados durante el crecimiento del patógeno en el hospedador. El suero adsorbido es luego empleado para ser ensayado frente a una genoteca de expresión proteica inducible del patógeno construida en *Escherichia coli*. El ADN del patógeno contenido en los clones reactivos de *E. coli* es investigado para identificar el producto génico. El procedimiento de la técnica IVIAT queda resumido en la Figura 3.

La reactividad de los clones identificados como positivos debe confirmarse para evitar resultados debidos a reacción cruzada entre genes ortólogos, ya que hay que considerar que los ejemplares analizados han podido estar expuestos a una variedad de antígenos de diversos microorganismos. La técnica IVIAT depende de la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos del patógeno expresados *in vivo*. Al basarse la técnica IVIAT únicamente en el empleo de sueros procedentes de individuos que han estado en contacto con el patógeno, no es posible detectar la respuesta inmune celular (Rollins *et al.*, 2005).

Introducción

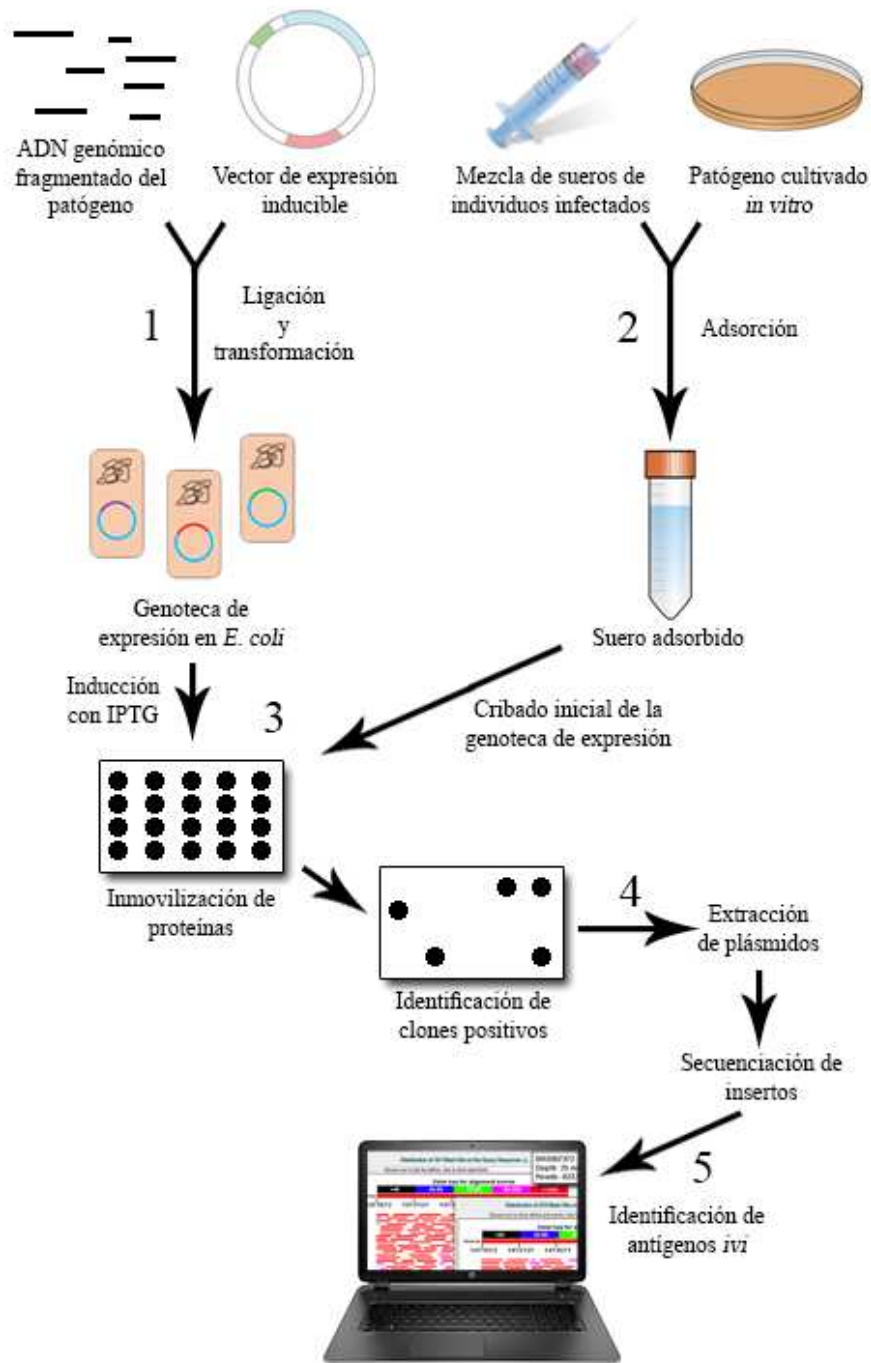


Figura 3. Esquema de la metodología IVIAT. Se diseña una genoteca de expresión en un hospedador adecuado, como *E. coli*, a partir de fragmentos del patógeno de interés y un vector de expresión inducible (1). Suero procedente de individuos que han experimentado una infección causada por el patógeno en estudio es mezclado y adsorbido frente al patógeno cultivado *in vitro*, quedando de esta manera en el suero únicamente los anticuerpos frente a antígenos que sólo se expresan *in vivo* (2). Los clones son cultivados y la expresión de las proteínas recombinantes inducidas mediante IPTG. Los clones son inmovilizados y sometidos a un proceso de lisis sobre una membrana de nitrocelulosa para finalmente ser enfrentados al suero adsorbido (3). Los clones inmunorreactivos serán considerados positivos, siendo aquellos que producen antígenos expresados durante una infección natural pero no durante un cultivo *in vitro*. Estos clones son seleccionados, su ADN plasmídico extraído y secuenciados los insertos contenidos (4). Una vez realizado el análisis de las secuencias, se pueden conocer los genes del patógeno que codifican para antígenos *ivi*, pudiendo estudiarse su papel en la virulencia y patogénesis (5) (Handfield *et al.*, 2000; Rollins *et al.*, 2005).

Aunque las técnicas inmunológicas aplicadas a la investigación de una genoteca de expresión proteica han sido descritas hace algún tiempo (Amara y Satchidanandam, 1996; Etz *et al.*, 2002), la técnica IVIAT es una modificación de dicho proceso que permite identificar los antígenos expresados específicamente *in vivo* durante la infección (Handfield *et al.*, 2000; Handfield *et al.*, 2002; Wallet *et al.*, 2010). Dicha técnica ha permitido identificar genes y productos génicos inducidos únicamente *in vivo*, como son aquellos implicados en la virulencia de patógenos, proteínas reguladoras, que modulan procesos metabólicos y en la regulación de mecanismos *in vivo*. Esta metodología ha sido empleada con éxito en patógenos como *Candida albicans* (Cheng *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Deb *et al.*, 2002), *Vibrio cholerae* (Hang *et al.*, 2003) y *Vibrio vulnificus* (Kim *et al.*, 2003).

La aplicación de esta tecnología en patógenos de importancia en acuicultura es escasa. Algunos estudios han logrado identificar mediante IVIAT antígenos expresados por *Edwardsiella tarda* en conejos (Jiao *et al.*, 2009) y ratas (Sun *et al.*, 2012) inoculados con este patógeno. Si bien el modelo de expresión *in vivo* no es un pez, los autores identifican y clonan diversos antígenos, que luego emplean para preparar una vacuna frente a *E. tarda* efectiva para ejemplares de falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*). En estos últimos años se han llevado a cabo ensayos para identificar antígenos directamente en especies acuícolas, como son ejemplares de trucha arcoíris infectados con *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Menanteau-Ledouble *et al.*, 2014; Menanteau-Ledouble *et al.*, 2016) y de rodaballo infectados con *Vibrio anguillarum* (Zou *et al.*, 2010). Hasta el momento, no se ha empleado la tecnología IVIAT para identificar proteínas inmunogénicas de *P. damselae* subsp. *piscicida* expresadas en *S. senegalensis*. A partir de los resultados obtenidos, se dispondrá de información valiosa sobre los genes implicados en la virulencia de *P. damselae* subsp. *piscicida* expresados *in vivo* y de forma concreta, en lenguado.

Las principales ventajas de la metodología (IVIAT) incluyen: 1) que los determinantes antigénicos inducidos *in vivo* se pueden identificar, a diferencia de otras tecnologías; 2) examina directamente la respuesta inmune ya que usa los sueros de individuos infectados con el patógeno de interés; 3) reduce o elimina el número de individuos a emplear en los ensayos, ya que se cuenta con sueros de ejemplares que han sufrido ya la enfermedad; 4) la mezcla de sueros de distintos ejemplares permite la

Introducción

identificación de antígenos expresados en distintas fases de la infección e indica las variaciones de las respuestas inmunes individuales; 5) la técnica IVIAT permite también investigar posibles diferencias antigénicas en función de las distintas rutas de infección o entre las diferentes fases de la infección (Rollins *et al.*, 2005).

Por otro lado, la información recogida se puede aplicar, si ella se considera relevante, en el diseño de estrategias profilácticas para la lucha contra patógenos de importancia en la industria acuícola, como es el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

5. SISTEMA INMUNE DE TELEÓSTEOS

La investigación de la interacción entre el patógeno y su hospedador es un campo cada vez más emergente y en constante evolución. Cada día se descubren nuevos patógenos, lo que acarrea el reto de la prevención y tratamiento de las patologías derivadas. La prevención supone la tarea de comprender los mecanismos del patógeno y del hospedador que participan en esta interacción, en la que están implicados genes y proteínas de ambos participantes. Por otra parte, el nivel de complejidad de esta interacción puede incrementarse cuando los patógenos evolucionan, siendo capaces de resistir los mecanismos de defensa del hospedador (Sen *et al.*, 2016).

El sistema inmune en peces es fisiológicamente similar al de los vertebrados superiores, aunque con ciertas diferencias. La inmunidad innata es el frente fundamental para la defensa y supervivencia de este tipo de organismos que adquieren la capacidad de vida libre a las pocas semanas de la eclosión (Uribe *et al.*, 2011). En cambio, la respuesta adaptativa en teleósteos entra en acción de forma más lenta e ineficiente que en vertebrados superiores, pero aún así resulta fundamental para la inmunidad duradera y los programas de vacunación (Tort *et al.*, 2003).

El fuerte incremento de la industria acuícola en las últimas décadas ha provocado un aumento en el interés por conocer los mecanismos del sistema inmune de peces, y por implementar las estrategias profilácticas contra las infecciones que afectan a especies de alto valor económico (Palíková *et al.*, 2015); sin embargo, el sistema inmune es en gran parte desconocido en la mayoría de las especies empleadas en acuicultura (Secombes y Wang, 2012). A continuación se describen los componentes

del sistema inmune de teleósteos, con especial énfasis en la información relativa a *Solea senegalensis*.

5.1. Sistema inmune innato

También denominado inespecífico, el sistema inmune innato es considerado esencial frente a la amenaza de patógenos, pues en teleósteos es más eficiente que el sistema inmune adquirido. Posee un tiempo de reacción muy corto o inexistente, otorgando una protección no específica inmediata. Se pueden distinguir tres componentes: barreras físicas, factores humorales y factores celulares (Magnadóttir, 2006; 2010).

En peces el sistema inmune innato juega un papel primordial en la respuesta frente a microorganismos patógenos de forma genérica mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), actuando en el desarrollo de una futura respuesta adaptativa que conduzca finalmente a protección a largo plazo (Raida y Buchmann, 2009). Además, en la mayoría de las especies piscícolas marinas el sistema inmune innato es funcional varias semanas después de la eclosión, lo que parece indicar que la defensa frente a las enfermedades infecciosas en larvas y postlarvas está basada en este sistema inmune inespecífico (Magnadóttir 2006; Saurabh y Sahoo, 2008). El estudio del desarrollo del sistema inmune en larvas de lenguado senegalés ha mostrado que los mecanismos de inmunidad específica están muy poco desarrollados durante las primeras semanas post-eclosión, siendo fundamental durante esta etapa la defensa inespecífica. En teleósteos, van surgiendo paulatinamente centros de melanomacrófagos (MMCs) y linfocitos asociados a vasos sanguíneos. Los tejidos linfoideos van apareciendo en la siguiente secuencia: timo, riñón y bazo; con intrusión de células inmunes en la zona periportal del hígado, llegándose a un sistema inmune completamente funcional a los cuatro meses post-eclosión (Hampton *et al.*, 1987; Agius y Roberts, 2003; Castro-Cunha *et al.*, 2008; Möller *et al.*, 2014).

5.1.1. Barreras físicas

Las barreras físicas engloban a las escamas, superficies mucosas de la piel y branquias o intestino. La importancia defensiva del mucus está bien documentada en diversas especies de peces, siendo un mecanismo eficiente al atrapar y retirar patógenos.

Introducción

El mucus posee sustancias microbicidas como lectinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas del complemento, inmunoglobulinas, proteasas y péptidos antibacterianos (Hjelmeland *et al.*, 1983; Rombout *et al.*, 1993; Aranishi y Nakane, 1997; Boshra *et al.*, 2006). Concretamente en lenguado senegalés se ha descrito la capacidad antimicrobiana del mucus frente a patógenos bacterianos como *P. damsela*, *V. harveyi* y *V. anguillarum* (Guardiola *et al.*, 2017).

5.1.2. Factores humorales

Son una serie de sustancias, mayormente proteínas, presentes en la sangre, y capaces de influir sobre el crecimiento de los microorganismos. Los componentes de la inmunidad innata humoral de peces tratados en este epígrafe son: citoquinas, lisozimas, sistema del complemento, proteínas de choque térmico y proteínas de fase aguda implicadas en la biodisponibilidad de hierro. El sistema del complemento posee actividad lítica, pro-inflamatoria, quimiotáctica y de opsonización que sirven de nexo con la respuesta innata celular.

5.1.2.1. Citoquinas

Las citoquinas participan en la regulación e integración de las respuestas innata y adaptativa, siendo actores fundamentales en los procesos inflamatorios, quimiotácticos y de diferenciación de leucocitos. Citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) son responsables de la acumulación de citoquinas en la respuesta de fase aguda debido a toxinas bacterianas, productos inflamatorios y otros estímulos invasivos (Roca *et al.*, 2008; Mosca *et al.*, 2014). Además, el TNF α , cuya expresión aumenta en hígado de lenguado senegalés sometido a estimulación con LPS (Osuna-Jimenez *et al.*, 2009), está implicado en el reclutamiento y activación de fagocitos, aumentando la actividad respiratoria (García-Castillo *et al.*, 2004).

El Factor 3 asociado al receptor TNF (TRAF-3) es un importante regulador tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa. TRAF-3 participa en la regulación de la señalización de células T a través de receptores de TNF y en el desarrollo y actividad de células citotóxicas (Häcker *et al.*, 2011). La estimulación de lenguado senegalés con LPS aumenta la transcripción del gen que codifica TRAF-3 en hígado y riñón cefálico (Prieto-Alamo *et al.*, 2009), al igual que la estimulación bacteriana en otras especies

acuícolas (Cai *et al.*, 2015). La interleucina 1 beta (IL-1 β) juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y de defensa del hospedador a través de la estimulación de la fagocitosis, proliferación de linfocitos y producción de superóxidos (Sangrador-Vegas *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000; Magnadóttir, 2010). La interleucina 6 (IL-6) también está implicada en la cascada de reacciones inflamatorias en respuesta a bacterias Gram negativas, induciendo además la diferenciación de linfocitos B y linfocitos T (Hirano 1998). IL-8b forma parte de la familia de las quimiocinas CXC, atrayendo de forma potente a neutrófilos y monocitos en la fase aguda de la respuesta inflamatoria e induciendo la reparación de tejidos mediante angiogénesis (Li y Yao, 2013; Li *et al.*, 2013a). En lenguado senegalés se ha analizado la expresión de genes que codifican para distintas interleucinas al ser sometidos a dietas con aceites vegetales (Montero *et al.*, 2015).

5.3.2.2. Lisozimas

Las lisozimas se encuentran presentes tanto en organismos vertebrados como invertebrados. En teleósteos se han detectado lisozimas tipo C y tipo G, que poseen una estructura tridimensional similar pero cuyos mecanismos catalíticos y propiedades enzimáticas son muy diferentes (Wang *et al.*, 2013b). Son enzimas con actividad lítica sobre bacterias que participan en la respuesta inmune innata. Las lisozimas actúan a nivel del peptidoglicano, el cual es componente esencial en la pared celular en procariontes y catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4 entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina, presentes en un peptidoglicano. Las lisozimas se asociaron inicialmente a la defensa frente a bacterias Gram positivas exclusivamente, debido a que éstas poseen una mayor cantidad de peptidoglicano en su pared celular; sin embargo, estudios posteriores han demostrado que también es capaz de actuar contra bacterias Gram negativas. Además produce opsonización, activa a fagocitos y al sistema del complemento (Magnadóttir, 2006).

La expresión de estos dos tipos de lisozima ha sido descrita en tejidos hematopoyéticos, piel, intestino, riñón cefálico, hígado, peritoneo, bazo y agallas de diferentes peces, incluyendo el lenguado senegalés entre ellos (Fernández-Trujillo *et al.*, 2008; Salas-Leiton *et al.*, 2010; Montero *et al.*, 2015). Esta expresión en distintos órganos ha sido propuesta como una adaptación ante la constante exposición del pez a un alto número de patógenos oportunistas en el agua (Callewaert y Michiels, 2010).

Introducción

5.1.2.3. Sistema del complemento

El sistema del complemento es uno de los principales componentes de la defensa inmune innata y está compuesto por cerca de 30 proteínas plasmáticas sintetizadas como pro-enzimas (Secombes y Wang, 2012). Estas proteínas son responsables de diversas funciones entre las que se incluyen la eliminación de patógenos invasivos, la activación de la fagocitosis y de la respuesta inflamatoria, la eliminación de células apoptóticas y desechos celulares, y la modulación de la respuesta inmune adaptativa (Holland y Lambris, 2002). Este sistema puede ser activado por tres vías diferentes: clásica, iniciada por inmunocomplejos; alternativa, iniciada por la unión a estructuras microbianas; y de las lectinas, iniciada por una lectina de unión a manosa bacteriana (Nakao *et al.*, 2011).

En teleósteos, se ha detectado ARNm que codifica para componentes del complemento en una amplia variedad de tejidos tales como hígado, riñón cefálico, intestino y branquias, entre otros (Løvoll *et al.*, 2007). Trabajos en lenguado senegalés han logrado identificar secuencias de genes que codifican para distintos factores del complemento implicados en sus tres vías de activación (Makridis *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2015).

5.1.2.4. Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSP) son chaperonas implicadas en la respuesta de fase aguda y han sido propuestas como reguladores frente a patógenos y diversos factores de estrés como temperatura, salinidad o contaminantes que pueden provocar la desnaturalización de proteínas (Sung *et al.*, 2011; Sung y MacRae, 2011). De acuerdo a su peso molecular se clasifican como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP de bajo peso molecular.

Las HSP juegan un papel importante tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa (Srivastava, 2002; Roberts *et al.*, 2010). En la respuesta inmune innata, han sido descritas como mediadoras entre la respuesta humoral y celular (Sung y MacRae, 2011). La presencia de HSP en el ambiente extracelular actúa como un activador de células dendríticas (DC) y macrófagos (Chen *et al.*, 1999; Kol *et al.*, 2000; Singh-Jasuja *et al.*, 2000), e inducen multitud de citoquinas como TNF α , IL-1 β , IL-12, además de algunas quimiocinas (Lehner *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2000; Moré *et al.*, 2001). Las

HSP tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune actuando como transportadores de antígenos, interactuando estos con las células presentadoras de antígeno (Ohashi *et al.*, 2000; Vabulas *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2001; Habich *et al.*, 2002). Por otra parte, se han descrito aumentos de los niveles de HSP en organismos acuáticos producidos por choque térmico, compuestos químicos o aporte exógeno de HSP relacionados con la resistencia ante infecciones (Sung y MacRae, 2011).

En teleosteos, al igual que en mamíferos, las HSP90 y HSP70 están involucradas en un amplio rango de procesos relacionados con la supervivencia celular, como la protección frente a incrementos de la temperatura, el plegamiento correcto de proteínas celulares sintetizadas en respuesta a patógenos bacterianos, almacenamiento y plegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas y con la estimulación de la respuesta inmune (Manchado *et al.*, 2008; Sung y MacRae, 2011; Cha *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015). Concretamente en lenguado senegalés se ha caracterizado y analizado la expresión de distintas proteínas de choque térmico en diversos órganos y tejidos (Manchado *et al.*, 2008), bajo diferentes densidades de crecimiento (Salas-Leiton *et al.*, 2010) y tras ser sometidos a estimulación con LPS (Osuna-Jimenez *et al.*, 2009).

5.1.2.5. Proteínas de fase aguda implicadas en la biodisponibilidad de hierro

La disponibilidad de hierro como nutriente es esencial para el crecimiento bacteriano y el desarrollo de la infección en el hospedador. Por ello, los organismos susceptibles de sufrir infecciones han desarrollado estrategias para modular sus niveles de hierro, que incluyen la síntesis de proteínas como transferrina, hepcidina y ferritina (Griffiths, 1991; Rivas, 2012) que reducen la biodisponibilidad del hierro para el desarrollo bacteriano (Neves *et al.*, 2009).

La transferrina es una glicoproteína encargada de mantener bajos los niveles de hierro en sangre en respuesta ante patógenos (Fouz *et al.*, 1997; Lieu *et al.*, 2001), habiendo sido descrita como una proteína de fase aguda negativa en *D. labrax* (Neves *et al.*, 2009). Por su parte, la ferritina es una proteína que participa en el almacenamiento de hierro y su expresión ha sido descrita bajo condiciones de estrés y en presencia de citoquinas inflamatorias (Orino *et al.*, 2001; Torti y Torti, 2002; Neves *et al.*, 2009). En caso de necesidad por parte del hospedador, la ferritina es capaz de liberar el hierro en forma biodisponible y no tóxica (Wang y Wei, 2012). Otra proteína de fase aguda

Introducción

descrita en peces e implicada tanto en la regulación del metabolismo del hierro como en la actividad antimicrobiana es la hepcidina. La hepcidina es una proteína secretada principalmente por el hígado. Un aumento en la producción de hepcidina suprime la eritropoyesis por falta de hierro, pudiendo contribuir a la anemia durante la respuesta inflamatoria (Rodrigues *et al.*, 2006; Pereiro *et al.*, 2012; Mosca *et al.*, 2014). Bajo ciertas condiciones de infección, las membranas de los eritrocitos pueden desestabilizarse, resultando en una liberación de los grupos hemo en el sistema circulatorio. Estos grupos pueden oxidar lípidos y proteínas, dañando los tejidos circundantes. Para evitar esta circunstancia, el organismo cuenta con una proteína de fase aguda llamada haptoglobina que se combina con grupos hemo libres para facilitar el reciclaje hepático del hierro y prevenir daños tisulares (Wicher y Fries, 2006).

En el caso concreto de lenguado senegalés, la estimulación con LPS se ha asociado a incrementos en la transcripción de genes de transferrina, ferritina, hepcidina y haptoglobina (Osuna-Jimenez *et al.*, 2009; Prieto-Alamo *et al.*, 2009). Igualmente, se han observado incrementos en la transcripción del gen que codifica para hepcidina a las 24 h de la infección por *V. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida* (Mosca *et al.*, 2014).

5.1.3. Factores celulares

Los elementos que componen la fracción celular de la defensa inmune inespecífica incluyen diversos tipos celulares, como son macrófagos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y células citotóxicas no específicas (NCC) (Alcorn *et al.*, 2008). Por un lado, los macrófagos y neutrófilos son muy importantes en la respuesta inflamatoria, al migrar al lugar de infección del patógeno y llevar a cabo su destrucción mediante la fagocitosis (Alfonso *et al.*, 1998). Por otra parte, las NCC son las encargadas de reconocer células parasitadas o tumorales y llevar a cabo su destrucción (Alcorn *et al.*, 2008).

5.1.3.1. Receptores de reconocimiento de patrones

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) son proteínas presentes en las células del sistema inmune encargadas de la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), radicando su importancia inmunitaria en ser capaces de

distinguir lo propio de lo ajeno. Estos patrones son pequeñas secuencias y estructuras presentes en las bacterias (peptidoglicano, LPS, lipoproteínas, endotoxinas, flagelos, ácido lipoteicoico, etc.), que son reconocidas por el sistema inmune del hospedador (Boltaña *et al.*, 2011). En teleósteos, estos receptores y mecanismos de reconocimiento resultan en una rápida y eficiente cascada de procesos para tratar de eliminar al microorganismo y que pueden involucrar tanto a la respuesta inmune inespecífica como específica (Boltaña *et al.*, 2011). Las células que poseen estos receptores pertenecen principalmente al sistema inmune, como son: linfocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos; además de células no inmunes como las endoteliales, epiteliales y nerviosas (Secombes y Wang, 2012).

Los receptores tipo Toll (TLR) son un tipo de PRR representados por proteínas transmembranales, con dominios extracelular, transmembrana y citoplasmático. Los TLR pueden ser divididos en dos categorías: extracelulares, aquéllos que son capaces de reconocer PAMP en la superficie celular; e intracelulares, aquéllos que son expresados mediante endosomas (Hansen *et al.*, 2011). Los TLR poseen un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR) que se unen a los PAMP y provocan la activación del receptor intracelular, llamado receptor Toll/Interleucina-1 (TIR). De esta manera se desencadena una cascada inflamatoria que lidera la producción de citoquinas, las cuales son vitales para la activación de la respuesta inmune innata mediante la fagocitosis y el estallido respiratorio, además de la activación del sistema inmune adaptativo (Secombes y Wang, 2012). Se ha descrito un total de 17 TLR en más de una docena de especies de teleósteos (Rebl *et al.*, 2010) y existen estudios que demuestran cómo la estimulación con virus y bacterias puede regular la expresión de ciertos TLR (Stafford *et al.*, 2003; Meijer *et al.*, 2004; Hirono *et al.*, 2004; Rebl *et al.*, 2007).

Los receptores tipo NOD (NLR) se encuentran en el citosol celular y están formados por un dominio de reconocimiento rico en leucina, un dominio central de oligomerización (NOD) y un dominio N-terminal de activación y reclutamiento (CARD) (Kumar *et al.*, 2011; Secombes y Wang, 2012). Los NLR reconocen productos de bacterias extracelulares, además de virus. Tras la detección de estos PAMP por parte del dominio rico en leucina, el dominio NOD sufre oligomerización mediante ATP, provocando una modificación en la conformación del receptor. Este cambio en la conformación hace posible que el dominio N-terminal efector sea accesible para interactuar con moléculas que inducirán la producción de citoquinas y caspasas

Introducción

proteolíticas, las cuales serán decisivas en fenómenos de respuesta inflamatoria o muerte celular programada (Kumar *et al.*, 2011; Secombes y Wang, 2012). Se han descrito NLR en especies de teleósteos como pez cebra (Laing *et al.*, 2008), trucha arcoíris (Chang *et al.*, 2011) y salmón atlántico (Pontigo *et al.*, 2015).

El peptidoglicano es un componente esencial de la pared celular en bacterias, siendo por ello un objetivo excelente para el reconocimiento de estos microorganismos por parte de las células inmunitarias del hospedador. El peptidoglicano induce una fuerte respuesta antibacteriana, activando monocitos, macrófagos y linfocitos B en vertebrados superiores. En mamíferos los monocitos son activados por la presencia de peptidoglicano a través de CD14 y TLR, desencadenando la producción de mediadores de inflamación responsables de síntomas como fiebre, inflamación, somnolencia, disminución del apetito, entre otros (Schwander *et al.*, 1999; Dziarski, R *et al.*, 2000; Dziarski *et al.*, 2000). El peptidoglicano es atacado por mecanismos antimicrobianos activados por la unión a proteínas de reconocimiento del peptidoglicano (PGLYRP) del hospedador. Este receptor ha sido descrito tanto en vertebrados como en insectos, demostrando que se trata de una proteína altamente conservada en la evolución (Kang *et al.*, 1998). Además de actuar como un activador de la defensa inmune innata, los PGLYRP están involucrados directamente en la eliminación de los microorganismos invasores. Su acción bactericida se da al interactuar su dominio C-terminal amidasa con el peptidoglicano catalizando su hidrólisis (Li *et al.*, 2006); o con la membrana externa, provocando una despolarización de la misma y la producción de radicales hidroxilo (Royet *et al.*, 2011). En teleósteos, concretamente en pez gato, el PGLYRP está descrito como el mayor PRR para el reconocimiento del peptidoglicano (Sun *et al.*, 2014). En trabajos en diferentes especies de peces, incluido el lenguado senegalés, se ha logrado obtener las secuencias de genes que codifican para distintas PGLYRP (Li *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Montero *et al.*, 2015), así como demostrar que los principales lugares de transcripción para estos genes son la piel, branquias, hígado, bazo e intestino (Sun *et al.*, 2014). Estudios de silenciamiento de genes de PGLYRP en embriones de pez cebra sometidos a exposición a *Flavobacterium columnare* revelaron una posterior reducción en la expresión de genes de distintos TLR y β -defensinas, además de un aumento significativo de la mortalidad de dichos embriones. Esto revelaría la existencia de una regulación positiva entre los TLR y PGLYRP, conectándose quizás entre ellos en el reconocimiento del peptidoglicano (Chang y Nie, 2008).

5.1.3.2. Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que permite eliminar de forma inespecífica el material extraño presente en el organismo, ya sea de naturaleza antigénica o no, y productos de desecho propios del organismo. Esta eliminación consiste en la interiorización celular de dichas partículas por medio de vesículas (fagosomas) para posteriormente ser digeridas por la acción de enzimas (Esteban *et al.*, 2015). La fagocitosis es uno de los procesos defensivos más importantes en animales poiquiloterms debido a que se ve menos afectado por la temperatura (Blazer, 1991; Le Morvan *et al.*, 1998). Las células fagocíticas del sistema inmune de peces son macrófagos y neutrófilos principalmente, y eosinófilos, células dendríticas (DC), linfocitos B y trombocitos en menor medida (Esteban *et al.*, 2015). El riñón cefálico es el principal órgano de teleosteos en el que se localizan macrófagos formando centros de melanomacrófagos (MMC), además de células linfoides, mayormente linfocitos B, en diferentes estadios de desarrollo (Press *et al.*, 1994). Así mismo, en el hígado de teleosteos se han localizado MMC en la zona periportal (Hampton *et al.*, 1987; Agius y Roberts, 2003), formando parte de la población de células inmunes intrahepáticas (IHIC).

La activación y reclutamiento de fagocitos puede ocurrir a través de distintos mecanismos, como son: receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), opsonización de patógenos y mediante la liberación de citoquinas (Graham y Secombes, 1990; Shoemaker *et al.*, 1997; Holland y Lambris, 2002; Esteban *et al.*, 2015). Algunos fagocitos activados tienen la capacidad de llevar a cabo la presentación de antígenos para iniciar la respuesta inmune específica. Los antígenos de los patógenos procesados son presentados en la superficie celular de los fagocitos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), Estos complejos pueden ser reconocidos por los linfocitos T colaboradores, activando su capacidad proliferativa y de producción de citoquinas (Alcorn *et al.*, 2008).

La fagocitosis, además de ejecutar su principal proceso de internalización de partículas extrañas, modula diversos mecanismos antimicrobianos adicionales como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS, incluyen a moléculas como O_2^- , OH^- y H_2O_2 , las cuales poseen radicales libres altamente reactivos que pueden causar estrés oxidativo y daños celulares en los microorganismos fagocitados, para su destrucción y digestión de los mismos (Esteban *et al.*, 2015). Para que los

Introducción

fagocitos puedan producir estas ROS, aumentan de forma enorme la demanda de oxígeno junto con el consumo de energía a nivel celular en un proceso conocido como estallido respiratorio. En este proceso participa la actividad NADPH oxidasa, capaz de generar aniones superóxidos que posteriormente reaccionarán con otras moléculas para dar lugar a radicales libres muy reactivos (Díaz-Rosales, 2006).

Debido a la importancia de la fagocitosis, diversos patógenos intracelulares han desarrollado mecanismos para evitar la actuación de los macrófagos, utilizando estas células para proliferar, favoreciendo su futura diseminación. Entre estas estrategias se encuentra la producción de enzimas, como son la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, que se encargan de catalizar la reducción de las ROS hasta formas menos reactivas o inofensivas; la inhibición de la unión de la vacuola que contiene a la bacteria con los lisosomas celulares, evitando la formación del fagolisosoma encargado de digerir y destruir al patógeno (Elkamel *et al.*, 2003). Ejemplos de patógenos marinos intracelulares son: *Edwardsiella tarda* (Ishibe *et al.*, 2009), *Yersinia ruckeri* (Ryckaert *et al.*, 2010), *Piscirickettsia salmonis* (McCarthy *et al.*, 2008), entre otros.

5.1.3.3. Citotoxicidad celular inespecífica

En cuanto a la respuesta celular inespecífica, en mamíferos es llevada a cabo por células citotóxicas conocidas como células NK y que en peces sus precursores evolutivos son las células citotóxicas no específicas (NCC) (Cuesta *et al.*, 2005). Las NCC, al contrario que las NK de mamíferos, son linfocitos pequeños y agranulares que se encuentran comúnmente en tejidos linfoides como riñón cefálico o bazo, además de en zonas del hígado formando parte de la población de células inmunes intrahepáticas (Möller *et al.*, 2014). Descritas en teleósteos por primera vez en pez gato, estas células son capaces de eliminar una amplia variedad de objetivos xenogénicos, incluyendo parásitos y objetivos tradicionales de las células NK de mamíferos (Graves *et al.*, 1984; Evans y Jaso-Friedmann, 1992).

Estas NCC cuentan con receptores proteicos (NCCRP-1) que son capaces de reconocer cambios en la superficie celular que se producen en células parasitadas o tumorales, diferenciándolas de las células sanas. Las NCC se unen a estas células diana activando una cascada de eventos que involucran citoquinas y respuesta inflamatoria que en último término causa la lisis celular (Evans *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1992;

Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Jaso-Friedmann y Evans, 1999; Jaso-Friedmann *et al.*, 2001). En el caso del lenguado senegalés se ha observado que la inoculación de LPS produce una elevación en la transcripción del gen que codifica para NCCRP-1 (Prieto-Alamo *et al.*, 2009).

5.2. Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por tener una fina especificidad, que se adapta al reconocimiento del elemento extraño que afecta a la homeostasis del organismo hospedador, así como su capacidad de memoria, ya que en caso de un segundo encuentro con el mismo patógeno, la respuesta del sistema inmunitario será más rápida y eficiente. La primera respuesta adaptativa frente a una infección, llamada respuesta primaria, suele tomar varios días hasta madurar las células involucradas. En cambio, una infección repetida por el mismo antígeno, dará lugar a la respuesta secundaria, implicando a células de memoria en un lapso de solo unas horas (Secombes y Wang, 2012).

En teleósteos, la inmunidad específica se caracteriza por una ineficiencia intrínseca debido a su naturaleza poiquiloterma y por un limitado repertorio de anticuerpos, maduración y memoria con lenta proliferación linfocitaria (Sunyer *et al.*, 1998). La inmunidad específica está compuesta a su vez por dos ramas, la respuesta humoral, mediada por linfocitos B y anticuerpos, y la respuesta celular, mediada por linfocitos T (Secombes y Wang, 2012). El órgano primario en la producción de anticuerpos en peces es el riñón cefálico (Tian *et al.*, 2009), además de ser el de mayor actividad hematopoyética (Zapata, 1979), siendo el equivalente a la médula ósea en vertebrados superiores. En el hígado de teleósteos se han descrito poblaciones intrahepáticas de células del sistema inmune adaptativo como son los linfocitos B y T (Möller *et al.*, 2014).

5.2.1. Factores humorales

5.2.1.1. Linfocitos B y anticuerpos

Los linfocitos B son las células del sistema inmunitario encargadas de sintetizar anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) y secretarlas al torrente sanguíneo, donde se unirán de manera específica al antígeno que estimuló su producción. La activación de los linfocitos B puede suceder de manera dependiente o independiente a los linfocitos T.

La activación dependiente de linfocitos T precisa de la fagocitosis del antígeno de naturaleza proteica por parte del linfocito B, su procesado y presentación posterior de la estructura antígeno-complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Ag-MHC II) en su superficie celular. Una vez expresada en superficie, los receptores de los linfocitos T reconocerán esta estructura activando al linfocito B para que inicie la síntesis de anticuerpos frente a ese antígeno específico que el patógeno tiene en su superficie. Esta activación produce anticuerpos con alta afinidad y más funcionales que los generados por la activación independiente, aunque la respuesta inmunitaria puede tardar varios días en tener lugar (Alcorn *et al.*, 2008; Blum *et al.*, 2013).

La activación de células B independiente de linfocitos T es llevada a cabo por antígenos de naturaleza polisacáridica, a través del reconocimiento y unión a receptores tipo Toll (TLR) de estructuras moleculares presentes en un amplio espectro de microorganismos. Este mecanismo es muy importante en la defensa inmune en organismos que carecen de células T. La respuesta inmunitaria mediante esta activación independiente es más rápida, aunque los anticuerpos generados presentan una menor afinidad que los producidos mediante la activación dependiente de linfocitos T (Fagarasan y Honjo, 2000; Cerutti *et al.*, 2011).

La unión del anticuerpo a virus o toxinas bacterianas bloquea su capacidad de unirse a los receptores de las células hospedadoras. La opsonización de patógenos con anticuerpos precipita su destrucción, principalmente por células en cuya superficie existen receptores para las inmunoglobulinas (Ig), como son los fagocitos del sistema inmune innato (Secombes y Wang, 2012) o mediante lisis a través de la vía clásica del sistema del complemento (Holland y Lambris, 2002).

Se han descrito tres isotipos de inmunoglobulinas en diversas especies de teleósteos, IgM, IgD e IgT (también conocida como IgZ en pez cebra) (Danilova *et al.*,

2005; Hansen *et al.*, 2005). La IgM es la inmunoglobulina más antigua y el único isotipo conservado en todos los vertebrados con mandíbula (gnatostomados). La IgD ha sido encontrada en todos los gnatostomados exceptuando a los pájaros, lo que indica que también es una clase de anticuerpo primitivo. Por último, la IgT de peces es una inmunoglobulina cuya actividad se ha descrito en la mucosa intestinal del organismo (Zhang *et al.*, 2010). La IgM es el isotipo predominante de inmunoglobulina en la sangre de teleósteos, con IgD e IgT en menores concentraciones. Tanto IgT como IgM pueden expresarse desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en peces (4 días tras la fertilización), especialmente la IgT, sugiriendo que ésta pueda tener un papel importante en la protección durante el estado larvario (Secombes y Wang, 2012). En organismos ya adultos, IgT e IgM se expresan constitutivamente en los órganos linfoides, predominando el isotipo IgM excepto en ciertas situaciones (parasitismo) en las que se puede encontrar niveles más elevados de IgT en la mucosa intestinal (Zhang *et al.*, 2010).

La respuesta inmune en la piel y branquias es muy importante en los organismos acuáticos debido a que estos órganos se encuentra en contacto directo con un ambiente biológicamente hostil (Uribe *et al.*, 2011). Se ha descrito la capacidad de generar anticuerpos específicos en la piel (Cain *et al.*, 2000), intestino (Jones *et al.*, 1999) y branquias (Lumsden *et al.*, 1993) sin precisar de una respuesta sistémica.

Estudios recientes en trucha arcoíris han detectado la presencia de diferentes poblaciones de linfocitos B expresando inmunoglobulinas M, D o T en su superficie celular en hígado (Castro *et al.*, 2014; Möller *et al.*, 2014). Estas células suponen entre el 15-29% de la población de células no hepáticas del hígado (Möller *et al.*, 2014). Específicamente en lenguado senegalés, se ha estudiado el efecto producido por dietas formuladas con probióticos en parámetros tales como el porcentaje de linfocitos de la sangre (Barroso *et al.*, 2016). Así mismo, en lenguado se ha observado la estimulación en la formación de anticuerpos tras la administración de bacterina de especies tales como *P. damsela* subsp. *piscicida* (Arijo *et al.*, 2005) y *V. harveyi* (Medina *et al.*, 2015).

5.2.2. Factores celulares

5.2.2.1 Linfocitos T citotóxicos

En mamíferos, los linfocitos T citotóxicos (CTL), también conocidos como linfocitos T CD8+, están implicados en la respuesta inmune específica. En peces, estos linfocitos producen reacciones citotóxicas gracias su capacidad para reconocer y provocar la muerte, mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I), de células invadidas por virus o bacterias (Uribe *et al.*, 2011).

El MHC I es esencial para reconocer péptidos antigénicos intracelulares y presentarlos a los CTL, para lo cual estos poseen receptores de membrana, los CD8 α , con los que interaccionan, permitiendo su activación.

La apoptosis o muerte celular provocada por la acción de los CTL se basa en la acción de gránulos líticos liberados por estos cerca de las células a destruir. Estos gránulos incluyen las granzimas y las perforinas. Las granzimas no son capaces de introducirse en los compartimentos celulares de la célula diana, por lo que precisan de la acción de las perforinas para su liberación y posterior diseminación por citoplasma y núcleo (Chowdhury y Lieberman, 2008). Estas perforinas presentan una gran homología con las proteínas formadoras del poro en el sistema del complemento (Jerome *et al.*, 2003). Las granzimas son proteasas involucradas en el inicio de una cascada coordinada que provoca la activación de las caspasas celulares, la citolisis y la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial interna lo que inducirá la apoptosis (Darmon *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1996; Barry *et al.*, 2000).

Por su parte, las caspasas son un grupo de proteínas que pertenecen a las cisteína-proteasas, las cuales tienen un papel fundamental en la apoptosis y procesos inflamatorios. Son sintetizadas como pro-enzimas, encontrándose en forma inactiva en el citosol celular a falta del estímulo proporcionado por parte los CTL. Funcionalmente, las caspasas pueden ser clasificadas como iniciadoras de apoptosis (caspasas-2, -8, -9 y -10); efectoras de apoptosis (caspasas-3, -6 y -7); y pro-inflamatorias (caspasas-1, -4, -5, -11 y -12) (Reis *et al.*, 2010). Las caspasas iniciadoras están especializadas en interaccionar y activar a las caspasas efectoras, mediante dimerizaciones y escisiones, que son las que llevan a cabo las funciones finales. Una caspasa iniciadora puede activar muchas caspasas efectoras, amplificándose el número de caspasas activas finales

(Crawford y Wells, 2011). Las caspasas pro-inflamatorias, como la caspasa-1, participan en el procesamiento de citoquinas inflamatorias, procesando la forma inactiva o prointerleucina-1 β para producir IL-1 β activa, la cual es una poderosa efectora de la respuesta inflamatoria (Sakamaki y Satou, 2009). Estudios en dorada han revelado la expresión de caspasa-1 en tejidos del sistema inmune (López-Castejón *et al.*, 2008). Por su parte, las caspasas efectoras fragmentan e inactivan proteínas celulares, lo cual provoca la destrucción de la célula, además de activar otras caspasas.

Los CTL pueden destruir células a través de mecanismos dependientes de caspasas, mediante el receptor de muerte celular Fas en las células diana. La presencia de este receptor provoca la activación de la caspasa-8, induciendo una cascada que desemboca en la pérdida del potencial en la membrana interna mitocondrial, liberando citocromo c (Barry *et al.*, 2000). Estudios en lubina han revelado que la caspasa-8 cuenta con dos dominios proteicos efectoros de muerte celular (DED) (Reis *et al.*, 2010). La caspasa-9 es otra caspasa iniciadora de apoptosis que posee un dominio de activación y reclutamiento (CARD), cuya función es activar caspasas efectoras (Reis *et al.*, 2007). DED y CARD son importantes dominios involucrados en las interacciones proteína-proteína necesarios para mediar la dimerización y consecuente activación de las caspasas-8 y -9, respectivamente.

Estudios en trucha arcoíris han revelado la presencia de transcritos de CTL y del MHC I detectables en larvas de una semana (Fischer *et al.*, 2006). Este hallazgo contempla la posibilidad de vacunar a peces a edades muy tempranas para desarrollar su inmunidad celular específica. Así mismo, en trucha arcoíris también se han detectado poblaciones de linfocitos T dispersos en el parénquima del hígado (Castro *et al.*, 2014; Möller *et al.*, 2014), observándose además un aumento en los niveles de ARNm correspondientes al gen que codifica para CD8 α , implicados en la respuesta de linfocitos T (Castro *et al.*, 2014). En lenguado senegalés se han descrito las secuencias de los genes que codifican CD8 α y CD8 β de linfocitos T cuya transcripción disminuye en lenguados sometidos a estrés (Montero *et al.*, 2015).

5.2.2.2. Linfocitos T colaboradores

Los linfocitos T colaboradores o cooperadores (Th), llamados también linfocitos T CD4+, son un subgrupo de linfocitos activados al interaccionar sus receptores CD4

Introducción

con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Este MHC II se encarga de presentar péptidos antigénicos extracelulares a los linfocitos T CD4+ (Nakanishi *et al.*, 2015). Se han descrito genes relacionados con los receptores CD4 de linfocitos T en lenguado senegalés (Montero *et al.*, 2015), y transcritos de CD4 se han detectado en hígado de trucha arcoíris (Castro *et al.*, 2014).

5.3. Estimulación del sistema inmune mediante vacunas

La respuesta del hospedador a una infección lleva implícita una compleja coordinación entre genes que activan o desactivan distintas vías para hacer frente a dicha infección. El conocimiento de los componentes que participan en la primera línea de defensa es de gran ayuda para comprender cómo los organismos son capaces de hacer frente a las infecciones; sin embargo, la información acerca de los genes que participan en la defensa de los organismos marinos frente a los patógenos es limitada. Para identificar qué genes están implicados en la respuesta de un hospedador frente a un determinado agente patógeno (bacteria, virus, protozoo, etc.) se emplean diversas aproximaciones entre las que la cuantificación de ARNm es la técnica usada más frecuentemente.

Los genes que codifican citoquinas, caspasas, sistema del complemento, lisozimas, moléculas de superficie de linfocitos T, moléculas implicadas en el metabolismo del hierro, entre otros, se han caracterizado en diferentes especies de interés piscícola, como trucha (Zou *et al.*, 2003; Wang y Secombes, 2003; Zou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Díaz-Rosales *et al.*, 2009), salmón (Skugor *et al.*, 2008; Ingerslev *et al.*, 2008; Munang'andu *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014), lubina (Scapigliati *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2007; Román *et al.*, 2013; Buonocore *et al.*, 2014) y dorada (López-Castejón *et al.*, 2008; García-Fernández *et al.*, 2011; Pellizzari *et al.*, 2013) y su transcripción en animales sometidos a diferentes condiciones de cultivo se ha analizado.

En cuanto a lenguado senegalés, se ha analizado la expresión de diferentes genes para valorar su idoneidad como genes de referencia en estudios de qPCR (Infante *et al.*, 2008). Del mismo modo, se han caracterizado y estudiados la transcripción de genes que codifican proteínas de choque térmico tras episodios de estrés térmico en ejemplares durante su desarrollo larvario y juvenil (Manchado *et al.*, 2008). Prieto-

Alamo *et al.* (2009) y Osuna-Jimenez *et al.* (2009) detectaron la sobreexpresión de genes involucrados en el proceso inflamatorio, en la respuesta de proteínas de choque térmico, metabolismo del hierro, sistema del complemento y respuesta celular citotóxica no específica, entre otros, en lenguados inoculados con LPS. Por otra parte, Salas-Leiton *et al.* (2010) observaron aumentos en la expresión génica de lisozimas, proteínas de choque térmico o proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro en lenguados sometidos a alta densidad de cultivo. Costas *et al.* (2011) determinaron que la inclusión de arginina en la dieta junto con la manipulación diaria de ejemplares de lenguado senegalés incrementan la expresión de diversos genes relacionados con la respuesta inmune innata junto con una mayor resistencia frente a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida*. Jiménez-Fernández *et al.* (2015) demostraron que la inclusión de vitamina C como suplemento alimenticio en larvas de lenguado produce una modulación en la transcripción de genes antioxidantes, proteínas de choque térmico u osmoregulación, en tanto que Montero *et al.* (2015) observaron la sobreexpresión de genes relacionados con el sistema del complemento, reconocimiento de patógenos y citoquinas tras la inclusión de aceites vegetales en la dieta de ejemplares juveniles de lenguado. Por su parte, Tapia-Paniagua *et al.* (2015) detectaron una reducción de la actividad apoptótica ejercida por el tratamiento con oxitetraciclina en ejemplares de lenguado senegalés, cuando en su dieta se incluyó el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11.

5.3.1. Vacunas frente *P. damsela* subsp. *piscicida*

Los estudios realizados hasta el momento sobre los mecanismos de patogenicidad así como las interacciones con el hospedador de *P. damsela* subsp. *piscicida* han permitido el desarrollo de diversas estrategias de vacunación frente a este patógeno, si bien ninguna de ellas se considera totalmente satisfactoria en la actualidad. La mayoría de estas estrategias consisten en el empleo de suspensiones que contienen células bacterianas inactivadas mediante calor o formalina (Romalde, 2002; Barnes *et al.*, 2005). Estas suspensiones utilizadas en medregal de Japón (*Seriola quinqueradiata*) proporcionan cierta protección, pero con resultados no reproducibles (Fukuda y Kusuda, 1981; Kusuda y Hamaguchi, 1987; 1988; Hamaguchi y Kusuda 1989). Igualmente, se han ensayado vacunas basadas en LPS y fracciones ribosómicas bacterianas que han dado problemas tanto de reproducibilidad como de elaboración a gran escala (Fukuda y Kusuda 1985; Kusuda *et al.*, 1988).

Introducción

En el caso de dorada y lubina, se ha llegado a comercializar bajo el nombre de ICTHIOVAC[®] PD (Laboratorios Hipra, Girona) una bacterina enriquecida con los ECPs del patógeno (Magariños *et al.*, 1994a; 1994d; 1999). Esta vacuna se formuló de forma específica para inmunizar mediante inmersión a alevines de dorada y otorga un porcentaje relativo de supervivencia (RPS) del 60% frente a episodios de infección producidos por *P. damselae* subsp. *piscicida* (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2002). En los estados larvarios se ha ensayado también, obteniéndose altas tasas de protección cuando se suministra por inmersión (Magariños *et al.*, 1996c; Magariños y Romalde, 1997). Otras vacunas formuladas a partir de bacterina de *P. damselae* subsp. *piscicida* enriquecida con ECPs o la cápsula polisacáridica han mostrado una eficacia variable, con una corta duración de la protección (Gravningen *et al.*, 1998; Bakopoulos *et al.*, 2003).

La vacuna comercializada con el nombre de Photogen (Aqua Health, Charlottetown, Canadá) ha sido ensayada en lubina para hacer frente a la fotobacteriosis. Esta vacuna consiste en bacterina del patógeno cultivado en condiciones que permiten el enriquecimiento en dos proteínas bacterianas de 52 kDa y 97 kDa, respectivamente. La vacunación mediante inmersión con esta preparación proporciona un RPS cercano al 50% en lubina y al 70% en medregal de Japón, frente a infecciones de *P. damselae* subsp. *piscicida* (Barnes *et al.*, 2005).

Hasta el momento, se ha utilizado de una manera muy limitada la tecnología del ADN recombinante en el desarrollo de vacunas bacterianas en teleósteos, no existiendo medidas preventivas eficaces frente la fotobacteriosis. Ho *et al.* (2011) identificaron antígenos de *P. damselae* subsp. *piscicida* mediante inmunoproteómica para el desarrollo de una vacuna de subunidades en cobia (*Rachycentron canadum*). Tres de las proteínas recombinantes seleccionadas (rHSP60, rEnolasa y rGAPDH) confirieron protección a ejemplares de cobia frente a una infección posterior con el patógeno. Sin embargo, no se dispone de información sobre la protección de estos antígenos en otras especies piscícolas susceptibles a la fotobacteriosis.

Andreoni *et al.* (2013) identificaron una lipoproteína (PDP_0080) en *P. damselae* subsp. *piscicida* mediante vacunología reversa. Para ello emplearon técnicas bioinformáticas con el objeto de encontrar proteínas localizadas en la superficie celular del patógeno, cuya exposición a los componentes del sistema inmune del hospedador se presupone superior. Estos autores observaron que los anticuerpos frente a la

lipoproteína identificada desarrollados en ratón inhiben la adhesión de *P. damsela* subsp. *piscicida* a células epiteliales de la línea celular CHSE, indicando, de esta forma, que la proteínas participa en la adhesión del patógeno. Por otro lado, la lipoproteína (PDP_0080) purificada se inyectó vía intraperitoneal en lubina, otorgando un RPS del 50% en los ejemplares vacunados.

Específicamente en lenguado, Arijo *et al.* (2005) diseñaron una vacuna divalente preparada con bacterina y ECPs de los patógenos marinos *Vibrio harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida*. La administración por inmersión durante 1-2 horas con una dosis de recuerdo a los 30 días proporcionó una protección (RPS 80%) efectiva durante 4 meses; sin embargo los niveles de anticuerpos detectados se redujeron rápidamente a partir del quinto mes.

Existen estudios que muestran que el empleo de vacunas polivalentes no tiene por qué ser necesariamente beneficioso para aumentar la protección de los ejemplares que las reciban (Nikoskelainen *et al.*, 2007). Considerando que no todos los antígenos estimulan la protección en la respuesta inmune, junto con el hecho de que el sistema inmunitario de peces tiene una capacidad definida y limitada para responder a cada una de las sustancias antigénicas, es necesario tener precaución a la hora de formular los componentes que van a ir incorporados en una vacuna para hacerla efectiva. Cada vez existen más evidencias de que los antígenos, inmunogénicos y no inmunogénicos, son capaces de interactuar de manera sinérgica o antagónica, pudiendo estimular, inhibir, suprimir o provocar reacciones cruzadas en la respuesta inmune frente a antígenos específicos (Busch, 1997).

Se ha observado que ejemplares de trucha arcoíris a los que se les suministraron diferentes vacunas polivalentes presentan un aumento en el estallido respiratorio a las tres semanas post-vacunación (Nikoskelainen *et al.*, 2007). Sin embargo, este estallido respiratorio es inespecífico y originado principalmente por el gran número de granulocitos y monocitos circulantes, más que por la presencia de anticuerpos que se unen a los antígenos. A las seis semanas post-vacunación, el grupo que se vacunó a la vez frente a un mayor número de patógenos mostró una menor especificidad en la fagocitosis frente al grupo cuya vacuna poseía menos componentes antigénicos (Nikoskelainen *et al.*, 2007). Actividades como la fagocitosis o el sistema del complemento pueden ser inhibidas por un exceso de anticuerpos específicos (Taborda y Casadevall, 2001; Taborda *et al.*, 2003; Nikoskelainen *et al.*, 2005). Estudios en

Introducción

humanos y ratones han determinado que las inmunoglobulinas presentes en un organismo pueden actuar como adyuvantes al multiplicar, o por contra, suprimir la respuesta mediada por anticuerpos frente a un antígeno específico (Heyman, 2000; Getahun y Heyman, 2006). El uso de inmunoglobulinas IgG, IgE e IgM en ciertos regímenes de inmunización pueden suprimir la respuesta de anticuerpos al producir un enmascaramiento de los epítomos antigénicos (Heyman, 2000; Taborda *et al.*, 2003).

En poblaciones de bacalao y trucha arcoíris con ejemplares tanto con altos, como bajos niveles de anticuerpos naturales a los que posteriormente se sometieron a vacunación, se comprobó cómo los peces que mostraban inicialmente altos niveles de anticuerpos no respondían al proceso de inmunización, mientras que aquellos que presentaban valores bajos respondieron bien a la vacunación (Michel *et al.*, 1990; Israelsson *et al.*, 1991). El que algunas vacunas diseñadas para teleósteos puedan inducir una respuesta de anticuerpos demasiado alta que suprima la activación del sistema del complemento y fagocitosis dependiente de anticuerpos queda aún por esclarecer (Nikoskelainen *et al.*, 2007). Por este motivo, el suministrar vacunas basadas en proteínas o componentes celulares aislados que realmente generen en el organismo hospedador una respuesta inmune específica fuerte representa un importante campo a explorar.





HIPÓTESIS



El control de las infecciones en la industria acuícola representa un aspecto crucial para el avance de la misma. El conocimiento de los componentes implicados en la respuesta inmune del hospedador resulta de gran ayuda para comprender cómo los peces son capaces de hacer frente a los microorganismos patógenos. En este contexto se plantea el estudio de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en *S. senegalensis* en la interacción con el patógeno *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por otra parte, la adaptación de la bacteria al ambiente que representa el hospedador, distinto al ambiente *in vitro*, requerirá la regulación de la expresión de genes diferentes en el patógeno. De esta forma, los genes regulados *in vivo* pueden desempeñar un importante papel en la enfermedad y ser determinantes en la virulencia. Por ello, su estudio es de gran relevancia en el conocimiento de la patogenicidad y en el diseño de vacunas más efectivas frente al patógeno.

En base a estos supuestos se han considerado las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1.- La inmunización de *S. senegalensis* con una vacuna frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de modular la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune de una manera similar a una infección frente al patógeno.
- 2.- Durante la infección de *S. senegalensis* con *P. damsela* subsp. *piscicida* se produce una modulación en la transcripción de genes de la bacteria que puede dar lugar a proteínas no expresadas *in vitro*.



OBJETIVOS



El objetivo global del presente trabajo es profundizar en el conocimiento de la interacción entre el patógeno *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Solea senegalensis* con vistas al desarrollo de estrategias para el control de la fotobacteriosis. Para abordar este objetivo global se han considerado los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Estudio de la modulación de la transcripción de genes relacionados con el sistema inmune de *S. senegalensis* en respuesta a la infección y a la vacunación con *P. damsela* subsp. *piscicida*.
- 2.- Identificación de proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida* inmunogénicas para *S. senegalensis* aplicando la tecnología IVIAT (*In Vivo Induced Antigen Technology*).
- 3.- Análisis de la transcripción de genes que codifican proteínas inmunogénicas seleccionadas mediante la tecnología IVIAT.



MATERIAL Y MÉTODOS



1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE *S. senegalensis* TRAS LA INFECCIÓN Y VACUNACIÓN FRENTE A *P. damsela* SUBSP. *piscicida*

1.1. Condiciones experimentales

Todos los experimentos en los que se usaron ejemplares de *S. senegalensis* se diseñaron de acuerdo a la normativa establecida por la Unión Europea (2010/63/UE) y España (Real Decreto 1201/2005 y ley 32/2007) para el uso de animales de laboratorio. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA).

1.1.1. Infección de ejemplares juveniles de *S. senegalensis* con *P. damsela* subsp. *piscicida*

Se emplearon 160 ejemplares de *S. senegalensis* con un peso de 130 ± 15 g suministrados por la Planta de Cultivos Marinos (CASEM, Universidad de Cádiz). Los peces se transfirieron a las instalaciones de la Universidad de Málaga y se mantuvieron a razón de 20 individuos por tanque en condiciones óptimas de densidad (7 kg m^{-2}) con un sistema de recirculación de agua de mar sometida a aireación, y paso por filtros biológicos y radiación ultravioleta. La temperatura del agua durante el experimento fue de 20-22 °C y la salinidad de 35 g L^{-1} .

Los animales se alimentaron diariamente (al 1% de la carga del tanque) con pienso comercial (Skretting, Burgos, España) y se aclimataron durante dos semanas previas al experimento. El día previo a la infección se evaluó el estado de salud de 24 ejemplares (3 por tanque) escogidos de forma aleatoria y se llevó a cabo un análisis microbiológico de los órganos internos en placas de agar tripticasa de soja (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con un suplemento de 1,5% de NaCl (TSAs) que se incubaron a 22 °C durante 48 h. La ausencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* se comprobó mediante PCR siguiendo la metodología descrita por Osorio *et al.*, (1999).

Para la infección experimental se empleó la cepa Lg 41/01 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, aislada de lenguados afectados por un brote de fotobacteriosis y cuya dosis letal 50 para lenguado por inoculación intraperitoneal es $DL-50=2,2 \times 10^4 \text{ ufc g}^{-1}$ (Díaz-Rosales *et al.*, 2003). Las células bacterianas se cultivaron en caldo tripticasa de

Material y Métodos

soja (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 1,5% de NaCl (TSBs) a 22 °C durante 24 h, se centrifugaron a 5.500 xg durante 10 min y se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS) estéril a una concentración final de 10^5 ufc ml⁻¹.

Se establecieron cuatro grupos experimentales, con dos réplicas por grupo: 1) peces (N=40) sometidos a infección por inoculación intraperitoneal (IP); 2) peces (N=40) control de la inoculación intraperitoneal (CIP); 3) peces (N=40) sometidos a infección por inmersión (IM) y 4) peces (N=40) control de la infección por inmersión (CIM). De esta forma fue posible tomar muestras en los tiempos seleccionados y determinar la tasa de mortalidad tras la infección. Los peces se anestesiaron antes de la infección mediante baño en agua de mar con aceite de clavo (200 ppm) y se inyectó a los ejemplares del grupo IP una dosis de 10^4 ufc g⁻¹ de la suspensión bacteriana, mientras que los del grupo IP control (CIP) recibieron el mismo volumen de PBS estéril. En el grupo de infección por inmersión (IM), los peces se mantuvieron a una densidad de 7 kg m⁻² durante 50 min con aireación a 20-22 °C en una suspensión de *P. damselae* subsp. *piscicida* (dosis 10^7 ufc ml⁻¹), mientras que el grupo IM control (CIM) se sometió a condiciones similares de inmersión pero sin adicionar el patógeno al agua. Los ejemplares se devolvieron a sus respectivos tanques tras el tiempo de infección.

Se tomaron tres ejemplares de cada tratamiento tras 24, 72 h y 30 d de la infección y se transfirieron a un nuevo tanque que contenía agua de mar con 200 ppm de aceite de clavo para sacrificarlos. Se extrajo la sangre mediante punción caudal, dejándola coagular a temperatura ambiente para recolectar finalmente el suero, que se conservó a -20 °C hasta la realización de los ensayos inmunológicos. La presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damselae* subsp. *piscicida* en el suero se determinó mediante ELISA según se describe en el apartado 1.6.

Por otro lado, el hígado y riñón cefálico se extrajeron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenados a -80 °C hasta su procesado. El procesado de las muestras para la obtención del ADNc así como la elección de los genes de referencia se detalla en los puntos 1.2. y 1.3. respectivamente, de la presente memoria.

A partir de las muestras de hígado y riñón se realizó la cuantificación relativa de ARNm empleando los cebadores de los genes del componente 3 del complemento (C3), componente 7 del complemento (C7), lisozima G (LYS-G), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor 3 asociado al receptor del TNF (TRAF-3), proteínas receptoras de

células citotóxicas no específicas (NCCRP-1), hepcidina (HAMP-1), transferrina (TF), ferritina-M (FERR-M), haptoglobina (HP-1), proteína de choque térmico GP96 (GP96), proteína de choque térmico 90AA (HSP90AA), proteína de choque térmico 90AB (HSP90AB), proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Anexo I) siguiendo la metodología detallada en el apartado 1.4.

1.1.2. Vacunación de ejemplares juveniles de *S. senegalensis* frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*

Se emplearon 386 ejemplares de *S. senegalensis* con un peso de $52,5 \pm 8,3$ g procedentes del centro del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Santander, donde se mantuvieron a lo largo del ensayo. Previo al comienzo del experimento, se comprobó el estado de salud de 7 ejemplares escogidos al azar mediante análisis microbiológico de los órganos internos en placas de TSAs, que se incubaron a 22 °C durante 48 h. La ausencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* se comprobó al igual que en el diseño experimental anterior, mediante PCR siguiendo la metodología descrita por Osorio *et al.*, (1999). Los peces se distribuyeron de forma aleatoria en tanques (300 L) con circulación de agua de mar sometida a aireación. La temperatura del agua durante el experimento fue de $20 \pm 0,5$ °C y la salinidad de 35 g L⁻¹. Los peces fueron alimentados diariamente con pienso comercial (Skretting, Burgos, España).

Se establecieron cuatro grupos de tratamiento, con dos réplicas por grupo: 1) vacunación por inoculación intraperitoneal (IP); 2) vacunación por inmersión (IM); 3) control PBS por inoculación intraperitoneal (CIP) y 4) control PBS+adyuvante incompleto de Freund por inoculación intraperitoneal (CAIF).

La vacuna consistió en una mezcla en proporción 10:1 de bacterina y ECPs de *P. damsela* subsp. *piscicida* que se preparó en los laboratorios de la Universidad de Málaga según la metodología descrita por Arijo *et al.* (2005). Para la vacunación los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (100 ppm), y los ejemplares del grupo inmunizado por vía intraperitoneal (N=95) inyectados con 0,1 ml de la vacuna y 0,1 ml de adyuvante incompleto de Freund (AIF) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Para la vacunación por inmersión se sacaron los peces (N=94) a un tanque auxiliar que contenía la preparación de vacuna diluida en agua de mar en proporción 1:10. Los peces se mantuvieron en dicho tanque durante 50 min a una densidad de 7 kg m⁻² y posteriormente se devolvieron a sus respectivos tanques. El grupo control (N=94) fue

Material y Métodos

inoculado con 0,1 mL de PBS estéril por vía intraperitoneal. El grupo control PBS+AIF (N=95) fue inoculado por vía intraperitoneal con 0,1 ml de PBS estéril y 0,1 ml de AIF. A los ejemplares se les administraron dos dosis de vacunación, a tiempo 0 y 30 d desde el inicio del ensayo.

Para el seguimiento de la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación se extrajo sangre a 10 ejemplares de los distintos grupos de *S. senegalensis*. Para ello, al inicio del ensayo y 15, 30, 45 y 90 d tras la vacunación inicial, se anestesiaron a los ejemplares mediante baño en agua de mar con 100 ppm de aceite de clavo. La sangre se extrajo de los ejemplares mediante punción caudal, recogándose finalmente el suero tras permitir la coagulación a temperatura ambiente. El suero se conservó a -20 °C para su análisis posterior. La presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en el suero se determinó mediante ELISA según se describe en el apartado 2.3.

Al final del ensayo de vacunación (90 d) se tomaron muestras de hígado y riñón cefálico para el estudio de la transcripción de genes relacionados con el sistema inmune. Para ello, los órganos se extrajeron asépticamente e introdujeron de forma inmediata en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARNm. Se almacenaron a -80 °C hasta su procesado como se detalla en el apartado 1.2.

A partir de las muestras de hígado y riñón se realizó cuantificación de ARNm empleando los cebadores de los genes interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), complejo C1q del complemento (C1q), componente 3 del complemento (C3), componente 4 del complemento (C4), componente 7 del complemento (C7), componente 9 del complemento (C9), lisozima C1 (LYS-C1), lisozima G (LYS-G), proteína 1 de reconocimiento de peptidoglicano (PGLYRP1), receptor 4 de linfocitos T colaboradores (CD4), receptor 8 alfa de linfocitos T citotóxicos (CD8 α), Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1b (MHC 1b), caspasa 1 (CASP1), caspasa 8, (CASP8), caspasa 9 (CASP9), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), receptor asociado al factor 3 del TNF (TRAF-3), proteína receptora de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1), hepcidina (HAMP-1), transferrina (TF), haptoglobina (HP-1), proteína de choque térmico GP96 (GP96), proteína de choque térmico 90AA (HSP90AA), proteína de choque térmico 90AB (HSP90AB), proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Anexo I) siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.4.

1.1.3. Infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* de los lenguados vacunados

Los ejemplares vacunados por las dos rutas descritas en el apartado anterior así como los distintos grupos control se sometieron a infección por inoculación intraperitoneal con *P. damsela* subsp. *piscicida* tras 90 d de la primera dosis de vacuna. Para ello se emplearon 40 ejemplares de *S. senegalensis* de cada uno de los grupos y se hicieron dos réplicas por grupo. Los peces se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura del agua, salinidad y alimentación detalladas en el diseño experimental anteriormente citado.

Los ejemplares se anestesiaron con 100 ppm de aceite de clavo y se inocularon por vía intraperitoneal con 100 μ l de una suspensión de células de *P. damsela* subsp. *piscicida* o un volumen similar de PBS estéril. Tras someter a los ejemplares a sus respectivos tratamientos se devolvieron a sus tanques y se siguió el desarrollo de la infección durante 15 d, contabilizándose el número de muertes. El porcentaje relativo de supervivencia (RPS) se calculó para evaluar la eficacia de la vacunación: $[1 - (\% \text{ de mortalidad en peces vacunados} / \% \text{ de mortalidad en peces control})] \times 100$. A partir de los ejemplares recién muertos se tomaron muestras para detectar la presencia del patógeno como se ha detallado en el apartado 1.1.1.

Para el ensayo de infección post-vacunación se empleó la cepa Lg 41/01 de *P. damsela* subsp. *piscicida* (dosis de 10^5 ufc g^{-1}). Las células bacterianas se cultivaron en TSBs a 22 °C durante 24 h, se centrifugaron a 5.500 xg, 10 min, 4°C y se resuspendieron en PBS estéril.

Tras 15 d de la infección, los ejemplares supervivientes se anestesiaron y se tomaron muestras de sangre, hígado y riñón cefálico siguiendo la metodología descrita en los diseños experimentales anteriores. La presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en el suero se determinó mediante ELISA según se describe en el apartado 2.3. A partir de las muestras de hígado y riñón se realizó cuantificación relativa de ARNm empleando los cebadores de los genes que codifican para interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), componente C1q del complemento (C1q), componente 3 del complemento (C3), componente 4 del complemento (C4), componente 7 del complemento (C7), componente 9 del complemento (C9), lisozima C1 (LYS-C1), lisozima G (LYS-G), proteína 1 de reconocimiento de peptidoglicano (PGLYRP1), receptor 4 de linfocitos T colaboradores (CD4), receptor 8 alfa de linfocitos T citotóxicos (CD8 α), complejo mayor de

Material y Métodos

histocompatibilidad clase 1b (MHC 1b), caspasa 1 (CASP1), caspasa 8, (CASP8), caspasa 9 (CASP9), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor 3 asociado al receptor del TNF (TRAF-3), proteína receptora de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1), hepcidina (HAMP-1), transferrina (TF), haptoglobina (HP-1), proteína de choque térmico GP96 (GP96), proteína de choque térmico 90AA (HSP90AA), proteína de choque térmico 90AB (HSP90AB), proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Anexo I) siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.4.

1.2. Extracción de ARN y reversotranscripción a ADNc

Para la extracción de ARN se empleó TRI Reagent (Sigma-Aldrich, España) y 1-bromo-3-cloropropano (BCP) (Sigma Aldrich, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 25 mg y de 50 mg de riñón cefálico e hígado, respectivamente. Durante todo el proceso de extracción de ARN se emplearon tubos libres de ARNasa y ADNasa, además de agua tratada con 0,1 % de dietil pirocarbonato (DEPC) libre de nucleasas. La integridad del ARN extraído se analizó mediante electroforesis en geles de TBE 0,5x (5,4 g/l Tris-base; 2,6 g/l ácido bórico; 2 ml EDTA 0,5 mM (pH=8); pH final = 8,3) con agarosa al 0,7%. El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría comprobando que la relación de absorbancias $A_{260/280\text{nm}}$ oscilase entre 1,9 – 2,0.

Para eliminar los posibles restos de ADN se realizó un tratamiento con ADNasa I (Life Technologies, España) a una concentración de 1U por μg de ARN durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se añadió ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) (Life Technologies, España) a una concentración de 50 mM e incubó durante 10 min a 65 °C de acuerdo con el protocolo de la casa comercial. La reversotranscripción a ADNc se realizó utilizando el kit cDNA First Strand Synthesis (Life Technologies, España) a partir de 1 μg de ARN de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

1.3. Elección de genes de referencia

Para seleccionar los genes de referencia a emplear en el presente trabajo se estudió la transcripción de los genes que codifican para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1 y 2 (GADPH 1 y 2), beta actina 2 (ACTB2), ubiquitina (UBQ), subunidad 18 S del ARN ribosómico (ARNr18S) y proteína ribosómica S4 (RPS4)

descritos por Infante *et al.*, (2008). Se utilizaron los cebadores GADPH1 y 2, ACTB2, UBQ, ARNr 18S y RPS4 para la amplificación del ADNc procedente de ejemplares de *S. senegalensis* (Tabla 3). La estabilidad en la expresión génica de los genes de referencia candidatos se analizó mediante el programa RefFinder (on-line Cotton EST Database) a través de sus algoritmos: Delta CT (Silver *et al.*, 2006), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), Normfinder (Andersen *et al.*, 2004) y Genorm (Vandesompele *et al.*, 2002). El programa ordena los resultados tras emplear cada uno de los algoritmos, asignando un peso específico a cada gen analizado, calculando la media geométrica de dichos pesos para finalmente presentar los genes ordenados de mayor a menor estabilidad. Como genes de referencia se seleccionaron aquellos que mostraron mayor estabilidad en las distintas condiciones de experimentación.

Tabla 3. Cebadores empleados para la elección de los genes de referencia.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 1	GADPH1	TGTTTCGTCTGGAGAAACCCGCCAAA (F)
		AGCGCCAGCATCAAAGATGGAGGAG (R)
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2	GADPH2	AGCCACCGTGTCCGCGACCT (F)
		AAAAGAGGAGATGGTGGGGGGTGGT (R)
Beta-actina 2	ACTB2	AATCGTGACCTCTGCTTCCCCCTGT (F)
		TCTGGCACCCCATGTTACCCCATC (R)
Ubiquitina	UBQ	AGCTGGCCCAGAAATATAACTGCGACA (F)
		ACTTCTTCTTGCGGCAGTTGACAGCAC (R)
Subunidad 18S del ARN ribosómico	ARNr 18S	GAATTGACGGAAGGGCACCACCAG (F)
		ACTAAGAACGGCCATGCACCACCAC (R)
Proteína ribosómica S4	RPS4	GTGAAGAAGCTCCTTGTCCGGCACCA (F)
		AGGGGGTCCGGGTAGCGGATG (R)

1.4. Cuantificación de la transcripción relativa mediante qPCR

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch™ (BioRad, España) con el módulo óptico CFX96™ (BioRad, España) para las mediciones de fluorescencia. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10 µl. La mezcla contenía 5 µl de Sso Advanced SYBR Green Supermix (BioRad, España), 0,5 µl de cada cebador (10 µM), 1 µl de ADNc y 3 µl de agua tratada con DEPC. Las condiciones de

Material y Métodos

amplificación fueron las siguientes: 30 s a 95 °C para la activación de la polimerasa y desnaturalización del ADNc, seguido de 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 10 s a 68 °C. Al final de cada ciclo se realizó la medición de fluorescencia de la placa. Para confirmar la amplificación específica en el producto de PCR, al terminar los 40 ciclos, se realizó el análisis de la curva de fusión partiendo de una temperatura inicial de 65 °C con un incremento de 0,5 °C por cada ciclo de 5 s hasta llegar a una temperatura final de 95 °C.

El cálculo de la eficiencia de amplificación se realizó mediante la dilución seriada de concentraciones conocidas de ADNc de distintas muestras y posterior amplificación de las mezclas de reacción. Los valores Ct obtenidos de cada una de las diluciones se representaron frente al logaritmo de la concentración de ADNc. La fórmula empleada para el cálculo de la eficiencia fue la siguiente (Pfaffl, 2001):

$$\text{Eficiencia (\%)} = (10^{[-1/p]} - 1) \times 100$$

Donde p es la pendiente de la recta obtenida. Todas las eficiencias calculadas entraban en el rango de acuerdo con las indicaciones de la polimerasa utilizada: 90 – 105%.

1.5. Tratamiento de los datos mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Los datos obtenidos tras las reacciones de qPCR se analizaron empleando el programa iCycler iQ v3.0 de BioRad. Los valores de Ct se normalizaron aplicando el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Este método asume que las eficiencias de amplificación del gen de referencia y de estudio son cercanas al 100%. En primer lugar, se normalizaron los valores de Ct obtenidos de los genes de estudio y referencia tanto de la muestra tratada como en la muestra control. La normalización del gen a estudiar respecto al gen de referencia permite compensar cualquier diferencia debido a la cantidad de muestra empleada en los ensayos:

$$\Delta C_{T(\text{tratado})} = C_{T \text{ gen de estudio}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$$

$$\Delta C_{T(\text{control})} = C_{T \text{ gen de estudio}} - C_{T \text{ gen de referencia}}$$

En segundo lugar, se normalizó el valor de Ct de la muestra tratada con la muestra control:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{tratado})} - \Delta C_{T(\text{control})}$$

Finalmente, se aplica la expresión:

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

El resultado indica el incremento o disminución relativa en el número de transcritos de un gen perteneciente a un individuo tratado con respecto al mismo gen de un individuo control sin tratar y normalizado al gen de referencia.

1.6. Determinación de anticuerpos en el suero mediante ELISA

Los niveles de anticuerpos presentes en los sueros de los ejemplares estudiados en el presente trabajo se determinaron mediante la técnica ELISA. Para ello se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp (Nunc International, NY, EEUU), tratadas para pruebas inmunológicas, en las cuales se añadió un volumen de 50 μ l por pocillo de una suspensión bacteriana de *P. damsela* subsp. *piscicida* preparada de acuerdo a Arijo *et al.*, (2005) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche para favorecer la inmovilización de los antígenos. Los pocillos se sometieron a tres lavados con 200 μ l de PBS con Tween 20 al 0,25% (v/v) (PBS-T) y se añadieron 200 μ l por pocillo de PBS-T suplementado con leche desnatada en polvo al 3%. Se incubaron a 22 °C durante 2 h con el fin de eliminar los sitios de unión inespecíficos y de nuevo se lavaron las placas tres veces con PBS-T. Por otro lado, se prepararon diluciones seriadas de los sueros en PBS (1:250; 1:500; 1:1000; 1:2000), se añadieron a razón de 50 μ l por pocillo e incubaron a 22 °C durante 2 h. Tras una nueva serie de lavados (x3) con PBS-T, se añadieron 50 μ l de una solución de PBS-T con albúmina bovina sérica (BSA) al 0,25% (p/v) y anticuerpos de conejo (dilución 1:1000) (Sigma-Aldrich, España) frente a IgM de lenguado purificada en nuestro laboratorio (Medina *et al.*, 2015). Tras una incubación a 22 °C durante 2 h, las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBS-T y se añadió un volumen de 50 μ l por pocillo de una solución de PBS-T + BSA al 0,25% (p/v) que contenía anticuerpo secundario frente a inmunoglobulina de conejo desarrollado en cabra y conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, España). La dilución empleada fue 1:5000 y se incubó durante 1 h a 22 °C. Después se lavaron los pocillos con PBS-T, se añadieron 200 μ l de una solución de o-fenilendiamina dihidrocloruro (SIGMAFAST™ OPD) (Sigma Aldrich, España) y se incubaron a 22 °C durante 30 min en oscuridad. La reacción colorimétrica producida se detuvo añadiendo 50 μ l por

Material y Métodos

pocillo de H₂SO₄ 3M y se procedió a realizar la lectura de la placa a 490 nm mediante el espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Madrid, España).

1.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software SPSS Statistics versión 17 (SPSS Inc, IBM, Nueva York, Estados Unidos). El análisis de las curvas de supervivencia tras la infección se realizó mediante el test Kaplan-Meier. Los resultados de transcripción de los genes estudiados se presentaron como promedio del incremento relativo \pm error estándar. La normalidad y homocedasticidad de los datos se comprobó mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, y, en caso de no cumplirse, se llevó cabo una transformación logarítmica. Las posibles diferencias significativas entre los valores de qPCR obtenidos en los grupos tratados respecto a sus controles se determinaron mediante el test t de Student, mientras que las posibles diferencias entre las diferentes rutas de administración empleadas para dichos tratamientos se analizaron mediante ANOVA empleando el test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.

2. IDENTIFICACIÓN MEDIANTE IVIAT DE ANTÍGENOS DE *P. damsela* SUBSP. *piscicida* EXPRESADOS *in vivo*

2.1. Construcción de la genoteca

2.1.1. Microorganismos empleados

Para la realización de una genoteca de expresión se empleó la cepa Lg41/01 del patógeno *P. damsela* subsp. *piscicida* (DL50=2,8x10⁴ ufc g⁻¹ en lenguado). Esta bacteria se cultivó a 22 °C en caldo tripticasa de soja suplementado con 1,5% de NaCl (TSBs). La cepa empleada para la expresión de la genoteca fue *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen, EEUU), la cual posee una alta eficiencia en la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor T7. *E. coli* BL21 (DE3) se cultivó en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C. Ambas cepas se conservaron a -80 °C en sus respectivos medios suplementados con un 15% de glicerol.

2.1.2. Extracción de ADN

P. damsela subsp. *piscicida* (Lg41/01) se cultivó en TSBs a 22 °C durante 36 h en agitación. El cultivo bacteriano se sometió a centrifugación a 5.000 xg, 4°C, durante 10 min, se recuperó el precipitado y se procedió a realizar la extracción de ADN de acuerdo con la metodología descrita por Martínez *et al.* (1998). El ADN obtenido se resuspendió finalmente en un volumen de 100 µl de agua destilada estéril tratada con DEPC.

Para eliminar los posibles restos de ARN en la muestra se hizo posteriormente tratamiento con 1 µl de ARNasa (10 mg ml⁻¹) (Life Technologies, España) durante 30 min a 37 °C. El ADN se volvió a purificar añadiendo 25 µl de acetato de sodio 3M, 1 µl de glucógeno 1M, 64 µl de agua estéril tratada con DEPC y 250 µl de etanol absoluto. La mezcla se incubó a 4 °C durante 30 min y centrifugó posteriormente a 12.000 xg a 4 °C durante 20 min. Se desechó el sobrenadante, se añadió etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 12.000 xg a 4 °C durante 10 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante y dejó secar el ADN a temperatura ambiente. El ADN se disolvió en agua destilada estéril tratada con DEPC y se almacenó a -20 °C para ser utilizado en la posterior elaboración de la genoteca.

2.1.3. Fragmentación hidrodinámica del ADN

Para la fragmentación del ADN se emplearon fuerzas de rotura hidrodinámicas mediante el aparato Hydroshear (GeneMachines, Michigan, Estados Unidos). Este sistema se basa en hacer pasar una solución que contiene ADN a través de una jeringuilla con un orificio de salida de reducido tamaño, provocado diferencias de presión en el fluido. La caída en la presión a la salida del orificio origina una aceleración de la solución para mantener de esta manera el caudal volumétrico. Dicha aceleración provoca en el ADN estiramientos que terminan causando la rotura de sus enlaces moleculares, fragmentándose. La fragmentación del ADN continuará hasta que los fragmentos presentes en la solución sean lo suficientemente pequeños para soportar dichas fuerzas (Figura 4). Para obtener fragmentos de tamaño que oscilasen entre 0,5 – 3,5 kb se emplearon los parámetros operacionales ocho y diez (llamados *Speed code*) de acuerdo con el manual del fabricante.

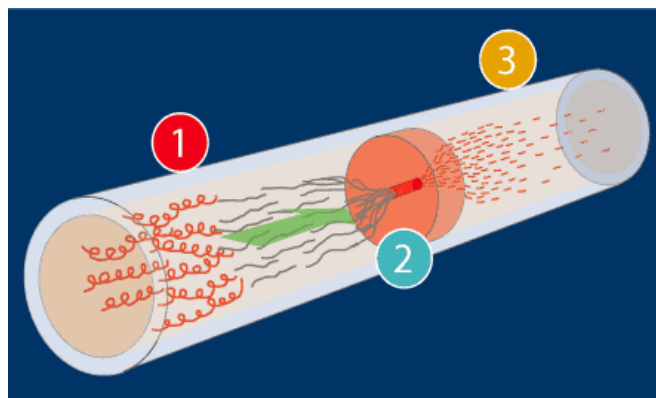


Figura 4. Ilustración que muestra el funcionamiento del aparato Hydroshear: el ADN pasa de una conformación enrollada a estirada (1), atraviesa el orificio de la jeringuilla con un diámetro menor causando la rotura del ADN (2), llegando a la zona de recogida el ADN ya fragmentado (3). Fuente de la imagen: United States Department of Energy Joint Genome Institute (DOE JGI).

Para comprobar la efectividad de la fragmentación hidrodinámica se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN recogidas al final del proceso de rotura del ADN de *P. damselae* subsp. *piscicida*. Tras la fragmentación se repararon los extremos del ADN mediante el empleo del kit Fast DNA End Repair (Life Technologies, España) a partir de 5 µg de ADN de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Los extremos del ADN quedaron de forma roma y fosforilados para poder llevar a cabo la posterior ligación. La mezcla de ADN se purificó mediante el kit GeneJET PCR Purification Kit (Life Technologies, España) y se guardó a -20 °C.

Para la elaboración de la genoteca se empleó el vector pET-30c(+) (Novagen, Estados Unidos) (Figura 5) cuyas principales características quedan resumidas en la Tabla 4.

El vector se cortó empleando la enzima de restricción rápida FastDigest EcoRV (Life Technologies, España) que reconoce y corta el sitio GAT[^]ATC originando extremos romos. Además se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina FastAP (Life Technologies, España) para liberar los grupos fosfato de las posiciones 5'- y 3'- del vector lineal, evitando que volviese a su forma circular original. La digestión y desfosforilación se llevaron a cabo de manera simultánea empleando la siguiente composición de la mezcla de reacción:

pET30c(+)	1 µg (2 µl)
FastDigest EcoRV	1 µl
Fosfatasa alcalina FastAP	1 µl
Tampón FastAP 10x	2 µl
H ₂ O MilliQ	14 µl

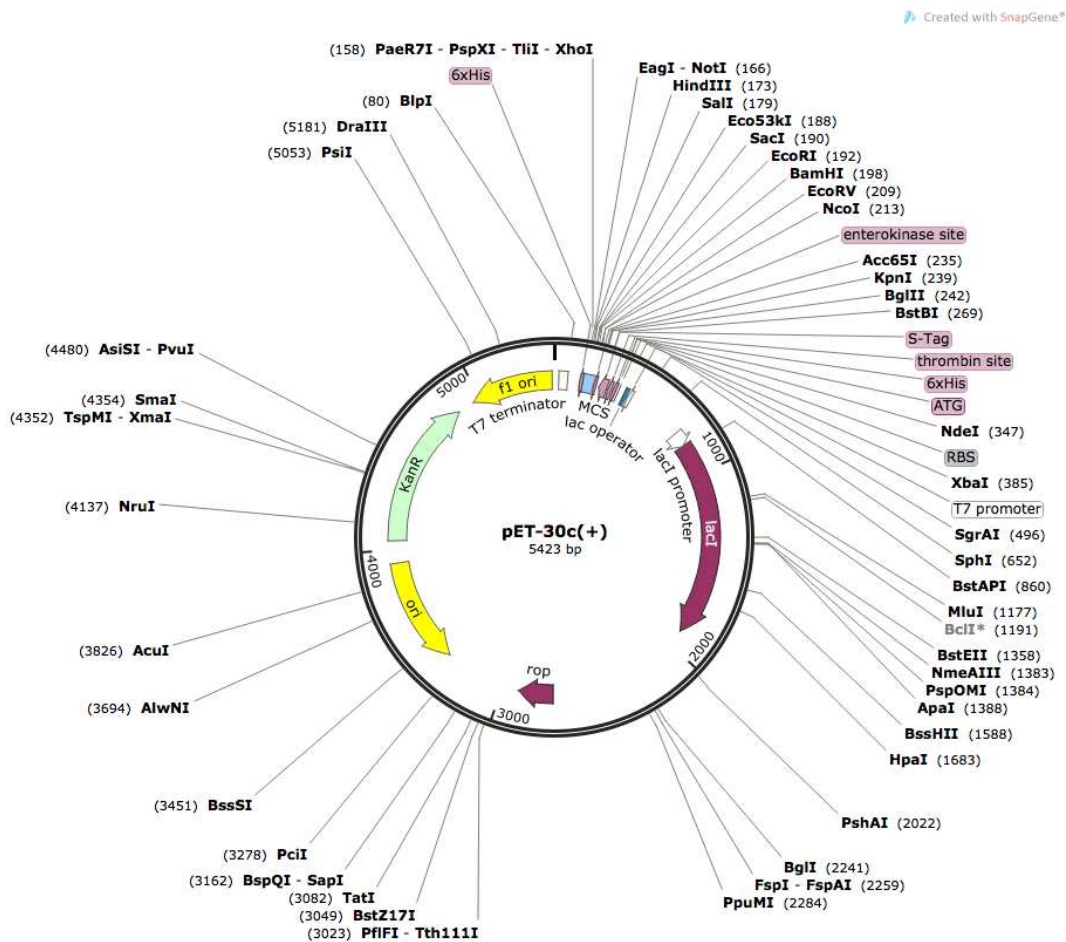


Figura 5. Mapa del vector pET30c(+) y la región de clonación (MCS) (Novagen).

La reacción se llevó a cabo en microtubos de 1,5 ml e incubación a 37 °C durante 10 min en un calentador de bloque QBD2 (Grant, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente se realizó la inactivación a 65 °C durante 15 min. Por último, se purificó la mezcla empleando el kit GeneJET PCR Purification Kit (Life Technologies, España) para evitar que la presencia de enzimas y sales pudieran afectar a la eficiencia de la reacción de ligación posterior. El vector en forma lineal se conservó a -20 °C hasta su uso.

Material y Métodos

Tabla 4. Principales características del vector pET30c(+) utilizado para la construcción de la genoteca en el presente trabajo.

Características	Posición nucleótidos
Terminador T7	26 – 73
His•Tag C-terminal	140 – 157
Región de clonación (MCS)	158 – 218
Enteroquinasa	220 – 234
S•Tag	250 – 294
Trombina	301 – 318
His•Tag N-terminal	328 – 345
Sitio de unión al ribosoma (RBS)	356 – 378
Operador <i>lacO</i>	393 – 417
Promotor T7	418 – 436
Represor <i>lacI</i>	827 – 1909
Origen pBR322	3339 – 3927
Resistencia a kanamicina (KanR)	4049 – 4864
Origen fl	4957 – 5412

2.1.4. Preparación de células competentes

Para la expresión de las proteínas recombinantes se han utilizado células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). Se trata de un lisógeno del bacteriófago λ DE3, que posee una copia en el cromosoma del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Mediante el empleo de un agente inductor como isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se induce la expresión de la ARN polimerasa T7 produciendo altos niveles de expresión de los genes recombinantes clonados bajo el promotor T7. Esta cepa es también deficiente en proteasas, lo que evita la degradación de las proteínas recombinantes expresadas.

Para que las células adquiriesen la capacidad de incorporar material genético desde el exterior se siguió la metodología descrita por Hanahan (1983; 1985) mediante diversos pasos de lavados en $RbCl_2$. Estos lavados provocan un aumento de la permeabilidad de la membrana bacteriana frente al ADN plasmídico foráneo cuando la célula es sometida a un breve choque térmico a 42 °C.

A partir de 250 μl de un cultivo de células de *E. coli* BL21 (DE3) conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se inoculó un tubo conteniendo 10 ml de caldo óptimo súper (SOB) (20 gL^{-1} triptona; 5 gL^{-1} extracto de levadura; 10 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM MgSO_4 ; pH = 7) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación fuerte durante 60 min hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,3. En ese momento se añadió un volumen de 90 ml de medio SOB fresco y se incubó durante otras 3 horas hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,5. El medio de cultivo se enfrió en hielo rápidamente durante 15 min, se centrifugó a 2.500 xg durante 6 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente descartar el sobrenadante, siendo el precipitado disuelto en 30 ml del tampón de transformación 1 (30 mM KacO; 100 mM RbCl_2 ; 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 15% glicerol; pH = 5,8) de forma cuidadosa para evitar dañar las células. Tras la incubación en hielo durante 15 min, se centrifugó de nuevo a 2.500 xg a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con cuidado en 4 ml del tampón de transformación 2 (10 mM RbCl_2 ; 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM MOPS; 15% glicerol; pH = 6,8) y se mantuvo en hielo durante 15 min. Finalmente, se transfirieron alícuotas ($50\text{ }\mu\text{l}$) de esta suspensión bacteriana a microtubos enfriados previamente y se introdujeron en nitrógeno líquido, para posteriormente mantenerlos en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se comprobó la frecuencia de transformación en medio agar LB (BD, Nueva Jersey, Estados Unidos) con kanamicina ($30\text{ }\mu\text{gml}^{-1}$) (Sigma Aldrich, Madrid, España), obteniéndose aproximadamente 10^8 transformantes por μg de vector pET30c. En el medio con antibiótico sólo pudieron crecer aquellas células de *E. coli* BL21 (DE3) que habían incorporado el vector pET30c que les otorgaba resistencia frente al mismo.

2.1.5. Ligación del ADN

Para la ligación se utilizaron las muestras del ADN fragmentado de *P. damselae* subsp. *piscicida* junto con el vector pET30c(+) lineal preparadas como se ha detallado en los apartados anteriores. Se realizó ligación de los extremos romos de ADN bacteriano y del vector empleando la enzima ADN ligasa de T4 (Life Technologies, España) junto con polietilenglicol (PEG) para aumentar la eficiencia del proceso. La proporción inserto:vector empleada fue de 5:1. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Material y Métodos

pET30c(+)	100 ng
ADN bacteriano	550 ng
Tampón de ligación	2 µl
PEG	2 µl
ADN ligasa de T4	1 µl
H ₂ O MilliQ	hasta 20 µl

La mezcla de ligación se incubó a 22 °C durante 90 min de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.1.6. Transformación en *E. coli*

Las células competentes preparadas según se ha detallado anteriormente se descongelaron en hielo, se les añadieron 5 µl del mix de ligación obtenido según se especifica en el apartado 2.1.6. y se incubaron en hielo durante 5 min. Para realizar la transformación por choque térmico se introdujeron los viales en un baño a 42 °C durante 30 s e inmediatamente se incubaron nuevamente en hielo durante 5 min. A cada vial se le añadieron 300 µl de caldo óptimo súper con glucosa (SOC) (20 g L⁻¹ triptona; 5 g L⁻¹ extracto de levadura; 10 mM NaCl; 5 mM KCl; 20 mM MgSO₄; 20 mM glucosa; pH = 7) precalentado a 37 °C, y se mantuvieron a dicha temperatura durante 60 min en un agitador rotatorio a 30 rpm. El contenido de los viales con las células transformadas se repartió mediante asa de vidrio en placas de agar LB con suplemento de kanamicina (30 µg ml⁻¹). Se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las colonias transformantes obtenidas se recogieron de forma individual y se cultivaron en placas multipocillos conteniendo caldo LB (10 g L⁻¹ triptona; 5 g L⁻¹ extracto de levadura; 10 g L⁻¹ NaCl; 30 µg ml⁻¹ kanamicina; pH = 7,4) suplementado con 30 µg ml⁻¹ de kanamicina. Tras una incubación de 5 horas en agitación suave a 37 °C, se añadió glicerol estéril al 15% y se procedió a su conservación a -80 °C. La genoteca de expresión adquirió un tamaño final de 7.000 clones recombinantes, la cual cubrió el 99% del genoma de *P. damsela* subsp. *piscicida* de acuerdo con la fórmula Clarke-Carbon:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Donde N es el número de recombinantes, P es la probabilidad deseada y f el ratio entre el tamaño del inserto respecto al del genoma total.

2.2. Obtención de suero con anticuerpos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* a partir de ejemplares de *S. senegalensis* sometidos a infección

Se emplearon ejemplares de *S. senegalensis* ($N = 30$) con un peso medio de 130 ± 15 g procedentes de la Planta de Cultivos Marinos (CASEM, Universidad de Cádiz). Tras ser anestesiados mediante baño en agua de mar con aceite de clavo (100 ppm) se inocularon intraperitonealmente con un volumen de 100 μ l de una suspensión de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Lg 41/01) conteniendo 10^5 ufc ml^{-1} . Los peces se mantuvieron durante 30 d en tanques con un sistema de recirculación de agua de mar sometida a aireación, y paso por filtros biológicos y radiación ultravioleta. La temperatura del agua durante el experimento fue de 20-22 °C y la salinidad de 35 g L^{-1} . Los animales se alimentaron diariamente (al 1% de la carga del tanque) con pienso comercial (Skretting, Burgos, España). Se estableció un grupo control que se inoculó con un volumen igual de PBS estéril (150 mM NaCl; 2 mM Na_2HPO_4 ; 5 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) y se mantuvo en las mismas condiciones que el grupo sometido a infección.

Al cabo de 30 d, los individuos supervivientes se sacrificaron con aceite de clavo (200 ppm) y se extrajo la sangre por punción caudal. La sangre se dejó reposar en tubos de coagulación (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) a temperatura ambiente durante 4 h, tras lo cual se recogió el suero y se conservó a -80 °C hasta su uso.

2.3. Determinación de anticuerpos en el suero mediante ELISA

Los niveles de anticuerpos presentes en los sueros de los ejemplares sometidos a infección subletal se determinaron mediante la técnica ELISA, siguiendo la metodología detallada en el apartado 1.6. de la presente memoria.

2.4. Adsorción del suero

Tras determinar la presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en los sueros de los lenguados supervivientes a la infección, se

Material y Métodos

mezclaron volúmenes iguales de los mismos y se sometieron a pasos secuenciales de adsorción frente a células de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41/01 y *E. coli* BL21 (DE3) de acuerdo con la metodología de Handfield *et al.* (2000). Para ello se añadió a la mezcla de sueros un volumen de PBS conteniendo 10^9 ufc mL⁻¹ de *P. damsela* subsp. *piscicida* y se incubó con agitación a 4 °C durante toda la noche. Las células bacterianas fueron eliminadas mediante centrifugación (10.000 xg, 15 min, 4 °C), repitiéndose este paso tres veces y conservándose siempre el sobrenadante. Posteriormente se adsorbió la mezcla de sueros frente a lisados celulares de *P. damsela* subsp. *piscicida* sin desnaturalizar, y posteriormente desnaturalizados por calor, adheridos a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (BioRad, España).

Estos lisados bacterianos se prepararon a partir de una suspensión de *P. damsela* subsp. *piscicida* (10^9 ufc mL⁻¹) en 2 ml de PBS con ázida sódica al 0,02%. La suspensión se sometió a tratamiento de sonicación consistente en 4 pulsos de 30 s con descansos de 15 s (ciclo 1, amplitud 50%). Un volumen de 1 ml del extracto se desnaturalizó por calor a 100 °C durante 10 min.

Por último, se realizaron pasos similares de adsorción frente a 10^{11} ufc mL⁻¹ de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET30c. La eficiencia de cada uno de los pasos de adsorción se determinó mediante la técnica ELISA. Los sueros adsorbidos se repartieron en viales y conservaron a -80 °C hasta su uso.

2.5. Análisis de la genoteca con sueros de *S. senegalensis* mediante dot blot

Para detectar los clones que expresan proteínas inmuno-reactivas se sometió la genoteca de expresión a inmunoensayo empleando la mezcla de sueros adsorbidos y sin adsorber procedentes de los ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes a la infección descrita anteriormente.

Los clones recombinantes del epígrafe 2.7. conservados en placas de 96 pocillos se sacaron del congelador -80 °C y sembraron en una nueva placa con caldo LB con 30 µg mL⁻¹ de kanamicina. Tras incubar la placa a 37 °C en agitación hasta alcanzar una D.O._{600 nm} = 0,8 se añadió a cada pocillo IPTG hasta una concentración 1mM (Life Technologies, España) para inducir la expresión de las proteínas recombinantes codificadas en cada clon. Se continuó con la incubación en agitación a 37 °C durante 4 h más y se colocaron alícuotas (5 µl) de cada pocillo en membranas de nitrocelulosa de

0,45 µm de diámetro de poro. Las células se lisaron mediante incubaciones sucesivas de las membranas depositadas sobre papel de 3 mm de grosor empapados en las soluciones desnaturizantes de acuerdo con el protocolo especificado en el manual de QIAGEN (2002):

Solución de SDS (10% (p/v) SDS)	10 min
Solución desnaturizante (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl)	5 min
Solución de neutralización (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-base; pH = 7,4)	5 min
Solución de neutralización	5 min
Solución SSC x20 (3 M NaCl; 0,3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	15 min

Una vez lisadas las células, se cubrieron las membranas con una solución de PBS-T (Tween 20 al 0,5% (v/v)) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche en agitación suave. Las membranas se sometieron a tres lavados con PBS-T a temperatura ambiente durante 5 min y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 h con PBS-T + BSA al 0,5% (p/v) y suero de lenguado adsorbido a o sin adsorber (dilución 1:5000). Las membranas se lavaron con PBS-T de nuevo como en el paso anterior y se inició el proceso de revelado. Para ello se añadió una solución de PBS-T + BSA al 0,5% (p/v) con anticuerpos desarrollados en conejo frente a IgM de lenguado (Sigma-Aldrich, España) (dilución 1:8000). Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 h, se lavaron las membranas tres veces durante 5 min con PBS-T en agitación a temperatura ambiente y se añadió una solución de PBS-T + BSA con anticuerpo secundario frente a conejo desarrollado en cabra y conjugado con peroxidasa (dilución 1:5000), incubándose a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Tras una nueva serie de lavados (x3) con PBS-T, se añadió la solución de revelado de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma Aldrich, España) y se mantuvo en oscuridad y sin agitación durante 10-15 min. La reacción se detuvo mediante tres lavados de la membrana con agua destilada. La membrana se dejó secar, se anotaron los clones recombinantes positivos que potencialmente contienen proteínas antigénicas y se procedió a su digitalización mediante un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad, España).

2.6. Extracción del vector recombinante y secuenciación

Para la purificación del vector recombinante se empleó la metodología descrita por Birnboim y Doly (1979) y modificada por Sambrook *et al.* (1989). Esta técnica se basa en la desnaturalización del ADN cromosómico mediante lisis alcalina, permitiendo recuperar exclusivamente el ADN plasmídico.

Para ello los clones positivos se cultivaron en caldo LB incubado a 37 °C hasta alcanzar fase logarítmica de crecimiento. Tras centrifugar el cultivo a 12.000 xg durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 100 µl de la solución I (25 mM Tris-base; 10 mM EDTA; 50 mM glucosa; pH = 8) para evitar la acción de las ADNasas y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 µl de la solución II (0,2 M NaOH; 35mM SDS) de SDS para provocar la lisis, se agitaron suavemente los viales y se volvió a incubar en hielo 5 min para posteriormente añadir 150 µl de la solución III (5 M CH₃COOK; 2 M CH₃COOH glacial) para neutralizar la alcalinidad, permitiendo al ADN plasmídico renaturalizarse. Los viales se incubaron de nuevo en hielo, 5 min y tras realizar centrifugación (12.000 xg, 10 min, 4°C), se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial. Este sobrenadante se sometió a tratamiento con proteinasa K (Life Technologies, España) (25 mg ml⁻¹, 37 °C, 10 min). Las proteínas se eliminaron mediante la adición de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Panreac AppliChem, España) en proporción 1:1, agitándose el vial durante 1 min hasta conseguir una emulsión blanquecina. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se recuperó en la fase fenólica tras una centrifugación a 12.000 xg durante 5 min. Finalmente, se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN y tras una incubación en hielo durante 10 min se eliminó el etanol mediante centrifugación (12.000 xg, 15 min). El sedimento se dejó secar al aire antes de ser disuelto en agua MilliQ. Las muestras se enviaron para la secuenciación de los insertos a la empresa MacroGen Europa. La localización celular de los productos secuenciados se predijo empleando el software SignalP3.0 y LipoP1.0.

2.7. Visualización de proteínas recombinantes en geles de acrilamida mediante SDS-PAGE – Western blot

Para la visualización de las proteínas recombinantes en geles de poli(acrilamida) con SDS se siguió la metodología descrita por Laemmli (1970). Las muestras de clones de *E. coli* BL21 (DE3) crecidos junto con el inductor IPTG se prepararon en tampón

Laemmli (SERVA Electrophoresis, Alemania) con β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, España) al 5% y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min.

La electroforesis se realizó con el sistema BioRad Mini Protean II System (BioRad, España) empleando geles discontinuos formados por un gel separador al 10% de acrilamida (7,4 ml agua destilada; 4,69 ml de solución 40% acrilamida/bisacrilamida 29:1; 4,69 ml de Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8; 187,5 μ l solución APS al 10%; 187,5 μ l solución SDS al 10%; 7,5 μ l TEMED) en la parte inferior y un gel concentrador al 4% de acrilamida (3,65 ml agua destilada; 0,625 ml solución 40% acrilamida/bisacrilamida 29:1; 0,625 ml de Tris-HCl 1 M, pH = 6,8; 50 μ l de solución APS al 10%; 50 μ l de solución SDS al 10%; 5 μ l TEMED) en la superior. Tras la polimerización, los geles se sumergieron en tampón de electroforesis (Tris-base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH = 8,3) y se cargaron 20 μ l de cada muestra en los pocillos con una jeringuilla. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V hasta que el frente alcanzó la parte inferior de los geles.

Tras la electroforesis, los geles se extrajeron de la cubeta, se depositaron sobre una placa de Petri y se tiñeron con una solución de fijación [azul de Coomassie G-250 0,2% (p/v); etanol 40% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v)] en agitación durante 60 min. Se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar el exceso de azul de Coomassie y se procedió a añadir solución de desteñido [etanol 30% (v/v); ácido acético glacial 8% (v/v)], siempre en agitación, hasta que las proteínas fueron visibles en el gel. El tamaño de las proteínas presentes se determinó comparando la migración de cada banda respecto al patrón de peso molecular *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Life Technologies, España). Los geles se digitalizaron mediante un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad, España). Las bandas seleccionadas se cortaron del gel y suspendieron en agua para su identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba.

Para la confirmación de la inmuno-reactividad de las proteínas seleccionadas se utilizó la técnica Western blot. Las proteínas se separaron mediante electroforesis como se ha detallado anteriormente y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro empleando la metodología descrita por Towbin *et al.* (1979). Para ello, tras incubar las membranas Whatman[®] 3MM (Sigma-Aldrich, España), el gel SDS-PAGE y la membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia [Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% (v/v)] en agitación durante 30 min, se realizó una

Material y Métodos

transferencia semi-seca consistente en un sándwich colocado en el siguiente orden: una primera capa de papel Whatman[®] 3MM (Sigma-Aldrich, España), un gel SDS-PAGE, una membrana de nitrocelulosa y una última capa de papel Whatman[®] 3MM. Tras cerrar el equipo de transferencia Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, España), se llevó a cabo la transferencia a 21 V durante 60 min. Posteriormente se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, España), durante 1 min para comprobar la correcta transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana. Las bandas marcadas en rojo se lavaron con agua destilada en agitación durante 5 min, volviendo a quedar incolora la membrana para el paso de la inmuno-detección.

Para la inmuno-detección se siguió la metodología descrita por McIntosh y Austin (1996) con modificaciones. En primer lugar, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana mediante incubación (temperatura ambiente, agitación suave, 1 h) con PBS suplementado con Tween 20 (0,5% v/v) y leche desnatada en polvo (3% p/v) (PBS-T-L). Las membranas se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron en agitación a 4 °C durante toda la noche en una solución de PBS-T-L junto con una mezcla de sueros de lenguados supervivientes a infección por *P. damselae* subsp. *piscicida* (dilución 1:500). Tras una nueva serie de lavados (x3) con PBS-T, se añadió una solución de PBS-T-L conteniendo anticuerpos frente a IgM de lenguado (dilución 1:5000) (Sigma-Aldrich, España), incubándose a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Las membranas se lavaron de nuevo (x3) con PBS-T y se añadió una solución de PBS-T-L conteniendo anticuerpo secundario frente a conejo desarrollado en cabra y conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, España) (1:8000), incubándose a temperatura ambiente en agitación durante 1 h. Finalmente, se lavaron las membranas (x3) con PBS-T y se procedió al revelado con la solución de TMB (Sigma Aldrich, España) durante 10-15 min en oscuridad y sin agitación. La reacción se detuvo realizando tres lavados de la membrana con agua destilada. La membrana se dejó secar, se anotaron las bandas de proteínas positivas y se procedió a su digitalización mediante un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad, España).

3. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE GENES DE *P. damsela* subsp. *piscicida*

3.1. Incubación de *P. damsela* subsp. *piscicida* en condiciones limitantes de hierro

El estudio del efecto del cultivo en condiciones diferentes de disponibilidad de hierro se realizó empleando la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41/01. Las condiciones limitantes de hierro se crearon mediante la adición a TSBs del quelante de hierro 2,2,-dipyridyl (Sigma-Aldrich, España) a una concentración de 100 μ M, mientras que para las condiciones de abundancia de hierro se añadió $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100 μ M) (Sigma-Aldrich, España) según protocolo de Díaz-Rosales *et al.* (2003; 2006). En todos los casos se incluyó un control en el que la bacteria se cultivó en medio TSBs. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Los cultivos se incubaron a 22 °C en agitación, tomándose una alícuota de 5 ml de cada vial cuando se alcanzó la mitad de la fase exponencial ($\text{D.O.}_{600 \text{ nm}} = 0,8 - 0,9$) y al alcanzar la fase estacionaria ($\text{D.O.}_{600 \text{ nm}} = 1,4 - 1,5$) en cada una de las condiciones ensayadas. Las alícuotas se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta su procesado. El protocolo para la purificación de ARNm y la obtención de ADNc se detalla en el punto 3.2. Se realizó cuantificación de la transcripción relativa de los genes que codifican para las proteínas Aip56, P53, HutD, HutB, PDP_0080, AhpC, Impdh, Sod, Irp1, Irp2, Shmt y AlaRS. Como gen de referencia se empleó ARNr 16S.

3.2. Incubación de *P. damsela* subsp. *piscicida* en condiciones de estrés oxidativo

Del mismo modo, se evaluó la respuesta a nivel transcripcional de genes seleccionados en las células de la cepa Lg41/01 sometidas a condiciones de estrés oxidativo inducidas por alta concentración de radicales superóxido y peroxinitrito. Para ello, se añadió metil viológeno (0,2 mM) (Sigma-Aldrich, España) a cultivos en mitad de la fase de crecimiento exponencial, obtenidos como se detalla en el apartado anterior, y se continuó la incubación durante 6 h antes de recoger las células. Por otro lado, la presencia de especies reactivas de nitrógeno se consiguió mediante la adición de peroxinitrito (Calbiochem®, Merck Millipore, Alemania) hasta una concentración final

Material y Métodos

de 100 μM al cultivo en condiciones similares a las descritas anteriormente y siguiendo las indicaciones de Barth *et al.* (2009) y McLean *et al.* (2010). Los cultivos se incubaron durante 2 h más desde la adición de peroxinitrito antes de recoger las células. Por último se incluyó un grupo control consistente en cultivo en medio TSBs al que no se le añadió ningún tipo de agente oxidante.

Todos los cultivos se incubaron a 22 °C en agitación, tomándose una alícuota de 5 ml de cada vial cuando finalizó el periodo de incubación. Las muestras se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta su procesado.

Igualmente, el protocolo empleado para la purificación de ARNm y la obtención de ADNc se detalla en el punto 3.2. Se realizó cuantificación de la transcripción relativa de los genes que codifican para las proteínas Aip56, P53, HutD, HutB, PDP_0080, AhpC, Impdh, Sod, Irp1, Irp2, Shmt y AlaRS. Como gen de referencia se empleó ARNr 16S.

3.3. Transcripción de genes de *P. damselae* subsp. *piscicida* durante la infección *ex vivo* de riñón cefálico de *S. senegalensis*

Se emplearon 5 especímenes de *S. senegalensis* con un peso de 130 ± 15 g suministrados por la Planta de Cultivos Marinos (CASEM, Universidad de Cádiz). Los peces se transfirieron a las instalaciones de la Universidad de Málaga donde se mantuvieron con un sistema de recirculación con agua de mar sometida a aireación durante 24 h para favorecer la aclimatación.

Los ejemplares se transfirieron a un nuevo tanque conteniendo 200 ppm de aceite de clavo para su sacrificio. En primer lugar se desangraron a los peces mediante punción caudal, para posteriormente abrir la cavidad peritoneal en condiciones asépticas para extraer el riñón cefálico, depositándose en medio Leibovitz L-15 (Gibco, EEUU) con un suplemento de heparina sódica (10 U ml^{-1}) y suero fetal bovino al 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, España). Se procedió al homogeneizado individual de cada uno de los riñones extraídos. La viabilidad de las células se determinó al microscopio mediante el test de exclusión de azul tripán (Sigma-Aldrich, España) (Díaz-Rosales *et al.*, 2006). Se ajustó la concentración de las suspensiones celulares a 10^7 céls ml^{-1} en medio L-15 sin antibióticos y se repartió en microtubos a razón de 100 μl .

Por otro lado, las células bacterianas se cultivaron en TSBs a 22 °C hasta mitad de fase exponencial, se centrifugaron a 5.500 xg durante 10 min y se suspendieron en PBS estéril a una concentración final de 10^9 ufc ml⁻¹. Las células de riñón se inocularon con la suspensión bacteriana a una ratio 1:10 célula:bacteria. Como control se utilizaron cultivos de la bacteria en medio L-15. Los viales se incubaron a 22 °C durante 0, 30, 60, 120 min y 6 h. Al final de cada tiempo se recogieron las células y se congelaron inmediatamente en viales a -80 °C hasta su procesado.

Igualmente, el protocolo empleado para la purificación de ARNm y la obtención de ADNc se detalla en el punto 3.2. Se realizó cuantificación de la transcripción relativa de los genes que codifican para las proteínas Aip56, P53, HutD, HutB, PDP_0080, AhpC, Impdh, Sod, Irp1, Irp2, Shmt y AlaRS. Como gen de referencia se empleó ARNr 16S.

3.4. Extracción de ARN y reverso-transcripción a ADNc

Para la extracción de ARN se empleó TRI Reagent (Sigma-Aldrich, España) y BCP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante todo el proceso de extracción de ARN se emplearon microtubos libres de ARNasa y ADNasa, además de agua tratada con DEPC libre de nucleasas. La integridad del ARN extraído se analizó mediante electroforesis cargando alícuotas de 1 µg en geles de agarosa. El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría comprobando que la relación de absorbancias $A_{260/280nm}$ oscilase entre 1,9 – 2,0.

Para eliminar los posibles restos de ADN bacteriano que pudieran quedar en las muestras de ARN se realizó un tratamiento con ADNasa I (Life Technologies, España) a 37 °C durante 30 min; posteriormente se añadió EDTA 50mM (Life Technologies, España) e incubó a 65 °C durante 10 min de acuerdo con el protocolo de la casa comercial. La reversotranscripción a ADNc se realizó utilizando el kit cDNA First Strand Synthesis (Life Technologies, España) a partir de 1 µg de ARN según las instrucciones del proveedor.

3.5. Cuantificación de la transcripción mediante qPCR

En todos los casos, el análisis de expresión génica se llevó a cabo empleando los cebadores descritos en la Tabla 5.

Material y Métodos

Tabla 5. Cebadores diseñados para la cuantificación relativa de la transcripción génica de *P. damselae* subsp. *piscicida*.

Gen	Código	Secuencia (5'→3')
Proteína inductora de apoptosis 56kD	<i>aip56</i>	GGTCGAAGCGATACAAGAGC (F) CCGTTGAAATCATCATCGTG (R)
Proteína 53kD	<i>p53</i>	GGATTTGGCTACCTCGTTCA (F) CCCACGGAGCATTAAACATT (R)
ATPasa del sistema de transporte ABC	<i>hutd</i>	TGAACCCACATCTGCTCTTG (F) GCGGTTGGGGTTAGTACTTG (R)
Proteína periplásmica de unión a la hemina	<i>hutb</i>	ACGGAGCATCGTTCTCAACT (F) TGGCATTGTTTTGATGGTTG (R)
Lipoproteína de adhesión	<i>pdp-0080</i>	TGCAGGCCAACATCTAACAG (F) TTAGCTCAGCAGGGAATGGT (R)
Alquil-hidroperóxido reductasa	<i>ahpc</i>	ATGGTGGTATTGGCCCTGTT (F) CATTGAGCTGGGCACACTTC (R)
Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	<i>impdh</i>	TGCTGATGGTGGTATCCGTT (F) GACATCGCACCAAGAGAACC (R)
Superóxido dismutasa	<i>sod</i>	AGACGCACTAGAACCACACA (F) GGGCTTAGACAGTGCCAGTA (R)
Proteína reguladora de hierro 1	<i>irp1</i>	GCTACAGAGGCCGCTATTTG (F) CTTCATCTTGCCAGTAGCCA (R)
Proteína reguladora de hierro 2	<i>irp2</i>	AGGCAGCATTTTCAGCAGATT (F) CGTTGTTCTCGGTCGGTATT (R)
Serina hidroximetil transferasa	<i>shmt</i>	CGGAACTTTATGCAGCCATT (F) CAATGGCAAGTTGTTCTGCT (R)
Alanina-ARNt sintetasa	<i>alars</i>	GTGTTAAGCATGGGCGATTT (F) CCTTGTTACCACAGAAGCA (R)
Componente 16S del ARN ribosómico	<i>ARNr 16s</i>	AACTGGCAGGCTAGAGTCTT (F) CACAACTCCAAGTAGACAT (R)

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch™ (BioRad, España) con el módulo óptico CFX96™ (BioRad, España) para realizar las mediciones de fluorescencia. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos en un volumen de 10 µl. La mezcla contenía 5 µl de Sso Advanced SYBR Green Supermix (BioRad, España), 0,5 µl de cada cebador (10 µM), 1 µl de ADNc y 3 µl de agua tratada con DEPC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 60 s a 95 °C para la activación de la polimerasa y desnaturalización del ADNc, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 40 s a 55 °C y 60 s a 72 °C. Al final de cada ciclo se realizó una medición de fluorescencia de la placa. Para confirmar especificidad en la amplificación del producto de PCR de interés, al término de los 40 ciclos, se realizó el análisis de la curva de fusión partiendo de una temperatura inicial de 65 °C con un incremento de 0,5 °C por cada ciclo de 5 s hasta llegar a una temperatura final de 95 °C.

La especificidad de los cebadores diseñados se comprobó tanto con el análisis de las curvas de fusión a través del programa iCycler iQ v3.0 de BioRad, como por la

visualización de los productos de PCR amplificados en geles de agarosa al 0,7%. El cálculo de la eficiencia de amplificación se realizó según se detalla en el epígrafe 1.4. del presente trabajo (Pfaffl, 2001). Los valores de las eficiencias obtenidas entraban en el rango de acuerdo con las indicaciones de la polimerasa empleada: 90 – 105%.

3.6. Tratamiento de los datos mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Los datos obtenidos tras las reacciones de qPCR se analizaron empleando la fórmula matemática: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak y Schmittgen, 2001), como se detalla en el apartado 1.5 de la presente memoria.

3.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software SPSS Statistics versión 17 (SPSS Inc, IBM, Nueva York, Estados Unidos). Los valores de transcripción relativa de los genes estudiados se presentan como promedio del incremento relativo \pm error estándar. La normalidad y homocedasticidad de los datos fue analizada mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, y en caso de no cumplirse se llevó cabo una transformación logarítmica. Las posibles diferencias significativas entre los valores de qPCR obtenidos en los grupos tratados respecto a sus controles se determinaron mediante el test t de Student, mientras que las posibles diferencias entre los tratamientos se analizaron mediante ANOVA empleando el test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas asumiendo $p < 0,05$.



RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE *S. senegalensis* A LA INFECCIÓN Y VACUNACIÓN FRENTE A *P. damsela* subsp. *piscicida*

1.1. Infección de ejemplares juveniles de *S. senegalensis* con *P. damsela* subsp. *piscicida*

Tanto el análisis bacteriológico como la PCR con cebadores específicos indicaron la ausencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* en riñón e hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* antes de la infección experimental. Por el contrario, tras las infecciones por vía IP (10^4 ufc/g) e IM (10^7 ufc/ml) se detectó la presencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* en hígado y riñón 24 y 72 h post-infección. Se observó mortalidad únicamente en los individuos sometidos a la infección por ruta IP a partir del 4º día de la infección, alcanzando el valor máximo (35%) en el 6º día post-infección (Figura 6). Posteriormente, no se detectaron mortalidades hasta el final del experimento (30 días). Los peces muertos durante el ensayo fueron analizados y se confirmó la presencia del patógeno mediante técnicas bacteriológicas y PCR, mientras que en los peces control no se detectó *P. damsela* subsp. *piscicida* en ningún caso. Por otro lado, si bien no se observó mortalidad en el grupo infectado vía IM, se detectó la presencia del patógeno en riñón e hígado a las 24 y 72h post-infección mediante PCR. No se obtuvieron resultados positivos para la presencia de la bacteria a los 30 d post-infección en los peces infectados por ninguna de las rutas ensayadas.

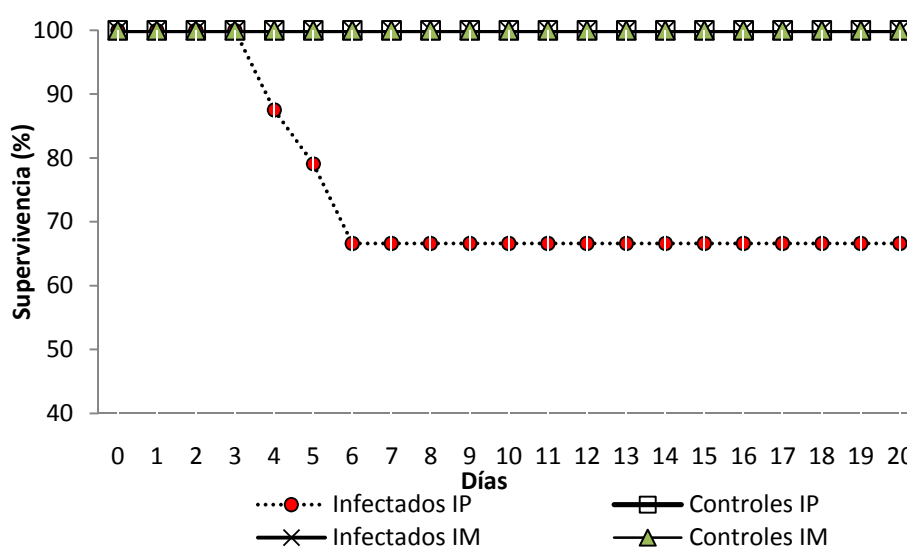


Figura 6. Supervivencia de ejemplares de *S. senegalensis* tras ser sometidos a infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM). Total de peces por grupo: 20 (100%).

Resultados

1.1.1. Detección de anticuerpos específicos mediante ELISA

La presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* se detectó mediante ELISA en el suero de los peces supervivientes tras 30 d de la infección por ambas rutas, indicando la activación de la respuesta inmune humoral tras la infección tanto por vía IP como IM. Si bien los valores observados fueron significativamente superiores en los peces infectados en comparación con el grupo control, los lenguados infectados IP presentaron niveles más elevados de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* que los infectados por inmersión (Figura 7).

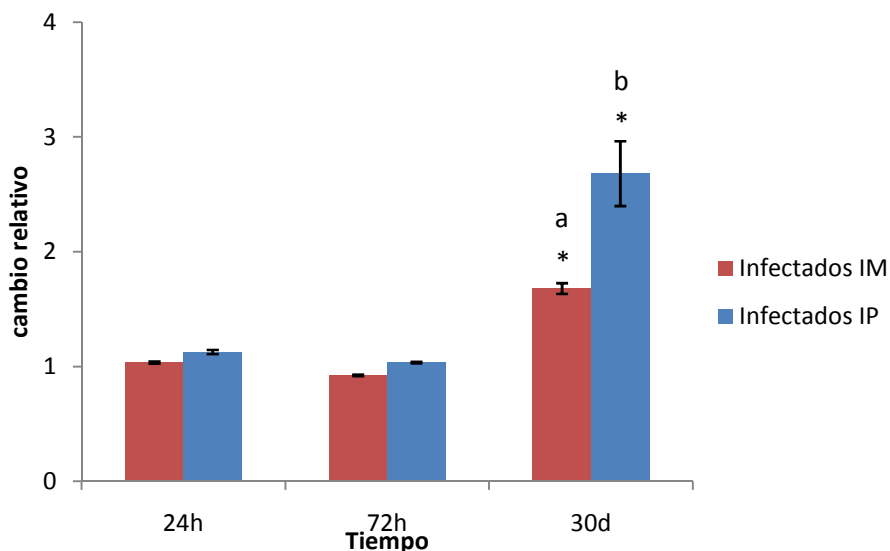


Figura 7. Niveles de anticuerpos específicos en sueros de ejemplares de *S. senegalensis* tras 24 h, 72 h y 30 d de la infección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. La infección se realizó por inmersión durante 50 min en agua marina conteniendo el patógeno (10^7 ufc/ml) (Infectados IM) e inyección de una dosis de 10^4 ufc/g de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Infectados IP). Los valores de absorbancia (492nm) se han relativizado a los respectivos controles (animales sometidos al mismo tratamiento pero en ausencia del patógeno). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con la prueba t de Student, entre los grupos control e infectados en el mismo tiempo de muestreo. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas ($p < 0,05$).

1.1.2. Transcripción génica

Para todos los genes analizados tanto en hígado como riñón cefálico de *S. senegalensis* se detectó la presencia de transcritos. Además, los peces infectados mostraron cambios significativos en la transcripción relativa de todos los genes estudiados excepto HSP70 y HSP90AA, cuyos niveles de transcripción relativa en los peces infectados fueron similares a los de sus respectivos controles.

Los genes que codifican para los componentes C3 y C7 del complemento incrementaron su transcripción relativa en el hígado de todos los peces infectados a las 24 h del inicio de la infección independientemente de la ruta de la misma (Figura 8). Sin embargo tras 72 h de la infección, este incremento se observó únicamente en riñón cefálico, decreciendo en el hígado de los ejemplares infectados. Treinta días tras la infección, los niveles de transcripción relativa de C3 y C7 fueron ligeramente superiores en los lenguados infectados vía IP. La infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* indujo la transcripción de LYS-G en hígado de lenguados infectados vía IP, con un máximo de transcripción relativa a las 72 h post-infección (Figura 8). Por el contrario, cuando la ruta empleada fue IM se observó una respuesta temprana en la transcripción relativa en hígado seguida por una leve disminución en la transcripción. En riñón cefálico, la transcripción de LYS-G sólo aumentó ligeramente a las 72 h post-infección.

Los genes de la familia TNF (TNF α y TRAF-3) mostraron un aumento en su transcripción relativa en el hígado de todos los individuos infectados a las 24 h post-infección (Figura 9). En el caso de TNF α , el incremento se observó también en el riñón de los animales infectados; esta inducción en TRAF-3, aunque menor, se observó de nuevo a los 30 d post-infección. En relación al gen que codifica para la proteína receptora de células citotóxicas no específicas, NCCRP-1, los peces infectados IP presentaron aumentos en la transcripción relativa de NCCRP-1 tanto en hígado como en riñón, a las 24 y 72 h de la infección. Esta inducción se mantuvo, si bien con valores muy inferiores y sólo en el hígado, tras 30 d de la infección. Por el contrario, la infección IM resultó en incrementos en la transcripción relativa de NCCRP-1 muy inferiores, sólo en riñón y tras 72 h y 30 d (Figura 9).

La transcripción de genes relacionados con proteínas de fase aguda implicadas en la biodisponibilidad de hierro fue diferente según el gen y la ruta de infección (Figura 10). La transcripción del gen que codifica para HAMP-1 aumentó tanto en los peces infectados por vía IP como por IM; sin embargo, en estos últimos, el cambio relativo fue mayor que en el grupo IP (Figura 10). Se observó una represión en la transcripción relativa del gen que codifica para TF 24 h y 72 h post-infección en ejemplares infectados vía IP e IM, respectivamente; mientras que se detectó aumento de la transcripción relativa a los 30 d post-infección (Figura 10). En cuanto a la transcripción relativa del gen que codifica HP-1, se observaron incrementos significativos en todos los peces infectados 24 h post-infección; sin embargo, 72 h post-

Resultados

infección la transcripción en el hígado disminuyó en ambos tipos de infección, manteniéndose niveles elevados de transcripción relativa sólo en el riñón de los animales infectados (Figura 10). Por último, la transcripción relativa del gen que codifica para FERR-M presentó un importante incremento en el riñón de los peces infectados IP 72 h post-infección (Figura 10).

El gen que codifica la proteína de choque térmico HSP90AA no modificó sus niveles de transcripción en los órganos analizados de *S. senegalensis* tras infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*; mientras que HSP70 sólo aumentó ligeramente su transcripción en el riñón cefálico 72 h post-infección IP (Figura 11). En el caso de HSP90AB se observaron variaciones en su transcripción relativa en las células del riñón, aumentando en las etapas iniciales de la infección, especialmente 72 h post-infección, y decreciendo a los 30 d (Figura 11). Por último, se detectaron incrementos en la transcripción del gen que codifica para GP96 en todos los peces infectados, alcanzándose los valores más elevados en los peces infectados IP a las 72 h de la infección (Figura 11).

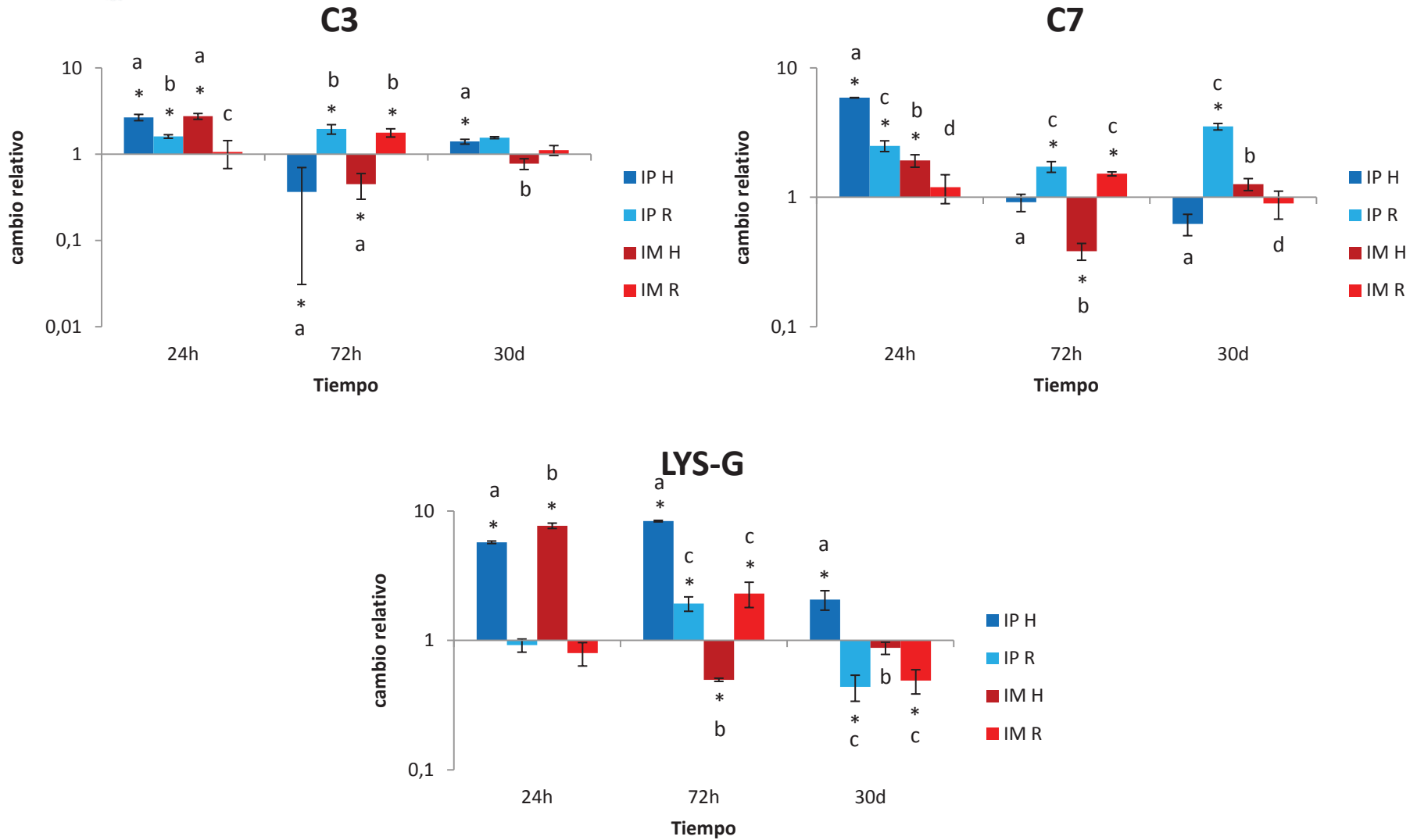


Figura 8. Transcripción relativas de genes que codifican para los componentes C3 y C7 del sistema del complemento y lisozima G en hígado (H) y riñón anterior (R) de ejemplares de *S. senegalensis* 24 h, 72 h y 30 d post-infección con *P. damselae* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM). Los valores se han normalizado con los genes ACTB2 y RPS4 y relativizado a los del grupo control. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con peces no infectados. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo órgano y tiempo respecto al control. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de tres individuos y sus tres réplicas técnicas.

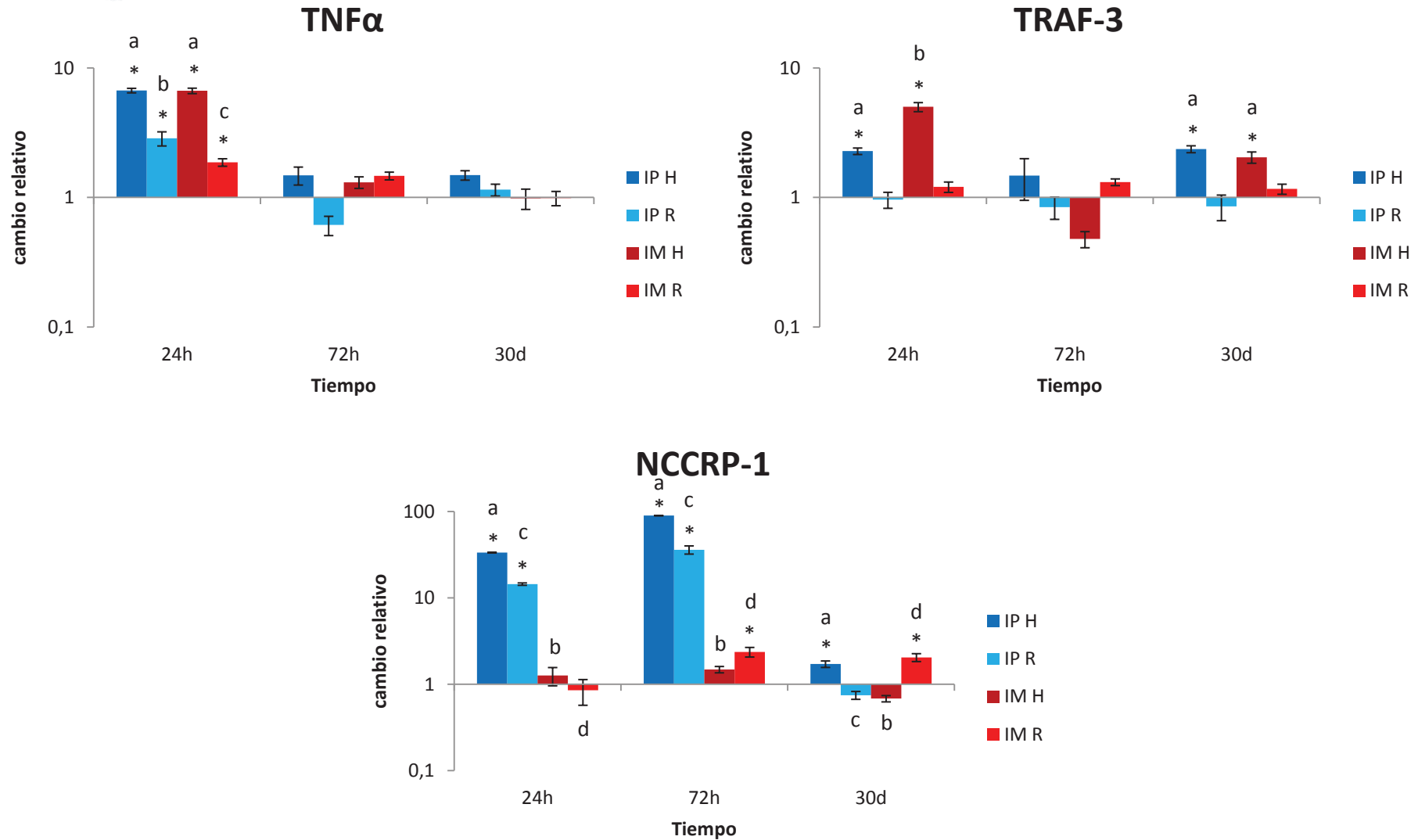


Figura 9. Transcripción relativa de los genes que codifican para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), receptor 3 asociado al TNF (TRAF-3) y receptor de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1) en hígado (H) y riñón anterior (R) de ejemplares de *S. senegalensis* tras 24 h, 72 h y 30 d de infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM). Los valores se han normalizado con los genes ACTB2 y RPS4 y relativizado a los del grupo control. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con peces no infectados. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo órgano y tiempo comparado a su respectivo control. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de tres individuos y sus tres réplicas técnicas.

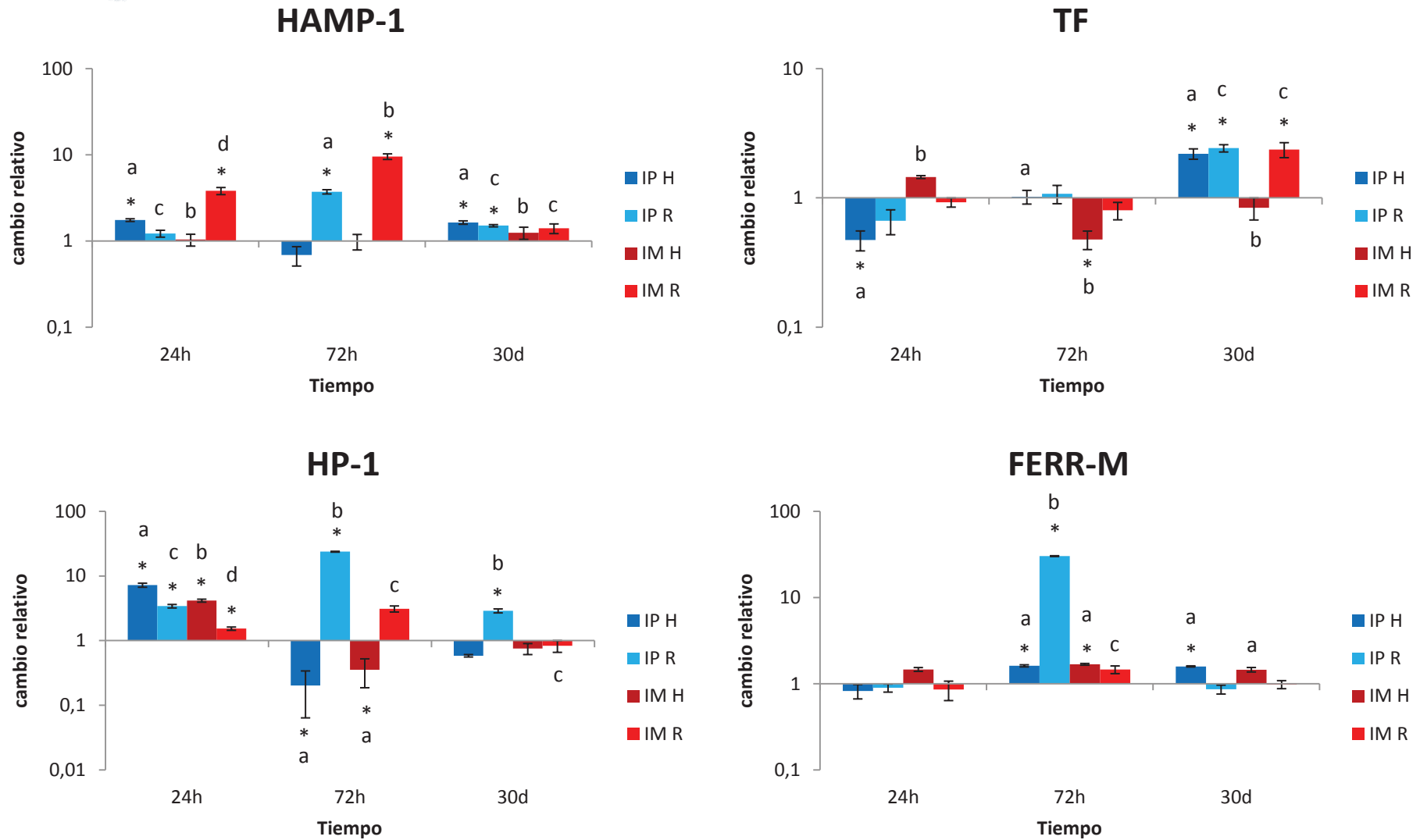


Figura 10. Transcripción relativa de los genes que codifican proteínas implicadas en la biodisponibilidad de hierro en hígado (H) y riñón anterior (R) de ejemplares de *S. senegalensis* tras 24 h, 72 h y 30 d post-infección con *P. damselae* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM). Los valores se han normalizado con los genes ACTB2 y RPS4 y relativizado a los del grupo control. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con peces no infectados. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo órgano y tiempo comparado a su respectivo control. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de tres individuos y sus tres réplicas técnicas.

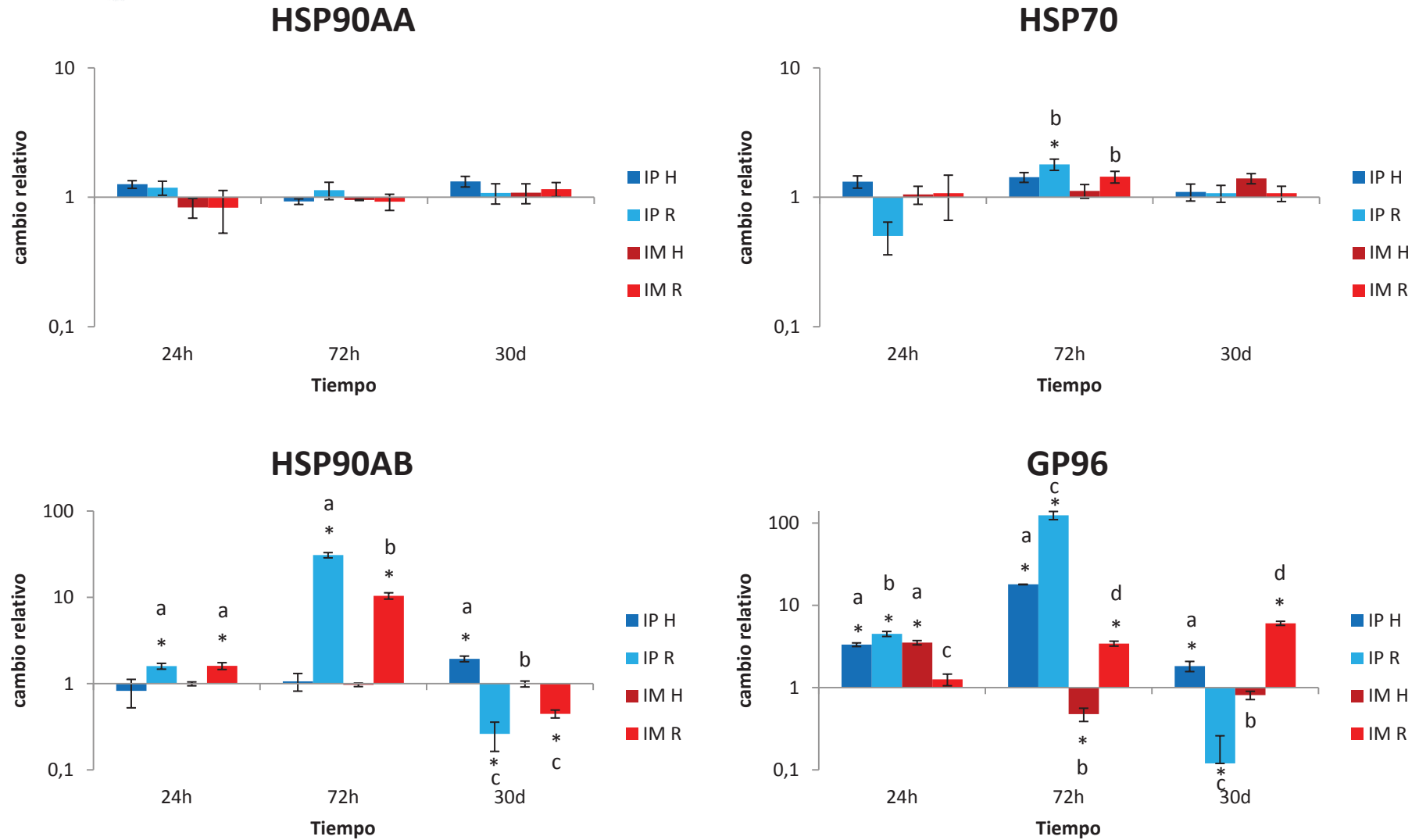


Figura 11. Transcripción relativa de los genes que codifican proteínas de choque térmico en hígado (H) y riñón anterior (R) de ejemplares de *S. senegalensis* tras 24 h, 72 h y 30 d post-infección con *P. damselae* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM). Los valores se han normalizado con los genes ACTB2 y RPS4 y relativizado a los del grupo control. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con peces no infectados. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo órgano y tiempo comparado a su respectivo control. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas. Los resultados se presentan como la media±error estándar de tres individuos y sus tres réplicas técnicas.

1.2. Vacunación de ejemplares de *S. senegalensis* frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*

Tanto el análisis bacteriológico como la PCR con cebadores específicos indicaron la ausencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* en riñón e hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* antes de la vacunación. Asimismo, se pudo descartar la presencia de anticuerpos específicos frente al patógeno en estudio mediante ELISA en el suero de los animales empleados.

1.2.1. Detección de anticuerpos específicos mediante ELISA

Transcurridos 90 d del inicio del ensayo de vacunación, y tras haber recibido los ejemplares de *S. senegalensis* una dosis inicial y una revacunación a los 30d, se determinó mediante ELISA la presencia de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en el suero de los peces vacunados por ambas rutas de inmunización (Figura 12). Si bien se encontraron incrementos significativos en los niveles de anticuerpos de los animales vacunados por ambas rutas, los valores más elevados se observaron en los lenguados vacunados IP. Estos valores fueron superiores al doble de los presentes en el grupo control en los peces vacunados IP y a 15 d tras la vacunación. Por el contrario, en los peces vacunados IM fue necesaria una revacunación para lograr doblar los valores de absorbancia detectados en los ejemplares del grupo control.

Resultados

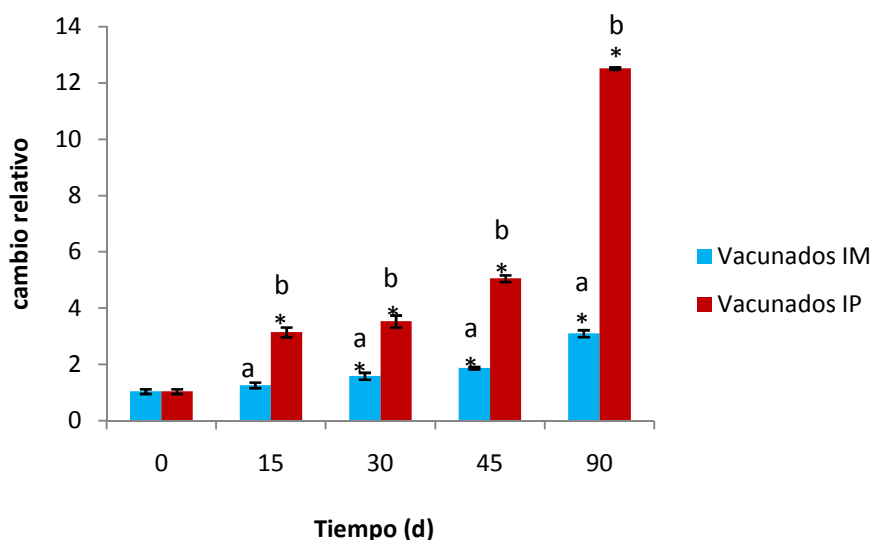


Figura 12. Niveles de anticuerpos específicos en sueros procedentes de ejemplares de *S. senegalensis* sometidos a vacunación por inmersión (IM) e inoculación intraperitoneal (IP). Las vacunaciones se realizaron a tiempo 0 y a tiempo 30 días (flechas). Se representan los valores de absorbancia (492nm) relativizados a sus respectivos controles. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con la prueba t de Student, entre el grupo vacunado y su respectivo control en el mismo tiempo de muestreo. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de infección ensayadas ($p < 0,05$).

1.2.2. Transcripción génica tras 90 días de la vacunación

En la Tabla 6 se presentan los datos de transcripción relativa de los genes estudiados en riñón cefálico e hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* tras 90 días de vacunación IP e IM y antes de ser infectados con *P. damselae* subsp. *piscicida*. El número de genes que presentaron un incremento en la transcripción génica fue mayor en el caso del riñón, mientras que los genes que mostraron represión fueron más numerosos en el hígado, independientemente de la ruta de administración de la vacuna. Sin embargo, se observaron diferencias significativas dependientes de la ruta de administración. Este fue el caso de la transcripción de genes tales como C1q, TNF α , HP-1, HSP70 y especialmente C7, C9, LYS-C1 y TF, que aumentó en los peces inmunizados IP, mientras que en los lenguados del grupo IM no se apreciaron cambios significativos en la transcripción de estos genes. Además, los genes que codifican para los componentes C3 y C4 mostraron aumentos en la transcripción relativa en ambos tipos de vacunación, si bien los incrementos fueron superiores en los peces vacunados por vía IP.

Tabla 6. Transcripción génica relativa tras 90 días de vacunación frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en riñón cefálico e hígado de ejemplares de *S. senegalensis*. Se vacunaron por vía intraperitoneal (IP) e inmersión (IM) según se detalla en Material y Métodos. Valores por encima de 1 (en negrita) indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 (en cursiva) indican reducción significativa comparados con peces no vacunados. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de vacunación ensayadas ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de cinco peces.

Gen	Riñón cefálico		Hígado	
	Vacunados IP	Vacunados IM	Vacunados IP	Vacunados IM
IL-1 β	1,06 \pm 0,28 (a)	0,45 \pm 0,01 (b)	0,94 \pm 0,13	0,97 \pm 0,11
IL-6	1,18 \pm 0,25	1,47 \pm 0,04	0,32 \pm 0,07 (a)	0,43 \pm 0,10 (a)
IL-8	1,25 \pm 0,21	0,71 \pm 0,07	0,27 \pm 0,07 (a)	0,55 \pm 0,12 (b)
TNF α	2,11\pm0,21 (a)	1,29 \pm 0,19 (b)	1,27 \pm 0,14	0,97 \pm 0,10
C1q	5,70\pm0,42 (a)	0,57 \pm 0,10 (b)	1,27 \pm 0,20	1,39 \pm 0,21
C3	3,16\pm0,38 (a)	2,48\pm0,42 (b)	1,39 \pm 0,16	0,77 \pm 0,12
C4	5,15\pm0,86 (a)	3,42\pm0,48 (b)	1,09 \pm 0,14 (c)	1,62\pm0,12 (d)
C7	19,28\pm3,78 (a)	1,38 \pm 0,13 (b)	0,78 \pm 0,21 (c)	2,14\pm0,29 (d)
C9	14,91\pm1,94 (a)	1,27 \pm 0,22 (b)	1,43 \pm 0,11	0,89 \pm 0,15
LYS-C1	19,36\pm3,44 (a)	1,28 \pm 0,23(b)	0,60 \pm 0,11	1,36 \pm 0,17
LYS-G	1,01 \pm 0,19	1,20 \pm 0,25	0,83 \pm 0,16	0,73 \pm 0,18
PGLYRP1	1,18 \pm 0,16	1,25 \pm 0,17	1,49 \pm 0,21	0,70 \pm 0,21
CD4	1,01 \pm 0,08	0,81 \pm 0,16	0,60 \pm 0,11	1,41 \pm 0,23
CD8 α	0,76 \pm 0,27	0,60 \pm 0,07	0,66 \pm 0,13	0,70 \pm 0,10
MHC 1B	0,80 \pm 0,13	1,25 \pm 0,31	0,62 \pm 0,14 (a)	0,40 \pm 0,08 (b)
CASP1	0,83 \pm 0,09	0,99 \pm 0,11	0,28 \pm 0,15 (a)	0,81 \pm 0,12 (b)
CASP8	0,97 \pm 0,10	1,32 \pm 0,24	0,21 \pm 0,08 (a)	0,30 \pm 0,09 (a)
CASP9	1,11 \pm 0,18	1,36 \pm 0,21	0,44 \pm 0,11 (a)	0,34 \pm 0,06 (a)
TRAF-3	1,42 \pm 0,13	1,48 \pm 0,05	1,17 \pm 0,19	1,35 \pm 0,20
NCCRP-1	0,60 \pm 0,13	1,46 \pm 0,13	0,41 \pm 0,11 (a)	0,83 \pm 0,09 (b)
HAMP-1	1,52\pm0,08 (a)	1,84\pm0,32 (a)	0,85 \pm 0,10	1,01 \pm 0,11
TF	19,30\pm3,19 (a)	0,90 \pm 0,11 (b)	1,53\pm0,11 (c)	1,56\pm0,12 (c)
HP-1	1,99\pm0,23 (a)	0,70 \pm 0,05 (b)	0,76 \pm 0,16	1,11 \pm 0,12
GP96	1,25 \pm 0,11	1,21 \pm 0,12	0,90 \pm 0,12	0,71 \pm 0,10
HSP90AA	1,12 \pm 0,13	0,90 \pm 0,21	0,79 \pm 0,19	1,34 \pm 0,21
HSP90AB	0,85 \pm 0,10	0,83 \pm 0,17	0,88 \pm 0,078	0,81 \pm 0,08
HSP70	1,83\pm0,19 (a)	0,51 \pm 0,21 (b)	0,38 \pm 0,06 (c)	0,99 \pm 0,20 (d)

Resultados

1.2.3. Infección experimental

Los grupos de ejemplares de lenguado senegalés que no recibieron la vacuna frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* (control y control AIF) así como el grupo vacunado por vía IM mostraron una mortalidad de entre el 75% y 76,9% para los grupos control, y del 50% en el caso del vacunado, tras la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por el contrario, no se observó mortalidad entre los individuos vacunados vía IP. La mortalidad se inició a partir del tercer día post infección tanto en los grupos sin vacunar como vacunado por vía IM, aumentando hasta el séptimo día post inoculación. El análisis de la supervivencia mediante el test de Kaplan-Meier mostró ($p < 0,05$) que la supervivencia de los peces del grupo vacunado IP fue estadísticamente diferente a la del grupo vacunado IM o sin vacunar (Figura 13). Los RPS obtenidos tras las vacunaciones por vía IP e IM fueron del 100% y 35%, respectivamente. Los peces muertos se analizaron y se confirmó la presencia del patógeno tanto por medio del análisis por PCR como con cultivo en medios bacteriológicos.

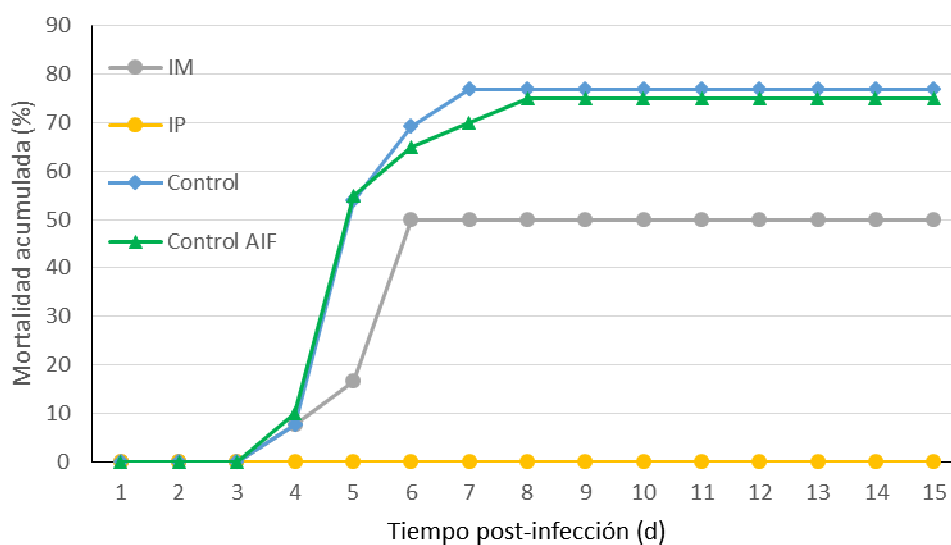


Figura 13. Porcentaje de mortalidad acumulada en los grupos vacunados y control durante la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Peces sin vacunar (Control), inoculados intraperitonealmente con adyuvante incompleto de Freund (Control AIF); sometidos a vacunación por inmersión (IM); vacunación intraperitoneal (IP).

Transcurridos 15d desde el inicio de la infección se estudió la expresión génica de los supervivientes de los grupos vacunados IP e IM que mostraron respuesta protectora, así como de los controles tratados únicamente con PBS.

1.2.4. Expresión génica tras la infección

Se detectó la presencia de transcritos para todos los genes estudiados tanto en hígado como riñón cefálico de *S. senegalensis*, los cuales vienen reflejados en la Tabla 7. Se observaron cambios en la transcripción relativa en todos los genes estudiados excepto para HSP90AA, TRAF-3 y CD4, los cuales mostraron unos niveles de transcripción similar en los peces sometidos a vacunación y posterior infección comparados con los peces control.

Se observó un aumento en la transcripción relativa en genes de citoquinas relacionados con la respuesta inflamatoria (IL-1 β , IL-6 y TNF α) y quimiotaxis (IL-8b) en el hígado de los ejemplares infectados no vacunados y en el de los infectados vacunados vía IM. En células de riñón cefálico, los genes IL-6, IL-8b presentaron un aumento en la transcripción relativa en los tres grupos estudiados, mientras que TNF α solo mostró dicho aumento en los individuos de los grupos infectados no vacunados e infectados vacunados vía IM. Todos los genes mostraron una dinámica similar, mostrando los valores de transcripción más elevados aquellos peces infectados no vacunados, mientras que los menores niveles los mostraron los peces del grupo infectado vacunado vía IP.

En relación a la transcripción de genes relacionados con los componentes del complemento estudiados (C1q, C3, C4, C7 y C9), se apreciaron aumentos en riñón cefálico de los peces no vacunados y vacunados IP, mientras que en los ejemplares vacunados IM solo se apreció sobreexpresión en el caso de los genes C4 y C7. En cuanto al hígado, únicamente los individuos no vacunados mostraron un aumento en la transcripción génica relativa de todos los componentes del sistema del complemento estudiados excepto para C4, pero en general estos incrementos fueron inferiores que los observados en riñón anterior.

Por otra parte, se observaron cambios significativos en los genes de lisozimas (LYS-C1 y LYS-G) en riñón anterior de los peces no vacunados y vacunados por vía IP, mientras que los ejemplares del grupo IM únicamente mostraron sobreexpresión en el caso de la LYS-G. El aumento de expresión relativa fue especialmente alto para LYS-G, en particular para los ejemplares no vacunados, seguidos de los vacunados por vía IM. El gen PGLYRP1 mostró incrementos significativos en sus niveles de transcripción a nivel renal en los tres grupos analizados, siendo mayores los de los ejemplares no

Resultados

vacunados, seguidos de los grupos IM e IP. En cambio, en hígado de los peces no vacunados y vacunados IP se apreció una represión en la transcripción relativa.

En relación con la transcripción de genes relacionados con la respuesta citotóxica mediada por células, el gen que codifica para MHC de tipo I mostró sobreexpresión en el riñón anterior en todos los peces y en hígado de los ejemplares vacunados IP, mientras que se apreció represión génica en el hígado de los individuos no vacunados. En cuanto al gen que codifica para receptores de proteínas de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1), se observaron incrementos tanto en hígado como en riñón cefálico de los peces no vacunados y vacunados IM, en especial en el hígado de los ejemplares del primer grupo. Por su parte, el gen del receptor CD8 α presentó aumentos en la transcripción relativa a nivel hepático en los peces no vacunados y vacunados por vía IM. La transcripción relativa del gen de la caspasa-8 aumentó en riñón anterior y en hígado de los peces de todos los grupos estudiados. Por otra parte, caspasa-9 incrementó su expresión en el hígado de todos los ejemplares analizados, mientras que se observó un ligero incremento en la transcripción en riñón anterior de los peces no vacunados.

En cuanto al análisis de los genes relacionados con proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, se observaron aumentos en la transcripción relativa de hepcidina (HAMP-1), transferrina (TF) y haptoglobina (HP-1) en riñón cefálico de los peces no vacunados y vacunados por vía IP, mientras que en los ejemplares vacunados por la vía IM solo se observaron incrementos en el gen HAMP-1. Respecto al hígado, se observaron incrementos en la transcripción en los peces no vacunados de HAMP-1 y HP-1, y represiones en el caso de TF, mientras que en los peces vacunados IP se observaron aumentos en HAMP-1, y disminuciones de TF en el caso de los vacunados IM.

En el hígado de los ejemplares no vacunados se detectaron ligeros incrementos en la transcripción relativa de los genes GP96 y HSP70, y únicamente en HSP70 en los vacunados IM. Por otra parte, en el riñón cefálico de todos los peces ensayados se observaron incrementos en la transcripción del gen HSP90AB, mientras que en HSP70 se observó un ligero incremento en los peces no vacunados y vacunados vía IP.

Tabla 7. Transcripción génica relativa en riñón cefálico e hígado de ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes (15 d) a una infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los ejemplares sin vacunar (No vacunados), vacunados mediante inmersión (IM) y vacunados por vía intraperitoneal (IP) se inocularon intraperitonealmente con el patógeno. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción (significativos en negrita), mientras que por debajo de 1 indican represión (significativos en cursiva) comparados con peces no infectados ni vacunados. Las distintas letras indican diferencias significativas entre las rutas de vacunación ensayadas para un mismo órgano. Los números indican diferencias significativas entre los órganos analizados para la misma ruta de vacunación ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de cinco peces.

Gen	Riñón cefálico			Hígado		
	Vacunados IP	Vacunados IM	No Vacunados	Vacunados IP	Vacunados IM	No Vacunados
IL-1 β	0,69 \pm 0,09	0,95 \pm 0,19 (1)	1,05 \pm 0,13	0,62 \pm 0,09 (a)	2,25\pm0,31 (b)(2)	3,65\pm0,25 (c)
IL-6	3,85\pm0,37 (a)(1)	4,20\pm0,30 (b)(3)	8,18\pm1,95 (c)(5)	1,66\pm0,21 (α)(2)	6,68\pm2,11 (β)(4)	14,58\pm3,18 (γ)(6)
IL-8	2,18\pm0,11 (a)(1)	1,88\pm0,11 (b)(3)	10,36\pm1,43 (c)(5)	4,35\pm0,65 (α)(2)	4,80\pm0,25 (α)(4)	14,57\pm1,79 (β)(6)
TNF α	0,70 \pm 0,08 (a)	1,78\pm0,13 (b)	2,71\pm0,19 (c)	0,74 \pm 0,09 (α)	1,58\pm0,18 (β)	2,27\pm0,36 (γ)
C1q	3,15\pm0,12 (a)(1)	0,82 \pm 0,17 (b)(3)	2,94\pm0,19 (a)(5)	1,10 \pm 0,11 (α)(2)	1,73\pm0,21 (β)(4)	1,84\pm0,19 (β)(6)
C3	5,07\pm0,39 (a)(1)	1,39 \pm 0,15 (b)	1,91\pm0,20 (c)(3)	1,32 \pm 0,19 (α)(2)	1,12 \pm 0,22 (α)	2,09\pm0,19 (β)(3)
C4	5,68\pm1,01 (a)(1)	3,57\pm0,41 (b)(3)	5,77\pm0,49 (a)(5)	0,87 \pm 0,08 (2)	0,99 \pm 0,19 (4)	1,32 \pm 0,12 (6)
C7	1,69\pm0,18 (a)(1)	1,66\pm0,12 (a)(3)	2,14\pm0,30 (b)(5)	0,93 \pm 0,11 (α)(2)	0,70 \pm 0,07 (α)(4)	1,98\pm0,17 (β)(5)
C9	5,27\pm0,62 (a)(1)	0,98 \pm 0,11 (b)	5,30\pm0,73 (a)(3)	1,21 \pm 0,19 (α)(2)	1,12 \pm 0,18 (α)	1,85\pm0,25 (β)(4)
LYS-C1	3,11\pm0,19 (a)(1)	0,66 \pm 0,08 (b)	1,81\pm0,22 (c)(3)	0,72 \pm 0,07 (2)	0,83 \pm 0,12	0,97 \pm 0,18 (4)
LYS-G	29,82\pm4,88 (a)(1)	50,63\pm5,19 (b)(3)	62,05\pm6,82 (b)(5)	0,87 \pm 0,09 (2)	1,00 \pm 0,18 (4)	1,43 \pm 1,21 (6)
PGLYRP1	2,41\pm0,19 (a)(1)	4,37\pm1,26 (b)(3)	6,00\pm0,59 (c)(5)	<i>0,32\pm0,06</i> (α)(2)	0,95 \pm 0,15 (β)(4)	<i>0,36\pm0,08</i> (α)(6)

Continúa en la siguiente página

Resultados

Gen	Riñón cefálico			Hígado		
	Vacunados IP	Vacunados IM	No Vacunados	Vacunados IP	Vacunados IM	No Vacunados
CD4	0,86±0,16	0,90±0,14	0,80±0,11	1,15±0,19	1,15±0,20	0,98±0,17
CD8α	0,76±0,14	0,66±0,10 (1)	0,63±0,11 (3)	1,42±0,14 (α)	3,15±0,31 (β)(2)	2,22±0,27 (γ)(4)
MHC 1B	1,66±0,19 (a)(1)	2,26±0,14 (b)(3)	2,87±0,28 (c)(5)	4,43±0,52 (α)(2)	0,89±0,12 (β)(4)	0,34±0,07 (γ)(6)
CASP1	1,01±0,13 (1)	0,87±0,15 (3)	1,21±0,14 (5)	1,82±0,27 (α)(2)	2,02±0,26 (α)(4)	19,32±2,88 (β)(6)
CASP8	3,90±0,21 (a)(1)	5,55±0,25 (b)(3)	4,95±0,40 (b)(5)	6,22±0,95 (α)(2)	3,24±0,73 (β)(4)	6,95±0,87 (α)(6)
CASP9	1,00±0,15 (a)(1)	1,21±0,14 (a)(3)	1,56±0,19 (b)(5)	1,91±0,11 (α)(2)	2,39±0,72 (α)(4)	4,04±0,34 (β)(6)
TRAF-3	0,92±0,29	1,02±0,09	1,20±0,21	0,56±0,11	0,87±0,21	1,26±0,11
NCCRP-1	1,01±0,12 (a)	1,62±0,12 (b)(1)	5,46±1,18 (c)(3)	1,28±0,16 (α)	3,55±0,64 (β)(2)	19,08±3,79 (γ)(4)
HAMP-1	2,35±0,31 (a)(1)	4,06±0,45 (b)(3)	6,06±0,48 (c)(5)	1,52±0,18 (α)(2)	1,16±0,17 (β)(4)	2,46±0,19 (γ)(6)
TF	5,46±0,23 (a)(1)	0,83±0,12 (b)(3)	4,41±0,14 (c)(5)	0,67±0,12 (α)(2)	0,45±0,09 (β)(4)	0,41±0,07 (β)(6)
HP-1	2,49±0,33 (a)(1)	0,88±0,12 (b)	1,89±0,12 (c)(3)	0,92±0,15 (α)(2)	0,71±0,09 (α)	2,00±0,35 (β)(3)
GP96	0,67±0,11	1,30±0,13	0,96±0,11 (1)	0,86±0,10 (α)	0,83±0,12 (α)	2,05±0,20 (β)(2)
HSP90AA	1,08±0,14	1,16±0,28	1,33±0,28	1,25±0,15	0,95±0,14	1,01±0,11
HSP90AB	2,04±0,24 (a)(1)	2,14±0,14 (a)(3)	3,28±0,82 (b)(5)	1,33±0,10 (2)	0,88±0,21 (4)	1,16±0,12 (6)
HSP70	1,73±0,20 (a)(1)	0,66±0,17 (b)(3)	1,89±0,14 (a)(5)	0,49±0,18 (α)(2)	1,64±0,19 (β)(4)	1,56±0,10 (β)(6)

2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE *P. damsela* SUBSP. *piscicida* EXPRESADAS *in vivo* EN *S. senegalensis*

2.1. Preparación de los sueros para la identificación de antígenos expresados *in vivo*

Para la detección de proteínas inmunogénicas expresadas por el patógeno durante la infección de *S. senegalensis* se emplearon sueros procedentes de ejemplares supervivientes a una infección experimental inducida mediante inoculación IP de una dosis subletal de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por otro lado, para la identificación de las proteínas inmunogénicas expresadas únicamente durante la infección del lenguado fue preciso someter la mezcla de sueros a una serie de adsorciones frente a células de *P. damsela* subsp. *piscicida* y *E. coli* BL21 (DE3) cultivadas en el laboratorio para, de esta manera, retirar los anticuerpos frente a proteínas expresadas *in vitro*. Tras las diferentes rondas de adsorción se constató una disminución paulatina del título de anticuerpos específicos frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* en la mezcla de sueros (Figura 14).

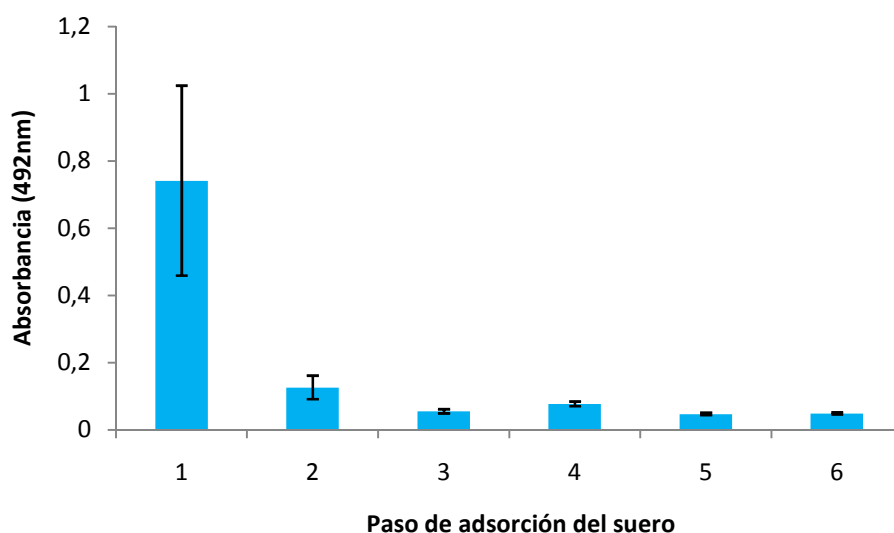


Figura 14. Niveles de anticuerpos específicos en la mezcla de sueros procedentes de ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes a infección intraperitoneal con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los sueros se sometieron a pasos secuenciales de adsorción: (1) sueros sin adsorber; (2) sueros adsorbidos frente a células completas de *P. damsela* subsp. *piscicida*; (3) sueros adsorbidos frente a lisados de *P. damsela* subsp. *piscicida*; (4) sueros adsorbidos frente a lisados de *P. damsela* subsp. *piscicida* desnaturalizados por calor; (5) sueros adsorbidos frente a lisados de *E. coli* BL21 (DE3) y (6) sueros adsorbidos.

Resultados

2.2. Identificación de los antígenos expresados *in vivo* por *P. damsela* subsp. *piscicida*

La electroforesis en agarosa realizada tras la fragmentación del ADN bacteriano mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos se encontraban entre 0,5 y 3,5 kpb (Figura 15).

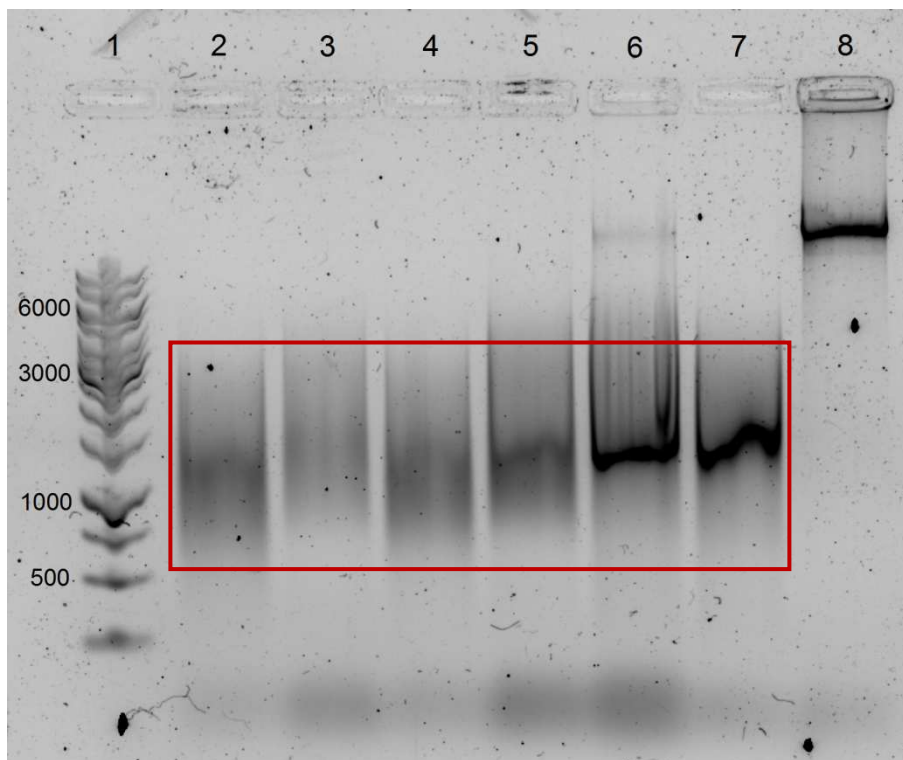


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos tras fragmentación con Hydroshear®. En las calles 2 a 7, alícuotas del ADN de *P. damsela* subsp. *piscicida* sometido a fragmentación hidrodinámica con el rango de tamaño esperado (0,5 – 3,5 kb). Calle 1: patrón de tamaños moleculares GeneRuler 1kb DNA Ladder (Life Technologies, España). Calle 8, ADN bacteriano sin someter a fragmentación.

Se obtuvo una genoteca de 7000 clones recombinantes a partir del genoma fragmentado de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41/01. La purificación de los vectores recombinantes y la amplificación mediante PCR de las secuencias insertadas de 50 clones elegidos al azar mostró que más del 95% de los plásmidos recombinantes contenían insertos con tamaños comprendidos entre 1000 y 3000 pb (Figura 16).

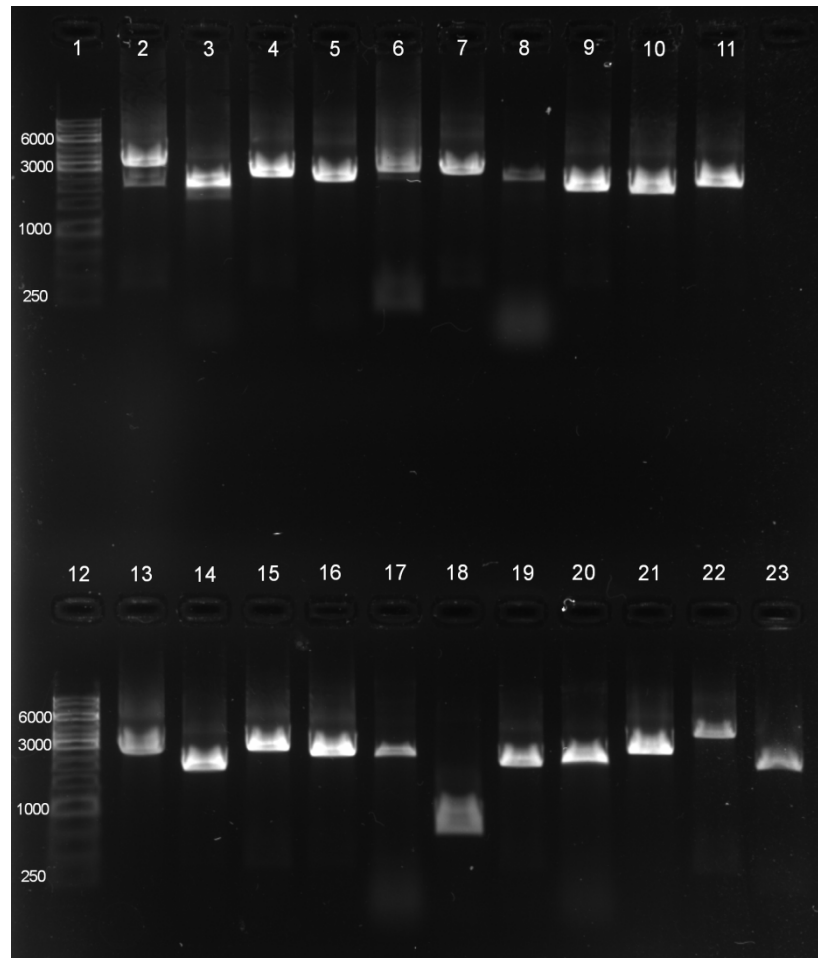


Figura 16. Análisis PCR de los fragmentos de ADN genómico de *P. damsela* subsp. *piscicida* incluidos en la genoteca de expresión de *E. coli* BL21 (DE3). Líneas 1 y 12: patrón de peso molecular (pb); Líneas 2-23: plásmidos recombinantes seleccionados de forma aleatoria.

Tras analizar la genoteca de expresión empleando sueros de lenguados supervivientes a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida* se realizó la selección de un total de 118 clones que mostraron reactividad al compararlos con el control negativo (*E. coli* BL21 (DE3)). Estos clones se sometieron a una segunda ronda de confirmación. En ella se ensayaron los clones seleccionados por triplicado empleando sueros tanto adsorbido como sin adsorber y se seleccionaron 18 clones candidatos positivos en al menos dos de tres réplicas realizadas frente al suero no adsorbido; de ellos, únicamente cinco clones se confirmaron como positivos frente al suero adsorbido de lenguado senegalés (Figura 17). Una vez seleccionados los clones inmunorreactivos se procedió a la visualización de la proteína expresada en geles SDS-PAGE. La reactividad de estas proteínas frente a los sueros se comprobó mediante Western-blot, empleando los sueros adsorbidos y sin adsorber (Figura 18).

Resultados

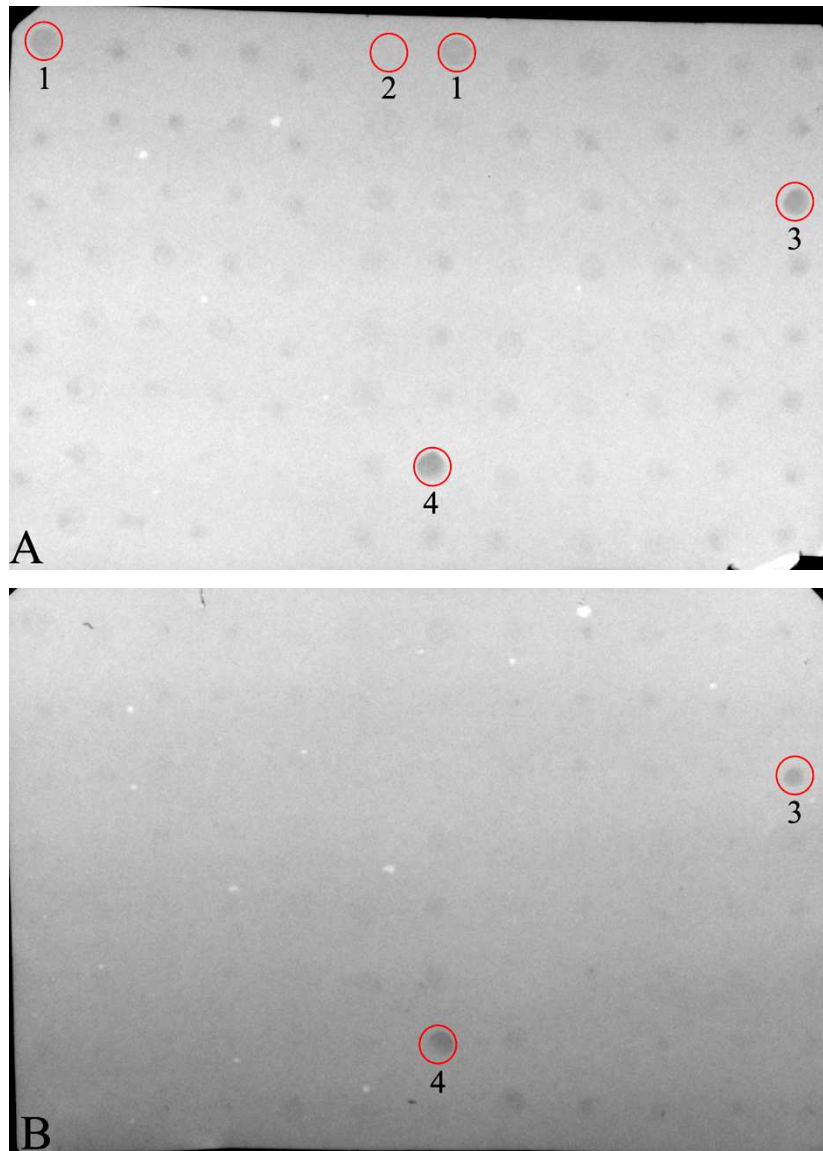


Figura 17. Membrana de nitrocelulosa que muestra la reactividad de parte de la genoteca de expresión de *P. damsela* subsp. *piscicida* en *E. coli* BL21 (DE3) mediante la técnica IVIAT. Tras incubar los clones de manera individual con IPTG para inducir la expresión de proteínas recombinantes, se añadió una gota de cada cultivo a una membrana de nitrocelulosa para llevar a cabo un dot-blot. Se emplearon sueros de ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes a fotobacteriosis, sin adsorber (A) y adsorbidos (B) frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Los clones reactivos se anotaron y posteriormente se purificaron para analizar las proteínas inmunorreactivas. (1): *P. damsela* subsp. *piscicida* (positivo); (2): *E. coli* BL21 (DE3)+pET30c (negativo); (3) y (4): clones IVIAT reactivos con ambos sueros.

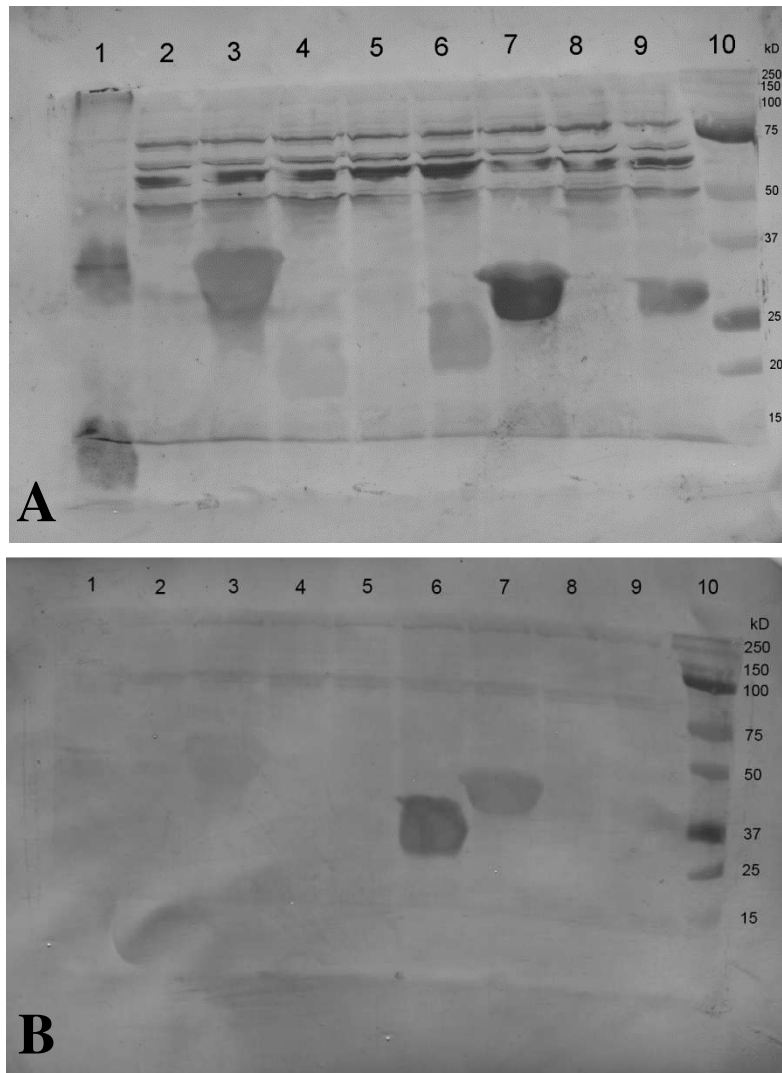


Figura 18. Membranas de nitrocelulosa que muestra la reactividad de las proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida* contenidas en los clones de *E. coli* BL21 (DE3) que dieron reacción frente a los sueros sin adsorber (**A**) y adsorbido (**B**) de ejemplares de *S. senegalensis* infectados. Línea 1: *P. damsela* subsp. *piscicida* (positivo); Línea 2: *E. coli* BL21 (DE3) (negativo); Líneas 3-9: *E. coli* BL21 (DE3) recombinantes con proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida*; Línea 10: patrón de peso molecular (kD).

Las secuencias de los insertos contenidos en los vectores de los clones positivos se analizaron para determinar la presencia de marcos abiertos de lectura (ORF) y se compararon con las secuencias de la base de datos BLASTn de NCBI. En la Tabla 8 se muestran las proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida* codificadas por los insertos presentes en los clones reactivos, sus funciones, así como su posible localización celular.

Entre las proteínas expresadas por *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección de *S. senegalensis* y reactivas a los sueros empleados se encuentran algunas implicadas en la replicación celular, división celular y conformación del ADN, síntesis y metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, metabolismo de la pared celular, defensa

Resultados

antioxidativa, adquisición de hierro y una serina proteasa de membrana. Todas estas proteínas pueden ser consideradas expresadas *in vivo*, mientras que únicamente aquellas detectadas con el suero adsorbido serán proteínas antigénicas inducidas *in vivo* (IVIAT). Así, en este estudio sólo cinco clones han dado reacción positiva frente al suero adsorbido procedente de *S. senegalensis* infectados y se consideran, por tanto, proteínas IVIAT. Éstas incluyen la proteína identificada como inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (Impdh), implicada en procesos de transporte y metabolismo; la proteína con actividad antioxidante alquil hidroperóxido reductasa (AhpC); dos proteínas relacionadas con la traducción y estructura de los ribosomas: serina hidroximetil transferasa (Shmt) y alanil-ARNt sintetasa (Alars); así como la péptido sintetasa no ribosómica implicada en la biosíntesis del sideróforo piscibactina y codificada por el gen *irp2* (Tabla 8).

Tabla 8. Relación de proteínas inmunogénicas para *S. senegalensis* identificadas en el presente trabajo. Las proteínas en negrita se detectaron por su reactividad frente a suero adsorbido y, por ello, se consideran proteínas inmunogénicas inducidas *in vivo* (IVIAT).

Categoría funcional	Identificación	Número de acceso (BLAST)	Localización celular
Replicación, recombinación y reparación	Subunidad B de la ADN girasa	WP_044180341.1	Citoplasma
	Proteína RdgC asociada a recombinación	WP_044176475.1	Citoplasma
Adquisición de hierro	Péptido sintetasa no ribosómica	AKQ52531	Membrana
Transporte y metabolismo	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	EEZ41661.1	Citoplasma
	Arginina descarboxilasa	AEU10010.1	Citoplasma
	Serina hidroximetil transferasa	WP_005300693.1	Citoplasma
	Glutamina amidotransferasa de clase II (GATasa)	WP_044179637.1	Citoplasma
	Amidotransferasa posible	AEU09986.1	Citoplasma
	Diguanilato fosfodiesterasa	WP_044178285.1	Membrana/ Citoplasma
Actividad antioxidante	Alquil hidroperóxido reductasa	WP_005298372.1	Citoplasma
	Superóxido dismutasa	WP_005298367.1	Periplasma
Envoltura celular y metabolismo de membrana	Transglicosilasa lítica	WP_044174705.1	Membrana externa
	Transglicosilasa de mureína	WP_044178572.1	Periplasma
Traducción, estructura ribosómica y biogénesis	Metiltransferasa del ARNr 23S	WP_044175535.1	Citoplasma
	Alanil-ARNt sintetasa	WP_044174517.1	Citoplasma
Control del ciclo celular, división celular y reparto cromosómico	Proteína de partición cromosómica ParA	WP_014386679.1	Citoplasma
Elementos móviles y extracromosómicos	Posible transposasa	AEU10011.1	Citoplasma
Otros	Serina proteasa intramembrana GlpG	WP_044173910.1	Membrana

3. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE GENES SELECCIONADOS DE *P. damsela* SUBSP. *piscicida*

3.1. Transcripción de genes de *P. damsela* subsp. *piscicida* en condiciones limitantes de hierro y estrés oxidativo

Se analizó la transcripción de los genes que codifican para las proteínas IVIAT detectadas (*impdh*, *ahpc*, *shmt*, *alars* e *irp2*), así como de los que codifican para otras proteínas identificadas por otros autores como factores de virulencia tales como la exotoxina Aip56 (Do Vale et al., 2005) que produce la apoptosis de macrófagos, las proteínas HutB y HutD, implicadas en el transporte de hemina en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Osorio et al., 2010); la lipoproteína PDP 0080 relacionada con la adhesión del patógeno a células del hospedador (Andreoni et al., 2013); la proteína codificada por el gen *irp1*, implicada en la síntesis del sideróforo piscibactina (Osorio et al., 2015), así como la proteína P53, la cual posee características comunes con proteínas de otras especies patógenas invasivas (Grasso et al., 2011). Para todos los genes estudiados se detectó la presencia de transcritos en las células de *P. damsela* subsp. *piscicida* cultivadas en condiciones de abundancia y limitación de hierro, así como de estrés oxidativo ensayadas. En relación a la influencia de la concentración de hierro libre en el medio, se observaron cambios en la transcripción relativa en todos los genes estudiados excepto en aquéllos que codifican para la lipoproteína PDP 0080, AlaRs, Impdh y Shmt (Figuras 19-21). Así, los genes que codifican para la toxina Aip56, y las proteínas AhpC y P53 incrementaron los valores de transcripción relativa en los cultivos de la bacteria en presencia de un quelante de hierro; por el contrario, no se observaron variaciones en la transcripción relativa de estos genes en las células cultivadas en condiciones de abundancia de hierro. Por otra parte, la transcripción relativa de los genes que codifican para las proteínas HutB, HutD, Irp1 e Irp2 se redujo en presencia de hierro, a la vez que aumentó en las células cultivadas en condiciones de limitación de hierro.

Por otro lado, las condiciones de estrés oxidativo impuestas por la presencia de metil viológeno y peroxinitrito en el medio de cultivo modificaron la transcripción relativa de los genes que codifican para la Irp1, Irp2, AhpC y Sod, mientras que la transcripción de los genes que codifican para P53 y Aip56 sólo se modificó en presencia de peroxinitrito. La transcripción de los genes que codifican para las proteínas restantes

ensayadas, HutB, HutD, PDP_0080, AlaRs, Impdh y Shmt, no resultó modulada por las condiciones de estrés oxidativo estudiadas.

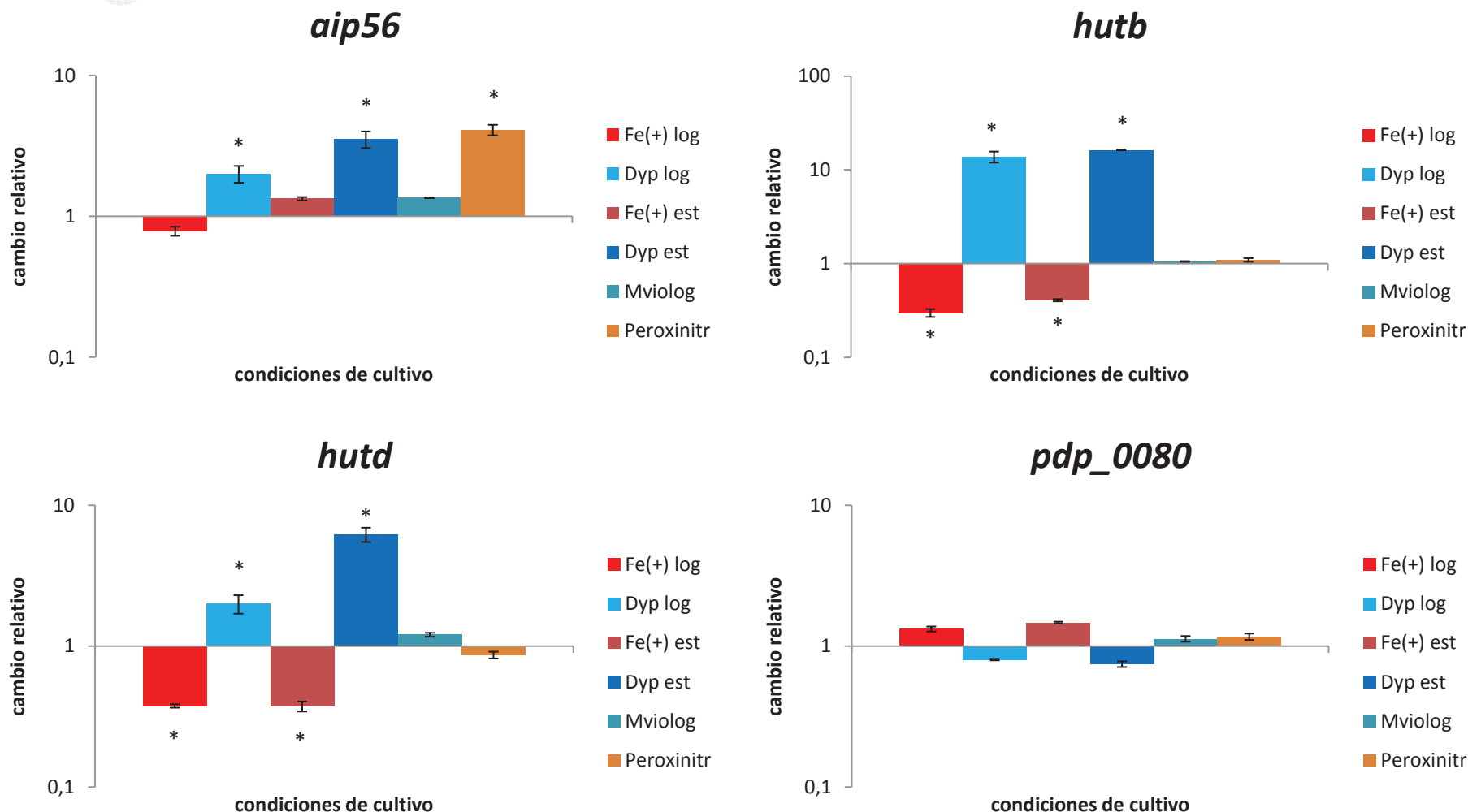


Figura 19. Transcripción relativa de los genes que codifican Aip56, HutB, HutD y PDP_0080 en células de *P. damsela* subsp. *piscicida* cultivadas en condiciones de exceso, limitación de hierro y presencia de radicales superóxido y peroxinitrito. Fe(+) log y Fe(+) est: cultivo en TSBs con FeCl₃ (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Dyp log y Dyp est: cultivo en TSBs con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Mviolog: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 6 h más en presencia de metil-viologen (0,2 mM). Peroxinitr: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 2 h más en presencia de peroxinitrito (1 mM). Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a bacterias cultivadas en TSBs. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican disminución comparados con las bacterias sin tratar. Los asteriscos señalan diferencias significativas para el gen y tratamiento respecto a su control ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como la media ± error estándar de tres réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.

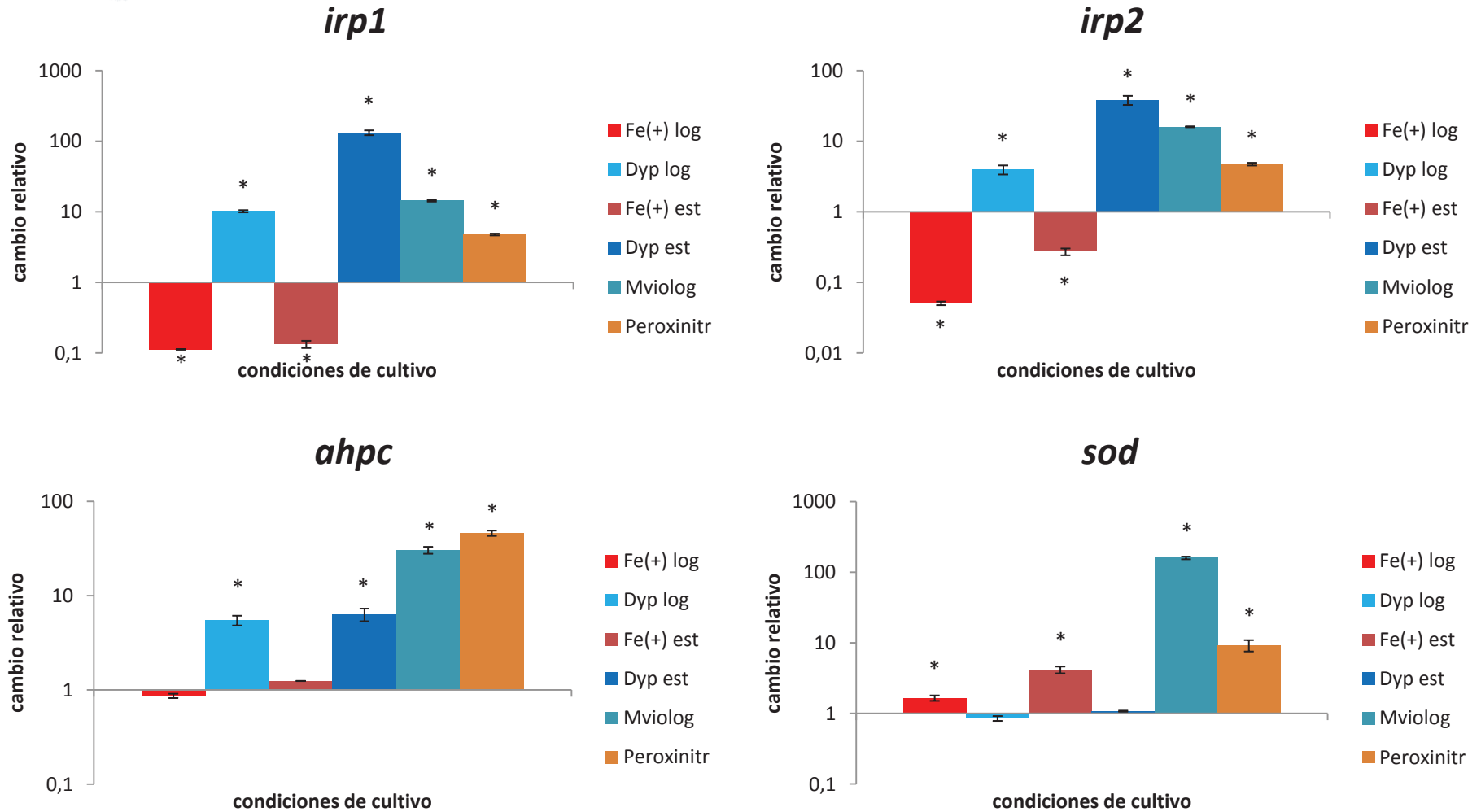


Figura 20. Transcripción relativa de los genes que codifican Irp1, Irp2, AhpC y SOD en células de *P. damselae* subsp. *piscicida* cultivadas en condiciones de exceso, limitación de hierro y presencia de radicales superóxido y peroxinitrito. Fe(+) log y Fe(+) est: cultivo en TSBs con FeCl₃ (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Dyp log y Dyp est: cultivo en TSBs con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Mviolog: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 6 h más en presencia de metil-viologen (0,2 mM). Peroxinitr: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 2 h más en presencia de peroxinitrito (1 mM). Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a bacterias cultivadas en TSBs. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican disminución comparados con las bacterias sin tratar. Los asteriscos señalan diferencias significativas para el gen y tratamiento respecto a su control ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como la media ± error estándar de tres réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.

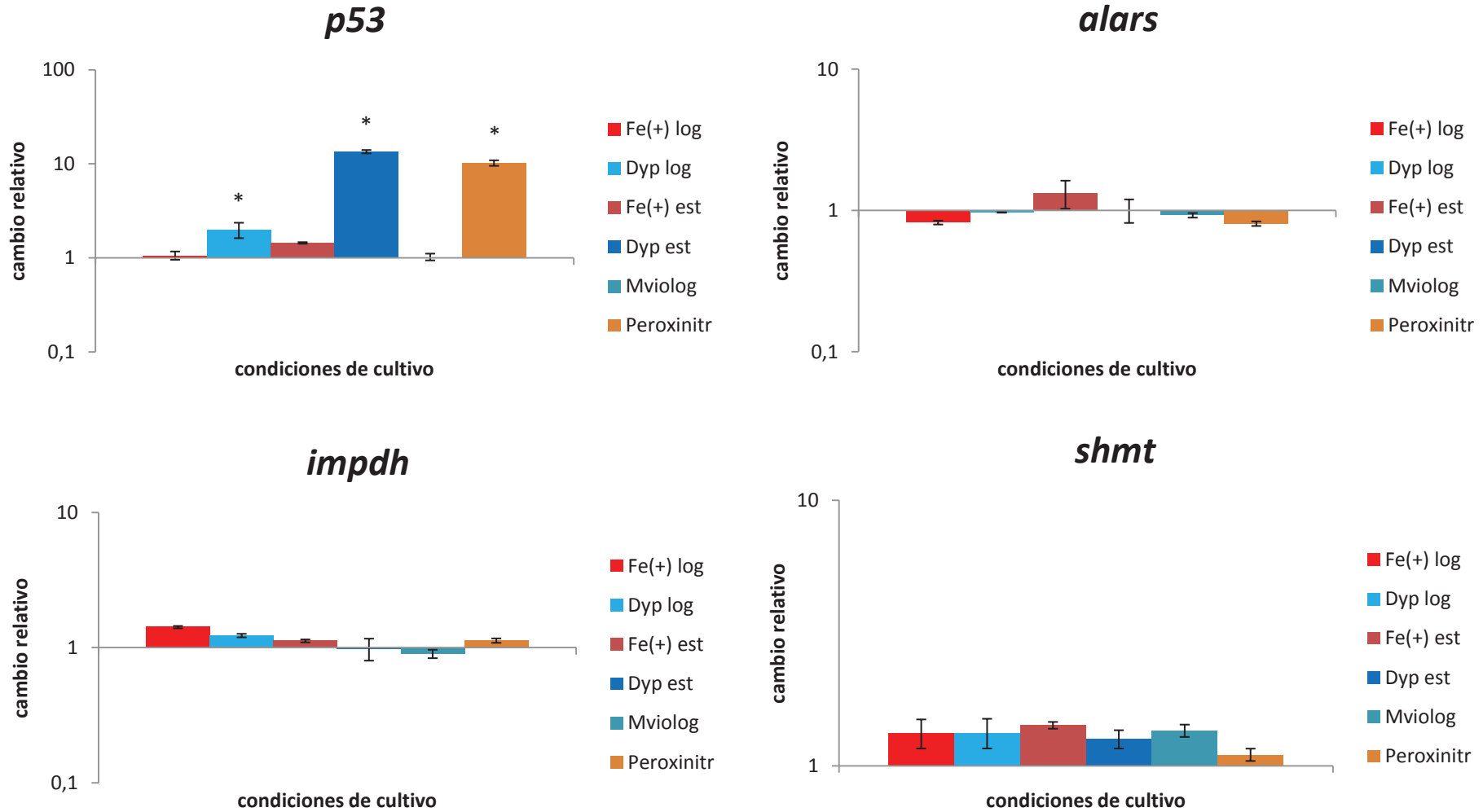


Figura 21. Transcripción relativa de los genes que codifican P53, AlaRs, Impdh y Shmt en células de *P. damsela* subsp. *piscicida* cultivadas en condiciones de exceso, limitación de hierro y presencia de radicales superóxido y peroxinitrito. Fe(+) log y Fe(+) est: cultivo en TSBs con FeCl₃ (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Dyp log y Dyp est: cultivo en TSBs con el quelante de hierro 2,2'-dipyridyl (100 μM) hasta la fase log y estacionaria, respectivamente. Mviolog: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 6 h más en presencia de metil-viologen (0,2 mM). Peroxinitr: bacteria cultivada hasta la fase log e incubada durante 2 h más en presencia de peroxinitrito (1 mM). Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a bacterias cultivadas en TSBs. Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican disminución comparados con las bacterias sin tratar. Los asteriscos señalan diferencias significativas para el gen y tratamiento respecto a su control ($p < 0,05$). Los resultados se presentan como la media ± error estándar de tres réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.

3.2. Transcripción de genes de *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección *ex vivo* de riñón cefálico de *S. senegalensis*

3.2.1. Supervivencia bacteriana en contacto con células de riñón cefálico de *S. senegalensis*

El recuento de células de *P. damsela* subsp. *piscicida* presentes en cada uno de los puntos muestreados puede observarse en la Figura 22. Se aprecia una reducción de cerca de 1 orden de magnitud en el número de células cultivables del patógeno entre los tiempos 120 min y 6 h en contacto con células de riñón cefálico de *S. senegalensis*. A las 24 h de este contacto se vuelve a observar cómo aumenta el título bacteriano hasta recuperar aproximadamente los valores que presentaban a los 120 min. Por otra parte, el recuento de las bacterias mantenidas en el medio en ausencia de células de riñón presentó un aumento progresivo a lo largo del periodo de ensayo.

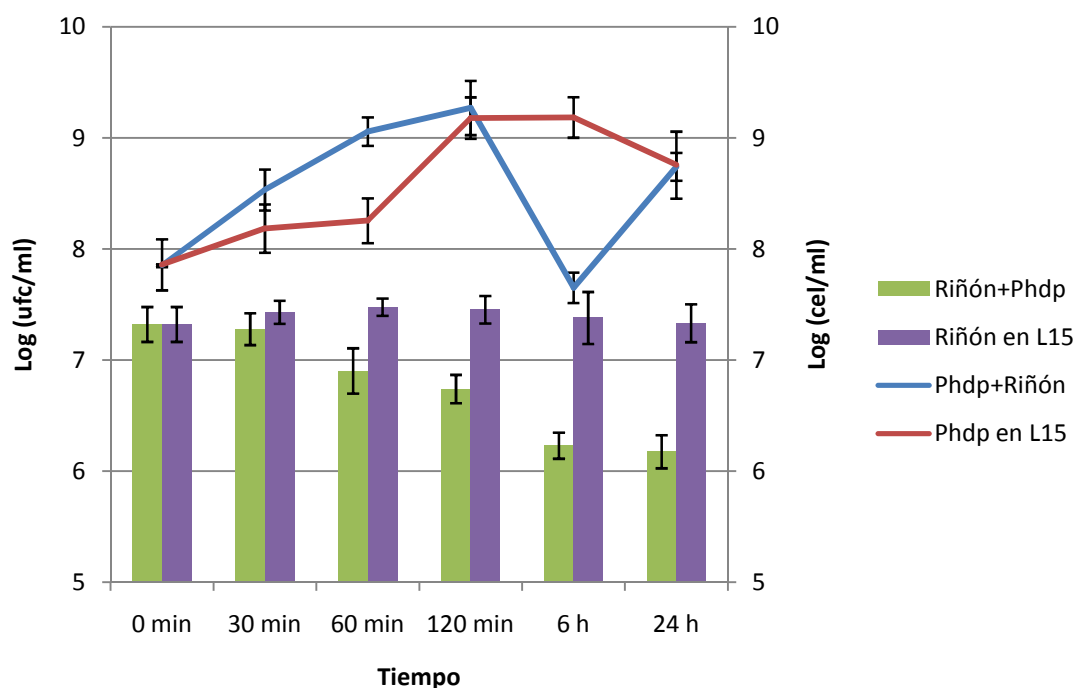


Figura 22. Recuento del número de células cultivables (ufc/ml) de *P. damsela* subsp. *piscicida* mantenidas en medio L-15 en presencia y ausencia de células de riñón cefálico de *S. senegalensis* (líneas); y recuento del número de células viables de riñón cefálico de *S. senegalensis* (cel/ml) en presencia y ausencia del patógeno (barras). Los recuentos se realizaron en TSAs. El recuento de células en cada punto de muestreo se realizó por triplicado y el ensayo se realizó por quintuplicado.

Resultados

3.2.2. Cuantificación de la transcripción relativa de *P. damsela* subsp. *piscicida* en células de riñón de *S. senegalensis*

La transcripción relativa de todos los genes ensayados en las células de riñón cefálico de lenguado presentó incrementos estadísticamente significativos cuando se incubó en contacto con células de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figuras 23-25). Estos aumentos se observaron tras 30 min de contacto de la bacteria con las células riñón para todos genes ensayados excepto el que codifica para Shmt, cuyo incremento requirió 120 min de coincubación de la bacteria y las células de riñón.

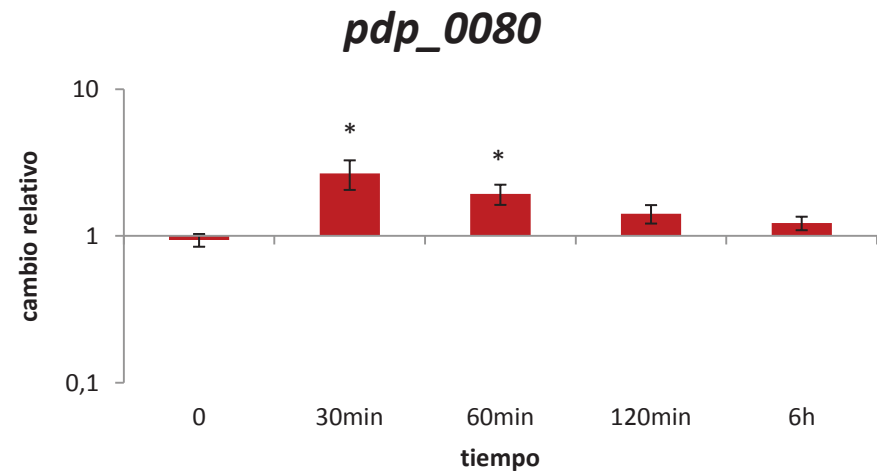
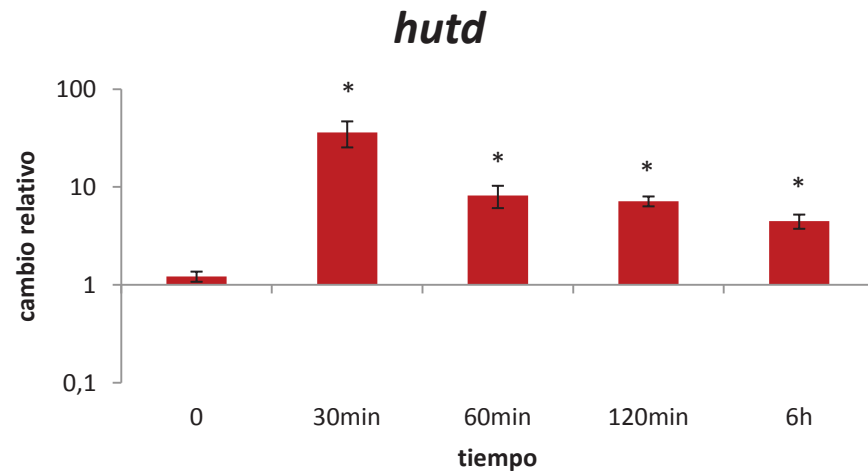
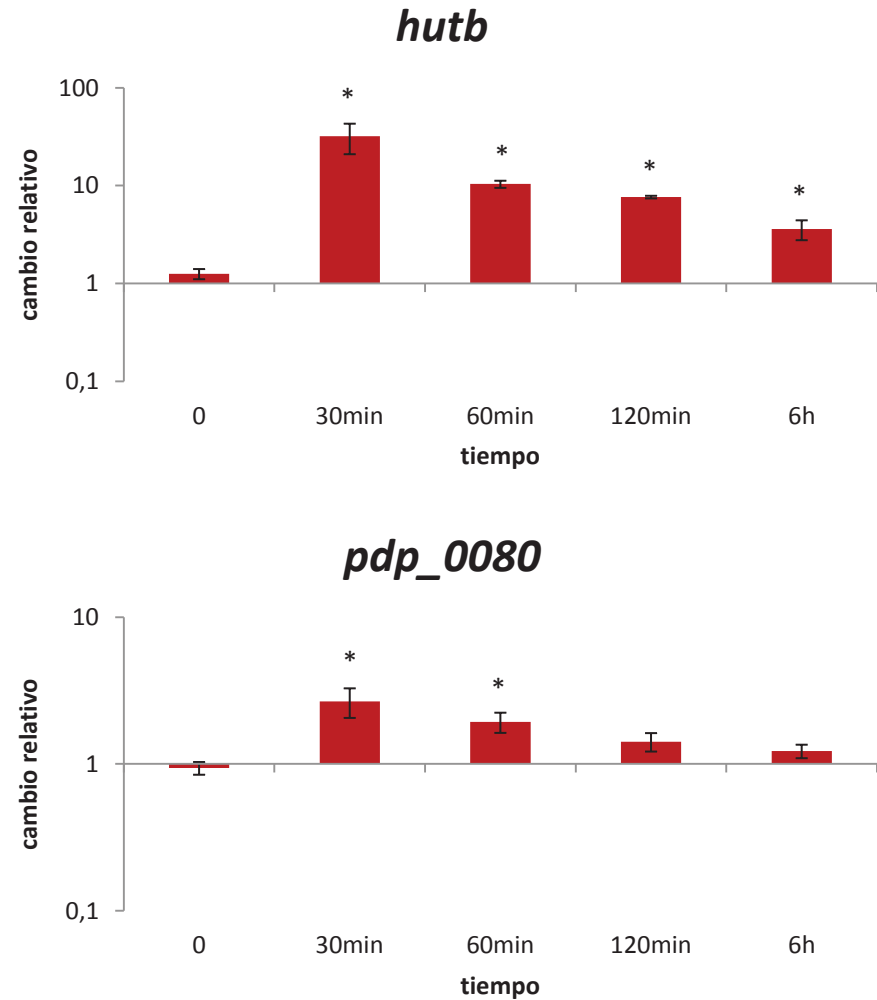
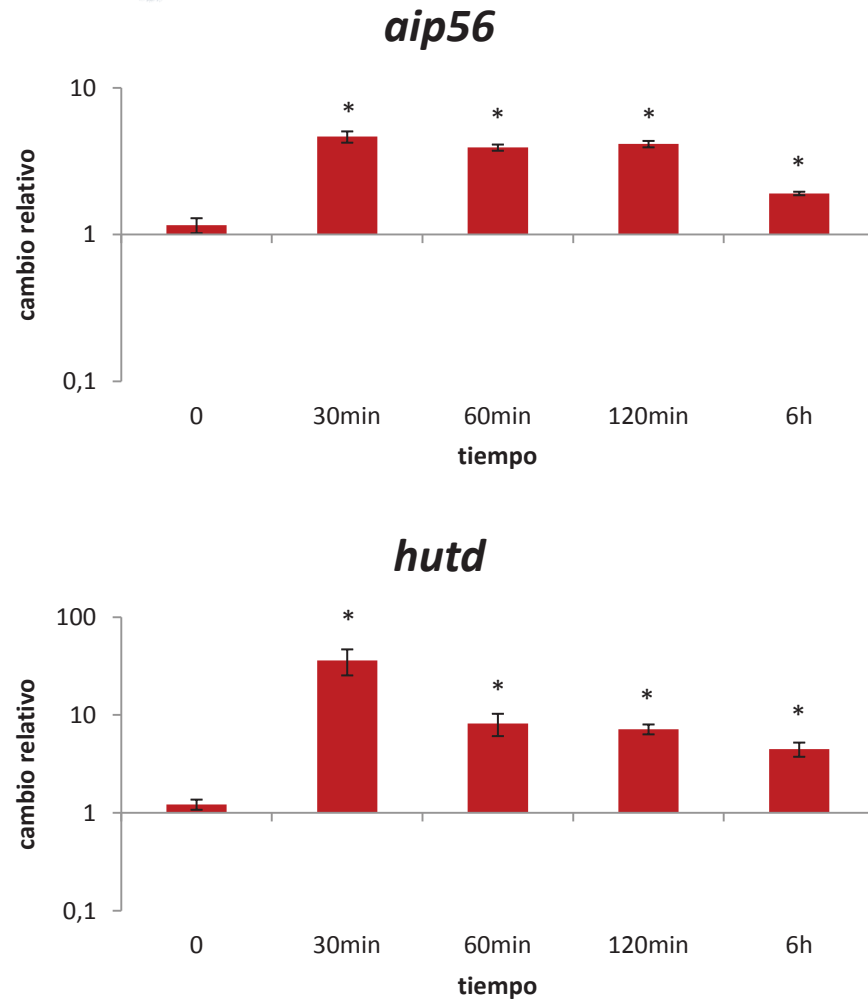


Figura 23. Niveles de transcripción de genes que codifican Aip56, HutB, HutD y PDP_0080 en células de *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección *ex vivo* de riñón cefálico. Las células bacterianas se cultivaron hasta fase log e incubaron durante diferentes tiempos junto a células de lenguado. Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a tratamiento control (bacterias cultivadas *in vitro* en medio L15). Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con las bacterias en L15. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el gen comparado respecto al tratamiento control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de cinco réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.

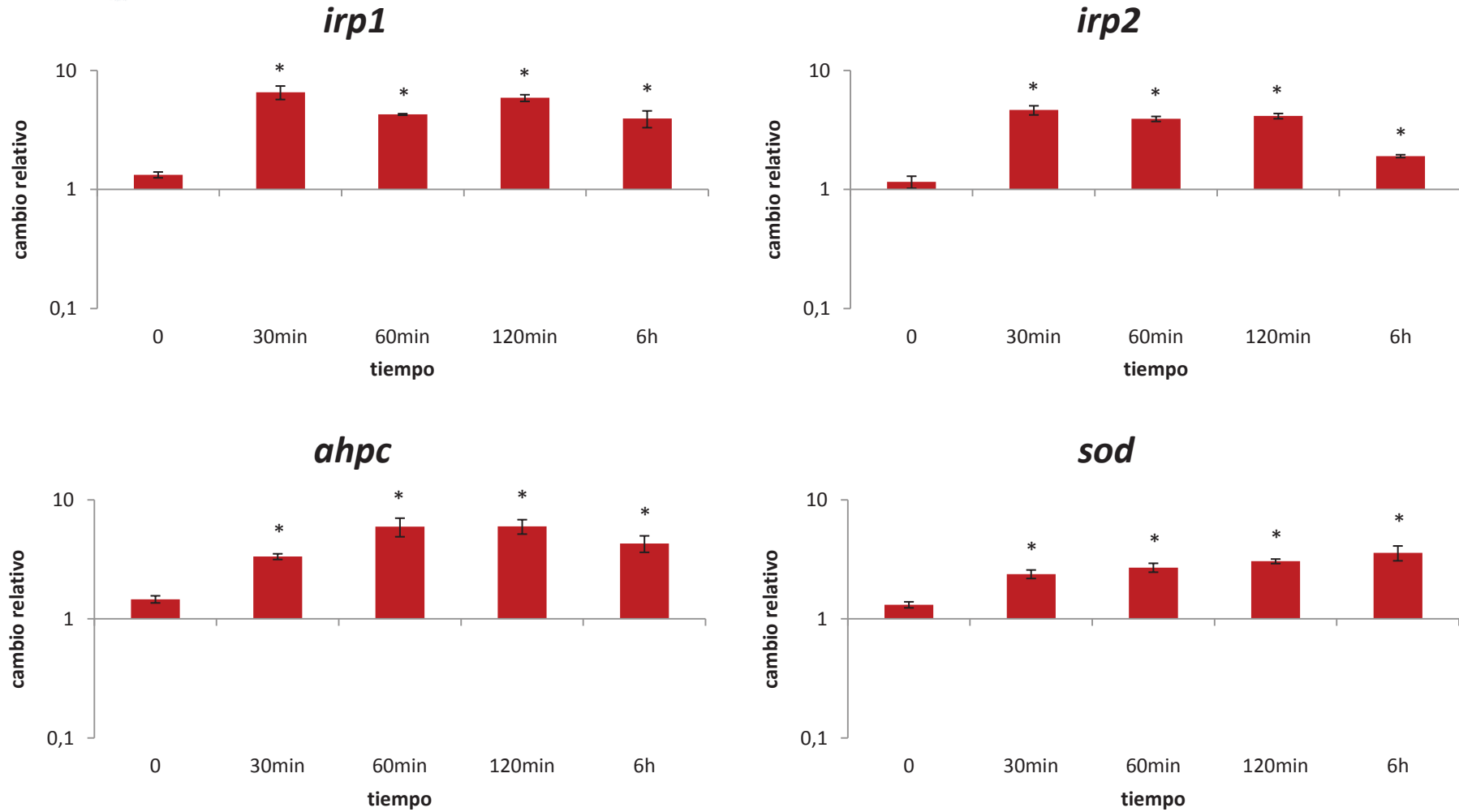


Figura 24. Niveles de transcripción de genes que codifican Irp1, Irp2, AhpC y SOD en células de *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección *ex vivo* de riñón cefálico. Las células bacterianas se cultivaron hasta fase log e incubaron durante diferentes tiempos junto a células de lenguado. Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a tratamiento control (bacterias cultivadas *in vitro* en medio L15). Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con las bacterias en L15. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el gen comparado respecto al tratamiento control. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de cinco réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.

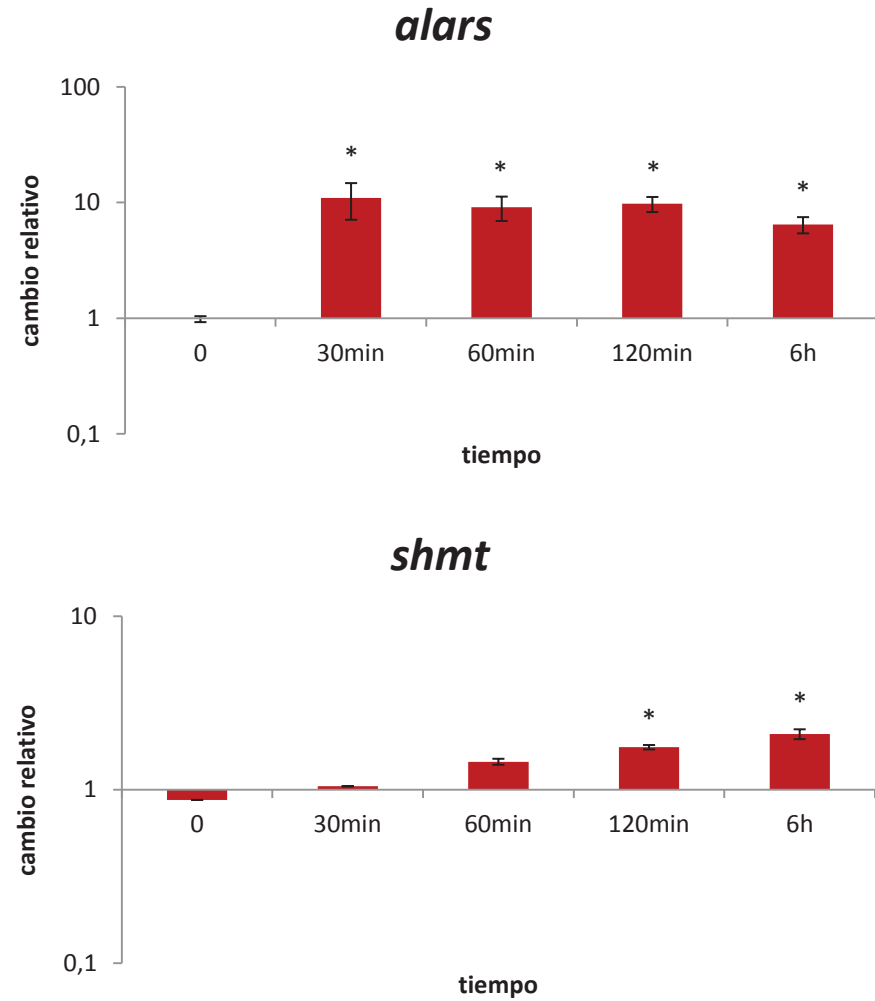
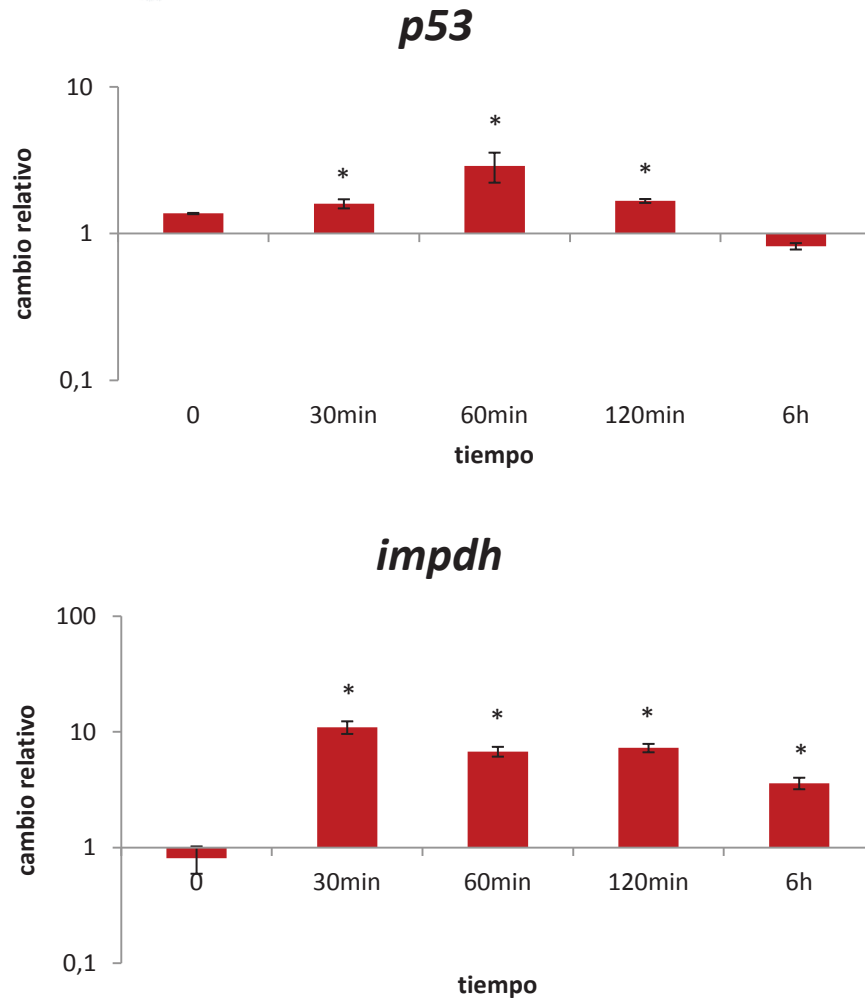


Figura 25. Niveles de transcripción de genes que codifican P53, AlaRS, Impdh y Shmt en células de *P. damselae* subsp. *piscicida* durante la infección *ex vivo* de riñón cefálico. Las células bacterianas se cultivaron hasta fase log e incubaron durante diferentes tiempos junto a células de lenguado. Los datos se normalizaron con el gen ARNr 16S y relativizaron a tratamiento control (bacterias cultivadas *in vitro* en medio L15). Valores por encima de 1 indican aumento en la transcripción, mientras que por debajo de 1 indican represión comparados con las bacterias en L15. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) para el gen comparado respecto al tratamiento control. Los resultados se presentan como la media ± error estándar de cinco réplicas biológicas y sus tres réplicas técnicas.



DISCUSIÓN



1. RESPUESTA INMUNE DE *S. senegalensis* A LA INFECCIÓN FRENTE A *P. damsela* SUBSP. *piscicida*

La fotobacteriosis es una enfermedad que afecta a multitud de especies, con una amplia distribución geográfica y que provoca un importante impacto económico en la industria acuícola. *P. damsela* subsp. *piscicida* es un patógeno oportunista caracterizado por invadir células del hospedador (López-Dóriga *et al.*, 2000), provocar septicemia hemorrágica, formación de gránulos blanquecinos en vísceras internas como hígado, riñón y bazo (Do Vale *et al.*, 2007), inducir apoptosis de fagocitos (Do Vale *et al.*, 2005), causar hinchazón de la región abdominal (Balebona *et al.*, 1992) y ser capaz de resistir a la actividad bactericida del suero (Acosta *et al.*, 2006). El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la defensa inmune de lenguado senegalés podrá contribuir al desarrollo de tratamientos profilácticos más efectivos que disminuyan los perjuicios causados por la fotobacteriosis. La mayoría de los estudios para determinar la respuesta de peces frente a una infección utilizan la ruta intraperitoneal como vía de inoculación del patógeno; pero hay que tener en cuenta que en el ambiente natural, el hospedador posee barreras de defensa como son la piel y las mucosas. Por esta razón, en este estudio se han ensayado dos rutas de infección, intraperitoneal (IP) e inmersión (IM).

Aunque la mortalidad se observó únicamente en los ejemplares infectados por vía IP, la presencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* se detectó tanto en hígado como riñón anterior de los lenguados infectados por ambas rutas. Del mismo modo, se observó un aumento significativo en los niveles de anticuerpos específicos frente al patógeno al compararlos con los presentes en los ejemplares control. Estos niveles fueron superiores en los ejemplares de lenguado senegalés infectados por vía IP, tal y como ha sido descrito en las infecciones por *Vibrio harveyi* en especies como *Pseudosciaena crocea* (Xu *et al.*, 2009). Se han observado respuestas similares en *S. senegalensis* infectados por inmersión sin causar mortalidad (Barroso *et al.*, 2014), por lo que la ruta de infección puede considerarse determinante para el desarrollo de la infección (Austin y Austin, 2012; Chettri *et al.*, 2015).

Discusión

Sistema del complemento

Entre las funciones del sistema del complemento se pueden citar la fagocitosis, reacciones inflamatorias y eliminación de microorganismos y retirada de inmunocomplejos, entre otras (Holland y Lambris, 2002). La activación del sistema del complemento a través de cualquiera de las tres vías (clásica, alternativa y de las lectinas) conlleva la participación de los componentes C3 y C7 (Wang y Secombes, 2013). De esta forma, el incremento en la transcripción de C3 podría indicar un aumento de la opsonización, favoreciendo la fagocitosis de células de *P. damsela* subsp. *piscicida* y su posterior eliminación. Por su parte, C7 está implicado en la lisis bacteriana, al formar parte del complejo de ataque a la membrana (MAC), y en el proceso inflamatorio (Boshra *et al.*, 2006). Algunos autores han detectado incrementos en la transcripción de C3 a nivel hepático en ejemplares de *S. aurata* y *D. labrax* 24 h post-inoculación con *P. damsela* subsp. *piscicida* (Mauri *et al.*, 2011; Costas *et al.*, 2013). Sin embargo, estos estudios no muestran datos sobre fases más avanzadas de la infección. Los resultados del presente estudio indican que tras 72 h de la infección, la transcripción de genes del sistema del complemento decrece en hígado, siendo la producción de C3 y C7 asumida por el riñón. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha demostrado la participación de los genes implicados en el sistema del complemento (C3 y C7) en los ejemplares de lenguado senegalés infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* independientemente de la ruta de infección. En ellos, el hígado es el principal órgano implicado en la etapa inicial de la infección, siendo asumido este papel posteriormente por el riñón anterior.

Lisozima

Las lisozimas son enzimas producidas durante la respuesta inmune innata y permiten al hospedador hacer frente a infecciones bacterianas. Poseen actividad lítica frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mostrando capacidad de opsonización, activación del sistema del complemento y de fagocitos (Fu *et al.*, 2013). Se ha detectado actividad lisozima en diferentes tejidos de peces, incluyendo riñón, bazo, hígado e intestino además de mucus de piel e intestinal (Saurabh y Sahoo, 2008; Fu *et al.*, 2013). En el presente trabajo, la modulación en la transcripción génica de LYS-G fue más pronunciada en hígado que en riñón anterior. Se han descrito altos niveles basales de LYS-G en riñón de *D. labrax*, sin embargo el aumento de

transcripción relativa de LYS-G en hígado de *S. senegalensis* tras ser expuestos a patógenos ha sido descrito previamente en *Ictalurus punctatus* (Wang *et al.*, 2013b) y *Scophthalmus rhombus* infectado con *P. damsela* subsp. *piscicida* (Jimenez-Cantizano *et al.*, 2008). Además, Costas *et al.* (2013) y Barroso *et al.* (2014) detectaron un aumento en la actividad de la lisozima presente en el plasma en *S. senegalensis* tras infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Al igual que los genes C3 y C7, la transcripción génica de LYS-G en hígado parece estar inducida durante las etapas iniciales post-infección, mientras que la inducción de LYS-G en riñón aparece más tarde. Además, la respuesta de LYS-G en hígado prevalece durante más tiempo tras la infección por vía IP respecto a la IM, la cual sólo es detectada a las 24 h post-infección.

Familia TNF y NCCRP

Los niveles elevados de transcripción génica de TNF α se han asociado con la acumulación de citoquinas en la respuesta inflamatoria debida a toxinas bacterianas, estímulos invasivos y compuestos con efecto inflamatorio (Roca *et al.*, 2008; Mosca *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que la infección producida por las rutas ensayadas resulta en una estimulación temprana de la transcripción génica de TNF α . La sobreexpresión temprana de TNF α ha sido descrita en diferentes especies de peces tras vacunación e infección con diversos patógenos (Fast *et al.*, 2007; Raida y Buchmann, 2009; Wang *et al.*, 2014). Esta citoquina participa en el reclutamiento y activación de fagocitos en *S. aurata* (García-Castillo *et al.*, 2004), aunque no estimula el estallido respiratorio de fagocitos *in vitro* (Roca *et al.*, 2008). Los efectos producidos por la estimulación del TNF α están relacionados con el reconocimiento de patógenos y presentación de antígenos, dirigiendo la respuesta de fase aguda y la inmunidad adaptativa (Pietretti y Wiegertjes, 2014). Los aumentos en la transcripción relativa de TNF α 24 h post-infección en ejemplares de lenguado senegalés podrían contribuir a la respuesta inflamatoria tras la infección por ambas rutas, IP e IM, estos efectos inflamatorios pueden añadirse a los producidos a causa de la activación del sistema del complemento mencionada anteriormente.

El factor 3 asociado al receptor de TNF (TRAF-3) es un importante regulador tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, participando en la regulación de la señalización de los linfocitos T a través de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y en el desarrollo y función de las células NK (Häcker *et al.*,

Discusión

2011). Al igual que ocurre en ejemplares de *S. senegalensis* sometidos a tratamiento con LPS (Prieto-Alamo *et al.*, 2009), la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* produce una sobreexpresión de TRAF-3 en el hígado 24 h post-inoculación independientemente de la ruta de administración. Sin embargo, aunque al tratamiento con LPS se le ha atribuido capacidad de incrementar la transcripción de TRAF-3 en riñón, hígado y bazo en otras especies de peces (Cai *et al.*, 2015), esto no ha ocurrido en el riñón de *S. senegalensis* en nuestros experimentos. Se ha descrito que el aumento en la expresión génica de TRAF-3 en *Lutjanus sanguineus* previene la producción de citoquinas pro-inflamatorias como interleucina 6 tras inyección con LPS (Cai *et al.*, 2015), mientras que otros autores han observado cómo la deficiencia de TRAF-3 produce altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF (Karin y Gallagher, 2009).

La proteína receptora de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1) interviene en el reconocimiento y lisis de células diana (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001). Por otra parte, la capacidad de *P. damsela* subsp. *piscicida* de invadir células del hospedador ha sido ya descrita (López-Dóriga *et al.*, 2000) y podría esperarse la participación de células citotóxicas no específicas (NCCs) en la eliminación de las células parasitadas. El notable incremento en la transcripción relativa de NCCRP-1 observada en los peces infectados por vía IP podría estar asociado al carácter intracelular del patógeno y a una respuesta citotóxica mediada por NCCRP-1. La presencia de un mayor número de células bacterianas en los peces infectados por la inoculación vía IP podría resultar en un mayor número de células infectadas que serían reconocidas y atacadas por las NCCs implicadas en la defensa del organismo. Por otra parte, la unión de NCCRP-1 a antígenos puede iniciar la activación de citoquinas por parte del dominio citoplasmático BOX-1 de NCCRP-1 (Evans *et al.*, 1999). Esta activación podría conducir de forma indirecta al reclutamiento de otros componentes como células fagocíticas implicadas en la respuesta inflamatoria anti bacteriana, así como en la actividad de las células T y B, involucradas en la respuesta inmune adquirida y cuyo papel se ha observado en el presente trabajo a través de los altos niveles de anticuerpos obtenidos con el análisis ELISA (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001). Por lo tanto, el notable incremento observado en la transcripción génica de NCCRP-1 en los ejemplares de *S. senegalensis* infectados por vía IP podría indicar una respuesta inflamatoria.

Biodisponibilidad de hierro

La proliferación bacteriana, así como la persistencia de patógenos en el interior del hospedador requieren mecanismos capaces de facilitar la obtención de nutrientes esenciales como el hierro (Do Vale *et al.*, 2002; Osorio *et al.*, 2006). En este sentido, tanto en ejemplares de lubina (Mosca *et al.*, 2014) como de dorada (Pellizzari *et al.*, 2013), se han observado incrementos en los niveles de hepcidina hepática e hipofeemia sérica tras la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal o por inmersión, respectivamente. Al igual que en mamíferos, la hepcidina muestra una doble funcionalidad en peces, estando involucrada en la regulación de los niveles de hierro y en la actividad antimicrobiana (Rodrigues *et al.*, 2006; Pereiro *et al.*, 2012). Además, diversos autores han descrito la participación de la interleucina 6 en la inducción de la producción de hepcidina mediada por inflamación a nivel de macrófagos en *O. mykiss*, pudiendo limitar la propagación de la infección al limitar el hierro disponible (Costa *et al.*, 2011). Nuestros datos revelan el papel relevante del riñón anterior en la respuesta de HAMP-1, especialmente tras la infección por vía IM. Considerando la actividad antimicrobiana de la hepcidina, este incremento en la transcripción relativa podría contribuir a crear un ambiente con bajos niveles de hierro en la sangre de los ejemplares infectados. Aunque se han detectado incrementos en la transcripción del gen TNF α en los lenguados infectados, sugiriendo una respuesta inflamatoria por parte de hígado y riñón, consideramos necesarios más estudios para poder determinar la implicación de las citoquinas inflamatorias en la sobreexpresión de HAMP-1.

La transferrina (TF) es una proteína asociada con la respuesta frente a patógenos por su contribución en el mantenimiento de niveles bajos de hierro sanguíneo (Lieu *et al.*, 2001). Al igual que en *S. senegalensis*, Yang *et al.* (2013) han descrito un descenso en la transcripción del gen que codifica para transferrina en *Scophthalmus maximus* relacionada con un aumento en la transcripción de hepcidina, sugiriendo que el gen HAMP-1 podría tener un papel en la regulación de la expresión del gen TF. La transferrina está considerada como una proteína negativa de fase aguda en ejemplares de *D. labrax* infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* (Neves *et al.*, 2009). En este sentido, la disminución de los niveles de transferrina podría dificultar la adquisición de hierro por parte de *P. damsela* subsp. *piscicida*, patógeno capaz de obtener hierro de la transferrina (Fouz *et al.*, 1997). Sin embargo, es destacable que el incremento en la

Discusión

transcripción relativa fue detectado no solo en hígado, sino también en riñón anterior de *S. senegalensis* 30 d post-infección. Aunque los niveles de hierro en plasma no han sido determinados en el presente trabajo, otros autores han descrito anemia asociada a infecciones con *P. damsela* subsp. *piscicida* en *D. labrax* (Mosca *et al.*, 2014); si esta es la situación en *S. senegalensis*, el incremento en la transcripción de TF podría ser considerada una estrategia tardía por parte del hospedador para hacer frente a la hipofeemia asociada con la infección provocada por este patógeno.

La ferritina es otra proteína asociada con el almacenamiento de hierro, cuya sobreexpresión génica (FERR-M) ha sido descrita bajo condiciones de estrés oxidativo y condiciones inflamatorias (Orino *et al.*, 2001; Torti y Torti, 2002). Estudios en *D. labrax* han detectado aumentos en la transcripción génica de FERR-M a pesar de los bajos niveles de hierro presentes en el suero de los ejemplares (Neves *et al.*, 2009). Tomado estos datos en conjunto, las respuestas de hepcidina, ferritina y transferrina en *S. senegalensis* contribuyen a la creación de un ambiente con bajos niveles de hierro en sangre que reduce su disponibilidad para el crecimiento bacteriano. Por último, la haptoglobina se combina con hemo libre para facilitar el reciclaje de los grupos hemo y prevenir daños tisulares. Moon *et al.* (2014) han descrito aumentos en la expresión de haptoglobina (HP-1) en ejemplares de *Paralichthys olivaceus* infectados. Los incrementos en la transcripción de HP-1 en *S. senegalensis* se podrían relacionar con la reducción en la disponibilidad de hierro para el patógeno. En resumen, además de su papel en el metabolismo del hierro en el propio hospedador, TF, FERR-M, HAMP-1 y HP1 poseen un papel relevante en la defensa ante infecciones frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*, al crear un ambiente limitante de hierro para el patógeno tal y como han descrito diversos autores en estudios llevados a cabo en peces (Neves *et al.*, 2009; Mosca *et al.*, 2014). No obstante, cabe señalar que niveles bajos de hierro pueden provocar efectos adversos en el hospedador y contribuir a que la infección resulte en mortalidades tal y como se ha observado en los ejemplares infectados por vía IP. Skugor *et al.* (2008) encontró una mayor susceptibilidad a sufrir furunculosis en especímenes de *Salmo salar* con sobreexpresión de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro.

Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSPs) participan en la respuesta de fase aguda y han sido propuestas como reguladores de la respuesta inmune frente a patógenos

microbianos (Sung y MacRae, 2011). En el presente trabajo únicamente se detectó un leve incremento en la transcripción génica de HSP70 en riñón anterior de lenguados infectados IP. Estudios con ejemplares de *D. labrax* infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* no mostraron variaciones significativas en la transcripción del gen HSP70 en bazo, timo y riñón cefálico, mientras que este gen aumentó su transcripción tras la infección con *Listonella anguillarum* (Mosca *et al.*, 2014). En cuanto a los genes HSP90, nuestros resultados indican ausencia de inducción por parte de HSP90AA tras la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*, cuya transcripción se induce en ejemplares de *S. senegalensis* sometidos a choque térmico (Manchado *et al.*, 2008); sin embargo, se ha descrito una regulación de los genes HSP90 distinta dependiendo del patógeno (Xie *et al.*, 2015). Tanto HSP70 como HSP90 pueden bloquear las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis al interferir con la activación de las caspasas (Lanneau *et al.*, 2008). Niveles bajos de inducción de HSP70 y HSP90AA, junto con el incremento en la transcripción de componentes inflamatorios como NCCRP-1 y TNF α podrían sugerir que un proceso apoptótico similar al descrito por Do Vale *et al.* (2003) en macrófagos y neutrófilos de *D. labrax* tendría lugar en los primeros instantes tras la infección de *S. senegalensis* por *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Por último, GP96 está implicada en la respuesta inmune adaptativa gracias a su papel en el proceso de presentación de antígenos (Basu *et al.*, 2000; Strbo y Podack, 2008). El incremento en la transcripción del gen GP96 (conocido también como GRP94) detectado en los ejemplares de *S. senegalensis* infectados vía IP, podría contribuir a amplificar la respuesta inflamatoria de acuerdo con Mrakovic-Sutic *et al.* (2008), el cual sugiere que la GP96 extracelular contribuye a crear un ambiente pro-inflamatorio, ayudando a la maduración de las células presentadoras de antígeno. Esta suposición podría estar apoyada por el título superior de anticuerpos detectado en los ejemplares del grupo IP comparado con el de IM. Los niveles de anticuerpos obtenidos mediante el análisis ELISA demuestran la eficacia de ambas rutas de infección para que el patógeno produzca una respuesta inmune específica. No obstante, el nivel de anticuerpos superior observado en los peces infectados IP podría estar relacionado con la activación del sistema inmune innato y su interacción con la inmunidad adaptativa vía células presentadoras de antígeno, como otros autores han propuesto para otros patógenos (Evans *et al.*, 2004; Ispir y Dorucu, 2014).

Discusión

De esta forma, tras la infección de *S. senegalensis* con *P. damsela* subsp. *piscicida* por ambas vías IP e inmersión, se han activado componentes del sistema inmune similares; sin embargo la respuesta inmune se ha centrado principalmente en el riñón anterior en los ejemplares infectados vía IM, mientras que la participación del hígado ha sido más importante en la inoculación IP. Las diferencias en las tasas de mortalidad podrían deberse a la interacción con los componentes del sistema inmune a nivel de las mucosas en la infección por inmersión además de a una mayor diseminación del patógeno al ser inoculado vía IP en comparación con la inmersión. Los resultados obtenidos muestran que la infección por vía IP en *S. senegalensis* produce un incremento en la transcripción relativa de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (LYS-G, TNF α y NCCRP-1) y disponibilidad de hierro (HP-1 y FERR-M). Aunque la inflamación media en la respuesta antibacteriana y la actividad de linfocitos T y B de la respuesta adaptativa, éstos quizá podrían tener efectos negativos para el hospedador. Los incrementos en la transcripción génica de HP-1 y FERR-M observados en los individuos infectados IP podrían estar relacionados con una mayor deficiencia de hierro para el hospedador, estrategia que, a pesar de su papel defensivo frente a multitud de patógenos bacterianos, puede llegar a resultar dañina para el hospedador. No obstante, se necesitan más estudios para establecer la relación entre la mortalidad observada en *S. senegalensis* y la reducción en la disponibilidad de hierro en el animal.

Finalmente, la modulación de la respuesta inmune de los ejemplares infectados del grupo IP fue más duradera para la mayoría de los genes ensayados, mientras que en los ejemplares del grupo IM las respuestas más duraderas se observaron solo en la transcripción de LYS-G, TF, GP96, HSP90AB y NCCRP-1 a nivel renal y en la transcripción hepática de TRAF-3. Aunque aún son necesarios más análisis para la comprensión de los mecanismos activados durante la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*, los resultados mostrados contribuyen a ampliar el conocimiento de los componentes implicados en el desarrollo de la respuesta protectora frente a este patógeno en *S. senegalensis*.

2. RESPUESTA INMUNE DE *S. senegalensis* A LA VACUNACIÓN FRENTE A *P. damsela* SUBSP. *piscicida*

2.1. Transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en los peces vacunados

Los resultados obtenidos muestran una modulación diferente de la transcripción génica dependiendo del órgano analizado en respuesta a la vacunación. De esta forma, la administración de la vacuna por vía intraperitoneal junto con el AIF ha dado lugar a cambios significativos en la transcripción de los genes C1q, TNF α , HP-1, HSP70 y especialmente C7, C9, LYS-C1 y TF, mientras que en los peces del grupo IM no se observaron cambios significativos en la transcripción de estos genes. El sistema del complemento tiene un papel esencial en la eliminación de microorganismos patógenos (Sunyer y Lambris, 1998; Gal *et al.*, 2007; Korotaevskiy *et al.*, 2009), en la inducción de procesos inflamatorios, eliminación de células apoptóticas y la modulación de la respuesta inmune adaptativa (Le Friec y Kemper, 2009). Cabe destacar que los incrementos significativos en la transcripción del gen C1q sólo se observaron en los peces vacunados IP, grupo con mayor grado de protección frente al patógeno. La actividad del componente C1q del sistema del complemento es crucial por su papel en el reconocimiento de patógenos a través de su unión a complejos inmunes (Matsushita *et al.*, 2004), en la activación de la vía clásica del complemento (Kishore y Reid, 2000), la neutralización vírica (Kishore *et al.*, 2004), la fagocitosis (Tahtouh *et al.*, 2009) y la migración celular (Bohlson *et al.*, 2007). Además, conecta la respuesta inmune innata con la adaptativa mediante la modulación de las células presentadoras de antígenos, linfocitos B y fibroblastos (Sunyer *et al.*, 2003; Kishore *et al.*, 2004). Por otra parte, la activación de los componentes C7 y C9 del complemento permite la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), responsable de la muerte bacteriana mediante la disrupción de sus membranas (Katagiri *et al.*, 1999). En este sentido, la ausencia de mortalidad en los ejemplares vacunados vía IP sugiere un importante papel del sistema del complemento en la respuesta protectora desarrollada después de una vacunación IP con AIF + vacuna frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Por otro lado, el hecho de que sólo se haya observado aumento en la transcripción de los genes que codifican para los componentes del complemento en el riñón anterior de *S. senegalensis* indica que, al igual que otras bacterias gram negativas en la corvina japonesa (*Larimichthys crocea*) (Guo *et al.*, 2016), *P. damsela* subsp. *piscicida* activa de manera

Discusión

más efectiva los componentes del complejo MAC en el riñón cefálico de peces que en el hígado.

La transcripción del gen que codifica para LYS-C puede ser modulada por patógenos de peces y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Ponce *et al.*, 2011). En este sentido, se ha descrito su sobreexpresión tras infecciones bacterianas e inoculación de LPS en *S. senegalensis* (Fernández-Trujillo *et al.*, 2008). En el presente estudio, la modulación de la transcripción génica de LYS-C observada en los ejemplares vacunados vía IP puede ser mediada por los PAMPs presentes en los ECPs o la bacterina de *P. damsela* subsp. *piscicida* o por un efecto sinérgico con el adyuvante, hecho que ya fue observado por Jiang *et al.* (2015). Los aumentos de la transcripción génica de LYS-C1 tras una infección bacteriana sugieren, al igual que para otros patógenos (Zhang *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012), un importante papel en la defensa frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* por parte de este tipo de lisozima. Además, su importancia está apoyada por la sobreexpresión observada en el grupo vacunado IP, con datos de supervivencia superiores tras la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Diversos estudios han señalado altos niveles de este tipo de lisozima tanto en hígado y riñón cefálico de peces sometidos a infección por patógenos bacterianos (Ye *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016); sin embargo, en el presente trabajo, los ejemplares de *S. senegalensis* sólo han aumentado la transcripción del gen LYS-C1 a nivel del riñón cefálico en respuesta a la vacunación IP.

La proliferación y supervivencia de los patógenos en el hospedador requiere mecanismos que compitan por la adquisición de hierro (Do Vale *et al.*, 2002; Osorio *et al.*, 2006). La modulación de la transcripción de genes relacionados con la homeostasis del hierro fue diferente en el riñón cefálico de peces vacunados vía IP e IM, con incrementos significativos de los genes HP-1 y TF en el grupo IP. Sin embargo, la transcripción de HAMP-1 aumentó en el riñón cefálico tanto de los peces IP como IM.

La hepcidina posee una función dual en teleósteos: participa en el mantenimiento de la homeostasis del hierro y en el control de las infecciones gracias a sus propiedades bactericidas (Rodrigues *et al.*, 2006; Pereiro *et al.*, 2012). De esta forma, ayuda al sistema inmunitario a acabar con el patógeno y contribuye a la disminución de los niveles de hierro en sangre (Mosca *et al.*, 2014). Por otra parte, la transferrina posee actividad quelante de hierro, mientras que la haptoglobina se combina

con la hemoglobina facilitando el reciclaje hepático de los grupos hemo. A estas dos proteínas se les puede atribuir un importante papel en el control de la fotobacteriosis en *S. senegalensis*, teniendo en cuenta la capacidad del patógeno para emplear la hemoglobina como única fuente de hierro (Magariños *et al.*, 1994c) y el carácter de la transferrina como proteína de fase aguda en infecciones de *P. damsela* subsp. *piscicida* en otras especies de peces (Neves *et al.*, 2009). En este sentido, cabe destacar el incremento en la transcripción de TF observado tras la vacunación por vía intraperitoneal, efecto opuesto al observado por autores como Neves *et al.* (2009) en lubinas infectadas con *P. damsela* subsp. *piscicida*. La transferrina ha sido descrita como proteína de fase aguda tanto de tipo positivo como negativo (Bayne & Gerwick, 2001). En el caso de la vacunación de *S. senegalensis*, el incremento en los niveles de transferrina puede contribuir a disminuir el hierro disponible para el patógeno a la vez que a la movilización del hierro hacia órganos hematopoyéticos como el riñón anterior (Reyes-Becerril *et al.*, 2016). Además, es de destacar el papel descrito en otras especies piscícolas para la transferrina como activador de la respuesta de los macrófagos, con la consiguiente producción de óxido nítrico e incremento de su actividad fagocítica (Stafford y Belosevic, 2003; Mohapatra *et al.*, 2017). Así, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la protección frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* podría estar relacionada con la capacidad de los peces de mantener niveles bajos de hierro disponible.

Por último, las proteínas de choque térmico (HSPs) participan en la respuesta de fase aguda, y han sido propuestas como reguladores inmunológicos frente a la infección por microorganismos patógenos (Warger *et al.*, 2006; Sung y MacRae, 2011). La HSP70 tiene un papel relevante como regulador de distintos eventos celulares que promueven la supervivencia celular frente a situaciones de estrés como son las infecciones bacterianas (Zeng *et al.*, 2014).

En resumen, los resultados obtenidos muestran un mejor estado inmunológico de los ejemplares vacunados por vía IP, los cuales son capaces de hacer frente a una infección de *P. damsela* subsp. *piscicida*. La identificación de genes que puedan predecir la protección conferida por una vacunación representa una alternativa atractiva para reducir el uso de animales en experimentos y aumentar el bienestar animal. Plotkin (2010) define como indicador de protección a la respuesta inmune producida tras una vacunación y que sustituye a la respuesta específica, pero quizás desconocida, que

Discusión

confiere protección. Si bien esta aproximación se ha usado tradicionalmente en humanos, Bridle *et al.* (2012) identificaron un conjunto de marcadores constituido por 17 genes como indicador de la protección frente a infecciones por *Yersinia ruckeri* en salmón atlántico. En base a nuestros resultados, se propone el conjunto de marcadores constituido por los genes LYS-C1, HAMP-1, TF, HP-1, HSP70 y los genes del sistema del complemento C1q, C3, C4, C7, C9. Estos marcadores podrían actuar como indicadores de la protección frente a la fotobacteriosis y permitir predecir el éxito de la vacunación IP (empleando AIF + vacuna frente a *P. damselae* subsp. *piscicida*) antes de una infección. De todas formas, son necesarios más experimentos para poder corroborar esta propuesta.

En base a los resultados obtenidos, se consideró interesante llevar a cabo la evaluación de la expresión de los mismos genes en aquellos peces que sobrevivieron a la infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*.

2.2. Transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en los peces supervivientes a la infección con *P. damselae* subsp. *piscicida*

La transcripción génica de los ejemplares supervivientes de *S. senegalensis* se moduló de manera diferente según el estado previo de vacunación en el que se encontraban los peces. De esta forma, aunque la vacunación no modificó la transcripción de LYS-G, la infección posterior con *P. damselae* subsp. *piscicida* produjo, al igual que se ha descrito en otras especies piscícolas sometidas a infección (Jimenez-Cantizano *et al.*, 2008; Buonocore *et al.*, 2014), un incremento en la transcripción génica, correspondiendo los valores más elevados a los ejemplares no vacunados. La mayoría de las lisozimas tipo G no poseen péptido señal, lo que sugiere la localización intracelular de la proteína (Irwin & Gong, 2003; Ponce *et al.*, 2011; Buonocore *et al.*, 2014). Por otro lado, aunque se ha descrito el aumento de la transcripción de LYS-G tras la inoculación de LPS (Buonocore *et al.*, 2014), esta sobreexpresión puede estar ausente en infecciones por patógenos no invasivos como *V. harveyi* y, en cualquier caso, es superior en las infecciones provocadas por patógenos intracelulares como *Francisella noatunensis* y *Edwardsiella tarda* (Seppola *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2013; Mohanty & Sahoo, 2010). En el presente trabajo, la ausencia de sobreexpresión tras la vacunación con *P. damselae* subsp. *piscicida* junto con el

incremento de la transcripción de LYS-G tras la infección, señala el papel de la invasión intracelular en la inducción de LYS-G. Así, mientras que la bacterina no es capaz de invadir las células del pez, las bacterias viables pueden penetrar en ellas e inducir la transcripción de LYS-G. En este contexto, una débil sobreexpresión de los peces infectados que fueron vacunados por vía IP comparada con los no vacunados podría explicar la menor invasión bacteriana esperada tras la vacunación IP.

Del mismo modo, todos los peces supervivientes presentaron aumentos en la transcripción del gen que codifica para la proteína de reconocimiento de peptidoglicano (PGLYRP1) en el riñón cefálico, si bien los incrementos mayores correspondieron a los ejemplares no vacunados, seguidos de los grupos IM e IP. La respuesta inmune específica ante los patógenos es coordinada y dependiente de la activación de receptores específicos de patógenos presentes en leucocitos como los macrófagos. La proteína PGLYRP1 juega un papel clave en la inmunidad de mamíferos debido a su capacidad de modular la inmunidad innata a través del reconocimiento de PAMPs y la actividad microbiocida (Tydell *et al.*, 2006), por lo que cabría pensar que en peces pudiera desempeñar un papel similar.

Nuestros resultados muestran un aumento en la transcripción génica de interleucinas inflamatorias como IL-6, IL-8 e IL-1 β superior en el hígado en comparación con el riñón anterior en los peces no vacunados. Además, como señalan algunos autores para otras especies (Pressley *et al.*, 2005; Ishibe *et al.*, 2009), en los ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida*, tanto no vacunados previamente como vacunados IM, aumentó la transcripción del gen que codifica para TNF α . Roca *et al.* (2008), han demostrado que las células endoteliales de los peces son la diana principal del TNF α , induciendo la expresión de selectina E y de quimioquinas. Esto sugiere que esta citoquina participa principalmente en el reclutamiento de fagocitos más que en su activación. La respuesta pro-inflamatoria podría ser mayor en el hígado debido a la sobreexpresión de IL-1 β y caspasa-1, especialmente notoria en los peces sin vacunar. La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria (Secombes *et al.*, 2001) que puede inducir la liberación de otras citoquinas capaces de activar a células del sistema inmune tanto innato como adaptativo, como macrófagos, linfocitos y células citotóxicas (Apte *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008). Por otra parte, el inflammasoma es un complejo celular multiproteico que responde a distintos estímulos tales como señales de daño y estrés

Discusión

causado por patógenos, produciéndose una activación directa de la caspasa 1 y la posterior inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Lai y Gallo, 2009). En nuestro estudio, la sobreexpresión combinada de los genes CASP1, IL-1 β , IL-6 e IL-8 podría indicar, de acuerdo con Costas *et al.* (2014) la activación de distintas citoquinas pro-inflamatorias por parte de la caspasa 1. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una importante sobreexpresión de los genes relacionados con la respuesta inflamatoria frente a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida*, tanto en hígado como en riñón cefálico que podría ser mitigada por una vacunación previa, especialmente empleando la ruta IP.

Los incrementos en la transcripción de genes que codifican para las caspasas 8 y 9 detectados en hígado de todos los peces infectados podrían estar relacionados con la sobreexpresión de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias, especialmente en el hígado. Por otro lado, una de las funciones del proceso inflamatorio es promover la migración de leucocitos, incluyendo fagocitos. *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de inducir la apoptosis mediada por caspasas de forma selectiva en macrófagos y neutrófilos (Do Vale *et al.*, 2007; Costa-Ramos *et al.*, 2011) a través de la exotoxina Aip56, la cual se encuentra codificada en un plásmido (Silva *et al.*, 2010). Los niveles de transcripción de genes relacionados con la inflamación superiores en el hígado podrían indicar un mayor número de células diana para Aip56 en este órgano, originado un efecto tóxico superior en el hígado.

El MHC de clase I juega, junto con el de clase II, un papel central en el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos a través de la interacción con sus receptores (Ferrareso *et al.*, 2016), iniciando la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares y ayudando a los linfocitos citotóxicos a reconocer y eliminar células que presentan sobre su superficie péptidos bacterianos (Fischer *et al.*, 2006). La sobreexpresión del gen MHC I observada en todos los peces supervivientes a la infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* podría ser el resultado de la respuesta inmune citotóxica que promueve la eliminación de células apoptóticas. Sin embargo, este punto necesita ser estudiado en mayor profundidad, ya que la transcripción de MHC I no se ha acompañado de un incremento en la transcripción de CD8 α . Además, la regulación del gen que codifica para MHC I observada en el hígado de los peces sin vacunar podría indicar una posible inmunosupresión, ya que la función de las moléculas MHC I es la presentación de péptidos intracelulares procesados ante los linfocitos T

CD8⁺ (Dirscherl *et al.*, 2014). En este contexto, las infecciones provocadas por diversos virus y bacterias patógenas inducen la sobreexpresión de MHC I (Fischer *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.*, 2007). Del mismo modo, se han descrito aumentos en la transcripción de CD8 α en infecciones del patógeno intracelular *Edwardsiella tarda* (Yamasaki *et al.*, 2014). Aunque los datos obtenidos en nuestro trabajo no parecen indicar una relación directa entre los niveles de transcripción de los genes MHC I y CD8 α , podría sugerirse que la sobreexpresión de MHC I, tanto en riñón cefálico como hígado en el grupo IP, incrementaría la cantidad de los productos de estos genes, promoviendo el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8⁺ de los antígenos intracelulares procesados de *P. damselae* subsp. *piscicida*. Este hecho podría contribuir a la ausencia de mortalidad en los peces IP en comparación con los otros grupos infectados por el patógeno. En este sentido, los ejemplares vacunados vía IM no mostraron represión del gen MHC I al contrario que los peces sin vacunar, que fueron los que a la postre presentaron unos niveles de mortalidad más elevados.

La proteína receptora de células citotóxicas no específicas (NCCRP-1) es capaz de reconocer antígenos NKTag expresados por células parasitadas o tumorales (Jaso-Friedmann *et al.*, 1997) y en último término causar su lisis mediante la activación de una cascada de eventos en los que participan citoquinas (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001). El notable incremento de la transcripción del gen NCCRP-1 en hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* no vacunados podría estar asociado con el carácter intracelular de *P. damselae* subsp. *piscicida* (López-Dóriga *et al.*, 2000) y la respuesta citotóxica mediada por NCCRP-1. Los peces vacunados IM presentaron sobreexpresión de este gen tanto en hígado como en riñón anterior, aunque estos incrementos fueron inferiores a los detectados en los ejemplares no vacunados.

En relación a los genes que codifican componentes implicados en la homeostasis del hierro, la sobreexpresión de los genes que codifican para la hepcidina (HAMP-1) y haptoglobina (HP-1) observada en los ejemplares sin vacunar de *S. senegalensis* infectados con *P. damselae* subsp. *piscicida* corrobora la situación de limitación de disponibilidad de hierro descrita en infecciones de *P. damselae* subsp. *piscicida* en *D. labrax* (Mosca *et al.*, 2014), *S. aurata* (Pellizzari *et al.*, 2013) y *S. senegalensis* (epígrafe 1 de la presente discusión).

Discusión

En los ensayos de infección de *S. senegalensis* con dosis subletales de *P. damsela* subsp. *piscicida* se observó aumento de la transcripción del gen que codifica para transferrina a los 30 días de la inoculación tanto en hígado como riñón anterior (epígrafe 1 de la presente discusión). Por el contrario, en los lenguados analizados tras 15 d de la infección, los ejemplares sin vacunar presentaron sobreexpresión en el riñón mientras que en el hígado se observó una ligera disminución en la transcripción de TF. Este resultado podría indicar un mayor daño a nivel hepático en los peces sin vacunar debido a la dosis bacteriana superior inoculada en el ensayo de vacunación. En consecuencia, los elevados niveles de transferrina podrían dificultar adquisición de hierro por parte del patógeno de forma más eficiente en el caso de la infección con una dosis inferior de patógeno (Fouz *et al.*, 1997). Además, la transferrina permitiría al animal recuperarse de la situación de anemia asociada a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida* (Neves *et al.*, 2009) así como promover la activación de macrófagos que contribuirán también a la eliminación del patógeno (Stafford y Belosevic, 2003). Por otro lado, la haptoglobina es capaz de combinarse con la hemoglobina para facilitar el reciclaje de los grupos hemo en el hígado y prevenir daños tisulares. El incremento en la transcripción de HP-1 en el riñón cefálico de los ejemplares IP podría permitir a estos peces emplear el hierro a partir de los grupos hemo y a su vez impedir su uso por parte del patógeno. Por otro lado, la represión hepática del gen que codifica la transferrina en los ejemplares sin vacunar y vacunados IM, junto a una menor inducción en el riñón cefálico del grupo sin vacunar en comparación con el grupo IP sugiere un importante papel de la transferrina en la defensa ante la fotobacteriosis, facilitándose probablemente la supervivencia del patógeno en el hígado con menor transferrina. Esta situación podría ser el resultado de una mayor proliferación bacteriana en los ejemplares IM y sin vacunar, pudiendo estar relacionada con los niveles de transcripción más elevados de los genes relacionados con la respuesta inflamatoria y apoptosis previamente descritos.

La sobreexpresión de los genes HSP70 y HSP90 ha sido relacionada con la reducción de la apoptosis en diferentes tipos celulares debido al bloqueo de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis al interferir las proteínas de choque térmico con la activación de las caspasas (Lanneau *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2014a). En este contexto, el incremento en la transcripción de genes en el riñón cefálico fue mayor que en el hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* supervivientes. Los aumentos en la

transcripción de los genes que codifican las distintas HSPs podrían ser una respuesta ante el daño celular producido en hígado y riñón cefálico a causa de la infección por *P. damselae* subsp. *piscicida*.

En resumen, la infección de ejemplares de *S. senegalensis* causada por *P. damselae* subsp. *piscicida* está asociada a una respuesta inflamatoria tardía y a un incremento de la transcripción del gen de la lisozima G. Tanto la supervivencia a la infección por *P. damselae* subsp. *piscicida* como la vacunación IP con la bacterina enriquecida en ECPs empleada, resultan en la modulación de la transcripción del mismo conjunto de genes, dando validez al grupo de marcadores propuestos en el presente trabajo. Por otro lado, en los ejemplares infectados se ha observado también una respuesta inflamatoria. La mayor resistencia a la enfermedad de los ejemplares IP podría estar relacionada con una respuesta inflamatoria menor, reducción de la disponibilidad de hierro para el patógeno y mayor procesamiento de antígenos del MHC I.

3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS EXPRESADAS POR *P. damselae* SUBSP. *piscicida* EN *S. senegalensis*

Los estímulos causados por el ambiente circundante modulan la expresión génica de los organismos. En consecuencia, las bacterias que invaden a un hospedador deben adaptarse a un ambiente *in vivo*, aumentando o reprimiendo la expresión de diversos genes. En el caso de los patógenos, la identificación de genes cuya regulación se ve modificada en condiciones *in vivo* podría dar una visión de los genes más relevantes en la virulencia bacteriana (Li *et al.*, 2013b).

La metodología IVIAT permite la identificación de antígenos inmunogénicos expresados únicamente durante la fase de infección. Además, al contrario de otras técnicas, en la técnica IVIAT no es imprescindible realizar infección experimental en animales, sino que únicamente precisa del suero de individuos que ya han sufrido la enfermedad. Esta técnica ya ha sido empleada para identificar antígenos inducidos *in vivo* de diversos patógenos, principalmente en humanos y ganado (Hang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013b). Hasta el momento, son escasos los estudios que han aplicado esta técnica a la identificación de antígenos en patógenos de peces (Jiao *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012; Menanteau-Ledouble *et al.*, 2014; Menanteau-Ledouble y El-Matbouli, 2016); no obstante, se ha llegado a diseñar una vacuna ADN contra *E. tarda* (Sun *et al.*, 2012). Sin

Discusión

embargo, aún no se ha realizado ningún estudio con *P. damsela* subsp. *piscicida* ni *S. senegalensis*.

En el presente trabajo, se elaboró una genoteca de expresión de la cepa Lg41/01 de *P. damsela* subsp. *piscicida*, y se evaluó su reactividad frente a una mezcla de sueros procedentes de ejemplares de *S. senegalensis* que superaron la infección con el patógeno. Un total de 18 clones mostraron reactividad, indicando que estas proteínas son expresadas por *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección en el pez. Además, 5 proteínas reaccionaron frente al suero adsorbido de los lenguados, lo que pone de manifiesto su carácter inducible *in vivo*. Estas proteínas identificadas están implicadas en funciones tales como división y replicación celular, transporte y metabolismo, reciclado de la pared celular, actividad antioxidativa e incorporación de hierro, entre otras. Aunque la expresión de genes bacterianos *in vivo* no es similar en todas las especies piscícolas, y se podrían esperar diferencias entre hospedadores, cabe señalar la identificación de la subunidad B de la ADN girasa a partir de su inmuno-reactividad con suero de ejemplares de *Rachycentron canadum* procedentes de un brote de fotobacteriosis (Ho *et al.*, 2011). Del mismo modo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la expresión de esta proteína por *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección en *S. senegalensis*. La subunidad B de la ADN girasa es una topoisomerasa de tipo II que participa en el superenrollamiento negativo del ADN bicatenario circular a través de un mecanismo dependiente de ATP para modular la topología del ADN y mantener los cromosomas con un superenrollamiento negativo (Collin *et al.*, 2011). Esto permite que tengan lugar procesos celulares que suponen la separación de hebras, como la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Igualmente, la proteína RdgC asociada a recombinación es otra proteína localizada en el citoplasma, que participa en la recombinación y reparación del ADN y se ha detectado en nuestro estudio como inmunogénica y expresada por *P. damsela* subsp. *piscicida* en ejemplares de *S. senegalensis*.

Además, se han detectado dos transglicosilasas (lítica y de mureína) con localización posible en la membrana externa expresadas durante la infección de *S. senegalensis*. Estas proteínas rompen el enlace β -1,4 presente entre el ácido N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina del peptidoglicano, degradando la pared celular en el periplasma localizado entre la membrana externa e interna. Las transglicosilasas líticas son responsables de la creación de un espacio dentro del sáculo del peptidoglicano para

llevar a cabo funciones de biosíntesis y reciclado, división celular e inserción de estructuras tales como flagelos y sistemas de secreción. Además, participan en la resistencia a antibióticos a través de la síntesis de mensajeros secundarios para controlar la expresión de β -lactamasas y en la liberación de factores de virulencia en forma de patrones moleculares asociados al patógeno derivados del peptidoglicano (Artola-Recolons *et al.*, 2014). Por lo tanto, dada su importancia en el metabolismo de la pared celular, las transglicosilasas líticas podrían constituir dianas para el desarrollo de nuevas vacunas contra *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Así mismo, se han detectado proteínas inmunogénicas expresadas por *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección en *S. senegalensis* implicadas en el metabolismo de aminoácidos, transferencia de grupos aminos e incorporación de carbohidratos del ambiente extracelular. La expresión de tres proteínas incluidas en esta categoría funcional se ha detectado en *P. damsela* subsp. *piscicida* sólo durante la infección de *S. senegalensis*, por lo que se han considerado antígenos inducidos *in vivo* o proteínas IVIAT. Entre estas proteínas se han identificado la alanil-ARNt sintetasa, serina hidroximetil transferasa e inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa. La transcripción de estos genes no resultó modulada cuando el patógeno se desarrolló bajo condiciones de estrés oxidativo o limitación de hierro; sin embargo, durante la incubación del mismo en un ambiente como el riñón cefálico de *S. senegalensis* se observó un aumento en su transcripción génica relativa. Este resultado podría corroborar el carácter IVIAT de las proteínas codificadas por los genes *alars*, *shtm* e *impdh* de *P. damsela* subsp. *piscicida*, indicando la expresión *in vivo* de genes del patógeno que participan en el metabolismo energético y el uso de fuentes alternativas de energía durante la interacción con el hospedador. No obstante, siempre se ha de considerar la confirmación mediante ensayos *in vivo*. La predicción de una localización citoplasmática para estas proteínas y su detección como proteínas inmunogénicas podría estar relacionada con la capacidad de los macrófagos y otras células fagocíticas para reconocer e internalizar al patógeno, los cuales podrían llevar a cabo la lisis bacteriana, el procesado y la presentación de componentes celulares a los linfocitos. Además, las células bacterianas podrían ser destruidas por componentes del sistema inmune de *S. senegalensis* como el complemento, cuyos genes han aumentado sus niveles de transcripción tras la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida* en los ensayos llevados

Discusión

a cabo en el presente trabajo. Como consecuencia, se liberarían los contenidos celulares bacterianos y podrían actuar como proteínas inmunogénicas.

La alanil-ARNt sintetasa pertenece a las aminoacil-ARNt sintetetas (AaRS), enzimas esenciales que unen aminoácidos a moléculas de ARNt. Además de su papel en la biosíntesis proteica, la alanil-ARNt sintetasa participa en la aminoacilación de polipéptidos en ribosomas bloqueados, haciendo posible el reciclado de estos ribosomas mediante la adición de etiquetas que inducirán la proteólisis de los polipéptidos. Esta actividad está considerada un mecanismo de adaptación bacteriana a condiciones de estrés (Keiler, 2015). Herbert *et al.* (2002) observó disminución de la supervivencia en ratas de un mutante de *Haemophilus influenzae* con la actividad de alanil-ARNt sintetasa suprimida, sugiriendo que esta actividad es esencial para el organismo en un ambiente *in vivo*. Las AaRS participan también en numerosos procesos que son regulados a través de sus productos, el ARNt cargado, estando documentado el control de la expresión de operones biosintéticos de aminoácidos a través de la aminoacilación del ARNt *in vivo* (Putzer *et al.*, 1995; Bullwinkle y Ibba, 2016). De manera similar, aunque detectada *in vitro*, *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de expresar la proteína metiltransferasa del ARNr 23S durante la infección en *S. senegalensis*. Esta actividad, responsable de la metilación de la adenina en el ARNr 23S, juega un papel fundamental en los mecanismos de corrección en el centro peptidil transferasa, contribuyendo a la fidelidad de la función ribosómica (Baldrige y Contreras, 2014). Por lo tanto, la contribución de esta proteína para evitar errores durante la síntesis proteica debe ser tenida en cuenta.

Por su parte, la serina hidroximetil transferasa, otro antígeno inducido en *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección de *S. senegalensis*, cataliza la conversión reversible de la serina y la glicina usando tetrahidrofolato (THF) como transportador de carbono. Esta reacción constituye la principal fuente de carbono necesario para la biosíntesis de purinas, timidilato y metionina, entre otras biomoléculas importantes. Estudios con mutantes miniTn5 de *Brucella suis* indican que el gen de la serina hidroximetil transferasa (*glyA*) de *B. suis* es necesario para la multiplicación intracelular del patógeno en macrófagos THP-1 de humanos (Kohler *et al.*, 2002). Además, mutantes en *glyA* de *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhimurium* presentan atenuación de la virulencia en ratón (Merrell *et al.*, 2002; Jelsbak *et al.*, 2014). Por otro lado, Bogard *et al.* (2012) informaron sobre la pérdida de capacidad de colonización de mutantes en

el gen *glyA* de *V. cholerae*, considerando a la serina hidroximetil transferasa como un factor de virulencia requerido para la colonización del intestino. Del mismo modo, el interior de *S. senegalensis* podría constituir un ambiente en el que la producción de glicina o conversión de la misma a THF sería esencial para la supervivencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*, necesitando el patógeno, de esta forma, aumentar la transcripción del gen de la serina hidroximetil transferasa. Estos resultados sugieren que esta proteína podría ser una nueva diana a considerar para el control de la fotobacteriosis.

La inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (Impdh) se encuentra ampliamente distribuida y está implicada en el metabolismo de nucleótidos de purina. Esta actividad enzimática cataliza la conversión de la inosina-5'-monofosfato a xantosina-5'-monofosfato produciendo una reducción de NAD a NADH. Impdh participa en el primer paso de la síntesis de guanosina-5'-trifosfato y desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Chiu *et al.*, 2011; Alexandre *et al.*, 2015). Aunque su papel en la virulencia en teleosteos aún es desconocido, se ha descrito la presencia de anticuerpos frente a Impdh de *Lactococcus garviae* en *Paralichthys olivaceous* (Shin *et al.*, 2009). En el presente trabajo, se ha observado la inducción de la expresión del gen *impdh* en *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la incubación *ex vivo* con células de riñón cefálico de *S. senegalensis*. El papel de la proteína Impdh como factor de virulencia ya ha sido descrito en diversas especies entre las que se encuentran *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Riemerella anatipestifer* (Zhang *et al.*, 1999; Kerr *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2009) detectaron una atenuación de la virulencia de mutantes de *S. suis* tipo 2 que carecían del gen *impdh* en varios modelos animales, y los estudios de Zhou *et al.* (2014) señalan la implicación de la proteína Impdh en la adhesión e invasión de *S. suis* serotipo 2 a líneas celulares. En este sentido, Impdh ha sido identificada como un receptor de plasminógeno (PlgR) en la superficie de *Staphylococcus aureus*. El plasminógeno unido a *S. aureus* puede ser convertido a plasmina por el activador de plasminógeno (PA) del hospedador o por el PA de *Staphylococcus*, facilitando la penetración bacteriana en los tejidos (Mölkänen *et al.*, 2002). Al igual que en *S. aureus*, la proteína Impdh de *P. damsela* subsp. *piscicida* podría favorecer la penetración del patógeno en los tejidos durante la infección.

Discusión

Se han identificado dos clases de Impdh bacterianas: la clase I con una organización octamérica y cinética cooperativa, y la clase II, que puede ser tanto tetramérica como octamérica, y exhibe una cinética enzimática micelaiana (Alexandre *et al.*, 2015). Las proteínas Impdh de bacterias Gram-negativas pertenecen a la clase I, mientras que las Impdh de clase II se pueden encontrar tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Por otra parte, únicamente las Impdh de clase II se prevé que existan en eucariotas, que además, poseen características cinéticas y sensibilidad a inhibidores diferentes (Zhang *et al.*, 1999; Hedstrom y Gan, 2006; Hedstrom, 2009). Así, las diferencias en las propiedades cinéticas y en la sensibilidad a los inhibidores permiten interferir con la Impdh bacteriana sin que ello ocurra con la Impdh propia del hospedador. El importante papel que desempeña la Impdh en la regulación de los nucleótidos de guanina intracelulares lleva a considerar que los inhibidores de Impdh podrían ser una estrategia prometedora en el desarrollo de antimicrobianos de amplio espectro (Makowska-Gryśka *et al.*, 2016). En este sentido, se ha observado reducción de la actividad Impdh en *V. parahaemolyticus* tratado con péptidos antimicrobianos catiónicos (Chiu *et al.*, 2011).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son componentes importantes de la respuesta inmune del hospedador y al mismo tiempo, son señales para los patógenos al indicar que existe contacto con el hospedador (Dubbs y Mongkolsuk, 2012). En este trabajo se ha detectado la expresión por parte de *P. damsela* subsp. *piscicida* de dos proteínas inmunogénicas implicadas en la actividad antioxidante: superóxido dismutasa (Sod) y alquil hidropéroxido reductasa (AhpC). Mientras las condiciones limitantes de hierro sólo indujeron la transcripción de *ahpC*, la transcripción de los genes que codifican ambas proteínas aumentó en las células del patógeno en contacto con las células de riñón cefálico de *S. senegalensis*. Díaz-Rosales *et al.* (2006) observaron bajos niveles de actividad Sod y catalasa en células de *P. damsela* subsp. *piscicida* cultivadas en condiciones limitantes de hierro, siendo estas bacterias más susceptibles a la actividad de los fagocitos de lenguado. Las proteínas AhpC constituyen la subunidad catalítica de una familia de peroxidasas llamadas peroxirredoxinas, o tiol-peroxidasas (familia TPx) (Wang *et al.*, 2013a). Estas enzimas representan un componente importante en la defensa frente a especies oxidantes tales como H₂O₂, peróxidos orgánicos y peroxinitritos. Ambas actividades enzimáticas están implicadas en el control de los niveles de peróxidos de origen endógeno y en la inducción de la respuesta

defensiva frente a aquellos de origen exógeno producidos por el medio ambiente o el hospedador, facilitando la supervivencia bacteriana (Hofmann *et al.*, 2002; Poole, 2005). AhpC se ha relacionado con la virulencia de diversos patógenos entre los que se encuentran *Pseudomonas aeruginosa* (Kaihami *et al.*, 2014), *Salmonella typhimurium* (Hebrard *et al.*, 2009) y *Helicobacter pylori* (Olczak *et al.*, 2003; O'Riordan *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la expresión de AhpC y producción de anticuerpos específicos durante la infección de *P. damsela* subsp. *piscicida* en *S. senegalensis*. La susceptibilidad *in vitro* de *P. damsela* subsp. *piscicida* al estrés oxidativo, permite atribuir un papel relevante al peróxido de hidrógeno en la inactivación del microorganismo (Barnes *et al.*, 1999). Por su parte, Díaz-Rosales *et al.* (2006) observaron mayor resistencia al peróxido en la cepa virulenta Lg41/01 de *P. damsela* subsp. *piscicida* frente a cepas no virulentas. Por lo tanto, puede esperarse que las actividades que se encargan de combatir los radicales peróxido tengan un papel importante en la virulencia del patógeno, especialmente teniendo en cuenta que *P. damsela* subsp. *piscicida* posee la capacidad de invadir fagocitos del hospedador comportándose como un patógeno intracelular facultativo (Elkamel *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2009). Además, la transcripción del gen *ahpC* aumentó al exponer la bacteria a radicales superóxido y peroxinitrito, al igual que al ser incubada *ex vivo* con células de riñón cefálico de *S. senegalensis*. Estos resultados indican que el aumento en la transcripción de *ahpC* por parte del patógeno durante la infección de *S. senegalensis* podría ser una respuesta ante las especies oxidantes producidas por el hospedador. Del mismo modo, se ha observado sobreexpresión de *ahpC* en *Burkholderia pseudomallei* (Jitprasutwit *et al.*, 2014) sometida a condiciones de estrés oxidativo y en *Shigella dysenteriae* en infecciones en cerdos (Kuntumalla *et al.*, 2011). En ratones se ha descrito el carácter inmunogénico de AhpC de *B. pseudomallei* (Reynolds *et al.*, 2015); O'Riordan *et al.* (2012) informaron de la protección frente a *Helicobacter pylori* mediada por IgG en ratones inmunizados con AhpC. Aunque aún son necesarios estudios adicionales para determinar el grado de protección conferido a *S. senegalensis* por la proteína AhpC de *P. damsela* subsp. *piscicida*, el carácter inmunogénico de esta proteína permite considerar su uso como un candidato potencial en la formulación de vacunas para la prevención de la fotobacteriosis.

Entre las proteínas de *P. damsela* subsp. *piscicida* detectadas por la metodología IVIAT se encontró un péptido sintético no ribosómico implicado en la

Discusión

síntesis de la piscibactina. La piscibactina es un sideróforo de tipo fenolato que posee una estructura similar a la de la yersiniabactina (Souto *et al.*, 2012). Además, el clúster de genes *irp* es necesario para la biosíntesis del sideróforo y guarda cierta similitud con la isla de patogenicidad presente en especies del género *Yersinia* y que le otorga una alta virulencia (Osorio *et al.*, 2006; Osorio *et al.*, 2015). Osorio *et al.* (2006) informaron de la expresión del gen *irp2* en cultivos de *P. damsela* subsp. *piscicida* con el quelante de hierro 2,2'-dypiridyl. En el presente trabajo se ha observado también un aumento en la transcripción de *irp1* e *irp2* al incubar la bacteria junto a células de riñón anterior de *S. senegalensis*. El carácter inducible *in vivo* observado para el gen *irp2* podría ser la respuesta de *P. damsela* subsp. *piscicida* ante un ambiente circundante con baja disponibilidad de hierro presente en el pez. La diseminación sistémica del patógeno en el pez sugiere que la bacteria es capaz de hacer frente a un ambiente limitante de hierro dentro del hospedador. De hecho, *P. damsela* subsp. *piscicida* puede incorporar hierro a partir de grupos hemo y hemoglobina como únicas fuentes de hierro *in vitro* (Magariños *et al.*, 1994c; Andreoni *et al.*, 2009). La péptido sintetasa no ribosómica implicada en la síntesis de piscibactina se localiza en la membrana celular (Osorio *et al.*, 2006), por lo que su exposición a los componentes el sistema inmune del pez hace que sea fácilmente reconocible como antígeno, convirtiéndolo en un antígeno a considerar de cara a futuras vacunas.

4. TRANSCRIPCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE *P. damsela* SUBSP. *piscicida* EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Además del análisis de expresión de genes que codifican para las proteínas detectadas mediante la tecnología IVIAT (Impdh, AhpC, Shmt, Alars e Irp2) y tratadas anteriormente, se han estudiado genes implicados en factores de virulencia previamente descritos por distintos autores, tales como la toxina Aip56 (Do Vale *et al.*, 2005), causante de apoptosis en macrófagos de peces; las proteínas Hut B y Hut D, que participan en el transporte de hemina (Osorio *et al.*, 2010); la lipoproteína denominada PDP_0080 implicada en la adhesión de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Andreoni *et al.*, 2013), así como la proteína P53 (Anantharaman y Aravind, 2003), cuya función concreta en *P. damsela* subsp. *piscicida* es aún desconocida pero su estructura posee

similitudes con la familia de proteínas NlpC/P60 presentes en multitud de patógenos invasivos con actividad proteasa en la pared celular.

La exotoxina Aip56 (proteína de inducción de apoptosis de 56 kDa) es un importante factor de virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Esta toxina es el principal producto secretado por la bacteria para evitar la fagocitosis, produciendo la apoptosis de macrófagos y neutrófilos en *D. labrax* (Do Vale *et al.*, 2003; 2005). Esta toxina posee un dominio C-terminal responsable de la unión e internalización de la misma hacia el citosol de células del hospedador (Silva, 2013). La exotoxina parece estar presente en las cepas virulentas de este patógeno, mientras que se encuentra ausente en las avirulentas (Do Vale *et al.*, 2005). El incremento de la transcripción génica en condiciones de limitación de hierro, en presencia de peroxinitrito y en infección *ex vivo* de riñón observado en el presente trabajo podría indicar una mayor expresión de la toxina Aip56 en el hospedador frente a lo observado en los medios de cultivo de laboratorio. Do Vale *et al.* (2005) observaron la actividad apoptótica en experimentos *ex vivo* con fagocitos de *D. labrax* incubados con la toxina Aip56. Está descrito que la toxina activa las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis de fagocitos, induciendo la activación de caspasas-3, -8 y -9, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c al citosol y producción de ROS, entre otros componentes citotóxicos que provocan una necrosis secundaria y daños tisulares en el hospedador (Kawabata *et al.*, 2002; Do Vale *et al.*, 2007; Costa-Ramos *et al.*, 2011; Silva, 2013). La toxina Aip56 posee por lo tanto, la doble funcionalidad de evitar la fagocitosis de la bacteria al disminuir el número de macrófagos y neutrófilos como consecuencia de la apoptosis inducida, y la de dañar los tejidos del hospedador. Así mismo, se ve afectada la producción de citoquinas, perjudicando aún más si cabe la respuesta inmune del hospedador.

El hierro es fundamental para la supervivencia del patógeno. En el caso de *P. damsela* subsp. *piscicida* la expresión de la cápsula de naturaleza polisacáridica es dependiente de la disponibilidad de hierro (Do Vale *et al.*, 2001), encontrándose una correlación positiva entre la administración de hierro y la mortalidad en infecciones por este patógeno en *D. labrax* (Rodrigues y Pereira, 2004). Además de mediante sideróforos como la piscibactina anteriormente mencionados, *P. damsela* subsp. *piscicida* es capaz de incorporar hierro a través de un sistema de transporte de proteínas HutA, TonBExBD, HutBCD y HutWXZ. El patógeno capta y transporta los grupos

Discusión

hemo hasta el periplasma a través del sistema TonB, las proteínas Hut B (proteína periplásmica de unión a la hemina), Hut C (permeasa) y Hut D (ATPasa del sistema de transporte ABC) (Juiz-Río *et al.*, 2005). La inducción de la transcripción de los genes Hut B y Hut D observada en el presente trabajo en condiciones limitantes de hierro así como en células de riñón de *S. senegalensis* indican una regulación mediada por los niveles de hierro, pero no por estrés oxidativo, al menos debido a radicales superóxido o peroxinitrito. Estos datos están en consonancia con los obtenidos por Osorio *et al.* (2010), en cuyos experimentos comprobaron la importancia de la actividad de Hut B y Hut D de *P. damsela* subsp. *piscicida* en la adquisición de hierro a partir de grupos hemo al emplear agentes quelantes de hierro, así como con el aumento de la transcripción de ambos genes durante la infección experimental de alevines de *Psetta maxima*. Estos resultados indican que el patógeno se encuentra en un ambiente con bajos niveles de hierro en el interior del hospedador durante el proceso infeccioso, por lo que induce la expresión de genes implicados en la adquisición de grupos hemo para tomar hierro del hospedador.

La proteína PDP_0080 de *P. damsela* subsp. *piscicida* ha sido descrita recientemente como una lipoproteína implicada en la adhesión de la bacteria a células epiteliales (Andreoni *et al.*, 2013). En el presente trabajo, hemos observado que la transcripción del gen que codifica PDP_0080 no está regulada por los niveles de hierro o estrés oxidativo; Sin embargo, en contacto con las células de riñón cefálico de *S. senegalensis* se incrementa la transcripción relativa de dicho gen. Estos resultados indican que aunque los bajos niveles de hierro o la presencia de especies oxidativas en el hospedador no inducirían la transcripción del gen que codifica PDP_0080, ésta se produciría a consecuencia de otros factores presentes en las células de riñón cefálico. Por ello, cabe atribuir a esta proteína un papel relevante en la patogénesis de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Las lipoproteínas bacterianas poseen una amplia variedad de funciones implicadas en la interacción con el hospedador, englobando la adhesión a las superficies, translocación de factores de virulencia a las células del hospedador, evasión del sistema inmune, colonización, entre otras (Tokuda y Matsuyama, 2004; Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Además, ensayos llevados a cabo en *D. labrax* vacunados con la lipoproteína y posteriormente infectados con *P. damsela* subsp. *piscicida* han mostrado un incremento en el título de anticuerpos específicos frente al patógeno y mayor supervivencia de los ejemplares inmunizados (Andreoni *et al.*, 2013). Los datos

obtenidos hasta el momento apoyan, por tanto, el interés de PDP_0080 de cara al diseño de futuras estrategias profilácticas frente a *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Por último, la proteína P53 ha sido descrita como la segunda proteína más abundante en los productos extracelulares de *P. damsela* subsp. *piscicida*, aunque su función concreta aún es desconocida (Grasso *et al.*, 2011). Esta proteína posee un tamaño de 53 kDa y del análisis de su estructura primaria se ha deducido su pertenencia a la familia de proteínas NlpC/P60, conteniendo un dominio N-terminal NlpC/P60, seguido de un dominio central SH3 y un dominio C-terminal NlpC/P60. La mayor parte de las enzimas NlpC/P60 caracterizadas son endopeptidasas (Xu *et al.*, 2010; 2015). Estas endopeptidasas a través de su acción sobre el peptidoglicano afectan a la división, expansión y diferenciación celular así como la renovación de la pared celular y la secreción de proteínas (Smith *et al.*, 2000).

Las endopeptidasas NlpC/P60 están presentes en una amplia variedad de patógenos bacterianos (Anantharaman y Aravind, 2003). La secuencia amoniocídica de la proteína P53 de *P. damsela* subsp. *piscicida* presenta similitud con proteínas presentes en especies Gram negativas, como *Salmonella enterica*, patógeno especialmente invasivo (Grasso *et al.*, 2011). Así mismo, (Parthasarathy *et al.*, 2012) demostró la necesidad de esta familia de proteínas para la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*. La transcripción del gen que codifica para P53 en *P. damsela* subsp. *piscicida* observada en riñón de *S. senegalensis* así como su inducción en condiciones limitantes de hierro o estrés oxidativo mediado por peroxinitrito podrían indicar un papel relevante de esta proteína en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*.



CONCLUSIONES



1. La infección de *Solea senegalensis* con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, tanto por vía intraperitoneal como por inmersión, induce la transcripción de genes del hospedador que codifican proteínas implicadas en la reducción de la disponibilidad de hierro para el patógeno.

2. En los estadios iniciales de la infección de *S. senegalensis* con *P. damsela* subsp. *piscicida*, tanto por vía intraperitoneal como por inmersión, el hígado es el principal órgano involucrado.

3. En comparación con la inmunización por inmersión, la vacunación con bacterina+ECPs de *P. damsela* subsp. *piscicida* junto con adyuvante incompleto de Freund por inyección intraperitoneal de *S. senegalensis* induce un mayor título de anticuerpos frente al patógeno e incrementa la transcripción de genes que codifican para la lisozima C1, factores del complemento y componentes implicados en el metabolismo del hierro. Todo ello se asocia a una mayor resistencia de los ejemplares a la infección por *P. damsela* subsp. *piscicida*.

4. Se han identificado cinco proteínas inmunogénicas: alanil-ARNt sintetasa, serina hidroximetil transferasa, inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa, alquil hidroperóxido reductasa y la péptido sintetasa no ribosómica Irp2, inducidas en *P. damsela* subsp. *piscicida* durante la infección de *S. senegalensis*. La transcripción de los genes que codifican a las mismas es inducida durante la infección *ex vivo* de riñón de *S. senegalensis*. Por tanto, estas proteínas inmunogénicas se consideran proteínas IVIAT y representan nuevas dianas para el diseño de estrategias profilácticas frente la fotobacteriosis.

5. Los niveles de hierro así como de radicales oxidantes superóxido y peroxinitrito regulan la transcripción de los genes que codifican las proteínas IVIAT alquil hidroperóxido reductasa y la péptido sintetasa no ribosómica Irp2.

Conclusiones

6. Se ha demostrado que la presencia de peroxinitrito y las condiciones limitantes de hierro modulan la transcripción de los genes que codifican las proteínas extracelulares Aip56 y P53 implicadas en la virulencia de *P. damsela* subsp. *piscicida*.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, F, Ellis, AE, Vivas, J, Padilla, D, Acosta, B, Déniz, S, Bravo, J, Real, F (2006) Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunology*, 20:709-717.

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

Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (2002) ICTHIOVAC-PD PASTEURELOSIS DORADA. *Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad*.

Agius, C, Roberts, RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26:499-509.

Alcorn, S, Ostland, V, LaPatra, S, Harbell, S, Firedman, C, Winton, J (2008) Measurement of the innate cellular immune response of hybrid striped bass and rainbow trout. *Extension bulletin for the Western Regional Aquaculture Center (WRAC)* (WRAC Publications).

Alexandre, T, Raynal, B, Munier-Lehmann, H (2015) Two classes of bacterial IMPDHs according to their quaternary structures and catalytic properties. *PLoS One*, 10:e0116578.

Alfonso, A, Lousada, S, Silva, J, Ellis, AE, Silva, MT (1998) Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34:27-37.

Allaway, D, Schofield, N, Leonard, ME, Gilardoni, L, Finan, TM, Poole, PS (2001) Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environmental Microbiology*, 3:397-406.

Amara, RR, Satchidanandam, V (1996) Analysis of a genomic DNA expression library of *Mycobacterium tuberculosis* using tuberculosis patient sera. *Infection & Immunity*, 64:3765-3771.

Anantharaman, V, Aravind, L (2003) Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology*, 4:-R11.

Andersen, CL, Jensen, JL, Orntoft, TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64:5245-5250.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Amagliani, G, Dominici, S, Riccioni, G, Zaccone, R, Mancuso, M, Scapigliati, G, Magnani, M (2013) Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31:820-826.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Bianconi, I, Dominici, S, Gorini, F, Magnani, M (2009) Expression, purification, and characterization of the recombinant putative periplasmic hemin-binding protein (hutB) of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 73:1180-1183.

Bibliografía

Andreoni, F, Magnani, M (2014) Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014:-ID793817.

Angelichio, MJ, Camilli, A (2002) *In vivo* expression technology. *Infection & Immunity*, 70:6518-6523.

APROMAR (2015) *La acuicultura en España 2015*. (APROMAR).

APROMAR (2016) *La acuicultura en España 2016*. (APROMAR).

Apte, RN, Dotan, S, Elkabets, M, White, MR, Reich, E, Carmi, Y, Song, X, Dvozin, T, Krelm, Y, Voronov, E (2006) The involvement of IL-1b in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Reviews*, 25:387-408.

Aranishi, F, Nakane, M (1997) Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology & Biochemistry*, 16:471-478.

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

Arijo, S, Rico, R, Chabrillon, M, Díaz-Rosales, P, Martínez-Manzanares, E, Balebona, MC, Toranzo, AE, Moriñigo, MA (2005) Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup) against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28:33-38.

Armstrong, B. D., 2015, Recombinase-based *in vivo* expression technology identifies a *Streptococcus pyogenes* bacteriocin important for niche adaptation in the nasopharynx, University of Western Ontario, London,

Artola-Recolons, C, Lee, M, Bernardo-García, N, Blázquez, B, Heseck, D, Bartual, S, Mahasenan, KV, Lastochkin, E, Pi, H, Boggess, B, Meindl, K, Usón, I, Fisher, JF, Mobashery, S, Hermoso, JA (2014) Structure and cell wall cleavage by modular lytic transglycosylase MltC of *Escherichia coli*. *ACS Chemical Biology*, 9:2058-2066.

Austin, B, Austin, DA (2012) *Bacterial fish pathogen. Disease of farmed and wild fish*. (Springer Science).

Avcı, H, Birincioglu, S, Epikmen, ET, Dereli, M (2013) Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164:72-79.

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

Baldrige, KC, Contreras, LM (2014) Functional implications of ribosomal RNA methylation in response to environmental stress. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49:69-89.

Balebona, MC, Moriñigo, MA, Sedano, E, Martínez-Manzanares, E, Vidaurreta, A, Borrego, JJ, Toranzo, AE (1992) Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in Southwestern Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 12:168-170.

Barnes, AC, Balebona, MC, Horne, MT, Ellis, AE (1999) Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology*, 145:483-494.

Barnes, AC, dos Santos, NMS, Ellis, AE (2005) Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in biologicals*, 121:75-84.

Barroso, C, Ozorio, ROA, Afonso, A, Moraes, JRE, Costas, B (2014) Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture Research*, 1-10.

Barth, KR, Isabella, VM, Wright, LF, Clark, VL (2009) Resistance to peroxynitrite in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*, 155:2532-2545.

Barry, M, Heibin, JA, Pinkoski, MJ, Lee, S, Moyer, RW, Green, DR, Bleackley, C (2000) Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology*, 20:3781:3794.

Basu, S, Binder, RJ, Rammensee, HG, Srivastava, PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14:303-313.

Basu, S, Binder, RJ, Suto, R, Anderson, KM, Srivastava, PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *International Immunology*, 12:1539-1546.

Bayne, CJ, Gerwick, L (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:725-743.

Birnboim, HC, Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7:1513-1523.

Blazer, VS (1991) Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3:77-86.

Blum, JS, Wearsch, PA, Cresswell, P (2013) Pathways of antigen processing. *Annual Review of Immunology*, 31:443-473.

Bogard, RW, Davies, BW, Mekalanos, JJ (2012) MetR-regulated *Vibrio cholerae* metabolism is required for virulence. *mBio*, 3:e00236-12.

Bohlsón, SS, Fraser, DA, Tenner, AJ (2007) Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular Immunology*, 44:33-43.

Boltaña, S, Roher, N, Goetz, FW, MacKenzie, SA (2011) PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35:1195-1203.

Bonet, R, Magariños, B, Romalde, JL, Simon-Pujol, MD, Toranzo, AE, Congregado, F (1994) Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 124:285-289.

Boshra, H, Li, J, Sunyer, JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20:239-262.

Bibliografía

Bridle, AR, Koop, BF, Nowak, BF (2012) Identification of surrogates of protection against yersiniosis in immersion vaccinated Atlantic salmon. *PLoS One*, 7:-e40841.

Bullwinkle, TJ, Ibba, M (2016) Translation quality control is critical for bacterial responses to amino acid stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113:2252-2257.

Buonocore, F, Randelli, E, Trisolino, P, Facchiano, A, de Pascale, D, Scapigliati, G (2014) Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Immunology*, 62:10-18.

Busch, RA (1997) Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens. *Developments in Biological Standardization*, 90:245-256.

Cai, J, Xia, H, Huang, Y, Tang, J, Jian, J, Wu, Z, Lu, Y (2015) Identification and characterization of tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 3 from humphhead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 46:243-251.

Cain, KD, Jones, DR, Raison, RL (2000) Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish & Shellfish Immunology*, 10:651-666.

Callewaert, L, Michiels, CW (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35:127-160.

Camilli, A, Beattie, DT, Mekalanos, JJ (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:2634-2368.

Camilli, A, Mekalanos, JJ (1995) Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Molecular Microbiology*, 18:671-683.

Castro, R, Abós, B, Pignatelli, J, von Gersdorff Jørgensen, L, González Granja, A, Buchmann, K, Tafalla, C (2014) Early immune responses in rainbow trout liver upon viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *PLoS One*, 9:-e111084.

Castro-Cunha, M, Makridis, P, Soares, F (2008) Timing of Appearance of Lymphoid Cells During Early Development of Senegalese Sole, *Solea senegalensis* Kaup. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39:436-439.

Cerutti, A, Puga, I, Cols, M (2011) Innate control of B cell responses. *Trends in Immunology*, 32:202-211.

Cha, IS, Kwon, J, Park, SB, Jang, HB, Nho, SW, Kim, YK, Hikima, J, Aoki, T, Jung, TS (2013) Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34:1455-1462.

Chang, M, Nie, P (2008) RNAi suppression of zebrafish peptidoglycan recognition protein 6 (zfpGRP6) mediated differentially expressed genes involved in Toll-like receptor signaling pathway and caused increased susceptibility to *Flavobacterium columnare*. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 124:295-301.

Chang, M, Wang, T, Nie, P, Zou, J, Secombes, CJ (2011) Cloning of two rainbow trout nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) splice variants and functional characterization of the NOD2 effector domains. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:118-127.

Chang, MX, Nie, P, Wei, LL (2007) Short and long peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in zebrafish, with findings of multiple PGRP homologs in teleost fish. *Molecular Immunology*, 44:3005-3023.

Chen, W, Syldath, U, Bellmann, K, Burkart, V, Kolb, H (1999) Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *The Journal of Immunology*, 162:3212-3219.

Cheng, S, Clancy, CJ, Checkley, MA, Handfield, M, Hillman, JD, Progulsk-Fox, A, Lewin, AS, Fidel, PL, Nguyen, MH (2003) Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 48:1275-1288.

Chettri, JK, Skov, J, Jaafar, RM, Krossoy, B, Kania, PW, Dalsgaard, I, Buchmann, K (2015) Comparative evaluation of infection methods and environmental factors on challenge success: *Aeromonas salmonicida* infection in vaccinated rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 44:485-495.

Chiu, Y, Kuo, TY, Lin, CC, Chen, WJ (2011) Proteomic analysis reveals responsive proteins of *Vibrio parahaemolyticus* on exposure to cationic antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 110:80-89.

Chowdhury, D, Lieberman, J (2008) Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual Review of Immunology*, 26:389-420.

Collin, F, Karkare, S, Maxwell, A (2011) Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 92:479-497.

Costa, MM, Maehr, T, Diaz-Rosales, P, Secombes, CJ, Wang, T (2011) Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular Immunology*, 48:1903-1916.

Costa-Ramos, C, Do Vale, A, Ludovico, P, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2011) The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:173-181.

Costas, B, Conceição, L, Dias, J, Novoa, B, Figueras, A, Afonso, A (2011) Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*, 31:838-847.

Costas, B, Couto, A, Azeredo, R, Machado, M, Krogdahl, A, Oliva-Teles, A (2014) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune responses are modulated after feeding with purified antinutrients. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:173-181.

Costas, B, Rego, PC, Simoes, I, Marques, JF, Castro-Cunha, M, Afonso, A (2013) Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. *Journal of Fish Diseases*, 36:543-553.

Crawford, ED, Wells, JA (2011) Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 80:1055-1087.

Bibliografía

Creedy, JP, Conway, T (2015) Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 23:133-140.

Croucher, NJ, Thomson, NR (2010) Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 13:619-624.

Cuesta, A, Esteban, MA, Meseguer, J (2005) Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Developmental & Comparative Immunology*, 29:637-650.

Cummins, J, Casey, PG, Joyce, SA, Gahan, CGM (2013) A mariner transposon-based signature-tagged mutagenesis system for the analysis of oral infection by *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*, 8:e75437.

Danilova, N, Bussmann, J, Jekosch, K, Steiner, LA (2005) The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology*, 6:295-302.

Darmon, AJ, Nicholson, DW, Bleackley, RC (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377:446-448.

Deb, DK, Dahiya, P, Srivastava, KK, Srivastava, R, Srivastava, BS (2002) Selective identification on new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach. *Tuberculosis*, 82:175-182.

Díaz-Rosales, P., 2006, Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados, Universidad de Málaga, Málaga,

Díaz-Rosales, P, Bird, S, Wang, T, Fujiki, K, Davidson, WS, Zou, J, Secombes, CJ (2009) Rainbow trout interleukin-2: cloning, expression and bioactivity analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 27:414-422.

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

Díaz-Rosales, P, Chabrillon, M, Morinigo, MA, Balebona, MC (2003) Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases*, 26:305-308.

Dirscherl, H, McConnell, SC, Yoder, JA, de Jong, JLO (2014) The MHC class I genes of zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology*, 46:11-23.

Do Vale, A, Costa-Ramos, C, Silva, A, Silva, DSP, Gärtner, F, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2007) Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. *Cellular Microbiology*, 9:988-1003.

Do Vale, A, Ellis, AE, Silva, MT (2001) Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44:237-240.

Do Vale, A, Magariños, B, Romalde, JL, Lemos, ML, Ellis, AE, Toranzo, AE (2002) Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48:109-115.

Do Vale, A, Marques, F, Silva, MT (2003) Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15:129-144.

Do Vale, A, Silva, MT, Dos Santos, NMS, Nascimento, DS, Reis-Rodrigues, P, Costa-Ramos, C, Ellis, AE, Azevedo, JE (2005) AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58:1025-1038.

Dubbs, JM, Mongkolsuk, S (2012) Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194:5495-5503.

Dziarski, R, Ulmer, AJ, Gupta, D (2000) Interactions of bacterial lipopolysaccharide and peptidoglycan with mammalian CD14. *Glycomicrobiology* (Kluwer Academic/Plenum Publishers), 145-186.

Dziarski, R, Ulmer, AJ, Gupta, D (2000) Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chemical Immunology*, 74:83-107.

Elkamel, AA, Hawke, JP, Henk, WG, Thune, RL (2003) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15:175-183.

Elkamel, AA, Thune, RL (2003) Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15:167-174.

Esteban, MA, Cuesta, A, Chaves-Pozo, E, Meseguer, J (2015) Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. *Biology*, 4:907-922.

Etz, H, Minh, DB, Henics, T, Dryla, A, Winkler, B, Triska, C, Boyd, AP, Söllner, J, Schmidt, W, von Ahsen, U, Buschle, M, Gill, SR, Kolonay, J, Khalak, H, Fraser, CM, von Gabain, A, Nagy, E, Meinke, A (2002) Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:6573-6578.

Evans, DL, Harris, DT, Jaso-Friedmann, L (1992) Function associated molecules on nonspecific cytotoxic cells: role in calcium signaling, redirected lysis, and modulation of cytotoxicity. *Developmental & Comparative Immunology*, 16:383-394.

Evans, DL, Harris, DT, Staton, DL, Jaso-Friedmann, L (1990) Pathways of signal transduction in teleost nonspecific cytotoxic cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 14:295-304.

Evans, DL, Jaso-Friedmann, L (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2:109-121.

Evans, DL, Leary, JH, III, Jaso-Friedmann, L (1999) An antigen receptor (NCCRP-1) on nonspecific cytotoxic cells is a phosphoprotein associated with the JAK-STAT activation pathway. *Cellular Signalling*, 11:287-292.

Evans, JJ, Klesius, PH, Shoemaker, CA (2004) Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*, 22:3769-3773.

Fagarasan, S, Honjo, T (2000) T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science*, 290:89-92.

Bibliografía

Falkow, S, Isberg, RR, Portnoy, DA (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 8:333-363.

FAO (2014) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014*.

FAO (2016) *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*.

Fast, MD, Johnson, SC, Jones, SR (2007) Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 22:403-407.

Fernández, L, Márquez, I, Guijarro, JA (2004) Identification of specific *in vivo*-induced (*ivi*) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Applied & Environmental Microbiology*, 70:5199-5207.

Fernández-Trujillo, MA, Porta, J, Manchado, M, Borrego, JJ, Álvarez, MC, Béjar, J (2008) c-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:697-700.

Ferraresso, S, Bonaldo, A, Parma, L, Buonocore, F, Scapigliati, G, Gatta, PP, Bargelloni, L (2016) Ontogenetic onset of immune-relevant genes in the common sole (*Solea solea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 57:278-292.

Fischer, U, Utke, K, Somamoto, T, Kollner, B, Ototake, M (2006) Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 20:209-226.

Fouz, B, Biosca, EG, Amaro, C (1997) High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *Journal of Applied Microbiology*, 82:157-167.

Frank, KL, Barnes, AMT, Grindle, SM, Manias, DA, Schlievert, PM, Dunny, GM (2012) Use of recombinase-based *in vivo* expression technology to characterize *Enterococcus faecalis* gene expression during infection identifies *in vivo*-expressed antisense RNAs and implicates the protease Eep in pathogenesis. *Infection & Immunity*, 80:539-549.

Fu, GH, Bai, ZY, Xia, JH, Liu, F, Liu, P, Yue, GH (2013) Analysis of two lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in asian seabass. *PLOS ONE*, 8:e79743.

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

Fukuda, Y, Kusuda, R (1985) Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathology*, 20:421-425.

Gal, P, Barna, L, Kocsis, A, Zavodszky, P (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology*, 212:267-277.

García de la Banda, I., 2011, Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858), Universidad de León, León,

García-Castillo, J, Chaves-Pozo, E, Olivares, P, Pelegrin, P, Meseguer, J, Mulero, V (2004) The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the *in vivo*

proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 61:1331-1340.

García-Fernández, C, Sánchez, JA, Blanco, G (2011) Characterization of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) transferrin gene: genomic structure, constitutive expression and SNP variation. *Fish & Shellfish Immunology*, 31:548-556.

Getahun, A, Heyman, B (2006) How antibodies act as natural adjuvants. *Immunology Letters*, 104:38-45.

Gort, AS, Miller, VL (2000) Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infection & Immunity*, 68:6633-6642.

Graham, S, Secombes, CJ (1990) Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 14:59-68.

Grangeasse, C, Stülke, J, Mijakovic, I (2015) Regulatory potential of post-translational modifications in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6:500.

Grasso, V, Do Vale, A, Reis, MI, Real, F, Padilla, D, Acosta, F, Dos Santos, NMS (2011) Identification of the second most abundant protein secreted by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *15th EAAP International conference on diseases of fish and shellfish*.

Graves, SS, Evans, DL, Cobb, D, Dawe, DL (1984) Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 8:293-302.

Gravningen, K, Thorarinsson, R, Johansen, LH, Nissen, B, Rikardsen, KS, Greger, E, Vigneulle, M (1998) Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*, 14:159-162.

Griffiths, E (1991) Iron and bacterial virulence: a brief overview. *Biology of Metals*, 4:7-13.

Guardiola, FA, Cuartero, M, Del Mar Collado-González, M, Díaz Baños, FG, Cuesta, A, Moriñigo MA, Esteban MÁ (2017) Terminal carbohydrates abundance, immune related enzymes, bactericidal activity and physico-chemical parameters of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) skin mucus. *Fish & Shellfish Immunology*, 60:483-491.

Guo, B, Wu, C, Lv, Z, Liu, C (2016) Characterisation and expression analysis of two terminal complement components: C7 and C9 from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 51:211-219.

Habich, C, Baumgart, K, Kolb, H, Burkart, V (2002) The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *The Journal of Immunology*, 168:569-576.

Häcker, H, Tseng, P, Karin, M (2011) Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature Reviews Immunology*, 11:457-468.

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

Bibliografía

Hampton, JA, Klaunig, JE, Goldblatt, PJ (1987) Resident sinusoidal macrophages in the liver of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*): an ultrastructural, functional and cytochemical study. *The Anatomical Record*, 219:338-346.

Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166:557-580.

Hanahan, D (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA Cloning: a practical approach. Volume 1* (Oxford University Press), 109-135.

Handfield, M, Bradly, LJ, Progulske-Fox, A, Hillman, JD (2000) IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends in Microbiology*, 8:336-339.

Handfield, M, Seifert, T, Hillman, JD (2002) In vivo expression of bacterial genes during human infections. *Methods in Molecular Medicine*, 71:225-242.

Hang, L, John, M, Asaduzzaman, M, Bridges, EA, Vanderspurt, C, Kim, TJ, Taylor, RK, Hillman, JD, Progulske-Fox, A, Handfield, M, Ryan, ET, Calderwood, SB (2003) Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100:8508-8513.

Hansen, JD, Landis, ED, Phillips, RB (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:6919-6924.

Hansen, JD, Vojtech, LN, Laing, KJ (2011) Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Developmental & Comparative Immunology*, 35:886-897.

He, SY (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36:363-392.

Hebrard, M, Viala, JP, Meresse, S, Barras, F, Aussel, L (2009) Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology*, 191:4605-4614.

Hedstrom, L (2009) IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chemical Reviews*, 109:2903-2928.

Hedstrom, L, Gan, L (2006) IMP dehydrogenase: structural schizophrenia and an unusual base. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10:520-525.

Hensel, M, Shea, JE, Gleeson, C, Jones, MD, Dalton, E, Holden, DW (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269:400-403.

Herbert, MA, Hayes, S, Deadman, ME, Tang, CM, Hood, DW, Moxon, ER (2002) Signature tagged mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for in vivo survival. *Microbial Pathogenesis*, 33:211-223.

Heyman, B (2000) Regulation of Antibody Responses via Antibodies, Complement, and Fc Receptors. *Annual Review of Immunology*, 18:709-737.

Hirano, T (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International Reviews of Immunology*, 16:249-284.

Hirono, I, Takami, M, Miyata, M, Miyazaki, T, Han, HJ, Takano, T, Endo, M, Aoki, T (2004) Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 56:38-46.

Hirsch, CD, Springer, NM, Hirsch, CN (2015) Genomic limitations to RNA sequencing expression profiling. *The Plant Journal*, 84:491-503.

Hjelmeland, K, Christie, M, Raa, J (1983) Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology*, 23:13-22.

Ho, LP, Lin, JHY, Liu, HC, Chen, HE, Chen, TZ, Yang, HL (2011) Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:412-419.

Hofmann, B, Hecht, HJ, Flohé, L (2002) Peroxiredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 383:347-364.

Holland, MC, Lambris, JD (2002) The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12:399-420.

Infante, C, Matsuoka, MP, Asensio, E, Canavate, JP, Reith, M, Manchado, M (2008) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 9:1-12.

Ingerslev, HC, Ronneseth, A, Pettersen, EF, Wergeland, HI (2008) Differential Expression of Immune Genes in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Challenged Intraperitoneally or by Cohabitation with IPNV. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69:90-98.

Irizarry, K, Kustanovich, V, Li, C, Brown, N, Nelson, S, Wong, W, Lee, CJ (2000) Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nature Genetics*, 26:233-236.

Irwing, DM, Gong, Z (2003) Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. *Journal of Molecular Evolution*, 56:234-242.

Ishibe, K, Yamanishi, T, Wang, Y, Osatomi, K, Hara, K, Kanai, K, Yamaguchi, K, Oda, T (2009) Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27:386-389.

Ispir, U, Dorucu, M (2014) Efficacy of lipopolysaccharide antigen of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout by intraperitoneal and bath immersion administration. *Research in Veterinary Science*, 97:271-273.

Israelsson, O, Petersson, A, Bengten, E, Wiersma, EJ, Andersson, J, Gezelius, G (1991) Immunoglobulin concentration in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., serum and cross-reactivity between anti-cod-antibodies and immunoglobulins from other species. *Journal of Fish Biology*, 39:265-278.

Jamet, A, Euphrasie, D, Martin, P, Nassif, X (2013) Identification of genes involved in *Neisseria meningitidis* colonization. *Infection & Immunity*, 81:3375-3381.

Bibliografía

Jaso-Friedmann, L, Evans, DL (1999) Mechanisms of cellular cytotoxic innate resistance in tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Developmental & Comparative Immunology*, 23:27-35.

Jaso-Friedmann, L, Leary, JH, III, Evans, DL (2001) The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:701-711.

Jaso-Friedmann, L, Leary, JH, III, Warren, J, McGraw, RA, Evans, DL (1997) Molecular characterization of a protozoan parasite target antigen recognized by nonspecific cytotoxic cells. *Cellular Immunology*, 176:93-102.

Jelsbak, L, Hartman, H, Schroll, C, Rosenkrantz, JT, Lemire, S, Wallrodt, I, Thomssen, LE, Poolman, M, Kilstrup, M, Jensen, PR, Olsen, JE (2014) Identification of metabolic pathways essential for fitness of *Salmonella typhimurium* in vivo. *PLoS One*, 9:-e101869.

Jerome, KR, Sloan, DD, Aubert, M (2003) Measurement of CTL-induced cytotoxicity: The caspase 3 assay. *Apoptosis*, 8:563-571.

Jiao, XD, Dang, W, Hu, YH, Sun, L (2009) Identification and immunoprotective analysis of an *in vivo*-induced *Edwardsiella tarda* antigen. *Fish & Shellfish Immunology*, 27:633-638.

Jiang, J, Zheng, Z, Wang, K, Wang, J, He, Y, Wang, E, Chen, D, Ouyang, P, Geng, Y, Huang, X (2015) Adjuvant immune enhancement of subunit vaccine encoding pSCPI of *Streptococcus iniae* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 16:28001-28013.

Jimenez-Cantizano, RM, Infante, C, Martin-Antonio, B, Ponce, M, Hachero, I, Navas, JI, Manchado, M (2008) Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 25:57-65.

Jiménez-Fernández, E, Ponce, M, Rodríguez-Rúa, A, Zuasti, E, Manchado, M, Fernández-Díaz, C (2015) Effect of dietary vitamin C level during early larval stages in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 443:65-76.

Jitprasutwit, S, Ong, C, Juntawiang, N, Ooi, WF, Hemsley, CM, Vattanaviboon, P, Titball, RW, Tan, P, Korbsrisate, S (2014) Transcriptional profiles of *Burkholderia pseudomallei* reveal the direct and indirect roles of Sigma E under oxidative stress conditions. *BMC Genomics*, 15:1-11.

Jones, AL, Knoll, KM, Rubens, CE (2000) Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 37:1444-1455.

Jones, DR, Hannan, CM, Russel-Jones, GJ, Raison, RL (1999) Selective B cell non-responsiveness in the gut of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 172:29-39.

Jorgensen, SM, Hetland, DL, Press, CM, Grimholt, U, Gjoen, T (2007) Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:576-588.

Juiz-Río, S, Osorio, CR, Lemos, ML (2005) Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of hutA pseudogenes. *Archives of Microbiology*, 185:347-358.

Kaihami, GH, Almeida, JR, Santos, SS, Netto, LE, Almeida, SR, Baldini, RL (2014) Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathogen*, 10:e1004442.

Kang, D, Liu, G, Lundström, A, Gelius, E, Steiner, H (1998) A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:10078-10082.

Karin, M, Gallagher, E (2009) TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunological Reviews*, 228:225-240.

Katagiri, T, Hirono, I, Aoki, T (1999) Molecular analysis of complement component C8b and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 50:43-48.

Kawabata, K, Hagio, T, Matsuoka, S (2002) The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, 451:1-10.

Keiler, KC (2015) Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13:285-297.

Kerr, KM, Cahoon, M, Bosco, DA, Hedstrom, L (2000) Monovalent cation activation in *Escherichia coli* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375:131-137.

Kim, YR, Lee, SE, Kim, CM, Kim, SY, Shin, EK, Shin, DH, Chung, SS, Choy, HE, Progulske-Fox, A, Hillman, JD, Handfield, M, Rhee, JH (2003) Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infection & Immunity*, 71:5461-5471.

Kishore, U, Ghai, R, Greenhough, TJ, Shrive, AK, Bonifati, DM, Gadjeva, MG, Waters, P, Kojouharova, MS, Chakraborty, T, Agrawal, A (2004) Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology Letters*, 95:113-128.

Kishore, U, Reid, KB (2000) C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49:159-170.

Kizy, AE, Neely, MN (2009) First *Streptococcus pyogenes* signature-tagged mutagenesis screen identifies novel virulence determinants. *Infection & Immunity*, 77:1854-1865.

Kohler, S, Foulongne, V, Ouahrani-Bettache, S, Bourg, G, Teyssier, J, Ramuz, M, Liautard, JP (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:15711-15716.

Kol, A, Lichtman, AH, Finberg, RW, Libby, P, Kurt-Jones, EA (2000) Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *The Journal of Immunology*, 164:13-17.

Korotaevskiy, AA, Hanin, LG, Khanin, MA (2009) Non-linear dynamics of the complement system activation. *Mathematical Biosciences*, 222:127-143.

Kovacs-Simon, A, Titball, RW, Michell, SL (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection & Immunity*, 79:548-561.

Kröger, C, Colgan, A, Srikumar, S, Händler, K, Sivasankaran, SK, Hammarlöf, DL, Canals, R, Grissom, JE, Conway, T, Hokamp, K, Hinton, JC (2013) An infection-relevant

Bibliografía

transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host & Microbe*, 14:683-695.

Kumar, H, Kawai, T, Akira, S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30:16-34.

Kuntumalla, S, Zhang, Q, Braisted, JC, Fleischmann, RD, Peterson, SN, Donohue-Rolfe, A, Tzipori, S, Pieper, R (2011) *In vivo* versus *in vitro* protein abundance analysis of *Shigella dysenteriae* type 1 reveals changes in the expression of proteins involved in virulence, stress and energy metabolism. *BMC Microbiology*, 11:1-13.

Kusuda, R, Hamaguchi, M (1987) A comparative study on efficacy of immersion and a combination of immersion and oral vaccination methods against pseudotuberculosis in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53:1008.

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

Kusuda, R, Ninomiya, M, Hamaguchi, M, Muraoka, A (1988) The efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in cultured yellowtail. *Fish Pathology*, 23:191-196.

Kusuda, R, Yamaoka, M (1972) Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38:1325-1332.

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lai, Y, Gallo, RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30:131-141.

Laing, KJ, Purcell, MK, Winton, JR, Hansen, JD (2008) A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC Evolutionary Biology*, 8:42.

Lanneau, D, Brunet, M, Frisan, E, Solary, E, Fontenay, M, Garrido, C (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 12:743-761.

Lashkari, DA, deRisi, JL, McCusker, JH, Namath, AF, Gentile, C, Hwang, SY, Brown, PO, Davis, RW (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:13057-13062.

Le Friec, G, Kemper, C (2009) Complement: coming full circle. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 57:393-407.

Le Morvan, C, Troutaud, D, Deschaux, P (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology*, 201:165-168.

Lee, JH, Pooley, NJ, Mohd-Adnan, A, Martin, SA (2014) Cloning and characterisation of multiple ferritin isoforms in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*, 9:e103729.

Lee, KE, Bang, JS, Baek, CH, Park, DK, Hwang, W, Choi, SH, Kim, KS (2007) IVET-based identification of virulence factors in *Vibrio vulnificus* MO6-24/O. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17:234-243.

Lehner, T, Bergmeier, LA, Wang, Y, Tao, L, Sing, M, Spallek, R, van der Zee, R (2000) Heat shock proteins generate beta-chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, 30:594-603.

Li, C, Yao, CL (2013) Molecular and expression characterizations of interleukin-8 gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 34:799-809.

Li, H, Cai, Y, Xie, P, Li, G, Hao, L, Xiong, Q (2013a) Identification and Expression Profiles of IL-8 in Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) in Response to Microcystin-LR. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 65:537-545.

Li, S, Song, J, Huang, H, Chen, W, Li, M, Zhao, Y, Cong, Y, Zhu, J, Rao, X, Hu, X, Hu, F (2013b) Identification of *in-vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human. *Microbial Pathogenesis*, 63:8-15.

Li, S, Wang, D, Liu, H, Yin, J, Lu, T (2016) Expression and antimicrobial activity of c-type lysozyme in taimen (*Hucho taimen*, Pallas). *Developmental & Comparative Immunology*, 63:156-162.

Li, X, Wang, S, Qi, J, Echtenkamp, SF, Chatterjee, R, Wang, M, Boons, GJ, Dziarski, R, Gupta, D (2007) Zebrafish peptidoglycan recognition proteins are bactericidal amidases essential for defense against bacterial infections. *Immunity*, 27:518-529.

Li, X, Wang, S, Wang, H, Gupta, D (2006) Differential expression of peptidoglycan recognition protein 2 in the skin and liver requires different transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:20738-20748.

Lieu, PT, Heiskala, M, Petersson, PA, Yang, Y (2001) The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 22:1-87.

Livak, KJ, Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25:402-408.

López-Castejón, G, Sepulcre, MP, Mulero, I, Pelegrin, P, Mesequer, J, Mulero, V (2008) Molecular and functional characterization of gilthead seabream *Sparus aurata* caspase-1: the first identification of an inflammatory caspase in fish. *Molecular Immunology*, 45:49-57.

López-Dóriga, MV, Barnes, CA, Dos Santos, NMS, Ellis, AE (2000) Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, 146:21-30.

Løvoll, M, Dalmo, RA, Børgwald, J (2007) Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 23:721-731.

Lowe, AM, Beattie, DT, Deresiewicz, RL (2016) Identification of novel staphylococcal virulence genes by *in vivo* expression technology. *Molecular Microbiology*, 27:967-976.

Lu, DQ, Bei, JX, Feng, LN, Zhang, Y, Liu, XC, Wang, JL (2008) Interleukin-1beta gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction. *Molecular Immunology*, 45:857-867.

Bibliografía

Lumsden, JS, Ostland, VE, Byrne, PJ, Ferguson, HW (1993) Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16:21-27.

Magariños, B, Bonet, R, Romalde, JL, Congregado, F, Toranzo, AE (1996a) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, 21:289-297.

Magariños, B, Norma, C, Manuel, N, Merino, P, Toranzo, AE, Lamas, J (2001) Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 195:17-21.

Magariños, B, Noya, M, Romalde, JL, Pérez, G, Toranzo, AE (1994a) Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 14:120-122.

Magariños, B, Osorio, CR, Toranzo, AE, Romalde, JL (1997) Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Pasteurella piscicida*. *Systematic & Applied Microbiology*, 20:634-639.

Magariños, B, Pazos, F, Santos, Y, Romalde, JL (1995) Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21:103-108.

Magariños, B, Romalde, JL (1997) Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. *Fish Vaccinology* (Editorial Karger), 167-177.

Magariños, B, Romalde, JL, Bandín, I, Fouz, B, Toranzo, AE (1992) Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied & Environmental Microbiology*, 58:3316-3322.

Magariños, B, Romalde, JL, Barja, JL, Núñez, S, Toranzo, AE (1999) Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 19:159-161.

Magariños, B, Romalde, JL, Barja, JL, Toranzo, AE (1994b) Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Applied & Environmental Microbiology*, 60:180-186.

Magariños, B, Romalde, JL, Lemos, ML, Barja, JL, Toranzo, AE (1994c) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied & Environmental Microbiology*, 60:2990-2998.

Magariños, B, Romalde, JL, López-Romalde, S, Moriñigo, MA, Toranzo, AE (2003) Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 23:183-190.

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

Magariños, B, Romalde, JL, Santos, Y, Casal, JF, Barja, JL, Toranzo, AE (1994d) Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120:201-208.

Magariños, B, Toranzo, AE, Barja, JL, Romalde, JL (2000) Existence of two geographically linked clonal lineages in the bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Epidemiology & Infection*, 125:213-219.

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

Magnadóttir, B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20:137-151.

Magnadóttir, B (2010) Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12:361-379.

Mahan, MJ, Slauch, JM, Mekalanos, JJ (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 259:686-688.

Makowska-Gryśka, M, Kim, Y, Gorla, SK, Wei, Y, Mandapati, K, Zhang, M, Maltseva, N, Modi, G, Boshoff, HI, Gu, M, Aldrich, C, Cuny, GD, Hedstrom, L, Joachimiak, A (2016) Mycobacterium tuberculosis IMPDH in complexes with substrates, products and antitubercular compounds. *PLoS One*, 10:e0138976.

Makridis, P, Moreira, C, Costa, RA, Rodrigues, P, Dinis, MT (2009) Use of microalgae bioencapsulated in *Artemia* during the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture*, 292:153-157.

Manchado, M, Salas-Leiton, E, Infante, C, Ponce, M, Asensio, E, Crespo, A, Zuasti, E, Canavate, JP (2008) Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 416:77-84.

Mancuso, M, Avendaño-Herrera, R, Zaccone, R, Toranzo, AE, Magariños, B (2007) Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Biological Research*, 40:85-92.

Marra, A, asundi, J, Bartilson, M, Lawson, S, Fang, F, Christine, J, Wiesner, C, Brigham, D, Schneider, WP, Hromockyj, AE (2002) Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infection & Immunity*, 70:1422-1433.

Martin, SJ, Amarante-Mendes, GP, Shi, L, Chuang, TH, Casiano, CA, O'Brien, GA, Fitzgerald, P, Tan, EM, Bokoch, GM, Greenberg, AH, Green, DR (1996) The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *The EMBO Journal*, 15:2407-2416.

Martínez, G, Shaw, EM, Carrillo, M, Zanuy, S (1998) Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24:283-239.

Matsushita, M, Matsushita, A, Endo, Y, Nakata, M, Kojima, N, Mizuochi, T, Fujita, T (2004) Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:10127-10131.

Mauri, I, Romero, A, Acerete, L, MacKenzie, S, Roher, N, Callol, A, Cano, I, Alvarez, MC, Tort, L (2011) Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*)

Bibliografía

and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:182-188.

McCarthy, UM, Bron, JE, Brown, L, Pourahmad, F, Bricknell, IR, Thompson, KD, Adams, A, Ellis, AE (2008) Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:477-484.

McIntosh, D, Austin, B (1996) The validity of Western blotting for the diagnosis of bacterial kidney disease based on the detection of the p57 antigen of *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Microbiological Methods*, 25:329-335.

McLean, S, Bowman, LA, Sanguinetti, G, Read, RC, Poole, RK (2010) Peroxynitrite toxicity in *Escherichia coli* K12 elicits expression of oxidative stress responses and protein nitration and nitrosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285:20724-20731.

Medina, A, Mancera, JM, Martínez-Manzanares, E, Moriñigo, MA, Arijo, S (2015) Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish & Shellfish Immunology*, 47:377-380.

Mei, JM, Nourbakhsh, F, Ford, CW, Holden, DW (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 26:399-407.

Meijer, AH, Gabby Krens, SF, Medina, RI, He, S, Bitter, W, Ewa Snaar-Jagalska, B, Spaink, HP (2004) Expression analysis of the Toll-like receptor, TIR domain adaptor families of zebrafish. *Molecular Immunology*, 40:773-783.

Menanteau-Ledouble, S, El-Matbouli, M (2016) Antigens of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* specifically induced *in vivo* in *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Diseases*, 39:1015-1019.

Menanteau-Ledouble, S, Kumar, G, Saleh, M, El-Matbouli, M (2016) *Aeromonas Salmonicida*: Updates on an Old Acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120:49-68.

Menanteau-Ledouble, S, Soliman, H, Kumar, G, El-Matbouli, M (2014) Use of *in vivo* induced antigen technology to identify genes from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* that are specifically expressed during infection of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *BMC Veterinary Research*, 10:1-11.

MERCASA (2015) Productos de la pesca y la acuicultura. *Alimentación en España 2015* 239-254.

Merrell, DS, Hava, DL, Camilli, A (2002) Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 43:1471-1491.

Michel, C, Gonzalez, R, Avrameas, S (1990) Opsonizing properties of natural antibodies of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology*, 37:617-622.

Ministerio de Agricultura, AyMA (2015) *El mercado del lenguado en España*.

Mohanty, BR, Sahoo, PK (2010) Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28:613-621.

Mohapatra, S, Chakraborty, T, Reza, MA, Shimizu, S, Matsubara, T, Ohta, K (2017) Short-term starvation and realimentation helps stave off *Edwardsiella tarda* infection in red sea bream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 206:42-53.

Mölkänen, T, Tyynelä, J, Helin, J, Kalkkinen, N, Kuusela, P (2002) Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Letters*, 517:72-78.

Möller, AM, Korytár, T, Köllner, B, Schmidt-Posthaus, H, Segner, H (2014) The teleostean liver as an immunological organ: Intrahepatic immune cells (IHICs) in healthy and benzo[a]pyrene challenged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 46:518-529.

Montero, D, Benitez-Dorta, V, Caballero, MJ, Ponce, M, Torrecillas, S, Izquierdo, M, Zamorano, MJ, Manchado, M (2015) Dietary vegetable oils: Effects on the expression of immune-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestine. *Fish & Shellfish Immunology*, 44:100-108.

Moon, JY, Hong, YK, Kong, HJ, Kim, DG, Kim, YO, Kim, WJ, Ji, YJ, An, CM, Nam, BH (2014) A cDNA microarray analysis to identify genes involved in the acute-phase response pathway of the olive flounder after infection with *Edwardsiella tarda*. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 161:49-56.

Moré, SH, Breloer, M, von Bonin, A (2001) Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells. *International Immunology*, 13:1121-1127.

Moreno, V, Solé, X (2004) Uso de chips de ADN (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados. *Medicina Clínica*, 122:73-79.

Mosca, F, Ciulli, S, Volpatti, D, Romano, N, Volpe, E, Bulfon, C, Massimini, M, Caccia, E, Galeotti, M, Tiscar, PG (2014) Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 162:83-95.

Mrakovcic-Sutic, I, Jakovac, H, Simin, M, Grebic, D, Cuk, M, Trobonjaca, Z, Radosevic-Stasic, B (2008) Heat shock protein-GP96 as an innate sensor of damage and activator of autoreactive NKT and regulatory T cells during liver regeneration. *Histology & Histopathology*, 23:1111-1126.

Munang'andu, HM, Fredriksen, BN, Mutoloki, S, Dalmo, RA, Evensen, O (2013) The kinetics of CD4+and CD8+T-cell gene expression correlate with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) vaccinated against infectious pancreatic necrosis. *Vaccine*, 31:1956-1963.

Naka, H, Hirono, I, Aoki, T (2007) Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *Journal of Fish Diseases*, 30:681-690.

Nakanishi, T, Shibasaki, Y, Matsuura, Y (2015) T cells in fish. *Biology*, 4:640-663.

Nakao, M, Masakazu, T, Ichiki, S, Vo, TK, Somamoto, T (2011) The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental & Comparative Immunology*, 35:1296-1308.

Bibliografía

Nascimento, DS, Do Vale, A, Tomás, AM, Zou, J, Secombes, CJ, Dos Santos, NMS (2007) Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Molecular Immunology*, 44:2277-2791.

Neves, JV, Wilson, JM, Rodrigues, PN (2009) Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 33:848-857.

Nikoskelainen, S, Verho, S, Airas, K, Lilius, EM (2005) Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium *Aeromonas salmonicida* can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 29:525-537.

Nikoskelainen, S, Verho, S, Järvinen, S, Madetoja, J, Wiklund, T, Lilius, EM (2007) Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 22:206-217.

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

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

O'Riordan, AA, Morales, VA, Mulligan, L, Faheem, N, Windle, HJ, Kelleher, DP (2012) Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine*, 30:3876-3884.

Ohashi, K, Burkart, V, Flohé, S, Kolb, H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164:558-561.

Olczak, AA, Seyler, RW, Olson, JW, Maier, RJ (2003) Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infection & Immunity*, 71:580-583.

Orino, K, Lehman, L, Tsuji, Y, Ayaki, H, Torti, SV, Torti, FM (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 357:241-247.

Osorio, CR, Collins, MD, Toranzo, AE, Barja, JL, Romalde, JL (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied & Environmental Microbiology*, 65:2942-2946.

Osorio, CR, Juiz-Río, S, Lemos, ML (2006) A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology*, 152:3327-3341.

Osorio, CR, Juiz-Río, S, Lemos, ML (2010) The ABC-transporter hutCD genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for haem utilization as iron source and are expressed during infection in fish. *Journal of Fish Diseases*, 33:649-655.

Osorio, CR, Rivas, AJ, Balado, M, Fuentes-Monteverde, JC, Rodríguez, J, Jiménez, C, Lemos, ML, Waldor, MK (2015) A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers

piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Applied & Environmental Microbiology*, 81:5867-5879.

Osuna-Jimenez, I, Williams, TD, Prieto-Alamo, MJ, Abril, N, Chipman, JK, Pueyo, C (2009) Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish & Shellfish Immunology*, 26:699-706.

Palíková, M, Navrátil, S, Navrátil, L, Mares, J (2015) Preventive and prophylactic measures in Intensive salmonid fish breeding – a review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 63:1409-1416.

Parthasarathy, G, Lun, S, Guo, H, Ammerman, NC, Geiman, DE, Bishai, WR (2012) Rv2190c, an NlpC/P60 family protein, is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 7:e43429.

Paulsen, SM, Lunde, H, Engstad, RE (2003) *In vivo* effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14:39-54.

Pellizzari, C, Krasnov, A, Afanasyev, S, Vitulo, N, Franch, R, Pegolo, S, Patarnello, T, Bargelloni, L (2013) High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: Results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish & Shellfish Immunology*, 34:1269-1278.

Pereiro, P, Figueras, A, Novoa, B (2012) A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload. *Fish & Shellfish Immunology*, 32:879-889.

Pfaffl, MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:e45.

Pfaffl, MW, Tichopad, A, Prgomet, C, Neuvians, TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26:509-515.

Picard, F, Dressaire, C, Girbal, L, Cocaign-Bousquet, M (2009) Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *Comptes Rendus Biologies*, 332:958-973.

Pietretti, D, Wiegertjes, GF (2014) Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Developmental & Comparative Immunology*, 43:205-222.

Pizarro-Cerdá, J, Ossart, P (2006) Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*, 124:715-727.

Plotkin, SA (2010) Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical & Vaccine Immunology*, 17:1055-1065.

Ponce, M, Salas-Leiton, E, Garcia-Cegarra, A, Boglino, A, Coste, O, Infante, C, Gisbert, E, Rebordinos, L, Manchado, L (2011) Genomic characterization, phylogeny and gene regulation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 31:925-937.

Bibliografía

Pontigo, JP, Agüero, MJ, Sánchez, P, Oyarzún, R, Vargas-Lagos, C, Mancilla, J, Kossmann, H, Morera, FJ, Yáñez, AJ, Vargas-Chacoff, L (2016) Identification and expressional analysis of NLRC5 inflammasome gene in smolting Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 58:259-265.

Poole, LB (2005) Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433:240-254.

Press, CM, Dannevig, BH, Landsverk, T (1994) Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 4:79-83.

Pressley, ME, Phelan, IPE, Witten, PE, Mellon, MT, Kim, CH (2005) Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebra fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 29:501-513.

Prieto-Alamo, MJ, Abril, N, Osuna-Jimenez, I, Pueyo, C (2009) *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR. *Aquatic Toxicology*, 91:312-319.

Putzer, H, Laalami, S, Brakhage, AA, Condon, C, Grunberg-Manago, M (1995) Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation. *Molecular Microbiology*, 16:709-718.

QIAGEN (2002) *QIAexpress Detection and Assay Handbook*. (QIAGEN Inc.).

Raida, MK, Buchmann, K (2009) Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Developmental & Comparative Immunology*, 33:35-45.

Rebl, A, Goldammer, T, Seyfert, HM (2010) Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 134:139-150.

Rebl, A, Siegl, E, Kollner, B, Fischer, U, Seyfert, HM (2007) Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evolutionary relationship, induced expression by *Aeromonas salmonicida salmonicida*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31:499-510.

Rediers, H, Rainey, PB, Vanderleyden, J, De Mot, R (2005) Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 69:217-261.

Reis, MI, Costa-Ramos, C, Do Vale, A, Dos Santos, NMS (2010) Molecular cloning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-8 gene and its involvement in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* triggered apoptosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:58-65.

Reis, MI, Do Vale, A, Pinto, C, Nascimento, DS, Costa-Ramos, C, Silva, DSP, Silva, MT, Dos Santos, NMS (2007) First molecular cloning and characterisation of caspase-9 gene in fish and its involvement in a gram negative septicaemia. *Molecular Immunology*, 44:1754-1764.

Remuzgo-Martínez, S, Lázaro-Díez, M, Padilla, D, Vega, B, El Arami, F, Icardo, JM, Acosta, F, Ramos-Vivas, J (2014) New aspects in the biology of *Photobacterium damsela*

subsp. *piscicida*: pili, motility and adherence to solid surfaces. *Veterinary Microbiology*, 174:247-254.

Reyes-Becerril, M, Angulo, C, Angulo, M, Ascencio, F (2016) Changes in transferrin gene expression after exposure to iron and *Aeromonas hydrophila* infection in yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*). *Agri Gene*, 1:79-87.

Reynolds, C, Goudet, A, Jenjaroen, K, Sumonwiriya, M, Rinchai, D, Musson, J, Overbeek, S, Makinde, J, Quigley, K (2015) T cell immunity to the alkyl hydroperoxide reductase of *Burkholderia pseudomallei*: a correlate of disease outcome in acute melioidosis. *The Journal of Immunology*, 194:4814-4824.

Rivas, A. J., 2012, Caracterización genética de factores de virulencia en *Photobacterium damsela*: bases moleculares de la actividad hemolítica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela,

Roberts, RJ, Agius, C, Saliba, C, Bossier, P, Sung, YY (2010) Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases*, 33:789-801.

Roca, FJ, Mulero, I, Lopez-Munoz, A, Sepulcre, MP, Renshaw, SA, Meseguer, J, Mulero, V (2008) Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *The Journal of Immunology*, 181:5071-5081.

Rodgers, CJ, Furones, MD (1998) Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean. *Fish Pathology*, 33:157-164.

Rodrigues, PN, Pereira, FA (2004) Effect of dietary iron overload on *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* pathogenicity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27:673-676.

Rodrigues, PN, Vazquez-Dorado, S, Neves, JV, Wilson, JM (2006) Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology*, 30:1156-1167.

Rollins, SM, Peppercorn, A, Hang, L, Hillman, JD, Calderwood, SB, Handfield, M, Ryan, ET (2005) *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cellular Microbiology*, 7:1-9.

Romalde, JL (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.

Román, L, Real, F, Padilla, D, El Arami, F, Déniz, S, Grasso, V, Acosta, F (2013) Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish & Shellfish Immunology*, 35:1329-1332.

Rombout, JH, Taverne, N, van de Kamp, M, Taverne-Thiele, AJ (1993) Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 17:309-317.

Royet, J, Gupta, D, Dziarski, R (2011) Peptidoglycan recognition proteins: Modulators of the microbiome and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11:837-851.

Bibliografía

Ryckaert, J, Bossier, P, D'Herde, K, Diez-Fraile, A, Sorgeloos, P, Haesebrouck, F, Pasmans, F (2010) Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:648-655.

Sakamaki, K, Satou, Y (2009) Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*, 74:727-753.

Salas-Leiton, E, Anguis, V, Martin-Antonio, B, Crespo, D, Planas, JV, Infante, C, Canavate, JP, Machado, M (2010) Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 28:296-302.

Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*.

Sánchez, FJ, Muñoz-Cueto, JA (2014) *Biology of European Sea Bass*.

Sangrador-Vegas, A, Martin, SA, O'Dea, PG, Smith, TJ (2000) Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *European Journal of Biochemistry*, 267:7031-7037.

Saurabh, S, Sahoo, PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39:223-239.

Savill, JS, Wyllie, AH, Henson, JE, Walport, MJ, Henson, PM, Haslett, C (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 83:865-875.

Saviola, B, Woolwine, SC, Bishai, WR (2003) Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based *in vivo* expression technology. *Infection & Immunity*, 71:1379-1388.

Scapigliati, G, Buonocore, F, Bird, S, Zou, J, Pelegrin, P, Falasca, C (2001) Phylogeny of cytokines: Molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 β . *Fish & Shellfish Immunology*, 11:711-726.

Schena, M, Shalon, D, Davis, RW, Brown, PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467-470.

Schneider, WP, Ho, SK, Christine, J, Yao, M, Marra, A, Hromockyj, AE (2002) Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infection & Immunity*, 70:1326-1333.

Schwander, R, Dziarski, R, Wesche, H, Rothe, M, Kirschning, CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like Receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:17406-17409.

Secombes, CJ, Wang, T (2012) The innate and adaptive immune system of fish. *Disease in Aquaculture: Prevention and Control* (Woodhead Publishing Limited), 3-68.

Secombes, CJ, Wang, T, Hong, S, Peddie, S, Crampe, M, Laing, KJ, Cunningham, C, Zou, J (2001) Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:713-723.

Sen, R, Nayak, L, De, RK (2016) A review on host-pathogen interactions: classification and prediction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35:1581-1599.

Seppola, M, Bakkemo, KR, Mikkelsen, H, Myrnes, B, Helland, R, Irwin, DM, Nilsen, IW (2016) Multiple specialised goose-type lysozymes potentially compensate for an exceptional lack of chicken-type lysozymes in Atlantic cod. *Scientific Reports*, 6:28318.

Shin, GW, Nho, SW, Park, SB, Jang, HB, Cha, IS, Ha, MA, Kim, YR, Dalvi, RS, Joh, SJ, Jung, TS (2009) Comparison of antigenic proteins from *Lactococcus garvieae* KG- and KG+ strains that are recognized by olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) antibodies. *Veterinary Microbiology*, 139:113-120.

Shoemaker, CA, Klesius, PH, Plumb, JA (1997) Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 58:190.

Silva, D. S. P., 2013, Structural and functional characterization of AIP56 an apoptogenic exotoxin of *Photobacterium damsela piscicida*, Universidade do Porto, Porto,

Silva, MT, Dos Santos, NMS, Do Vale, A (2010) AIP56: A novel bacterial apoptogenic toxin. *Toxins*, 2:905-918.

Silver, N, Best, S, Jiang, J, Thein, SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:-33.

Singh-Jasuja, H, Hilf, N, Scherer, HU, Arnold-Schild, D, Rammensee, HG, Toes, RE, Schild, H (2000) The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress & Chaperones*, 5:462-470.

Skarmeta, AM, Bandín, I, Toranzo, AE (1995) *In vitro* killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23:51-57.

Skugor, S, Glover, KA, Nilsen, F, Krasnov, A (2008) Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 9:1-18.

Smith, TJ, Blackman, SA, Foster, SJ (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, 146:249-262.

Snieszko, SF, Bullock, GL, Hollis, E, Boone, JG (1964) *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88:1814-1815.

Souto, A, Montaos, MA, Rivas, AJ, Balado, M, Osorio, CR, Rodríguez, J, Lemos, ML, Jiménez, C (2012) Structure and biosynthetic assembly of Piscibactin, a new siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, predicted from genome analysis. *European Journal of Organic Chemistry*, 29:5693-5700.

Srivastava, P (2002) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2:185-194.

Stafford, JL, Belosevic, M (2003) Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 27:539-554.

Bibliografía

Stafford, JL, Ellestad, KK, Magor, KE, Belosevic, M, Mago, BG (2003) A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 27:685-698.

Strbo, N, Podack, ER (2008) Secreted heat shock protein gp96-Ig: an innovative vaccine approach. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59:407-416.

Sun, L, Liu, S, Wang, R, Zhang, J, Liu, Z (2014) Pathogen recognition receptors in channel catfish: IV. Identification, phylogeny and expression analysis of peptidoglycan recognition proteins. *Developmental & Comparative Immunology*, 46:291-299.

Sun, Y, Zheng, WJ, Hu, YH, Sun, BG, Sun, L (2012) *Edwardsiella tarda* Eta1, an *in vivo*-induced antigen that is involved in host infection. *Infection & Immunity*, 80:2948-2955.

Sung, YY, MacRae, TH (2011) Heat Shock Proteins and disease control in aquatic organisms. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3:1-10.

Sung, YY, MacRae, TH, Sorgeloos, P, Bossier, P (2011) Stress response for disease control in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 3:120-137.

Sunyer, JO, Boshra, H, Lorenzo, G, Parra, D, Freedman, B, Bosch, N (2003) Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 27:549-564.

Sunyer, JO, Lambris, JD (1998) Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*, 166:39-57.

Sunyer, JO, Zarkadis, IK, Lambris, JD (1998) Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Trends in Immunology*, 19:519-523.

Taborda, CP, Casadevall, A (2001) Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence, and prozone-like effects in passive protection experiments. *The Journal of Immunology*, 166:2100-2107.

Taborda, CP, Rivera, J, Zaragoza, O, Casadevall, A (2003) More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. *The Journal of Immunology*, 170:3621-3630.

Tapia-Paniagua, ST, Vidal, S, Lobo, C, García de la Banda, I, Esteban, MA, Balebona, MC, Moriñigo, MA (2015) Dietary administration of the probiotic SpPdp11: Effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline. *Fish & Shellfish Immunology*, 46:449-458.

Tahtouh, M, Crog, F, Vizioli, J, Sautiere, PE, Van, CC, Salzet, M, Daha, MR, Pestel, J, Lefebvre (2009) Evidence for a novel chemotactic C1q domain containing factor in the leech nerve cord. *Molecular Immunology*, 46:523-531.

Tian, JY, Xie, HX, Zhang, YA, Xu, Z, Yao, WJ, Nie, P (2009) Ontogeny of IgM-producing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by *in situ* hybridisation. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 132:146-152.

Tokuda, H, Matsuyama, S (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1693:5-13.

Toranzo, AE, Barreiro, S, Casal, JF, Figueras, A, Magariños, B, Barja, JL (1991) Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99:1-15.

Tort, L, Balasch, S, MacKenzie, S (2003) Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22:277-286.

Torti, FM, Torti, SV (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99:3505-3516.

Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350-4354.

Tydell, CC, Yuan, J, Tran, P, Selsted, ME (2006) Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *The Journal of Immunology*, 176:1154-1162.

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

Uribe, C, Folch, H, Enriquez, R, Moran, G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56:486-503.

Vabulas, RM, Ahmad-Nejad, P, da Costa, C, Miethke, T, Kirschning, CJ, Häcker, H, Wagner, H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:31332-31339.

Valdivia, RH, Falkow, S (1996) Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Molecular Microbiology*, 22:367-378.

Valdivia, RH, Falkow, S (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science*, 277:2007-2011.

Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, Poppe, B, Van Roy, N, De Paepe, A, Speleman, F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3:RESEARCH0034.

Veal-Carr, WL, Stibitz, S (2004) Demonstration of differential virulence gene promoter activation *in vivo* in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Molecular Microbiology*, 55:788-798.

Wallet, SM, Chung, J, Handfield, M (2010) Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Methods in Molecular Biology*, 666:181-195.

Wang, HW, Chung, CH, Ma, TY, Wong, HC (2013a) Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied & Environmental Microbiology*, 79:3734-3743.

Wang, J, Lory, S, Ramphal, R, Jin, S (1996a) Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* genes inducible by respiratory mucus derived from cystic fibrosis patients. *Molecular Microbiology*, 22:1005-1012.

Bibliografía

Wang, J, Mushegian, A, Lory, S, Jin, S (1996b) Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by *in vivo* selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93:10434-10439.

Wang, L, Wei, Y (2012) Isolation and gene expression of yellow grouper ferritin heavy chain subunit after Lipopolysaccharide treatment. *Biochemical Genetics*, 50:467-475.

Wang, R, Feng, J, Li, C, Liu, S, Zhang, Y, Liu, Z (2013b) Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 35:136-145.

Wang, T, Holland, JW, Carrington, A, Zou, J, Secombes, CJ (2007) Molecular and functional characterization of IL-15 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: a potent inducer of IFN-gamma expression in spleen leukocytes. *The Journal of Immunology*, 179:1475-1488.

Wang, T, Secombes, CJ (2003) Complete sequencing and expression of three complement components, C1r, C4 and C1 inhibitor, of the classical activation pathway of the complement system in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Immunogenetics*, 55:615-628.

Wang, T, Secombes, CJ (2013) The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 35:1703-1718.

Wang, X, Ding, C, Wang, S, Han, X, Yu, S (2015) Whole-genome sequence analysis and genome-wide virulence gene identification of *Riemerella anatipestifer* strain Yb2. *Applied & Environmental Microbiology*, 81:5093-5102.

Wang, YT, Huang, HY, Tsai, MA, Wang, PC, Jiang, BH, Chen, SC (2014) Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41:250-259.

Wang, Z, Gerstein, M, Snyder, M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 1:57-63.

Warger, T, Hilf, N, Rechtsteiner, G, Haselmayer, P, Carrick, DM, Jonuleit, H, von Landenberg, P, Rammensee, HG, Nicchitta, CV, Radsak, MP, Schild, H (2006) Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:22545-22553.

Wei, S, Huang, Y, Cai, J, Huang, X, Fu, J, Qin, Q (2012) Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33:186-196.

Wei, T, Gao, Y, Wang, R, Xu, T (2013) A heat shock protein 90 β isoform involved in immune response to bacteria challenge and heat shock from *Miichthys miiuy*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35:429-437.

Wicher, K, Fries, E (2006) Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:4168-4173.

Xie, Y, Song, L, Weng, Z, Liu, S, Liu, Z (2015) Hsp90, Hsp60 and sHsp families of heat shock protein genes in channel catfish and their expression after bacterial infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 44:642-651.

Xu, Q, Abdubek, P, Astakhova, T, Axelrod, HL, Bakolitsa, C, Cai, X, Carlton, D, et al. (2010) Structure of the c-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase YkfC from *Bacillus cereus*

in complex with L-Ala-c-D-Glu: insights into substrate recognition by NlpC/P60 cysteine peptidases. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology & Crystallization Communications*, 66:1354-1364.

Xu, Q, Mengin-Lecreulx, D, Liu, XW, Patin, D, Farr, CL, Grant, JC, et al. (2015) Insights into substrate specificity of NlpC/P60 cell wall hydrolases containing bacterial SH3 domains. *mBio*, 6:e02327-14.

Xu, Z, Chen, CF, Mao, ZJ, Zhu, WY (2009) Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes. *Aquaculture*, 287:243-247.

Yamasaki, M, Araki, K, Nakanishi, T, Nakayasu, C, Yamamoto, A (2014) Role of CD4 β and CD8a+ T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of gimbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36:299-304.

Yang, CG, Liu, SS, Sun, B, Wang, XL, Wang, N, Chen, SL (2013) Iron-metabolic function and potential antibacterial role of Hepsidin and its correlated genes (Ferroportin 1 and Transferrin Receptor) in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 34:744-755.

Ye, X, Zhang, L, Tian, Y, Tan, A, Bai, J, Li, S (2010) Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34:501-509.

Young, GM, Miller, VL (1997) Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 25:319-328.

Yuan, C, Pan, X, Gong, Y, Xia, A, Wu, G, Tang, J, Han, X (2008) Effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology*, 8:51-58.

Zapata, A (1979) Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental & Comparative Immunology*, 3:55-65.

Zeng, F, Tee, C, Liu, M, Sherry, V, Dixon, B, Duncker, BP, Bols, NC (2014) The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethynylsulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells. *Aquatic Toxicology*, 146:45-51.

Zhang, R, Evans, G, Rotella, FJ, Westbrook, EM, Beno, D, Huberman, E, Joachimiak, A, Collart, FR (1999) Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 38:4691-4700.

Zhang, X, He, K, Duan, Z, Zhou, J, Yu, Z, Ni, Y, Lu, C (2009) Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2. *Microbial Pathogenesis*, 47:267-273.

Zhang, X, Wu, FX, Sun, M, Sang, QY, Wang, YJ, Wang, XK (2008) Study on antimicrobial and antiviral activities of lysozyme from marine strain S-12-86 *in vitro*. *Agricultural Sciences in China*, 7:112-116.

Zhang, YA, Salinas, I, Li, J, Parra, D, Bjork, S, Xu, Z, LaPatra, SE, Bartholomew, J, Sunyer, JO (2010) IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11:827-835.

Bibliografía

Zhao, JH, Meng, XL, Zhang, J, Li, YL, Li, YJ, Fan, ZM (2014a) Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen glucose deprivation injury: role of HSP70 and inhibition of apoptosis. *Journal of Huazhong University of Science & Technology [Medical Sciences]*, 34:18-22.

Zhao, S, Fung-Leung, WP, Bittner, A, Ngo, K, Liu, X (2014b) Comparison of RNA-Seq and Microarray in transcriptome profiling of activated T Cells. *PLoS One*, 9:e78644.

Zhou, J, Zhang, X, He, K, Wang, W, Ni, Y, Zhu, H, Yu, Z, Mao, A, Lv, L (2014) Characterization and proteome analysis of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic *Streptococcus suis* Serotype 2. *Current Microbiology*, 68:663-669.

Zorrilla, I, Balebona, MC, Moriñigo, MA, Sarasquete, C, Borrego, JJ (1999) Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 22:167-172.

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

Zou, J, Holland, JW, Pleguezuelos, O, Cunningham, C, Secombes, CJ (2000) Factors influencing the expression of interleukin-1 beta in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 24:575-582.

Zou, J, Peddie, S, Scapigliati, G, Zhang, Y, Bols, NC, Ellis, AE, Secombes, CJ (2003) Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27:813-822.

Zou, YX, Mo, ZL, Hao, B, Ye, XH, Guo, DS, Zhang, PJ (2010) Screening of genes expressed *in vivo* after infection by *Vibrio anguillarum* M3. *Letters in Applied Microbiology*, 51:564-569.



ANEXO I

Gen	Código	Secuencia (5'→3')	Referencia
Interleucina 1 beta	IL-1 β	CGCAGAAAGTGACATGTTGAGATTT (F) GGAAGCGGGCAGACATGA (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Interleucina 6	IL-6	ACAATTTCTGCAGAGATAAAAGTAAGCT (F) CAAGCCCTCAGGCCTACAATATTAA (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Interleucina 8	IL-8	GAAGGTGGAAATAATTCCTGGAAGCT (F) TGTCTTTTTTCAGCGTGGCAATG (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Complejo C1q del complemento	C1q	CTACGCTTCTAACAGTGTGATCCT (F) AGCTGCACACACACCTCATC (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Complemento C3	C3	ACCTTAGACTGCCCTACTCTGCTGTCCGTG (F) GCACTGCACACATCATCCGTCTCAGAC (R)	Prieto-Alamo <i>et al.</i> (2009)
Complemento C4	C4	GACTGACAAAGAATGATCGTTTGCA (F) CTGAGCACTTCGACAATGTATCCAT (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Complemento C7	C7	GGCACACACTATCTGTGCGCAGGGCTC (F) GGCGAACGCCTGATGGTTTAACTCCAG (R)	Prieto-Alamo <i>et al.</i> (2009)
Complemento C9	C9	TCAAATTCAGCCCAAGTGAGGATAC (F) CTCAGACCGACATTCACATTCAC (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Lisozima tipo C1	LYS-C1	CAGATCAACAGCCGCTATTGG (F) GCTGATTCCACATGCATTTGAAGTG (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Lisozima tipo G	LYS-G	ACTGCTCGCGGTGAATGGGACA (F) CCTGAAAATTTATTACGGATTTCGGCCAATG (R)	Salas-Leiton <i>et al.</i> (2010)
Proteína 1 de reconocimiento de peptidoglicano	PGLYRP1	GCAGGCTCTGATGGACACAT (F) CCTATTGAGTTGTGTCCAAGAGTGT (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Clúster de diferenciación 4	CD4	GACCTCAGGCTGCAATGGT (F) TGAGCAGAGTGATGGACAGACT (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Clúster de diferenciación 8 alfa	CD8 α	GTGCCAGCATTAAGCAACGA (F) GCAGTCACAACCTCCGCTCTTT (R)	Montero <i>et al.</i> (2015)
Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1b	MHC 1B	CGACCGAATCATGACAACAC (F) GCACAACCATCACAACCAAG (R)	Diseño propio
Caspasa 1	CASP1	AACATTCCCAGCCAGAAGAT (F) TCCCATGTTAGCTTTGGTC (R)	Diseño propio
Caspasa 8	CASP8	TGCTTTCTGGACGTGAAGT (F) TGATCTTCTCCAGGCGTTT (R)	Diseño propio
Caspasa 9	CASP9	TGTTTCAGCCTCTCCCATTT(F) ATGATGAGGCAGTGACCACA (R)	Diseño propio
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF α	CTGGGACTGCTGGCACTTGGATTTG (F) CAGTTCTCCACGCTGACGTACTGTGCAAC (R)	Osuna-Jimenez <i>et al.</i> (2009)
Factor 3 asociado al receptor TNF	TRAF-3	CCGCCGACAGATGAACATCG (F) CAAGCTCACGGTTCAGGAAGGTCAG (R)	Prieto-Alamo <i>et al.</i> (2009)
Receptor de proteínas de células citotóxicas no específicas	NCCRP-1	ATGCCCGACAGCCTGGACTGG (F) CCAACCTCAGGTTTCAGGTGGAGGGATG (R)	Prieto-Alamo <i>et al.</i> (2009)
Hepcidina	HAMP-1	ACACTCGTGCTCGCCTTTGTTTGCTTC (F) TGACTCCAGCGTCTGTGTCTGACATGATTC (R)	Osuna-Jimenez <i>et al.</i> (2009)
Transferrina	TF	CGTTGTATCGCTCCTCATCTCTGGGTTT (F) CTACTTCAGTGAGAGCTGTGCCCTGGAG (R)	Prieto-Alamo <i>et al.</i> (2009)

Continúa en la página siguiente

Anexo I

Ferritina M	FERR-M	ATGGAGTCTCAAGTGCGTCGGAACCTACCAC (F) CATGCTCCTTCTCCTCCTCGCTGTTCTC (R)	Prieto- Alamo <i>et al.</i> (2009)
Haptoglobina	HP-1	GAAATGTAGACCATGACCTGCCAGGGGAC (F) TGAAACATCTGTGCGCAGCCTCCAGGTTAG (R)	Prieto- Alamo <i>et al.</i> (2009)
Proteína de choque térmico GP96	GP96	GAGTCTTCTCCCTTTGTTGAGCGGCTG (F) TGATGCCTTCCTTTGCCACGTTCTG (R)	Osuna- Jimenez <i>et al.</i> (2009)
Proteína de choque térmico 90AA	HSP90AA	GACCAAGCCTATCTGGACCCGCAAC (F) TTGACAGCCAGGTGGTCTCCAGT (R)	Manchado <i>et al.</i> (2008)
Proteína de choque térmico 90AB	HSP90AB	TCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCGGCTTA (F) GCCAAGGGGCTCACCTGTGTCG (R)	Manchado <i>et al.</i> (2008)
Proteína de choque térmico 70	HSP70	GCTATACCAGGGAGGGATGGAAGGAGGG (F) CGACCTCCTCAATATTTGGGCCAGCA (R)	Salas-Leiton <i>et al.</i> (2010)

SUMMARY

Fish aquaculture is an important industry in southern Europe, mainly focused on the culture of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Nowadays, species such as Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a flatfish with great potential for farming at commercial scale due to its elevated flesh quality, high market value and increasing demand by consumers are being cultured in the southwestern and Mediterranean areas of Spain and Portugal (Morais *et al.*, 2014). However, like other fish species, *S. senegalensis* is highly susceptible to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infections, a bacterial pathogen that has been isolated from diseased *S. senegalensis* specimens from fingerling to broodstock stages (Zorrilla *et al.*, 1999; Martínez-Manzanares *et al.*, 2008).

P. damsela subsp. *piscicida*, the etiological agent of photobacteriosis or pasteurellosis, is an important bacterial pathogen affecting marine fish species worldwide (Romalde, 2002; Wang *et al.*, 2013). *P. damsela* subsp. *piscicida* is able to avoid host defenses by invasion and intracellular survival in macrophages (Elkamel *et al.*, 2003) and non-phagocytic cells, mainly epithelial cells (Magariños *et al.*, 1996; López-Dóriga *et al.*, 2000). In addition, an exotoxin named AIP56 has been described and considered responsible for inducing apoptosis of phagocytes (Do Vale *et al.*, 2005). Other virulence factors reported in *P. damsela* subsp. *piscicida* include restricting complement-mediated activity (Acosta *et al.*, 2006), iron acquisition mechanisms such as siderophores that enable the pathogen to obtain iron from transferrin (Fouz *et al.*, 1997) and bind haemin (Do Vale *et al.*, 2002), as well as antioxidant enzymatic activities capable to counteract superoxide radicals (Barnes *et al.*, 1999).

The treatment of infectious diseases, including photobacteriosis, involves the use of antimicrobial agents. The large volume of antimicrobials used in recent years has significant negative impact both on the environment and on increased resistance (Haya *et al.*, 2001; Boxall *et al.*, 2004). This evidence has led to a drastic restriction in the use of antibiotics in this industry and very few antimicrobials have been authorized in the treatment of bacterial diseases (Cabello, 2006). In order to prevent infectious outbreaks and diminish the use of antibiotics, vaccination represents a valuable alternative (Hastein *et al.*, 2005; Andreoni *et al.*, 2013). Several vaccine formulations based on inactivated whole bacteria or their products have been proposed to prevent photobacteriosis in farmed fish (Fukuda & Kusuda, 1985; Magariños *et al.*, 1999; Andreoni *et al.*, 2013). The genomic identification of potential vaccine candidates for

Summary

the development of a recombinant subunit vaccine has also been applied with interesting results (Ho *et al.*, 2011; Andreoni *et al.*, 2013) but commercial protective vaccines for most fish species are not available yet.

In addition, although some studies on the immune response to both *P. damsela* subsp. *piscicida* infection and vaccination have been carried out in fish species such as *Seriola* (Andreoni & Magnani, 2014), *D. labrax* (Andreoni *et al.*, 2013; Mosca *et al.*, 2014) and *S. aurata* (Acosta *et al.*, 2004), information on *S. senegalensis* immune response is still scarce.

On the other hand, it is well established that microorganisms respond to many different extracellular signals in the environment (Goh *et al.*, 2002). Bacteria express different repertoires of proteins in response to environmental conditions and when invading a host, sense *in vivo* environment and adapt by inducing or repressing specific genes allowing the pathogen survive in the host and progression of the infection (Li *et al.*, 2013). In the case of pathogens, identification of genes with up-regulated expression *in vivo* compared to *in vitro* conditions might give an insight into those genes relevant to the bacterial virulence.

In the present PhD thesis, the immune response of *S. senegalensis* against *P. damsela* subsp. *piscicida* infection and vaccination has been studied through the analysis of the transcription of immune related genes. In addition, the potential expression of antigenic proteins by the pathogen *P. damsela* subsp. *piscicida* during the infection of *S. senegalensis* has been determined. The identification of antigenic proteins induced *in vivo* has been approached by using the *in vivo* induced antigen technology (IVIAT). Finally, transcription of virulence related genes and IVIAT identified genes under different bacterial growth conditions, including *ex vivo* *S. senegalensis* head kidney infection has been determined.

In the first chapter of the present PhD thesis, response of cultured *S. senegalensis* to *P. damsela* subsp. *piscicida* infection has been studied. Early and late fish responses to the infection as well as two routes of infection, immersion (IM) and intraperitoneal injection (IP) have been evaluated. These routes of administration were selected because intraperitoneal injection is the most widely infection route used in experimental studies, whilst the immersion challenge represents a route closer to natural infection. Results obtained have been published in *Veterinary Immunology Immunopathology* 179 (2016) 8-17 (Article section – article 1).

Briefly, transcription of iron metabolism related genes (TF, FERR-M, HP-1 and HAMP-1) as well as innate immune system components such as complement proteins (C3 and C7), lysozyme (LYS-G), TNF family (TNF α , TRAF-3), NCCRP-1 and heat shock protein encoding genes (HSP70, HSP90AA, HSP90AB and GP96) were determined in the liver and head kidney of *S. senegalensis* specimens after *P. damsela* subsp. *piscicida* infection.

For infection, Senegalese sole specimens (130 ± 15 g mean body weight, N = 160), were randomly stocked in eight separated tanks (20 fish per tank) under optimal stocking density (7 kg m^{-2}) with recirculating aerated seawater at 20-22 °C. Before challenge, absence of *P. damsela* subsp. *piscicida* was checked by microbiological and PCR analysis of internal organs (Osorio *et al.*, 1999). *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg 41/01 strain was selected for infection experiments and cells were grown at 22 °C for 24 h and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) to a final concentration of 10^5 CFU ml^{-1} . Four experimental groups were established and two replicates of each group done in order to sample at selected intervals and test fish mortality after infection. Fish were anaesthetized with clove oil (200 ppm) and specimens injected with 0.1 ml of the bacterial suspension (dose 10^4 CFU g^{-1}) (IP group). Control fish were injected with the same volume of sterile phosphate buffered saline (PBS) (IP Control group). In the immersion challenge, specimens were maintained in a bacterial suspension (dose 10^7 CFU ml^{-1}) at a stocking density of 7 kg m^{-2} with aeration, 20-22 °C for 50 min (IM group). In this case, control fish were subjected to similar immersion conditions but devoid of *P. damsela* subsp. *piscicida* (IM Control group). Specimens were returned to their respective tanks and the eight groups kept separately.

Sole peripheral blood was collected 24, 72 h and 30 days post-infection by caudal puncture and sera obtained by allowing the blood to clot at room temperature. Specific antibody levels against *P. damsela* subsp. *piscicida* in fish sera were determined using ELISA. Liver and head kidney were dissected and divided into two parts, one was used for DNA extraction and specific *P. damsela* subsp. *piscicida* PCR detection according to Osorio *et al.* (1999) and the other for fish RNA isolation and qPCR assays. Fish mortality in the eight groups was monitored for 30 days and PCR and bacteriological analysis of internal organs of just dead fish was carried out to confirm death by bacterial infection.

Summary

Mortality was observed only in IP inoculated specimens and started 4 days after infection, its maximum (35%) being reached 6 days post-infection. Afterwards, no mortality was detected until the end of the experiment (30 days post-infection). Despite no mortality was observed in IM infected fish, *P. damselae* subsp. *piscicida* was detected by PCR in kidney and liver samples from these fish 24 and 72 h post-infection; no positive result was obtained in IP or IM infected fish 30 d post-infection. Fish developed specific antibodies 30 d post-infection by both routes, higher levels being detected in IP infected specimens.

Transcription of genes related with complement factors (C3 and C7), lysozyme (LYS-G), inflammatory response (TNF α , TRAF-3 and NCCRP-1) iron metabolism (HAMP-1, TF, HP-1 and FERR-M) and heat shock proteins (HSP90AB and GP96) was modulated in *S. senegalensis* specimens after *P. damselae* subsp. *piscicida* infection by both routes; however, immune response was mainly focused in kidney tissues in IM infected fish, whilst participation of the liver was notorious after IP infection. Differences in the outcome of the infection may be the result of a more extensive infection in IP fish compared to IM infected, or the interaction with mucosal components of the immune system. However, we have observed that IP infection of *S. senegalensis* specimens results in increased relative transcription of genes related to inflammatory response and iron metabolism. Although inflammation mediates anti-bacterial responses and the activity of T and B cells involved in acquired immune response, they may also have adverse effects for the host. Both infection routes resulted in increased relative transcript levels of FERR-M, HP-1 and HAMP-1 genes and TF decreased relative transcription, conducting to lower iron availability for the pathogen. This response can be considered as a strategy to limit iron availability for *P. damselae* subsp. *piscicida*, a pathogen capable to obtain iron from transferrin. Although iron sequestration has a protective role against many bacterial pathogens, this strategy could result in anaemia, damaging the host. However, further experiments to establish a potential relationship between mortality observed in *S. senegalensis* and lower iron availability for the host need to be carried out.

Relative transcription of genes encoding lysozyme and complement factors C3 and C7 also increased regardless of the infection route; the liver was the main organ involved in the initial stages and the kidney in later stages of the infection. TNF α and TRAF-3 relative gene transcription increased 24 h post-infection, this latter gene also

showing slight increased relative gene transcription 30 d post-infection. NCCRP-1 transcription changes were observed in the liver and kidney after IP infection; whilst IM infection resulted only in slight changes in the kidney of infected fish. This different response observed maybe related to lower numbers of cells invaded by the pathogen. Finally, different late modulation has been observed in the transcription of genes such as LYS-G, TF, NCCRP-1, GP96 and HSP90AB depending on the route of infection. Thus, gene transcription was modulated 30 d post-infection in the kidney of IM infected specimens; whereas IP infected fish showed modulation in a higher number of genes, in both liver and kidney tissues. Although further studies need to be carried out to improve the comprehension of the mechanisms activated during infection with *P. damsela* subsp. *piscicida*, results obtained in the present work contribute to the knowledge of the components involved in the development of protective responses against *P. damsela* subsp. *piscicida* in *S. senegalensis*. This information is relevant for the development of effective vaccines against this pathogen.

In order to achieve better understanding of the mechanisms related to immune response, which is crucial for the development of effective approaches for disease management (Ferraresso *et al.*, 2016), the transcription of immune related genes in *S. senegalensis* specimens vaccinated against *P. damsela* subsp. *piscicida* has also been evaluated in the present PhD Thesis. Results obtained have been published in *Fish & Shellfish Immunology* (2017) (article section – article 2). Identification of predictors of vaccine-induced protection represents an attractive alternative to reduce the use of animals in challenges and increase animal welfare. Plotkin (2010) define a surrogate of vaccine-induced protection as a quantified immune response that substitutes for the, perhaps unknown, specific response closely related to protection. Although numerous studies have been carried out to identify surrogates of vaccination in mammals, very few have been performed in fish. In the present work, it was considered interesting to evaluate the differential gene expression in vaccinated and unvaccinated *S. senegalensis* specimens surviving *P. damsela* subsp. *piscicida* infection to identify a potential surrogate of protection against *P. damsela* subsp. *piscicida* infections after vaccination.

Experiments carried out consisted in the vaccination by intraperitoneal injection and immersion of two groups of *S. senegalensis* specimens with a vaccine preparation consisting in a bacterin suspension of *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41/01 supplemented with their extracellular products according to Arijo *et al.* (2005).

Summary

For vaccination, Senegalese sole specimens (52.5 ± 8.3 g mean body weight) from the Spanish Institute of Oceanography (Santander, Spain) were randomly distributed in 300 L seawater tanks (two tanks per treatment) at $18.3 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Before the vaccination, absence of *P. damselae* subsp. *piscicida* was determined in head kidney and liver by PCR assays according to Osorio *et al.* (1999) and by microbiological techniques. After the acclimation period, two experimental groups were established and two replicate of each group done. For intraperitoneal vaccination, fish specimens were intraperitoneally injected with 0.1 ml of the vaccine and 0.1 ml Freund's incomplete adjuvant (FIA) (IP group). In the immersion vaccination, specimens were maintained in a vaccine suspension (10-fold dilution of the vaccine in aerated seawater) at a density of 7 kg m^{-2} , $20\text{--}22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 50 min (IM group). Control fish were injected with the same volume of sterile PBS (Control group) or with 0.1 ml sterile PBS and 0.1 ml FIA (FIA Control group). Specimens were returned to their respective tanks and received a booster 30 d later in the same conditions described above.

Sole peripheral blood was sampled 90 days post-immunization by caudal puncture and sera obtained by allowing the blood to clot at room temperature. Sera specific antibody levels against *P. damselae* subsp. *piscicida* were determined by ELISA. Liver and head kidney samples were also obtained for RNA isolation and qPCR assays. Protection induced by vaccination was evaluated by determination of the survival rates after intraperitoneal infection with *P. damselae* subsp. *piscicida*.

Fish not vaccinated against *P. damselae* subsp. *piscicida* (control and FIA control) showed mortality rates ranging from 75% to 76.9%, whilst mortality in IM vaccinated group was 50%. The relative percentage of survival (RPS) obtained in IP and IM vaccinated groups was 100% and 35%, respectively. In both cases, significant increased antibody serum levels were detected. In addition, vaccination resulted in different gene transcription modulation depending on the organ examined and the vaccination route used. Thus, C1q, TNF α , HP-1, HSP70 and especially C7, C9, LYS-C1 and TF up-regulation was detected in IP fish while IM fish did not show significant changes in these gene transcription. The complement system has an essential role in clearance of pathogenic microorganisms, induction of inflammation, elimination of apoptotic cells and modulation of adaptive immune response (Sunyer & Lambris, 1998; Le Friec & Kemper, 2009). The activity of component C1q is crucial because by its binding to immune complexes induces pathogen recognition (Matsushita *et al.*, 2004),

activation of classical complement pathway (Kishore & Reid, 2000), phagocytosis (Tahtouh *et al.*, 2009) and cell migration (Bohlon *et al.*, 2007). In addition, it is a link between innate and adaptive immunity by modulation of antigen presenting cells, lymphocytes B and fibroblasts (Sunyer *et al.*, 2003; Kishore *et al.*, 2004). Activation of the complement, including C7 and C9, results in the formation of the membrane attack complex (MAC), which kills bacteria by disrupting their membranes (Katagiri *et al.*, 1999). This way, absence of mortality in IP fish, points out to a relevant role of complement in the protective response developed by intraperitoneal vaccine+FIA against *P. damsela* subsp. *piscicida*. In this study, IP fish showed significant increased transcription of the genes encoding these components only in the head kidney. Similar results were reported by Guo *et al.* (2016), who suggested that the MAC complex components were more effectively triggered by Gram negative bacteria in the head-kidney than in the liver of fish.

Expression of LYS-C can be modulated by fish pathogens and pathogen associated molecular patterns (PAMPs) (Ponce *et al.*, 2011) and up-regulation after bacterial infection and lipopolysaccharide (LPS) inoculation has been reported in *S. senegalensis* (Fernández-Trujillo *et al.*, 2008). In the present study, LYS-C1 transcription modulation observed in IP vaccinated fish may be mediated by PAMPs displayed in *P. damsela* subsp. *piscicida* ECPs, bacterin cells, or because of a synergetic effect with adjuvant, effect already observed by Jiang *et al.* (2015). Increased LYS-C1 gene transcription after bacterial challenge may suggest an important role in the defense of fish against *P. damsela* subsp. *piscicida* infections for this type of lysozyme as it has been reported in other species (Zhang *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2012). This role is also supported by the up-regulation observed in the IP group, which was resistant to *P. damsela* subsp. *piscicida* challenge. Several studies have reported high levels of lysozyme C in the liver and head kidney of fish challenged with bacterial pathogens (Ye *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016). However, in the present work notorious up-regulation of LYS-C1 transcription was only detected in the head kidney of IP vaccinated *S. senegalensis* specimens.

Proliferation and persistence of pathogens in the host require mechanisms to compete for iron acquisition (Do Vale *et al.*, 2002; Osorio *et al.*, 2006). Different modulation of the transcription of iron homeostasis related genes was detected in the head kidney of IP and IM fish, with significant up-regulation of HP-1 and, especially,

Summary

TF observed only in IP fish. On the other hand, HAMP-1 relative transcription increased in the head kidney of both IP and IM fish. Hepcidin has a dual function in fish, with a role during infection and iron homeostasis (Rodrigues *et al.*, 2006; Pereiro *et al.*, 2012). This dual function is related to the control of the pathogen in the host thanks to its antimicrobial effect and to the contribution to create low iron levels in fish blood infected by *P. damsela* subsp. *piscicida* (Mosca *et al.*, 2014). On the other hand, transferrin has the ability to chelate iron and haptoglobin combines with hemoglobin facilitating the hepatic recycling of hemo iron. An important role in the control of *P. damsela* subsp. *piscicida* infections in *S. senegalensis* can be attributed to both proteins, considering the ability to use hemoglobin as a source of iron by this pathogen (Magariños *et al.*, 1994) and the negative acute phase character described for transferrin in *P. damsela* subsp. *piscicida* infections of other fish species (Neves *et al.*, 2009).

Finally, IP vaccinated fish, which showed 100% survival after challenge, slightly increased HSP70 gene transcription. HSPs are involved in the acute phase response and have been proposed as immunological regulators against microbial pathogens (Warger *et al.*, 2006; Sung & MacRae, 2011). HSP70 family is key to regulate fundamental cellular events that promote the survival of cells exposed to different stressors such as bacterial infections (Zeng *et al.*, 2014).

Globally, the results obtained indicate better immune status in IP vaccinated fish, capable to face *P. damsela* subsp. *piscicida* infection with no mortality in challenged fish. Identification of predictors of vaccine-induced protection represents an attractive alternative to reduce the use of animals in challenges and increase animal welfare. Plotkin (2010) defines a surrogate of vaccine-induced protection as a quantified immune response that substitutes for the, perhaps unknown, specific response closely related to protection. Based on our results, a biosignature comprised of relative transcription of LYS-C1, HAMP-1, TF, HP-1, HSP70 and complement components C1q, C3, C4, C7, C9; encoding genes could act as a surrogate of protection against *P. damsela* subsp. *piscicida* infection and predict success after IP vaccination (using FIA+vaccine against *P. damsela* subsp. *piscicida*) before challenge. However, more studies need to be carried out in order to confirm this proposal.

In order to check the suitability of the proposed surrogate, and the performance of vaccinated fish in *P. damsela* subsp. *piscicida* infection, the immune response of vaccinated and unvaccinated fish surviving the infection challenge was compared.

Gene transcription was differentially modulated in surviving *S. senegalensis* specimens depending on the previous vaccination status. Thus, although LYS-G was not up-regulated by vaccination, subsequent *P. damsela* subsp. *piscicida* infection resulted in increased transcription, especially in unvaccinated fish. Most g-type lysozymes have no signal peptide, suggesting an intracellular location of the enzyme (Irwin & Gong, 2003; Ponce *et al.*, 2011; Buonocore *et al.*, 2014). On the other hand, LYS-G up-regulation is stronger after infection by intracellular pathogens such as *Francisella noatunensis* and *Edwardsiella tarda*, with even absence of up-regulation by non-invasive pathogens such as *V. harveyi* (Seppola *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2013; Mohanty & Sahoo, 2010). In the present work, lack of up-regulation by *P. damsela* subsp. *piscicida* vaccination together with increased LYS-G transcription after infection, points out to a role of intracellular invasion in LYS-G induction. Thus, whilst the bacterin would not be able to invade host cells, viable bacteria would enter fish cells and induce LYS-G transcription. In this context, weaker up-regulation of challenged IP vaccinated fish compared to unvaccinated ones may be explained by the lower invasion rates expected after IP vaccination. In addition, higher LYS-C1 transcription levels observed in IP vaccinated fish may represent an advantageous situation that could sum this LYS-C activity to that of LYS-G.

Higher up-regulation of pro-inflammatory genes such as IL-6, IL-8 and IL-1 β was observed in the liver of unvaccinated fish compared to the head kidney. In addition, increased TNF α relative transcription was detected in both unvaccinated and IM vaccinated soles surviving *P. damsela* subsp. *piscicida* infection. Increased TNF α levels are associated to microbial infection (Pressley *et al.*, 2005; Ishibe *et al.*, 2009). Roca *et al.* (2008) demonstrated that fish endothelial cells are the main target cells of TNF α promoting the expression of E-selectin and chemokines, and suggesting that this cytokine is involved in the recruitment of phagocytes. This pro-inflammatory response could be higher in the liver due to the additional IL-1 β and caspase 1 up-regulation, especially notorious in unvaccinated fish. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine (Secombes *et al.*, 2001) that can induce the release of other cytokines capable to trigger immune cells of both innate and adaptive immunity such as macrophages, lymphocytes and NCC cells (Apte *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008). On the other hand, the inflammasome is a cellular multiprotein complex that responds to a diverse range of microbial stress and damage signals resulting in direct activation of caspase 1 and subsequent induction of the secretion of pro-inflammatory cytokines (Lai & Gallo,

Summary

2009). In our study, jointly up-regulation of CASP1 and IL-1 β , IL-6 and IL-8 may indicate, according to Costas *et al.* (2014), the activation of pro-inflammatory cytokines by caspase 1.

Increased relative transcription of genes encoding caspase 8 and caspase 9 detected in the liver of all infected fish could be related to the up-regulation of genes encoding pro-inflammatory cytokines, especially high in liver. One of the effects of the inflammatory process involves migration of leukocytes, including phagocytes. *P. damselae* subsp. *piscicida* AIP56 toxin induces selective apoptosis to macrophages and neutrophils (Do Vale *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010) through a caspase-dependent apoptotic pathway (Costa-Ramos *et al.*, 2011). Higher transcription levels of genes related to inflammation in the liver could indicate increased number of AIP56 target cells, leading to more detrimental effect of the toxin AIP56 in this organ. Results obtained in the present PhD thesis show strong up-regulation of genes involved in the inflammatory response to *P. damselae* subsp. *piscicida* infection, both in the liver and head kidney that can be partially mitigated by previous vaccination, especially IP vaccination.

MHC I plays, together with class II, a pivotal role in mediating antigen recognition by lymphocytes through the interaction with TCR molecules (Ferrareso *et al.*, 2016), class I being key players in initiating an immune response against intracellular pathogens, helping cytotoxic lymphocytes recognize and kill cells presenting bacteria-derived peptides in their surfaces (Fischer *et al.*, 2006). MHC I up-regulation observed in all fish surviving *P. damselae* subsp. *piscicida* infection could be the result of a cytotoxic mediated immune response that leads to the elimination of the target cell by apoptosis. However, this point needs further study as CD8 α and MHC I gene transcription were not jointly up-regulated. In addition, down-regulation of gene encoding MHC I observed in the liver of unvaccinated fish could indicate a potential immune-suppression because the classical function of MHC class I molecules is the presentation of processed intracellular peptides to CD8+ lymphocytes, allowing the activation of T cells (Dirscherl *et al.*, 2014). In this context, the infections caused by some fish viruses and pathogenic bacteria induce up-regulation of MHC I gene (Fischer *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.*, 2007). Similarly, increased transcription of CD8 α gene has been reported during infections with the intracellular pathogen *E. tarda* (Yamasaki *et al.*, 2014). Although data obtained in our study do not seem to show a direct relation between MHC class I and CD8 α gene transcription, ability to up-regulate MHC I gene

both in the kidney and liver in IP group, could facilitate the recognition of *P. damselae* subsp. *piscicida* antigens intracellularly processed by CD8⁺ lymphocytes. This fact could contribute to the absence of mortality observed in these fish. In this way, IM fish did not show MHC I down-regulation unlike unvaccinated fish, this latter showing the highest mortality rate.

NCCRP-1, is a receptor present in NC cells (NCC) able to recognize the natural killer target antigen (NKTag) on a broad range of target cells (Jaso-Friedmann *et al.*, 1997) and ultimately produce target cell lysis (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001). Significant increased transcription of NCCRP-1 gene was detected in the liver of unvaccinated fish, which may be associated to the intracellular character of *P. damselae* subsp. *piscicida* infection (López-Dóriga *et al.*, 2000) and a cytotoxic response mediated by NCCRP-1.

In the case of iron homeostasis, up-regulation of hepcidin and haptoglobin encoding genes was observed in unvaccinated soles. These data corroborate those for hepcidin observed in sea bass (Mosca *et al.*, 2014), gilthead seabream (Pellizzari *et al.*, 2013) and Senegalese sole (First chapter of this PhD thesis) infected with *P. damselae* subsp. *piscicida*.

Like in IP vaccinated fish, up-regulation of iron homeostasis related genes contributes to create a situation of low iron availability, which can restrict pathogen growth. On the other hand, hepatic down-regulation of transferrin encoding gene and weaker gene up-regulation in the head kidney of unvaccinated and IM vaccinated fish suggest an important role of transferrin in the defense against *P. damselae* subsp. *piscicida* infections, probably allowing *P. damselae* subsp. *piscicida* survival in the liver. This situation would be the outcome of a more extensive pathogen proliferation in IM and unvaccinated fish and it can be related to the higher transcription levels of genes related to apoptosis previously described.

Regarding HSP encoding genes, surviving fish showed HSP70 and HSP90AB increased transcription. This up-regulation has been linked to the reduction of apoptosis in different cellular types, blocking extrinsic and intrinsic apoptotic pathways by interfering with caspase activation (Lanneau *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2014). The up-regulation of genes encoding HSPs proteins could be a response to liver and head kidney damage due to *P. damselae* subsp. *piscicida* infection. IP fish showed up-regulation of HSP70 and HSP90AB genes in the head kidney whereas in IM and unvaccinated fish up-regulation was detected in both liver and head kidney.

Summary

In short, *S. senegalensis* infection by *P. damsela* subsp. *piscicida* is associated to late inflammatory response and increased lysozyme G gene transcription. Survival to *P. damsela* subsp. *piscicida* infection results in the modulation of the same genes up-regulated by IP vaccination, supporting the biosignature proposed in the present work; however, inflammatory response is also displayed by infected fish. The higher resistance to *P. damsela* subsp. *piscicida* infection observed in IP vaccinated fish could be related to weaker inflammatory response, facilitating MHC I antigen processing and lower iron availability to the pathogen.

In the last chapter of the Thesis, the search for new candidate antigens for vaccination against *P. damsela* subsp. *piscicida*, specifically in *S. senegalensis* has been addressed. We have considered that bacteria express different repertoires of proteins under *in vitro* culture conditions due to missing *in vivo* signals, such as those coming from the interaction with host cells, extracellular environment, and restriction in nutrients such as free iron. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT) is an immunological technique that uses antisera from an infected host to identify pathogen antigens expressed *in vivo* (Handfield *et al.*, 2000; Rollins *et al.*, 2005). Thus, it allows for the detection of immunogenic epitopes in proteins not expressed by bacteria during *in vitro* growth. Results obtained have been accepted for publication in *Fish & Shellfish Immunology* 64 (2017) 446-456 (article section – article 3).

In the present PhD Thesis, an expression library of *P. damsela* subsp. *piscicida* Lg41/01 has been constructed in *E. coli* BL21 (DE3) with pET30c expression vector, which is under the control of the T7 promoter. Briefly, *P. damsela* subsp. *piscicida* genomic DNA was isolated, cut in 1000 – 3500 bp fragments and ligated with pET30c vector. Mixture ligation was used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells to generate a genomic expression library with a size of 7000 recombinants.

Sera collected from *S. senegalensis* specimens surviving *P. damsela* subsp. *piscicida* infection was checked to confirm the presence of specific antibodies and was adsorbed against *in vitro* grown *P. damsela* subsp. *piscicida* and *E. coli* BL21 (DE3) cells and lysates. The efficacy of adsorption procedure was assessed by determining serum antibody titers against *P. damsela* subsp. *piscicida* by ELISA.

The genomic expression library was screened by immunoblot assay with both adsorbed and non-adsorbed sera from *S. senegalensis* specimens convalescent from a *P. damsela* subsp. *piscicida* infection. In the first round, a total of 118 clones with

reactivity compared to negative control *E. coli* BL21 (DE3) were selected. In the second screening, 18 out of 118 candidate clones showed positive reactivity, indicating that proteins encoded are expressed by *P. damsela* subsp. *piscicida* during *S. senegalensis* infection and are immunogenic for this fish species. In addition, five proteins were reactive against adsorbed sera, indicating their *in vivo* induced character. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (Impdh), serine hydroxymethyl transferase (Shmt) and alanyl-tRNA synthetase (AlaRS), involved in aminoacid and nucleotide metabolism; the protein with antioxidant activity alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) and a non-ribosomal peptide synthetase (Irp2) responsible for the synthesis of the siderophore piscibactin have been identified as antigens only induced in *P. damsela* subsp. *piscicida* during *S. senegalensis* infection. Proteins induced during *in vivo* growth of *P. damsela* subsp. *piscicida* represent promising targets for the development of novel antimicrobial or prophylactic agents in the treatment and prevention of photobacteriosis.

The transcription of putative *in vivo* expressed genes in *P. damsela* subsp. *piscicida* under different *in vitro* culture and during *ex vivo* infection of *S. senegalensis* head kidney cells was assessed by qPCR. For *in vitro* culture, *P. damsela* subsp. *piscicida* was grown in the presence of dipyriddy or FeCl₃.6H₂O at 22 °C to study the effect of iron availability. The effect of the oxidative stress on gene transcription, *P. damsela* subsp. *piscicida* was determined on cells grown with peroxyxynitrite and methyl viologen, which generates superoxide radicals.

For *ex vivo* assays, head kidney from five healthy *S. senegalensis* specimens were individually isolated and *P. damsela* subsp. *piscicida* bacterial suspension added to sole kidney cells. Co-incubation was performed at 22 °C for 0, 30, 60, 120 min and 6 h before relative qPCR analysis.

Induction of selected genes was also observed by *ex vivo* infection of head kidney cells. Thus, co-incubation with head kidney cells resulted in up-regulation of *irp1*, *irp2*, *ahpC*, *sod*, *alars* and *impdh* after 30 min incubation and lasted 6 h, whilst *shmt* started after 120 min. On the other hand, iron and oxidative stress modulated transcription of selected genes except for *alars*, *impdh* and *shmt*. It is noteworthy that despite no change was observed in these gene transcription in bacteria grown under replete and limiting iron conditions and oxidative stress, co-incubation with kidney cells resulted in transcription up-regulation. These results indicate that expression in *S.*

Summary

senegalensis kidney cells of genes selected by IVIAT technology is up-regulated in *ex vivo* conditions.

Transcription of *P. damsela* subsp. *piscicida* genes related to virulence factors reported by other authors was studied along with IVIAT genes. These genes included the one encoding Aip56 exotoxin and the gene encoding P53 protein, the second more abundant protein detected in the extracellular products of *P. damsela* subsp. *piscicida*. P53 protein has been identified as a NIpC/P60 family protein, which includes cell-wall related cysteine peptidases with homology to several Gram-negative bacterial proteins, many of them produced by pathogenic species (Grasso *et al.*, 2011).

In addition, adhesion and invasion abilities are essential in the initial stages of infection. Andreoni *et al.* (2013) found a lipoprotein (PDP_0080) involved in the adherence of the bacterium to epithelial cells. Vaccination of *D. labrax* with this lipoprotein resulted in increased survival when fish were challenged with *P. damsela* subsp. *piscicida*, however, there is no information on the conditions inducing expression of the protein.

Finally, considering the important role of iron in *S. senegalensis* infections by *P. damsela* subsp. *piscicida*, transcription of *hutB* and *hutD* genes was also assayed. These genes participate in an heme uptake system encoded in nine genes arranged in two operons, *hutWXZ* and *tonBexbBDhutBCD* and allow *P. damsela* subsp. *piscicida* to secrete proteins to extract heme from the complex and deliver it to an outer membrane receptor. Then, heme is transported into the periplasm by a TonB system, crossing finally the cytoplasmic membrane by an ATP-binding cassette system (Andreoni *et al.*, 2009). In this system, *tonBexbBD* genes encode the components of the Ton system and *hutBCD* genes the periplasmic hemin binding protein, the inner membrane permease and the ABC transporter ATPase (Juiz-Río *et al.*, 2005).

The results obtained indicate up-regulation of genes encoding the toxin Aip56, the protein P53 and the hemin binding and transport HutB and HutD proteins in cells grown under iron limiting conditions regardless of the growth phase. Furthermore, *hutB* and *hutD* genes were also down-regulated in bacterial cells grown under iron overload. On the contrary, no modulation by iron availability was observed in the gene encoding the lipoprotein PDP_0080. Increased relative transcription observed in iron limiting conditions was more noticeable in stationary phase cultures compared to log phase in the case of Aip56, P53 and HutD encoding genes, whilst no difference related to the

growth phase was observed in *hutB*. Reactive oxygen and nitrogen species can also be encountered by pathogens during host infection. Oxidative stress due to superoxide anions did not modulate the transcription of assayed genes; however, Aip56 and P53 encoding genes were up-regulated by peroxynitrite.

Co-incubation of *P. damsela* subsp. *piscicida* with kidney cells from *S. senegalensis* resulted in up-regulation of all the genes assayed, especially those encoding proteins involved in hemin binding HutB and HutD. This up-regulation was observed 30 min post-incubation and lasted 6 h in the case of genes encoding Aip56, HutB and HutD, whilst increased transcription length was shorter for PDP_0080 and P53 protein encoding genes.

In summary, results obtained indicate regulation of genes encoding virulence factors by iron availability and oxidative stress, conditions faced by the pathogen during its *in vivo* stage in host infection. Transcription of the gene encoding the lipoprotein PDP_0080 was not modulated by these factors, although it was increased in *ex vivo* head kidney infection, thus indicating the influence of additional factors in the host.

Summary references

Acosta, F, Ellis, AE, Vivas, J, Padilla, D, Acosta, B, Déniz, S, Bravo, J, Real, F (2006) Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunology*, 20:709-717.

Acosta, F, Ruiz de Galarreta, CM, Ellis, AE, Diaz, R, Gomez, V, Padilla, D, Real, F (2004) Activation of the nitric oxide response in gilthead seabream after experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16:581-588.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Amagliani, G, Dominici, S, Riccioni, G, Zaccone, R, Mancuso, M, Scapigliati, G, Magnani, M (2013) Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31:820-826.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Bianconi, I, Dominici, S, Gorini, F, Magnani, M (2009) Expression, purification, and characterization of the recombinant putative periplasmic hemin-binding protein (*hutB*) of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 73:1180-1183.

Andreoni, F, Magnani, M (2014) Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014:-ID793817.

Apte, RN, Dotan, S, Elkabets, M, White, MR, Reich, E, Carmi, Y, Song, X, Dvozkin, T, Krelin, Y, Voronov, E (2006) The involvement of IL-1b in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Reviews*, 25:387-408.

Summary

Arijo, S, Rico, R, Chabrillon, M, Díaz-Rosales, P, Martínez-Manzanares, E, Balebona, MC, Toranzo, AE, Moriñigo, MA (2005) Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup) against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28:33-38.

Barnes, AC, Balebona, MC, Horne, MT, Ellis, AE (1999) Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology*, 145:483-494.

Bohlson, SS, Fraser, DA, Tenner, AJ (2007) Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular Immunology*, 44:33-43.

Boxall, AB, Fogg, LA, Blackwell, PA, Kay, P, Pemberton, EJ, Croxford, A (2004) Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 180:1-91.

Buonocore, F, Randelli, E, Trisolino, P, Facchiano, A, de Pascale, D, Scapigliati, G (2014) Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Immunology*, 62:10-18.

Cabello, FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8:1137-1144.

Costa-Ramos, C, Do Vale, A, Ludovico, P, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2011) The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:173-181.

Costas, B, Couto, A, Azeredo, R, Machado, M, Krogdahl, A, Oliva-Teles, A (2014) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune responses are modulated after feeding with purified antinutrients. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:173-181.

Dirscherl, H, McConnell, SC, Yoder, JA, de Jong, JLO (2014) The MHC class I genes of zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology*, 46:11-23.

Do Vale, A, Costa-Ramos, C, Silva, A, Silva, DSP, Gärtner, F, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2007) Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. *Cellular Microbiology*, 9:988-1003.

Do Vale, A, Magariños, B, Romalde, JL, Lemos, ML, Ellis, AE, Toranzo, AE (2002) Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48:109-115.

Do Vale, A, Marques, F, Silva, MT (2003) Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15:129-144.

Do Vale, A, Silva, MT, Dos Santos, NMS, Nascimento, DS, Reis-Rodrigues, P, Costa-Ramos, C, Ellis, AE, Azevedo, JE (2005) AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58:1025-1038.

Elkamel, AA, Hawke, JP, Henk, WG, Thune, RL (2003) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15:175-183.

Fernández-Trujillo, MA, Porta, J, Manchado, M, Borrego, JJ, Álvarez, MC, Béjar, J (2008) c-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish & Shellfish Immunology*, 25:697-700.

Ferraresso, S, Bonaldo, A, Parma, L, Buonocore, F, Scapigliati, G, Gatta, PP, Bargelloni, L (2016) Ontogenetic onset of immune-relevant genes in the common sole (*Solea solea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 57:278-292.

Fischer, U, Utke, K, Somamoto, T, Kollner, B, Ototake, M (2006) Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 20:209-226.

Fouz, B, Biosca, EG, Amaro, C (1997) High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *Journal of Applied Microbiology*, 82:157-167.

Fu, GH, Bai, ZY, Xia, JH, Liu, P, Yue, GH (2013) Analysis of two lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in asian seabass. *PLoS One* 8:e79743.

Fukuda, Y, Kusuda, R (1985) Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathology*, 20:421-425.

Goh, E, Yim, G, Tsui, W, McClure, J, Surette, MG, Davies, J (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:17025-17030.

Grasso, V, Do Vale, A, Reis, MI, Real, F, Padilla, D, Acosta, F, Dos Santos, NMS (2011) Identification of the second most abundant protein secreted by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *15th EAAP International conference on diseases of fish and shellfish*.

Guo, B, Wu, C, Lv, Z, Liu, C (2016) Characterisation and expression analysis of two terminal complement components: C7 and C9 from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 51:211-219.

Handfield, M, Bradly, LJ, Progulske-Fox, A, Hillman, JD (2000) IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. *Trends in Microbiology*, 8:336-339.

Hastein, T, Gudding, R, Evensen, O (2005) Bacterial vaccines for fish--an update of the current situation worldwide. *Journal of Developmental Biology*, 121:55-74.

Haya, K, Burrige, LE, Chang, BD (2001) Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. *ICES Journal of Marine Science*, 58:492-496.

Ho, LP, Lin, JHY, Liu, HC, Chen, HE, Chen, TZ, Yang, HL (2011) Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:412-419.

Irwing, DM, Gong, Z (2003) Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. *Journal of Molecular Evolution*, 56:386-389.

Summary

Ishibe, K, Yamanishi, T, Wang, Y, Osatomi, K, Hara, K, Kanai, K, Yamaguchi, K, Oda, T (2009) Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27:386-389.

Jaso-Friedmann, L, Leary, JH, III, Evans, DL (2001) The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:701-711.

Jaso-Friedmann, L, Leary, JH, III, Warren, J, McGraw, RA, Evans, DL (1997) Molecular characterization of a protozoan parasite target antigen recognized by nonspecific cytotoxic cells. *Cellular Immunology*, 176:93-102.

Jiang, J, Zheng, Z, Wang, K, Wang, J, He, Y, Wang, E, Chen, D, Ouyang, P, Geng, Y, Huang, X (2015) Adjuvant immune enhancement of subunit vaccine encoding pSCPI of *Streptococcus iniae* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *International Journal of Molecular Sciences*, 16:28001-28013.

Jorgensen, SM, Hetland, DL, Press, CM, Grimholt, U, Gjoen, T (2007) Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:576-588.

Juiz-Río, S, Osorio, CR, Lemos, ML (2005) Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of hutA pseudogenes. *Archives of Microbiology*, 185:347-358.

Katagiri, T, Hirono, I, Aoki, T (1999) Molecular analysis of complement component C8b and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics*, 50:43-48.

Kishore, U, Ghai, R, Greenhough, TJ, Shrive, AK, Bonifati, DM, Gadjeva, MG, Waters, P, Kojouharova, MS, Chakraborty, T, Agrawal, A (2004) Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunology Letters*, 95:113-128.

Kishore, U, Reid, KB (2000) C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49:159-170.

Lai, Y, Gallo, RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30:131-141.

Lanneau, D, Brunet, M, Frisan, E, Solary, E, Fontenay, M, Garrido, C (2008) Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 12:743-761.

Le Friec, G, Kemper, C (2009) Complement: coming full circle. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 57:393-407.

Li, S, Song, J, Huang, H, Chen, W, Li, M, Zhao, Y, Cong, Y, Zhu, J, Rao, X, Hu, X, Hu, F (2013) Identification of *in-vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human. *Microbial Pathogenesis*, 63:8-15.

Li, S, Wang, D, Liu, H, Yin, J, Lu, T (2016) Expression and antimicrobial activity of c-type lysozyme in taimen (*Hucho taimen*, Pallas). *Developmental & Comparative Immunology*, 63:156-162.

López-Dóriga, MV, Barnes, CA, Dos Santos, NMS, Ellis, AE (2000) Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, 146:21-30.

Lu, DQ, Bei, JX, Feng, LN, Zhang, Y, Liu, XC, Wang, JL (2008) Interleukin-1beta gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction. *Molecular Immunology*, 45:857-867.

Magariños, B, Romalde, JL, Barja, JL, Núñez, S, Toranzo, AE (1999) Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 19:159-161.

Magariños, B, Romalde, JL, Lemos, ML, Barja, JL, Toranzo, AE (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied & Environmental Microbiology*, 60:2990-2998.

Magariños, B, Romalde, JL, Noya, M, Barja, JL, Toranzo, AE (1996) Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 138:29-34.

Manchado, M, Salas-Leiton, E, Infante, C, Ponce, M, Asensio, E, Crespo, A, Zuasti, E, Canavate, JP (2008) Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 416:77-84.

Martínez-Manzanares, E, Tapia-Paniagua, S, Diaz-Rosales, P, Chabrilón, M, Moriñigo, MA (2008) Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, and gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) to several antimicrobials. *Journal of Fish Diseases*, 31:73-76.

Matsushita, M, Matsushita, A, Endo, Y, Nakata, M, Kojima, N, Mizuochi, T, Fujita, T (2004) Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:10127-10131.

Mohanty, BR, Sahoo, PK (2010) Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28:613-621.

Montero, D, Benitez-Dorta, V, Caballero, MJ, Ponce, M, Torrecillas, S, Izquierdo, M, Zamorano, MJ, Manchado, M (2015) Dietary vegetable oils: Effects on the expression of immune-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestine. *Fish & Shellfish Immunology*, 44:100-108.

Morais, S, Aragao, C, Cabrita, E, Conceição, LEC, Constela, M, Costas, B, Dias, J, Duncan, N, Engrola, S, Estevez, A, Gisbert, E, Mananós, E, Valente, LMP, Yúfera, M, Dinis, MT (2014) New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 6:1-37.

Mosca, F, Ciulli, S, Volpatti, D, Romano, N, Volpe, E, Bulfon, C, Massimini, M, Caccia, E, Galeotti, M, Tiscar, PG (2014) Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 162:83-95.

Summary

Neves, JV, Wilson, JM, Rodrigues, PN (2009) Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 33:848-857.

Osorio, CR, Collins, MD, Toranzo, AE, Barja, JL, Romalde, JL (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied & Environmental Microbiology*, 65:2942-2946.

Osorio, CR, Juiz-Río, S, Lemos, ML (2006) A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology*, 152:3327-3341.

Osuna-Jimenez, I, Williams, TD, Prieto-Alamo, MJ, Abril, N, Chipman, JK, Pueyo, C (2009) Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish & Shellfish Immunology*, 26:699-706.

Pellizzari, C, Krasnov, A, Afanasyev, S, Vitulo, N, Franch, R, Pegolo, S, Patarnello, T, Bargelloni, L (2013) High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: Results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish & Shellfish Immunology*, 34:1269-1278.

Pereiro, P, Figueras, A, Novoa, B (2012) A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload. *Fish & Shellfish Immunology*, 32:879-889.

Plotkin, SA (2010) Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical & Vaccine Immunology*, 17:1055-1065.

Ponce, M, Salas-Leiton, E, Garcia-Cegarra, A, Boligno, A, Coste, O, Infante, C, Gisbert, E, Rebordinos, L, Manchado, M (2011) Genomic characterization, phylogeny and gene regulation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 31:925-937.

Pressley, ME, Phelan, IPE, Witten, PE, Mellon, MT, Kim, CH (2005) Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebra fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 29:501-513.

Prieto-Alamo, MJ, Abril, N, Osuna-Jimenez, I, Pueyo, C (2009) *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR. *Aquatic Toxicology*, 91:312-319.

Roca, FJ, Mulero, I, Lopez-Munoz, A, Sepulcre, MP, Renshaw, SA, Meseguer, J, Mulero, V (2008) Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *The Journal of Immunology*, 181:5071-5081.

Rodrigues, PN, Vazquez-Dorado, S, Neves, JV, Wilson, JM (2006) Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental & Comparative Immunology*, 30:1156-1167.

Rollins, SM, Peppercorn, A, Hang, L, Hillman, JD, Calderwood, SB, Handfield, M, Ryan, ET (2005) *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cellular Microbiology*, 7:1-9.

Romalde, JL (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.

Salas-Leiton, E, Anguis, V, Martin-Antonio, B, Crespo, D, Planas, JV, Infante, C, Canavate, JP, Manchado, M (2010) Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 28:296-302.

Secombes, CJ, Wang, T, Hong, S, Peddie, S, Crampe, M, Laing, KJ, Cunningham, C, Zou, J (2001) Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:713-723.

Seppola, M, Bakkemo, BK, Mikkelsen, H, Myrnes, B, Helland, R, Irwing, DM, Nilsen, IW (2016) Multiple specialised goose-type lysozymes potentially compensate for an exceptional lack of chicken-type lysozymes in Atlantic cod. *Scientific Reports* 6:28318.

Silva, MT, Dos Santos, NMS, Do Vale, A (2010) AIP56: A novel bacterial apoptogenic toxin. *Toxins*, 2:905-918.

Sung, YY, MacRae, TH (2011) Heat Shock Proteins and disease control in aquatic organisms. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3:1-10.

Sunyer, JO, Lambris, JD (1998) Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*, 166:39-57.

Sunyer, JO, Boshra, H, Lorenzo, G, Parra, D, Freedman, B, Bosch, N (2003) Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 27:549-564.

Tahtouh, M, Crog, F, Vizioli, J, Sautiere, PE, Van, CC, Salzet, M, Daha, MR, Pestel, J, Lefebvre (2009) Evidence for a novel chemotactic C1q domain containing factor in the leech nerve cord. *Molecular Immunology*, 46:523-531.

Tydell, CC, Yuan, J, Tran, P, Selsted, ME (2006) Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *The Journal of Immunology*, 176:1154-1162.

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

Warger, T, Hilf, N, Rechtsteiner, G, Haselmayer, P, Carrick, DM, Jonuleit, H, von Landenberg, P, Rammensee, HG, Nicchitta, CV, Radsak, MP, Schild, H (2006) Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:22545-22553.

Wei, S, Huang, Y, Cai, J, Huang, X, Fu, J, Qin, Q (2012) Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33:186-196.

Yamasaki, M, Araki, K, Nakanishi, T, Nakayasu, C, Yamamoto, A (2014) Role of CD4 β and CD8a $^{+}$ T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36:299-304.

Summary

Ye, X, Zhang, L, Tian, Y, Tan, A, Bai, J, Li, S (2010) Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34:501-509.

Yuan, C, Pan, X, Gong, Y, Xia, A, Wu, G, Tang, J, Han, X (2008) Effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology*, 8:51-58.

Zeng, F, Tee, C, Liu, M, Sherry, V, Dixon, B, Duncker, BP, Bols, NC (2014) The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethanesulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells. *Aquatic Toxicology*, 146:45-51.

Zhang, X, Wu, FX, Sun, M, Sang, QY, Wang, YJ, Wang, XK (2008) Study on antimicrobial and antiviral activities of lysozyme from marine strain S-12-86 *in vitro*. *Agricultural Sciences in China*, 7:112-116.

Zhao, JH, Meng, XL, Zhang, J, Li, YL, Li, YJ, Fan, ZM (2014) Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen glucose deprivation injury: role of HSP70 and inhibition of apoptosis. *Journal of Huazhong University of Science & Technology [Medical Sciences]*, 34:18-22.

Zorrilla, I, Balebona, MC, Moriñigo, MA, Sarasquete, C, Borrego, JJ (1999) Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 22:167-172.

CONCLUSIONS



1. *Solea senegalensis* infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, both by intraperitoneal and immersion routes, results in the up-regulation of fish genes involved in the limitation of iron availability for the pathogen.

2. In the infection of *S. senegalensis* with *P. damsela* subsp. *piscicida*, both by intraperitoneal and immersion routes, the involvement of the liver in the initial stages of the disease is greater than that of the head kidney.

3. In comparison with *S. senegalensis* immunization by immersion, intraperitoneal vaccination with *P. damsela* subsp. *piscicida* bacterin+ECPs and Freund's incomplete adjuvant induces higher specific antibody levels and up-regulation of the transcription of genes encoding lysozyme C, complement factors and iron metabolism components. This is associated with increased resistance of *S. senegalensis* to *P. damsela* subsp. *piscicida* infection.

4. Five immunogenic proteins are induced in *P. damsela* subsp. *piscicida* during *S. senegalensis* infection: alanyl-tRNA synthetase, serine hydroxymethyl transferase, inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, alkyl hydroperoxide reductase and the non-ribosomal peptide synthetase Irp2. There is increased transcription of genes encoding above-mentioned proteins in head kidney *ex vivo* infection. Therefore, they are considered IVIAT proteins. These proteins represent new targets in the design of prophylactic strategies against photobacteriosis.

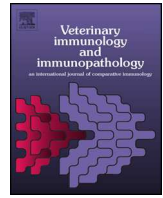
5. Transcription of genes encoding IVIAT proteins alkyl hydroperoxide reductase and the non-ribosomal peptide synthetase Irp2 is regulated by iron availability and superoxide and peroxynitrite reactive species.

Conclusions

6. Low iron availability and oxidative stress due to peroxynitrite induce up-regulation of the genes encoding the extracellular proteins Aip56 and P53, both involved in *P. damselae* subsp. *piscicida* virulence.



SECCIÓN DE ARTÍCULOS – ARTICLE SECTION



Two routes of infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are effective in the modulation of the transcription of immune related genes in *Solea senegalensis*



J.A. Núñez-Díaz^{a,*}, M. Fumanal^a, J.M. Mancera^b, M.A. Moriñigo^a, M.C. Balebona^a

^a Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos s/n, 29071, Málaga, Spain

^b Universidad de Cádiz, Departamento de Biología, Campus de Excelencia Internacional del Mar (CEI-MAR), 11510, Puerto Real, Cádiz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 4 June 2016

Accepted 20 July 2016

Keywords:

Solea senegalensis

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*

Gene expression

Immunity

Infection route

ABSTRACT

The marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) is responsible for important disease outbreaks affecting cultured fish species including the flatfish *Solea senegalensis*. In the present work, transcription of iron metabolism related genes (TF, FERR-M, HP-1 and HAMP-1) as well as innate immune system components such as complement proteins (C3 and C7), lysozyme (LYS-G), TNF family (TNF α , TRAF-3), NCCRP-1 and heat shock protein encoding genes (HSP70, HSP90AA, HSP90AB and GP96) has been determined in the liver and kidney of *S. senegalensis* specimens after *Phdp* infection. Intraperitoneal injection (IP) and immersion (IM) routes have been used for infection. Fish developed specific antibodies in both cases, higher levels being detected in IP infected specimens. Both infection routes resulted in increased relative transcript levels of FERR-M, HP-1 and HAMP-1 genes and TF decreased relative transcription, conducting to lower iron availability for the pathogen. This response can be considered as a strategy to limit iron availability for *Phdp*, a pathogen capable to obtain iron from transferrin. Relative transcription of genes encoding lysozyme and complement factors C3 and C7 were also increased regardless the infection route; the liver was the main organ involved in the initial stages and the kidney in later stages of the infection. TNF α and TRAF-3 relative gene transcription increased 24 h post-infection. TRAF-3 gene induction was detected 30 d post-infection, whilst no changes in TNF α were observed 72 h or 30 d post-infection. NCCRP-1 changes were observed after IP infection in the liver and kidney; however, IM infection resulted only in slight changes in the kidney of infected fish. This different response observed maybe related to a lower number of invaded cells by the pathogen. Finally, changes in HSP90AB and GP96 have been detected after infection by both routes. Different late modulation has been observed in assayed genes depending on the route of infection. Thus, only LYS-G, TF, NCCRP-1, GP96 and HSP90AB gene transcription was modulated 30 d post-infection in the kidney of IM infected specimens; however, IP infected fish showed modulation in a higher number of genes both in liver and kidney tissues. The implications of these responses in resistance to infection by *Phdp* need to be elucidated.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fish aquaculture is an important industry in southern Europe mainly focused on species such as gilthead sea bream (*Sparus aurata*) or sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Nowadays, species such as Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a flatfish with a great potential for farming at commercial scale but with high susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) infections are being cultured in the south-western and Mediterranean areas of

Spain and Portugal (Morais et al., 2014). In this sense, *Phdp* has been isolated from diseased *S. senegalensis* specimens from fingerling to broodstock stages (Zorrilla et al., 1999; Martínez-Manzanares et al., 2008).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), the etiological agent of photobacteriosis or pasteurellosis, is an important pathogen affecting marine fish species worldwide (Romalde, 2002; Wang et al., 2013a). *Phdp* is able to avoid host defenses by invasion and intracellular survival in non-phagocytic cells, mainly epithelial cells (Magarinos et al., 1996; Lopez-Doriga et al., 2000). In addition, an exotoxin named AIP56 has been described and considered responsible for inducing apoptosis of phagocytes (do Vale et al., 2005). Other virulence factors reported in *Phdp* include restricting

* Corresponding author

E-mail address: jose.alberto.nd@uma.es (J.A. Núñez-Díaz).

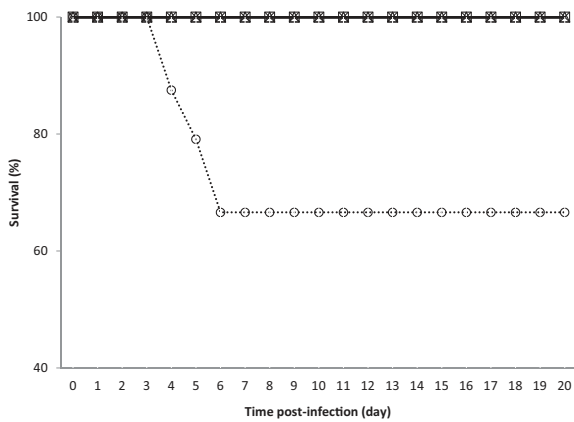


Fig. 1. Cumulative *Solea senegalensis* mortality after *Phdp* infection. Infections were carried out by intraperitoneal injection (IP) (○) and immersion (IM) (×). IP Control (□) and IM Control (△). Total fish per group: 20 (100%).

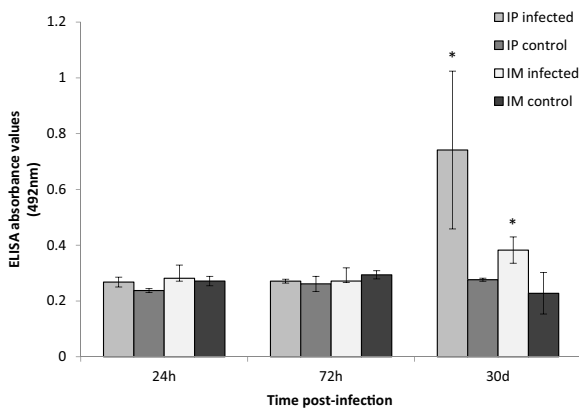


Fig. 2. Serum absorbance values (dilution 1/1000) determined by ELISA in *S. senegalensis* specimens infected with *P. damsela* subsp. *piscicida* at 24 h, 72 h and 30 d post-infection. Fish were injected with PBS (IP control), *P. damsela* subsp. *piscicida*, dose 10^4 CFU g^{-1} (IP infected) or challenged by immersion in seawater (IM control) or seawater containing *P. damsela* subsp. *piscicida*, dose 10^7 CFU mL^{-1} (IM infected) for 50 min. Values correspond to the mean \pm SD of three fish. Asterisks indicate significant differences, according to Student's *t*-test, between control and infected groups at the same sampling time ($p < 0.05$).

complement-mediated activity (Acosta et al., 2006), iron acquisition mechanisms such as siderophores that enable the pathogen to obtain iron from transferrin (Fouz et al., 1997) and ability to bind haemin (do Vale et al., 2002) and antioxidant enzymatic activities capable to counteract superoxide radicals (Barnes et al., 1999).

Studies on the immune response to *Phdp* infection are scarce and most of them have been carried out in other fish species such as *Seriola* (Andreoni and Magnani, 2014), *D. labrax* (Andreoni et al., 2013; Mosca et al., 2014) and *S. aurata* (Acosta et al., 2004). In the present work, response of cultured *S. senegalensis* to *P. damsela* subsp. *piscicida* infection has been studied through the determination of transcriptional changes in genes related to iron metabolism, stress response and innate immune system. In addition, early and late fish responses to the infection as well as two routes of infection, immersion and intraperitoneal injection, have been evaluated. Intraperitoneal injection is the most widely infection route used in experimental studies, whilst the immersion challenge represents a route closer to natural infection.

2. Materials and methods

2.1. Fish infection and sampling

Senegalese sole (*S. senegalensis*) specimens (130 ± 15 g mean body weight, $N = 160$) were supplied by Planta de Cultivos Marinos (CASEM, University of Cádiz, Puerto Real, Cádiz, Spain). Fish were transferred to the facilities at the University of Málaga (Málaga, Spain) and randomly stocked in eight separated tanks (20 fish per tank) under optimal stocking density (7 kg m^{-2}) with recirculating aerated seawater at $20\text{--}22^\circ\text{C}$ (35 g L^{-1} salinity). Animals were fed daily (1% body mass) with pelleted food (Skretting, Burgos, Spain) and acclimatized to laboratory conditions for 2 weeks before experiments. The day before the challenge fish were checked for health status by random sampling of 24 fish specimens (3 per tank) and microbiological analysis of internal organs on tryptic soy agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSAs). In addition, absence of *Phdp* in internal organs was checked by PCR assays according to (Osorio et al., 1999). *Phdp* Lg41/01 strain ($LD_{50} = 2.2 \times 10^4$ CFU g^{-1} , determined by intraperitoneal injection in *S. senegalensis* specimens) was selected for infection experiments. This strain was isolated from diseased cultured *S. senegalensis* showing typical signs of pseudotuberculosis (Diaz-Rosales et al., 2003). *Phdp* cells were grown in tryptic soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSBs) at 22°C for 24 h and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) to a final concentration of 10^5 CFU mL^{-1} . Four experimental groups were established and two replicate of each group done in order to sample at selected intervals and test fish mortality after infection. Fish were anaesthetized with clove oil (200 ppm) and specimens in the intraperitoneally infected group (IP group) were injected with 0.1 ml of the bacterial suspension (dose 10^4 CFU g^{-1}). Control fish were injected with the same volume of sterile phosphate buffered saline (PBS) (IP Control group). In the immersion challenge, specimens were maintained in a bacterial suspension (dose 10^7 CFU mL^{-1}) at a density of 7 kg m^{-2} for 50 min with aeration, $20\text{--}22^\circ\text{C}$ (IM group). In this case, control fish were subjected to similar immersion conditions but devoid of *Phdp* (IM Control group). Specimens were returned to their respective tanks and the eight groups kept separately. For sampling, soles ($N = 3$) were carefully taken from their respective tanks 24, 72 h and 30 days post-infection and transferred to a new tank containing clove oil (200 ppm) to euthanize.

Peripheral blood was sampled by caudal puncture and sera obtained by allowing the blood to clot at room temperature and centrifugation at $500 \times g$ for 30 min, 4°C . Collected sera were stored as single samples at -20°C until assayed. Liver and head kidney were dissected and divided into two parts, one was used for DNA extraction and specific *Phdp* PCR detection according to (Osorio et al., 1999) and the other for qPCR assays. In all the cases, samples were frozen immediately using liquid nitrogen and stored at -80°C . Fish mortality in the eight groups was monitored for 30 days and PCR and bacteriological analysis of internal organs of just dead fish was carried out to confirm death by bacterial infection.

2.2. RNA isolation and qPCR

RNA was isolated from head kidney and liver tissue using GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) according to manufacturer instructions. RNA quality was checked by running an aliquot on an agarose gel and quantity spectrophotometrically determined in Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Madrid, Spain) via $A_{260/280\text{nm}}$ and $A_{260/230\text{nm}}$ readings. DNase treatment (Thermo Scientific, Madrid, Spain) was carried out to ensure complete removal of DNA. Reverse transcription was performed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with

Table 1
List of *Solea senegalensis* genes studied in this work.

Gene	Code	Reference
Complement system and LYS-G		
Complement component 3	C3	Prieto-Alamo et al. (2009)
Complement component 7	C7	Prieto-Alamo et al. (2009)
Lysozyme G	LYS-G	Salas-Leiton et al. (2010)
TNF family		
Tumor necrosis factor α	TNF- α	Osuna-Jimenez et al. (2009)
TNF receptor-associated factor 3	TRAF-3	Prieto-Alamo et al. (2009)
Non-specific cytotoxic cell receptor protein 1	NCCRP-1	Prieto-Alamo et al. (2009)
Iron homeostasis		
Hepcidin	HAMP-1	Osuna-Jimenez et al. (2009)
Transferrin	TF	Prieto-Alamo et al. (2009)
Ferritin M	FERR-M	Prieto-Alamo et al. (2009)
Haptoglobin	HP-1	Prieto-Alamo et al. (2009)
Heat shock protein		
Heat shock protein GP96	GP96	Osuna-Jimenez et al. (2009)
Heat shock protein 90AA	HSP90AA	Manchado et al. (2008)
Heat shock protein 90AB	HSP90AB	Manchado et al. (2008)
Heat shock protein 70	HSP70	Salas-Leiton et al. (2010)
Reference genes		
Ribosomal protein S4	RPS4	Infante et al. (2008)
β -actin 2	ACTB2	Infante et al. (2008)

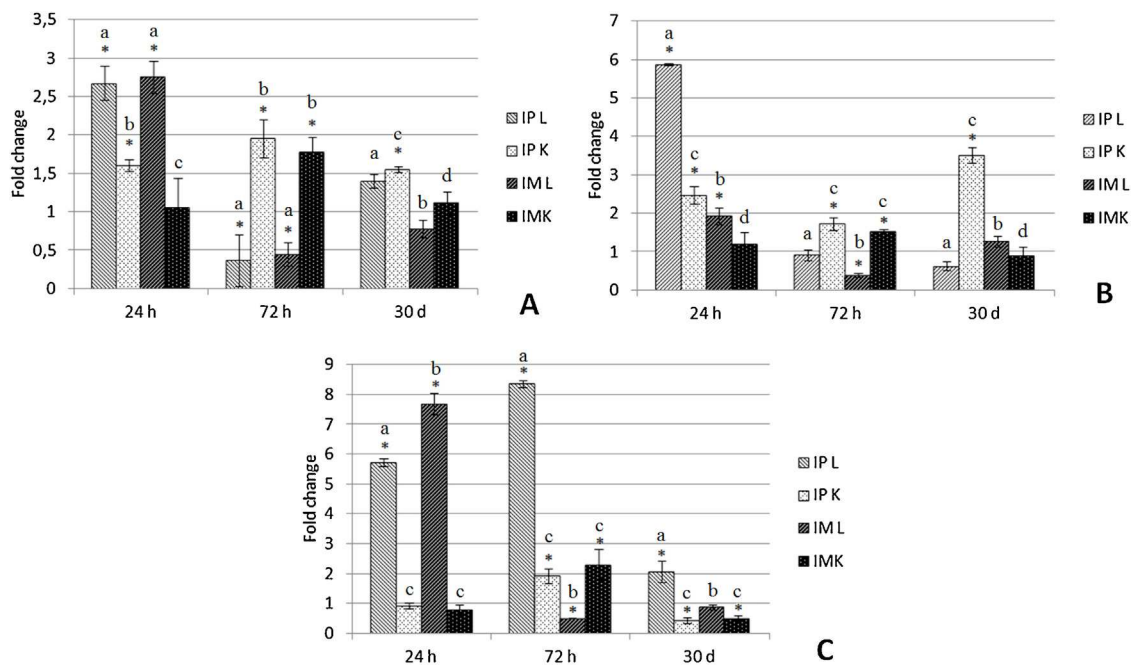


Fig. 3. Transcription levels (normalized with RPS4 and ACTB2 genes) and relative to control fish of genes encoding complement component 3 (A), complement component 7 (B) and lysozyme G (C) of *S. senegalensis* specimens 24, 72 h and 30 d post-infection with *Phdp* by intraperitoneal injection (IP) or immersion route (IM). Values in the liver (IP L) and kidney (IP K) of IP infected fish; and liver (IM L) and kidney (IM K) of IM infected fish. Values above 1 indicate increased transcription and below 1 decreased transcription compared to non-infected fish. For the same organ and sampling interval, asterisks denote significant differences compared to their respective controls and different letters differences between infections routes. Results are presented as average \pm SE of three individual fish and three technical replicates. Significance was set at ($p < 0.05$).

1 μ g of total RNA and using oligo (dT)₁₈ primers. One microliter of each cDNA synthesis reaction was employed as the template in the qPCRs to analyze each gene transcription. Primers to detect expression of genes encoding complement components 3 and 7 (C3 and C7), G type-lysozyme (LYS-G), tumor necrosis alpha (TNF α), tumor necrosis factor receptor associated factor 3 (TRAF3), non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 (NCCRP-1), hepcidin precursor (HAMP-1), transferrin (TF), ferritin M (FERR-M), haptoglobin (HP-1) and four heat shock proteins (GP96, HSP90AA, HSP90AB and HSP70) were used as described by authors (Infante et al., 2008; Manchado et al., 2008; Osuna-Jimenez et al., 2009; Prieto-Alamo et al., 2009; Salas-Leiton et al., 2010) and listed in Table 1.

Amplifications were performed in a final volume of 10 μ l. Reaction mixture contained 5 μ l of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0.5 μ l of each primer set (10 μ M), 1 μ l of template cDNA and 3 μ l of DEPC-water. Real time PCR determinations were performed in triplicate in 96-well PCR plates and carried out in an CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with an initial denaturation cycle of 95 $^{\circ}$ C for 30 s, followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 5 s and 51 $^{\circ}$ C for 15 s. Amplification was followed by a standard melting curve from 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C, in increments of 0.5 $^{\circ}$ C for 5 s at each step, to confirm that only one product was amplified and detected. Samples were run in parallel with two reference genes, beta-actin (ACTB2) and ribosomal proteins S4 (RPS4) (Infante et al.,

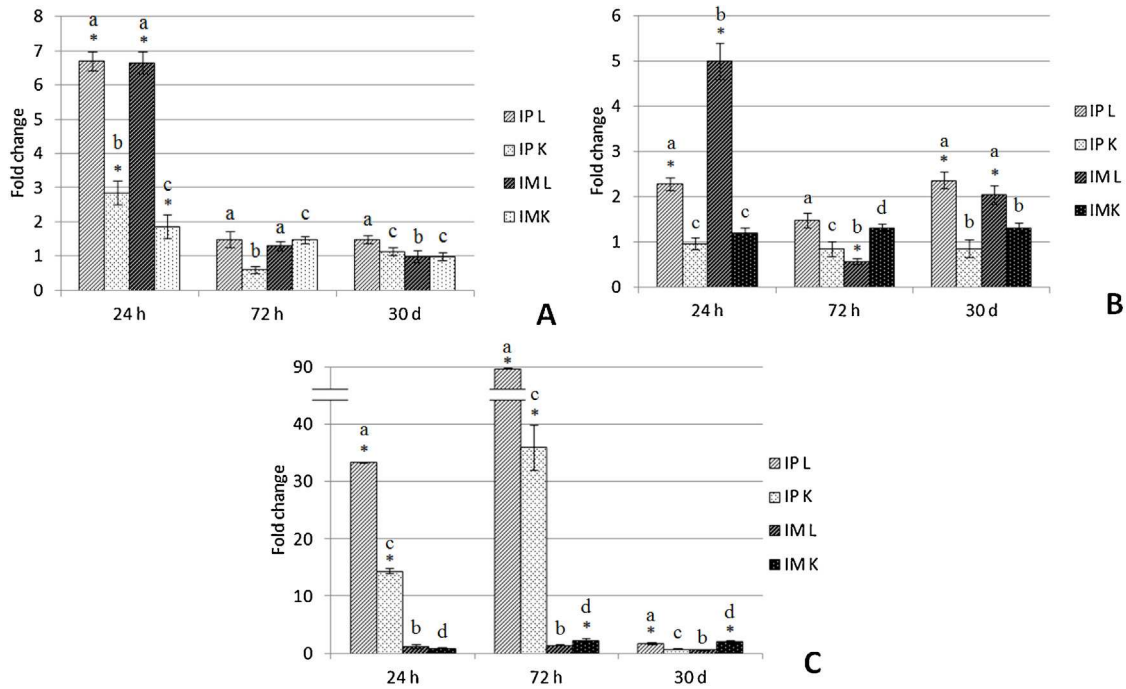


Fig. 4. Transcription levels (normalized with RPS4 and ACTB2 genes) and relative to control fish of genes encoding TNF- α (A), TRAF-3 (B) and NCCRP-1 (C) of *S. senegalensis* specimens 24, 72 h and 30 d post- infection with *Phdp* by intraperitoneal injection (IP) or immersion route (IM). Values in the liver and kidney of IP infected fish; and liver and kidney of IM infected fish. Values above 1 indicate increased transcription and below 1 decreased transcription compared to non-infected fish. For the same organ and sampling interval, asterisks denote significant differences compared to their respective controls and different letters differences between infections routes. Results are presented as average \pm SE of three individual fish and three technical replicates. Significance was set at ($p < 0.05$).

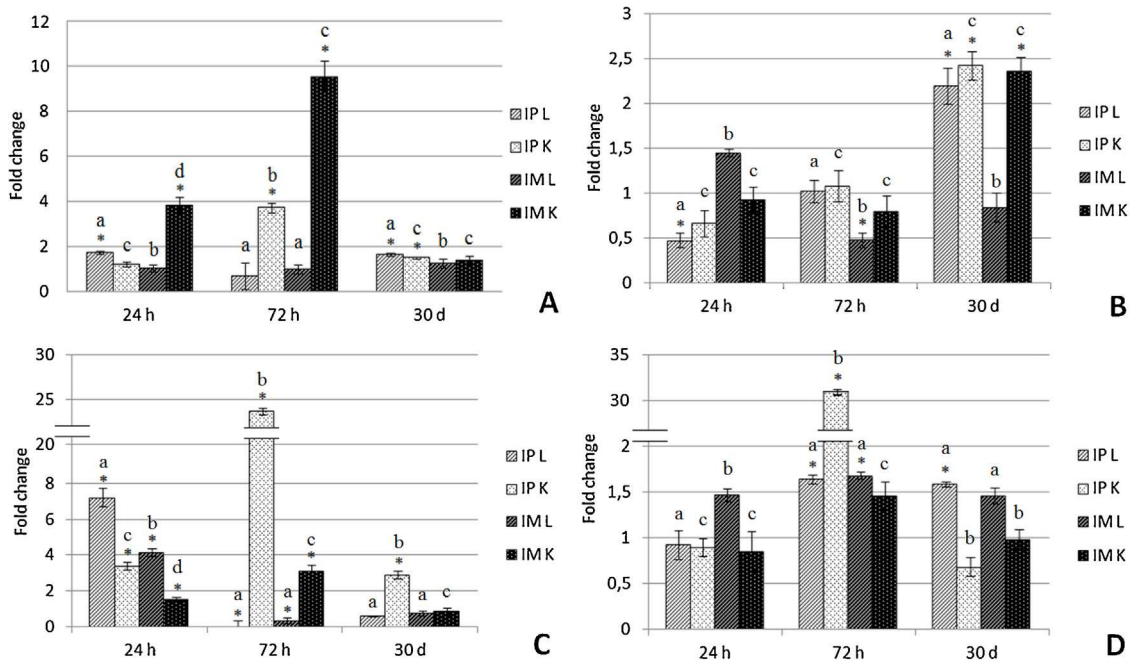


Fig. 5. Transcription levels (normalized with RPS4 and ACTB2 genes) and relative to control fish of genes encoding HAMP (A), TF (B), HP-1 (C) and FERR (D) of *S. senegalensis* specimens 24, 72 h and 30 d post- infection with *Phdp* by intraperitoneal injection (IP) or immersion route (IM). Values in the liver and kidney of IP infected fish; and liver and kidney of IM infected fish. Values above 1 indicate increased transcription and below 1 decreased transcription compared to non-infected fish. For the same organ and sampling interval, asterisks denote significant differences compared to their respective controls and different letters differences between infections routes. Results are presented as average \pm SE of three individual fish and three technical replicates. Significance was set at ($p < 0.05$).

2008), for cDNA normalization. The stability of the mRNA expression of the reference genes was evaluated with the on-line Cotton EST database using its computational algorithm. Threshold values (Ct) were calculated and analyzed using CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Amplification at Ct < 40 was con-

sidered as a positive result, whereas Ct \geq 40 or no amplification was considered negative. Relative mRNA expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), normalizing with geometric average of two reference genes (ACTB2 and RPS4) and relative to non-infected fish from each control group.



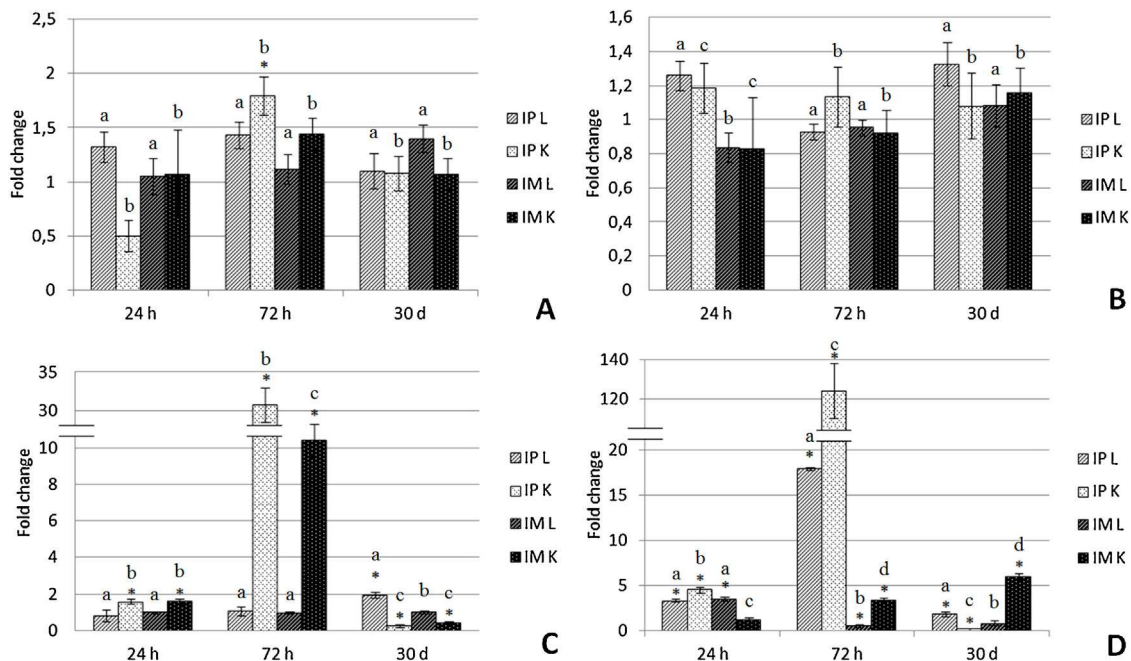


Fig. 6. Transcription levels (normalized with RPS4 and ACTB2 genes) and relative to control fish of genes encoding HSP70 (A), HSP90AA (B), HSP90AB (C) and GP96 (D) of *S. senegalensis* specimens 24, 72 h and 30 d post-infection with *Phdp* by intraperitoneal injection (IP) or immersion route (IM). Values in the liver and kidney of IP infected fish; and liver and kidney of IM infected fish. Values above 1 indicate increased transcription and below 1 decreased transcription compared to non-infected fish. For the same organ and sampling interval, asterisks denote significant differences compared to their respective controls and different letters differences between infections routes. Results are presented as average \pm SE of three individual fish and three technical replicates. Significance was set at ($p < 0.05$).

2.3. Detection of serum specific IgM by ELISA

Antibody levels in fish sera were measured using ELISA. *Phdp* (strain Lg41/01) bacterin suspensions were prepared according to Arijó et al. (2005) and used as immobilized antigens. Briefly, ELISA flat-bottom 96-well plates (MaxiSorp immuno-plates, Nunc International, NY, USA) were incubated overnight at 4 °C with the bacterin suspension (50 μ l/well). Then, plates were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.25% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 200 μ l/well of PBS-T supplemented with 3% (w/v) nonfat dry milk was added. Plates were incubated at 22 °C for 2 h and washed with PBS-T three times. Serial dilutions (1/500; 1/1000; 1/2000) of fish serum samples were added and incubated at 22 °C for 2 h. Plates were again washed with PBS-T three times and 50 μ l of anti-sole antibody developed in rabbit (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) against *S. senegalensis* IgM purified in our laboratory (Medina et al., 2015) was added to each well (dilutions 1/1000 in PBS-T containing 0.25% (w/v) BSA). Plates were incubated at 22 °C for 2 h and washed again with PBS-T three times. Then, 50 μ l/well of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) developed in goat was added (dilution 1/5000 in PBS-T+BSA) and incubated at 22 °C for 1 h. Plates were again washed with PBS-T three times and 200 μ l/well of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma Aldrich, Madrid, Spain) was added and incubated at 22 °C for 30 min in the dark. Chromogenic reaction was stopped by adding 50 μ l/well of 3 M H₂SO₄ and plates were read spectrophotometrically at 492 nm using a Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Madrid, Spain).

2.4. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc, IBM Company, NY, USA). Normality and homogeneity of the data were previously assessed using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The statistical significance of differences in qPCR values between control and infected groups was

determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Tukey's test was used to analyze differences between each of the treatments. Data of ELISA absorbance values in IP and IM infected fish were analyzed using Student's *t*-test. Significance was set for $p < 0.05$. Post hoc power analysis was performed with GPower software and only significant differences ($p < 0.05$) obtained with statistical power $(1-\beta) > 0.80$ have been considered.

2.5. Ethical statements

All procedures involving fish were conducted in strict accordance with Guidelines established by the European Union (2010/63/UE) and the Spanish legislation (RD 1201/2005 and law 32/2007) for the use of laboratory animals. All experiments were approved by the Ethic Committee of Animal's Welfare of the University of Malaga (CEUMA).

3. Results

3.1. Health check and experimental infection

Phdp PCR detection and bacteriological analysis of fish carried out before experimental infection assays were negative.

Fish were IP (10^4 CFU fish⁻¹) or IM infected (10^7 CFU mL⁻¹) and *Phdp* was detected by PCR in kidney and liver samples. Mortality was observed only in IP inoculated specimens and started 4 days after infection, its maximum (35%) being reached 6 days post-infection (Fig. 1). Afterwards, no mortality was detected until the end of the experiment (30 days post-infection). Dead fish were analyzed and the presence of the pathogen was confirmed both in bacteriological and PCR assays, whilst fish from control groups were negative in bacteriological and *Phdp* PCR determinations. Despite no mortality was observed in IM infected fish, *Phdp* was detected by PCR in kidney and liver samples from these fish 24 and 72 h post-infection; no positive result was obtained in IP or IM infected fish 30 d post-infection.

In addition, dead fish from IP infected group were analyzed and the presence of the pathogen was confirmed both in microbiological and PCR determinations, whilst results of fish from control groups were negative.

3.2. Serum specific Ig levels

Data obtained in ELISA assays demonstrate immune response against the pathogen resulting from fish infection. Thus, specific antibodies against *Phdp* were detected in both IP and IM infected specimens 30 days post-infection, indicating the effectivity in antibody production of both infection routes. However, sera from IP infected fish showed higher antibody levels compared to sera from IM infected fish (Fig. 2).

3.3. Gene expression

Relative transcription was detected for all the analyzed genes in both liver and head kidney samples from *S. senegalensis* specimens, with Ct < 40. In addition, changes in the relative transcription were observed in all the genes except for HSP70 and HSP90AA, which showed similar transcription levels in infected fish compared to their respective controls.

Increased relative transcription in complement components (C3 and C7) genes was observed in the liver of all infected fish 24 h post-infection regardless the infection route (Fig. 3A and B). However, 72 h post-infection, this increase was only present in head kidney cells, relative gene transcription being decreased in the liver of infected fish. Thirty days after infection, transcription of C3 and C7 genes were only slightly increased in IP infected soles. *Phdp* infection induced LYS-G transcription in the liver of IP infected soles, with maximum relative transcription levels 72 h post-infection (Fig. 3C). On the contrary, IM infection resulted in early increased relative transcription in the liver followed by decreased levels. Head kidney LYS-G transcription was only increased 72 h post- IM infection.

TNF family genes (TNF α and TRAF 3) relative transcript abundance increased in the liver of all infected fish 24 h post-infection (Fig. 4A and B). This induction was not observed at 72 h, when TRAF 3 gene relative transcript levels were decreased in IM infected fish, but was observed again 30 d post-infection. No changes in transcription were observed in kidney cells except for TNF α in IP injected fish 24 h post-infection. Regarding the gene encoding the nonspecific cytotoxic cell receptor protein, NCCRP-1, statistically significant increased relative transcription was observed in both liver and head kidney cells of IP fish, however, only kidney cells from IM infected fish showed increases of this gene transcription (Fig. 4C). Thirty days post-infection modulation of NCCRP-1 transcription was still observed in the liver and kidney of IP and IM infected fish, respectively.

Transcription of iron homeostasis related genes was different depending on the gene and assayed conditions (Fig. 5). Thus, HAMP-1 transcription increased in both IP and IM infected fish; however, in IM infected fish, fold change values were higher than in the IP infected group (Fig. 5A). Decreased relative transcript levels were observed in TF gene at 24 h and 72 h in IP and IM infected fish, respectively; whereas induction was present 30 d post-infection (Fig. 5B). Regarding HP-1 transcription, significant increases were observed 24 h post-infection; however, it decreased 72 h post-infection in the liver of both fish groups but increased in head kidney cells (Fig. 5C). Finally, relative FERR-M gene transcription changed 72 h post-infection, it being observed in the liver of all infected fish and kidney cells of IP infected fish (Fig. 5D).

Heat shock protein genes (HSP90AA, HSP90AB and HSP70) did not change transcription levels in the liver of *S. senegalensis* specimens after *Phdp* infection (Fig. 6). However, whilst HSP90AA

transcription was not modulated (Fig. 6A), changes in HSP90AB transcription were observed in head kidney samples from both route infected fish, increasing its transcription at initial infection stages and decreasing 30 d post-infection (Fig. 6B). Similarly, HSP70 only increased slightly kidney transcription levels after 72 h of IP infection (Fig. 6C). Finally, GP96 transcription changes were detected in all infected fish, these changes being more noticeable in IP infected fish, which showed increased relative transcript abundance in liver and kidney cells (Fig. 6D).

4. Discussion

Photobacteriosis is a worldwide disease that affects many fish species and it is responsible for severe economic losses in the aquaculture industry. *Phdp* is able to invade host cells (Lopez-Doriga et al., 2000; Acosta et al., 2009), induce apoptosis of phagocytes (do Vale et al., 2005) and resist bactericidal activity of serum (Acosta et al., 2006). These abilities allow the pathogen to evade the host immune response and contribute to its virulence. The knowledge of molecular mechanisms involved in *Phdp* fish resistance as well as understanding sole immune response during *Phdp* infection could contribute to the development of more effective treatments. Most studies to determine fish response to infection consist in intraperitoneal injection of the pathogen; however, important barriers such as the mucosa and the skin are overcome and host response can be influenced by the route of infection. For this reason, two routes of infection have been considered in the present study.

Although mortality was only observed in IP infected fish, *Phdp* infected the liver and kidney after IP and IM challenge, and significantly increased levels of specific antibody titers were detected in both infected groups compared to control fish. These levels were higher in IP infected *S. senegalensis* specimens, as other authors had previously reported for other fish species such as yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) infected with *Vibrio harveyi* (Xu et al., 2009). Similarly, immune responses in *S. senegalensis* specimens infected by immersion with no mortality outcome have also been reported (Barroso et al., 2014), the infection route being considered determinant of the outcome of the infection (Austin and Austin, 2012; Chettri et al., 2015).

4.1. Genes related with complement system

Complement system functions are involved in phagocytosis, microbial killing, inflammatory reactions and clearance of immune complexes, among others (Holland and Lambris, 2002). Activation of the complement system through any of the three pathways results in C3 and C7 activation (Wang and Secombes, 2013). Thus, C3 protein increased levels could entail higher opsonisation, enhanced phagocytosis of *Phdp* cells and faster clearance of pathogen cells. Meanwhile, C7 is involved in bacterial lysis (Boshra et al., 2006), playing an integral role in the assembly of the cytolytically active membrane attack complex (MAC) and in the inflammation process. Like in *S. senegalensis*, increased hepatic C3 gene transcription has been reported in *S. aurata* and *D. labrax* specimens 24 h post-inoculation with *Phdp* (Mauri et al., 2011; Costas et al., 2013). However, these authors did not report levels in subsequent infection stages. Our results indicate that after 72 h, transcription of complement genes decreases in the liver and the role in the production of C3 and C7 components is assumed by the kidney. Thus, in the present work, participation of genes involved in the complement system (C3 and C7) has been demonstrated in *S. senegalensis* specimens challenged with *Phdp* regardless the infection route, the liver being the main organ involved in the initial stages of infection and this role being assumed by the kidney in later stages.

4.2. Lysozyme

Lysozymes are key enzymes in the innate immune response against bacterial infection. They have lytic activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, display opsonic activity and activate the complement system and phagocytes. Lysozymes have been detected in different fish tissues, including internal organs and intestinal and skin mucus (Saurabh and Sahoo, 2008). In the present work, modulation of LYS-G gene transcription was more pronounced in the liver than in the kidney. Buonocore et al. (2014) found higher relative basal transcription levels in the kidney of *D. labrax*; however, increased hepatic LYS-G gene transcription observed in *S. senegalensis* after exposition to pathogens has previously been reported in farmed catfish (*Ictalurus punctatus*) (Wang et al., 2013b) and brill (*Scophthalmus rhombus*) infected with *Phdp* (Jimenez-Cantizano et al., 2008). In addition, Costas et al. (2013) and Barroso et al. (2014) detected increased plasma lysozyme activity in *S. senegalensis* following *Phdp* infection. Like C3 and C7 genes, LYS-G hepatic transcription seems to be induced in early stages post-infection, whilst lower kidney LYS-G gene induction takes place later. In addition, LYS-G response in the liver seems to be prevailing after IP infection compared to IM challenge, for which liver response is detected only 24 h post-infection.

4.3. TNF family and NCCRP

Higher TNF α gene transcription levels are responsible for cytokine accumulation in inflammatory response due to bacterial toxins, inflammatory products and other invasive stimulus (Roca et al., 2008; Mosca et al., 2014). Our results indicate that *Phdp* infection using both routes was efficient enhancing early TNF α transcription. The early up-regulation of TNF α gene has been described in several fish species after vaccination and infection with several pathogens (Fast et al., 2007; Raida and Buchmann, 2009; Wang et al., 2014). This cytokine promotes recruitment and activation of phagocytes in *S. aurata* (Garcia-Castillo et al., 2004), although it does not stimulate *in vitro* phagocyte respiratory burst (Roca et al., 2008). Effects showed by TNF α can imply a role in the recognition of pathogens and presentation of antigens determining the adaptive immunity and the acute phase response (Pietretti and Wiegertjes, 2014). Increased TNF α gene transcription observed 24 h post-infection in *S. senegalensis* may contribute to inflammatory response after both IP and IM infection and these early inflammatory effects may be added to those due to the complement activation aforementioned.

Tumor necrosis factor receptor associated factor 3 (TRAF-3) is an ubiquitously and relevant regulator of both innate and adaptive immune response. TRAF-3 participates in the regulation of signaling to T cells through members of the tumor necrosis factor receptors (TNFR) superfamily and NK cell development and function (Häcker et al., 2011). Like in *S. senegalensis* treated with LPS (Prieto-Alamo et al., 2009), *Phdp* infection results in higher relative TRAF-3 gene transcription in the liver 24 h post-infection regardless the infection route; however, despite TRAF-3 gene expression has been demonstrated to be highly expressed in the kidney, liver and spleen in other fish species after LPS treatment (Cai et al., 2015), no induction in the kidney of *S. senegalensis* specimens was observed. Cai et al. (2015) reported that increased TRAF-3 expression in *Lutjanus sanguineus* prevented production of pro-inflammatory cytokine IL-6 after LPS injection and other authors have observed that TRAF-3 deficient cells produce higher levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF (Karin and Gallagher, 2009).

NCCRP-1 binds target cells and triggers events that ultimately produce target cell lysis (Jaso-Friedmann et al., 2001). On the other hand, ability of *Phdp* to invade fish cells has been reported (Lopez-

Doriga et al., 2000) and it could be expected the participation of NCC in the elimination of infected cells. The notable increased NCCRP-1 relative transcript levels observed in IP infected fish may be associated to the intracellular character of *Phdp* infection and a cytotoxic response mediated by NCCRP-1, a receptor present in NC cells (NCC) able to recognize the natural killer target antigen (NKTag) on a broad range of target cells (Jaso-Friedmann et al., 1997). A more extensive spread of the pathogen in IP infected *S. senegalensis* specimens may result in higher numbers of infected cells that would be recognized and attacked by NCC among other cytotoxic cells. On the other hand, NCCRP-1 binding to NKTag can facilitate a non-lytic function of cytokine release directed by the cytoplasmic domain BOX-1 motifs of NCCRP-1 (Evans et al., 1999). This activation may indirectly lead to recruitment of other participants such as phagocytic cells in anti-bacterial inflammatory responses and in the activity of T and B cells, involved in acquired immune responses and observed in the present work as higher ELISA serum absorbance values (Jaso-Friedmann et al., 2001). Thus, the notable increase in NCCRP-1 gene transcription observed in IP infected fish may indicate inflammatory response in *S. senegalensis*.

4.4. Iron homeostasis genes

Bacterial proliferation and persistence of pathogens in the host require mechanisms able to compete for acquisition of essential elements such as iron (do Vale et al., 2002; Osorio et al., 2006). Hepatic hepcidin gene up-regulation and serum hypoferrremia have been reported in *D. labrax* specimens 24 h after inoculation (Mosca et al., 2014) and *S. aurata* infected by bath with *Phdp* (Pellizzari et al., 2013). Like in mammals, a dual function of hepcidin has been reported in fish, it being involved in responses to iron levels and infection (Rodrigues et al., 2006; Pereiro et al., 2012), and several authors have reported that IL-6 participates in inflammation-mediated induction of hepcidin expression in *O. mykiss* (Costa et al., 2011). Our data demonstrate a relevant role of head kidney in the response of HAMP-1 especially after *S. senegalensis* IM infection by *Phdp*. This increased relative transcription could be related to hepcidin antimicrobial activity and contribute to create low iron levels in fish blood. Although early TNF α induction was also detected in infected specimens, suggesting inflammatory response in the liver and kidney, further studies need to be performed to determine the mediation of inflammatory cytokines in HAMP-1 up-regulation.

Transferrin (TF) is a protein associated with the response against pathogens for its contribution to keep low iron levels in blood (Lieu et al., 2001). Like in *S. senegalensis*, Yang et al. (2013) reported decreased transcription of TF gene in *Scophthalmus maximus* related to higher transcription levels of HAMP gene, suggesting that hepcidin may induce changes in the expression of TF gene. Transferrin has been considered as a negative acute phase protein in *D. labrax* specimens treated with *Phdp* (Neves et al., 2009). In this way, decreased levels of transferrin may hinder iron uptake for *Phdp*, a pathogen capable to obtain iron from transferrin (Fouz et al., 1997). However, it is noteworthy that increased relative transcription was observed not only in the liver, but also in the kidney of *S. senegalensis* specimens 30 d post-infection. Although plasma iron levels have not been determined in the present study, other authors have reported anemia associated to *Phdp* infection in *D. labrax* (Mosca et al., 2014); if this is the case for *S. senegalensis*, increased transcription of TF can be considered as a late strategy of the host to cope with the hypoferrremia associated with *Phdp* infections.

Ferritin is another protein involved in iron storage (Harrison and Arosio, 1996), and up-regulation of the gene encoding this protein (FERR-M) has been reported under oxidative stress and inflammatory conditions (Orino et al., 2001; Torti and Torti, 2002). Neves et al. (2009) also reported increased FERR-M gene transcription in

D. labrax despite low iron levels were present in fish sera. Taken together, observed responses of hepcidin, ferritin and transferrin in *S. senegalensis* contribute to decrease serum iron levels and availability for bacterial growth. Finally, haptoglobin combines with free hemoglobin to facilitate hepatic recycling of heme iron and prevent tissue damage. Moon et al. (2014) reported increased expression of haptoglobin (HP-1) in infected olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) specimens. Increased HP-1 transcription in *S. senegalensis* could involve again reduced availability of iron for the pathogen. In summary, apart from their roles in host iron metabolism, TF, FERR-M, HAMP-1 and HP-1 play a relevant role in *S. senegalensis* during *Phdp* infections, probably creating limiting iron environments for the pathogen as other authors have reported in several fish species (Neves et al., 2009; Mosca et al., 2014). However, this low iron availability may have adverse effects for the host and contribute to the consequence of the infection, such as the mortality observed in IP infected fish. In this way, Škugor et al. (2009) found higher susceptibility to furunculosis in salmon specimens with overexpression of proteins involved in iron and heme metabolism.

4.5. Heat shock proteins

HSPs are involved in the acute phase response and have been proposed as immunological regulators against microbial pathogens (Sung and MacRae, 2011). However, in the present study only a slight increase was detected in the transcription of HSP70 gene in the kidney of IP infected soles. Similarly, *D. labrax* specimens challenged with *Phdp* did not show significant modifications in HSP70 gene expression in spleen, thymus and head kidney, whereas fish up-regulated this gene 72 h after the challenge with *Listonella anguillarum* (Mosca et al., 2014). Regarding HSP90 genes, our results indicate the absence of induction of HSP90AA after *Phdp* infection, a gene reported to be inducible by heat shock in *S. senegalensis* (Manchado et al., 2008); however, differential regulation of HSP90 genes has also been reported depending on the pathogen (Xie et al., 2015). Both HSP70 and HSP90 can block the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways by interfering with caspase activation (Lanneau et al., 2008). Lack or poor induction of HSP70 and HSP90AA, together with the increased transcription of the inflammatory component NCCRP-1 and TNF α , could indicate that an apoptosis process similar to that described by do Vale et al. (2003) in macrophages and neutrophils of *D. labrax* takes place early after *Phdp* infection in *S. senegalensis*.

Finally, GP96 is also involved in the adaptive response thanks to its role in the antigen presentation process (Basu et al., 2000; Strbo and Podack, 2008). Notable increased transcription of GP96 gene (also known as GRP94) observed in IP infected *S. senegalensis* specimens may contribute to higher inflammation according to Mrakovcic-Sutic et al. (2008), who suggested that extracellular GP96 contributes to create a “proinflammatory milieu” helping to the maturation of antigen presenting cells. This assumption could be related to the higher antibody levels detected in specimens of *S. senegalensis* intraperitoneally challenged with *Phdp* compared to fish challenged by immersion. The levels of antibodies obtained by ELISA demonstrated the effectiveness of both routes of infection for the pathogen to promote the specific immune response. However, higher antibody titers observed in fish IP inoculated could be related to the activation of innate immune system and its interaction with adaptive immunity via antigen presenting cells as other authors suggest (Evans et al., 2004; Ispir and Dorucu, 2014).

5. Conclusions

Similar components were activated in *S. senegalensis* specimens after *Phdp* infection by both routes of infection; however, immune

response was mainly focused in kidney tissues in IM infected fish, whilst participation of the liver was notorious after IP infection. Differences in the outcome of the infection may be the result of a more extensive infection in IP fish compared to IM infected, or the interaction with mucosal components of the immune system. However, we have observed that IP infection of *S. senegalensis* specimens results in increased relative transcription of genes related to inflammatory response (Lys-G, TNF α , NCCRP-1) and iron metabolism (HP-1 and FERR). Although inflammation mediates anti-bacterial responses and the activity of T and B cells involved in acquired immune response, they may also have adverse effects for the host. Notable increases in HP-1 and FERR gene transcription observed in IP infected fish may be associated with higher iron deficiency for the host in IP infections. Although iron sequestration has a protective role against many bacterial pathogens, this strategy can also be damaging for the host. However, further experiments to establish a potential relationship between mortality observed in *S. senegalensis* and lower iron availability for the host need to be carried out.

IP infected specimens showed long lasting changes in most of the genes assayed, whereas in the case of IM infection the late response was observed only in kidney transcription of LYS-G, TF, GP96, HSP90AB and NCCRP-1 genes and liver TRAF-3 transcription.

Although more studies need to be carried out to improve the comprehension of the mechanisms activated during infection with *Phdp*, results obtained in the present work contribute to the knowledge of the components involved in the development of protective responses against *Phdp* in *S. senegalensis*. This information is relevant for the development of effective vaccines against this pathogen.

Funding

This work was supported by Junta de Andalucía and co-financed by FEDER funds (Grant P10-RNM-6338).

Acknowledgement

J.A. Núñez-Díaz thanks Junta de Andalucía for research grant.

References

- Acosta, F., Ruiz de Galarreta, C.M., Ellis, A.E., Diaz, R., Gomez, V., Padilla, D., Real, F., 2004. Activation of the nitric oxide response in gilthead seabream after experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 581–588.
- Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J., Real, F., 2006. Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 709–717.
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., Real, F., 2009. Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* 32, 535–541.
- Andreoni, F., Magnani, M., 2014. Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *J. Immunol. Res.* 2014, 793817-.
- Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., Zaccone, R., Mancuso, M., Scapigliati, G., Magnani, M., 2013. Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine* 31, 820–826.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magarinos, B., Toranzo, A.E., Morinigo, M.A., 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 33–38.
- Austin, B., Austin, D.A., 2012. *Bacterial Fish Pathogen. Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer Science, 654.
- Barnes, A.C., Balebona, M.C., Horne, M.T., Ellis, A.E., 1999. Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145, 483–494.
- Barroso, C., Ozorio, R.O.A., Afonso, A., Moraes, J.R.E., Costas, B., 2014. Immune responses and gut morphology in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed dietary probiotic supplementation and following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquac. Res.*, 1–10.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., Srivastava, P.K., 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial

- maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* 12, 1539–1546.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 239–262.
- Buonocore, F., Randelli, E., Trisolino, P., Facchiano, A., de Pascale, D., Scapigliati, G., 2014. Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mol. Immunol.* 62, 10–18.
- Cai, J., Xia, H., Huang, Y., Tang, J., Jian, J., Wu, Z., Lu, Y., 2015. Identification and characterization of tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 3 from humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 243–251.
- Chettri, J.K., Skov, J., Jaafar, R.M., Krossoy, B., Kania, P.W., Dalsgaard, I., Buchmann, K., 2015. Comparative evaluation of infection methods and environmental factors on challenge success: *Aeromonas salmonicida* infection in vaccinated rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 485–495.
- Costa, M.M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C.J., Wang, T., 2011. Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Mol. Immunol.* 48, 1903–1916.
- Costas, B., Rego, P.C., Simoes, I., Marques, J.F., Castro-Cunha, M., Afonso, A., 2013. Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. *J. Fish Dis.* 36, 543–553.
- Diaz-Rosales, P., Chabrillon, M., Morinigo, M.A., Balebona, M.C., 2003. Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *J. Fish Dis.* 26, 305–308.
- do Vale, A., Magarinos, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Ellis, A.E., Toranzo, A.E., 2002. Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 109–115.
- do Vale, A., Marques, F., Silva, M.T., 2003. Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 129–144.
- do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., Azevedo, J.E., 2005. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol. Microbiol.* 58, 1025–1038.
- Evans, D.L., Leary III, J.H., Jaso-Friedmann, L., 1999. An antigen receptor (NCCRP-1) on nonspecific cytotoxic cells is a phosphoprotein associated with the JAK-STAT activation pathway. *Cell. Signal.* 11, 287–292.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., 2004. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* 22, 3769–3773.
- Fast, M.D., Johnson, S.C., Jones, S.R., 2007. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1beta-1, TNFalpha-1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 403–407.
- Fouz, B., Biosca, E.G., Amaro, C., 1997. High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J. Appl. Microbiol.* 82, 157–167.
- García-Castillo, J., Chaves-Pozo, E., Olivares, P., Pelegrin, P., Meseguer, J., Mulero, V., 2004. The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the *in vivo* proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1331–1340.
- Häcker, H., Tseng, P., Karin, M., 2011. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 457–468.
- Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161–203.
- Holland, M.C., Lambiris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 399–420.
- Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Canavate, J.P., Reith, M., Manchado, M., 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 9, 1–12.
- Ispir, U., Dorucu, M., 2014. Efficacy of lipopolysaccharide antigen of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout by intraperitoneal and bath immersion administration. *Res. Vet. Sci.* 97, 271–273.
- Jaso-Friedmann, L., Leary III, J.H., Warren, J., McGraw, R.A., Evans, D.L., 1997. Molecular characterization of a protozoan parasite target antigen recognized by nonspecific cytotoxic cells. *Cell. Immunol.* 176, 93–102.
- Jaso-Friedmann, L., Leary III, J.H., Evans, D.L., 2001. The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 701–711.
- Jimenez-Cantizano, R.M., Infante, C., Martin-Antonio, B., Ponce, M., Hachero, I., Navas, J.I., Manchado, M., 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 57–65.
- Karin, M., Gallagher, E., 2009. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol. Rev.* 228, 225–240.
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 743–761.
- Lieu, P.T., Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y., 2001. The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 22, 1–87.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Lopez-Doriga, M.V., Barnes, A.C., dos Santos, N.M., Ellis, A.E., 2000. Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology* 146 (Pt. 1), 21–30.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1996. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 29–34.
- Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E., Canavate, J.P., 2008. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* 416, 77–84.
- Martínez-Manzanares, E., Tapia-Paniagua, S., Diaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Moriñigo, M.A., 2008. Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, and gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) to several antimicrobials. *J. Fish Dis.* 31, 73–76.
- Mauri, I., Romero, A., Acerete, L., Mackenzie, S., Roher, N., Callol, A., Cano, I., Alvarez, M.C., Tort, L., 2011. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 182–188.
- Medina, A., Mancera, J.M., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M.A., Arijó, S., 2015. Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish Shellfish Immunol.* 47, 377–380.
- Moon, J.Y., Hong, Y.K., Kong, H.J., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, W.J., Ji, Y.J., An, C.M., Nam, B.H., 2014. A cDNA microarray analysis to identify genes involved in the acute-phase response pathway of the olive flounder after infection with *Edwardsiella tarda*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 161, 49–56.
- Morais, S., Aragao, C., Cabrita, E., Conceicao, L.E.C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L.M.P., Yúfera, M., Dinis, M.T., 2014. New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Rev. Aquacult.* 6, 1–37.
- Mosca, F., Ciulli, S., Volpatti, D., Romano, N., Volpe, E., Bulfon, C., Massimini, M., Caccia, E., Galeotti, M., Tiscar, P.G., 2014. Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 162, 83–95.
- Mrakovcic-Sutic, I., Jakovac, H., Simin, M., Grebic, D., Cuk, M., Trobonjaca, Z., Radošević-Stasić, B., 2008. Heat shock protein-GP96 as an innate sensor of damage and activator of autoreactive NKT and regulatory T cells during liver regeneration. *Histol. Histopathol.* 23, 1111–1126.
- Neves, J.V., Wilson, J.M., Rodrigues, P.N., 2009. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 848–857.
- Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V., Torti, F.M., 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* 357, 241–247.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L., 1999. 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2942–2946.
- Osorio, C.R., Juiz-Río, S., Lemos, M.L., 2006. A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology* 152, 3327–3341.
- Osuna-Jimenez, I., Williams, T.D., Prieto-Alamo, M.J., Abril, N., Chipman, J.K., Pueyo, C., 2009. Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 699–706.
- Pellizzari, C., Krasnov, A., Afanasiev, S., Vitulo, N., Franch, R., Pegolo, S., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2013. High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1269–1278.
- Pereiro, P., Figueras, A., Novoa, B., 2012. A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 879–889.
- Pietretti, D., Wiegertjes, G.F., 2014. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 205–222.
- Prieto-Alamo, M.J., Abril, N., Osuna-Jimenez, I., Pueyo, C., 2009. *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR. *Aquat. Toxicol.* 91, 312–319.
- Raida, M.K., 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.
- Roca, F.J., Mulero, I., Lopez-Munoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw, S.A., Meseguer, J., 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., Vazquez-Dorado, S., Neves, J.V., Wilson, J.M., 2006. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1156–1167.

- Romalde, J.L., 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* 5, 3–9.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martin-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Canavate, J.P., Machado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 296–302.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 39, 223–239.
- Škugor, S., Jørgensen, S.M., Gjerde, B., Krasnov, A., 2009. Hepatic gene expression profiling reveals protective responses in Atlantic salmon vaccinated against furunculosis. *BMC Genomics* 10, 503.
- Strbo, N., Podack, E.R., 2008. Secreted heat shock protein gp96-Ig: an innovative vaccine approach. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 407–416.
- Sung, Y.Y., MacRae, T.H., 2011. Heat shock proteins and disease control in aquatic organisms. *J. Aquac. Res. Dev.* 3, 1–10.
- Torti, F.M., Torti, S.V., 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99, 3505–3516.
- Wang, T., Secombes, C.J., 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1703–1718.
- Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., Wang, J., 2013a. Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity. *Vet. Microbiol.* 162, 957–963.
- Wang, R., Feng, J., Li, C., Liu, S., Zhang, Y., Liu, Z., 2013b. Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 136–145.
- Wang, Y.T., Huang, H.Y., Tsai, M.A., Wang, P.C., Jiang, B.H., Chen, S.C., 2014. Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 250–259.
- Xie, Y., Song, L., Weng, Z., Liu, S., Liu, Z., 2015. Hsp90, Hsp60 and sHsp families of heat shock protein genes in channel catfish and their expression after bacterial infections. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 642–651.
- Xu, Z., Chen, C.F., Mao, Z.J., Zhu, W.Y., 2009. Detection of serum and mucosal antibody production and antibody secreting cells (ASCs) in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) following vaccination with *Vibrio harveyi* via different routes. *Aquaculture* 287, 243–247.
- Yang, C.G., Liu, S.S., Sun, B., Wang, X.L., Wang, N., Chen, S.L., 2013. Iron-metabolic function and potential antibacterial role of Hepcidin and its correlated genes (Ferroportin 1 and Transferrin Receptor) in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* 34, 744–755.
- Zorrilla, I., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Sarasquete, C., Borrego, J.J., 1999. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J. Fish Dis.* 22, 167–172.



Full length article

Transcription of immune related genes in *Solea senegalensis* vaccinated against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identification of surrogates of protection



J.A. Núñez-Díaz^a, I. García de la Banda^b, C. Lobo^b, M.A. Moriñigo^a, M.C. Balebona^{a,*}

^a Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Santander, 39080 Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2017

Received in revised form

17 May 2017

Accepted 18 May 2017

Available online 19 May 2017

Keywords:

Solea senegalensis

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*

Gene expression

Immunity

Vaccination

ABSTRACT

Solea senegalensis is a flatfish with a great potential for aquaculture, but infectious diseases restrict its production, being this fish species highly susceptible to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) infections. A better understanding of the mechanisms related to fish immune response is crucial for the development of effective approaches in disease management. In the present work, transcriptional changes of immune related genes have been evaluated in farmed *S. senegalensis* specimens vaccinated against *Phdp* by intraperitoneal injection (IP) and immersion (IM). IP fish showed higher antibody levels and increased transcription of genes encoding lysozyme C1, complement factors involved in the classical pathway and components involved in the opsonization and the limitation of free iron availability, all of them facilitating the faster elimination of the pathogen and promoting higher RPS after the infection with *Phdp*. The results of this study seem to support a different intensity of the specimens immune response in the head kidney. Analysis of the immune response in 15 day post-challenged fish showed up-regulation of genes involved in all stages of *S. senegalensis* immune response, but especially those genes encoding proteins related to the innate response such as complement, lysozyme and iron homeostasis in the head kidney. On the other hand, liver transcription was higher for genes related to inflammation, apoptosis and cell mediated cytotoxicity (CMC). Furthermore, comparison of the differential response of *S. senegalensis* genes in vaccinated and unvaccinated fish to *Phdp* infection allowed the identification of a potential biosignature, consisting in 10 genes, as a surrogate of protection and therefore, as indicator of vaccine success against photobacteriosis after IP vaccination. These results provide important insights into the *S. senegalensis* protection against *Phdp* induced by vaccination.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) is the etiological agent of photobacteriosis or pasteurellosis, a disease characterized by a bacterial septicaemia resulting in high mortality and affecting a broad range of hosts [1–3]. The treatment of the diseases, including pasteurellosis, could involve the use of antimicrobials. In this sense the large volume of antimicrobials employed in recent years has a significant negative impact both on the environment and on increased bacterial resistance [4,5]. This evidence has led to a drastic restriction in the use of antibiotics in

aquaculture industry and only very few antimicrobials have been authorized [6]. Thus, in order to prevent infectious outbreaks and diminish the use of antibiotics, vaccination represents a valuable alternative [7,8]. Several vaccine formulations have been proposed to prevent pasteurellosis in farmed fish based on inactivated whole bacteria or their products [8–10]. Likewise, the genomic identification of potential vaccine candidates for the development of a recombinant subunit vaccine has also been applied with interesting results [1,8] but commercial protective vaccines for all susceptible fish species are not yet available.

Solea senegalensis is a flatfish with a great potential for aquaculture due to its high flesh quality, high market value and increasing consumer demand. Bacterial diseases restrict the production of *S. senegalensis*, which is highly susceptible to *Phdp* infections [11–13], and information about the response of sole to

* Corresponding author.

E-mail address: balebona@uma.es (M.C. Balebona).

Phdp vaccines is scarce [12].

A better understanding of the mechanisms related to immune response is crucial for the development of effective approaches for disease management [14]. Thus, the genomic approach to study the host immune response against the pathogen can be very useful to develop preventive strategies. In this context, data about the immune response of *S. senegalensis* against *Phdp* infection have recently been reported [15], but more information on the immune response to vaccination is essential to achieve high protection. In this study, the transcriptional changes of genes related to the immune response of farmed *S. senegalensis* specimens vaccinated against *Phdp* have been evaluated. In addition, the differential response of *S. senegalensis* genes in vaccinated and unvaccinated fish to *Phdp* infection has been compared in order to identify a potential surrogate of protection against *Phdp* infections after vaccination. This biosignature used as surrogate of protection may constitute an alternative to disease challenges in favor of animal welfare.

2. Materials and methods

2.1. Vaccine preparation

Phdp strain (Lg41/01) with LD50 = 2.2×10^4 CFU g⁻¹, determined by intraperitoneal injection in *S. senegalensis* specimens, was used to prepare a monovalent vaccine. This strain was isolated from diseased cultured sole specimens showing typical signs of pseudotuberculosis [16]. The monovalent vaccine, consisting in *Phdp* bacterin added with inactivated ECPs was prepared according to Arijio et al., 2005 [12]. Briefly, *Phdp* cells were grown in trypticase soy agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSAs) at 22 °C for 48 h. Then, cells were recovered and inactivated by treatment with formalin (1% final concentration), overnight at 4 °C. Bacterial cells were then collected by centrifugation at 6500xg, 4 °C for 30 min, washed three times with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and suspended to 1×10^{10} cells mL⁻¹ final concentration. This resultant bacterin was supplemented with inactivated ECPs from *Phdp* obtained with the cellophane overlaying technique [17]. *Phdp* ECPs preparations were filtered through 0.2 µm pore size membranes and inactivated by addition of formalin (1% final concentration) and heating at 100 °C for 30 min. Inactivated *Phdp* ECPs were added to the bacterin suspension previously described at 1/10 rate. Sterility conditions of the vaccine preparation were confirmed from the absence of growth on bacteriological media.

2.2. Fish vaccination

Healthy farmed Senegalese sole juveniles (N = 290; 52.5 ± 8.3 g mean body weight) from the stock of the Spanish Institute of Oceanography (Santander, Spain) were randomly distributed in 300 L seawater tanks (two tanks per treatment) connected to an open circulating system (35 g L⁻¹ salinity, 18.3 ± 0.5 °C) with 500% day⁻¹ water renewal rate. Specimens were acclimated for 2 weeks prior to the experimental period and seven fish were sampled to check the health status of the stock. The seven specimens were dissected and liver and kidney samples cultured on TSAs for 48 h at 22 °C to detect potential microbial growth. Absence of *Phdp* infection in specimens was determined in head kidney and liver by PCR assays according to Osorio et al. (1999) [18]. Sole juveniles were fed daily with a commercial pellet diet (SKRETTING, Burgos, Spain). The initial fish weight was used to adjust the daily ration of feed according to the normal pattern in this species (20 g kg⁻¹).

After the acclimation period, three groups were established and two replicates of each group done. IM group (N = 94) was vaccinated by immersion for 50 min in a 1/10 dilution of the vaccine in

aerated seawater at a density of 7 kg m⁻² at 20–22 °C. For intraperitoneal vaccination (IP group), fish (N = 95) were anaesthetized with clove oil (100 ppm) and specimens were intraperitoneally injected with 0.1 ml of the vaccine and 0.1 ml of incomplete Freund's Adjuvant. Control fish (Control group) (N = 94) were injected with the same volume of sterile PBS. Specimens were returned to their respective tanks and the six groups kept separately. Fish received a booster dose 30 days after the first dose. For sampling, soles (N = 10) were carefully taken from their respective tanks 90 days post-immunization and transferred to a new tank containing clove oil (200 ppm) to euthanize. Peripheral blood was sampled by caudal puncture and sera were obtained by allowing the blood to clot at room temperature. Collected sera were stored as single samples at -20 °C until assayed. Liver and head kidney samples were frozen immediately using liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.3. RNA isolation and qPCR

RNA was isolated from head kidney and liver tissue using GenJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) according to manufacturer instructions. RNA quality was checked by running an aliquot on an agarose gel and quantity spectrophotometrically determined in Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Madrid, Spain) via A260/280 nm and A260/230 nm readings. DNase treatment (Thermo Scientific, Madrid, Spain) was carried out to ensure complete removal of DNA. Reverse transcription was performed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) with 1 µg of total RNA and using oligo(dT)18 primers. One microliter of each cDNA synthesis reaction was employed as the template in the qPCR reactions to analyze each gene transcription. Primers to detect expression of genes reference genes (ACTB2 and RPS4) and encoding three interleukins (IL-1 β, IL-6 and IL-8), tumor necrosis factor alpha (TNFα), five complement components (C1q, C3, C4, C7 and C9), two lysozymes (LYS-C1 and LYS-G), peptidoglycan recognition protein 1 (PGLYRP1), cluster of differentiation 8 alpha and 4 (CD8α and CD4), major histocompatibility complex class I (MHC I), three caspases (CASP1, CASP8 and CASP9), tumor necrosis factor receptor associated factor 3 (TRAF-3), non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 (NCCRP-1), hepcidin precursor (HAMP-1), transferrin (TF), haptoglobin (HP-1) and four heat shock proteins (GP96, HSP90AA, HSP90AB and HSP70) are listed in Table 1. When specified, specific primers were designed using Primer 3 and AmplifX software according to known qPCR restrictions (size, Tm difference between primers, % GC content and self-dimer or cross-dimer formation). The reliability of a qPCR depends on identical amplification efficiencies for both the target and the calibrator. In order to obtain accurate results, PCR efficiency was checked and determined from the expression

$$E = \left(10^{\left[\frac{-1}{\text{slope}} \right]} - 1 \right) \times 100$$
 after plotting the logarithm of the initial template concentration against Ct values. All primers designed amplified the selected targets with optimal PCR efficiencies according to the polymerase instructions (98–100%). Reference gene stability was verified in treated and non-treated samples using RefFinder software, a platform integrating Delta CT [19], BestKeeper [20], Normfinder [21] and Genorm [22] computational algorithms, and the overall stability of candidate genes determined.

Amplifications were performed in a final volume of 10 µL. Reaction mixture contained 5 µL of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0.5 µL of each primer set (10 µM), 1 µL of template cDNA and 3 µL of DEPC-water. Real time PCR determinations were performed in triplicate in 96-well

Table 1List of *Solea senegalensis* genes studied in this work.

Gene	Code	Sequence (5' → 3')	Reference
Beta actin 2	ACTB2	AATCGTGACCTCTGCTTCCCCTGT (F) TCTGGCACCCCATGTTACCCCATC (R)	[23]
Ribosomal protein S4	RPS4	GTGAAGAAGCTCCTTGTCCGGACCA (F) AGGGGGTCGGGGTAGCGGATG (R)	[23]
Interleukin 1 beta	IL-1β	CGCAGAAAGTGACATGTTGAGATTT (F) GGAAGCGGGCAGACATGA (R)	[96]
Interleukin 6	IL-6	ACAATTTCTGCAGAGATAAAAGTAAGCT (F) CAAGCCCTCAGGCCTACAATATTAA (R)	[96]
Interleukin 8	IL-8	GAAGTGGAAATAATTCCTGGAAGCT (F) TGCTTTTTTTCAGCGTGGCAATG (R)	[96]
Complement C1q	C1q	CTACGCTTCTAACAGTGTGATCCT (F) AGCTGCACACACCTCATC (R)	[96]
Complement C3	C3	ACCTTAGACTGCCCTACTCTGCTGTCCGTG (F) GCACTGCACACATCATCCGTCTCAGAC (R)	[97]
Complement C4	C4	GACTGACAAAGAATGATCGTTTGA (F) CTGAGCACTTCGACAATGTATCCAT (R)	[96]
Complement C7	C7	GGCACACACTATCTGTCCGAGGGCTC (F) GGCGAACGCTGATGGTTAACTCCAG (R)	[97]
Complement C9	C9	TCAAATTCAGCCCAAGTGAGGATAC (F) CTCAGACCGACATTCACATTCAC (R)	[96]
Lysozyme type C1	LYS-C1	CAGATCAACAGCCGCTATTGG (F) GCTGATCCACATGCATTTGAAGTG (R)	[96]
Lysozyme type G	LYS-G	ACTGCTCGCGTGAATGGGACA (F) CCTGAAAATTTATTACGGATTCCGCCAATG (R)	[98]
Peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1	GCAGGCTCTGATGGACACAT (F) CCTATTGAGTTGTGTCGAAGAGTGT (R)	[96]
Cluster of differentiation 4	CD4	GACCTCAGGCTGCAATGGT (F) TGAGCAGAGTGATGGACAGACT (R)	[96]
Cluster of differentiation 8 alpha	CD8α	GTGCCAGCATTAAAAGCAACGA (F) GCAGTCACAACCTCCGCTCTTT (R)	[96]
Major histocompatibility complex class I	MHC I	CGACCGAATCATGACAACAC (F) GCACAACCATCACAAACCAAG (R)	This study
Caspase 1	CASP1	AACATTTCCAGCCAGAAGAT (F) TCCCCATGTTAGCTTTGGTC (R)	This study
Caspase 8	CASP8	TGCTTTCTGGAGCTGAAGT (F) TGATCTTCTCCAGGCGTTT (R)	This study
Caspase 9	CASP9	TGTTACGCTCTCCCCATTT (F) ATGATGAGGCACTGACCACA (R)	This study
Tumor necrosis factor alpha	TNFα	CTGGGACTGCTGGCACTGGATTG (F) CAGTTTCCCAGCTGACGTACTGTCCAAC (R)	[99]
Tumor necrosis factor receptor associated factor 3	TRAF-3	CCGCCGAGAGATGAACATCG (F) CAAGCTCACGGGTCAGGAAGTCCAG (R)	[97]
Non-specific cytotoxic cell receptor protein 1	NCCRP-1	ATGCCCGACAGCCTGGACTGG (F) CCAACTCAGGTTCAAGTGGAGGGATG (R)	[97]
Hepcidin	HAMP-1	ACACTCGTGCTCGCTTTGTTGCTTC (F) TGACTCCAGGCTCTGTCTGACATGATTC (R)	[99]
Transferrin	TF	CGTTGTATCGTCTCTATCTGGGTTG (F) CTACTTCAGTGAGAGCTGTGCCCTGGAG (R)	[97]
Haptoglobin	HP-1	GAAATGTAGACCATGACCTGCCAGGGGAC (F) TGAAACATCTGTCCGAGCCTCCAGGTTAG (R)	[97]
Heat shock protein GP96	GP96	GAGTCTTCTCCCTTTGTTGAGCGGCTG (F) TGATGCCTTCTTTGCCACGTTCTG (R)	[99]
Heat shock protein 90AA	HSP90AA	GACCAAGCCTATCTGACCCGCAAC (F) TTGACAGCCAGGTGCTCCCACT (R)	[100]
Heat shock protein 90AB	HSP90AB	TCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCGGCTTA (F) GCCAAGGGCTCACCTGTGTCG (R)	[100]
Heat shock protein 70	HSP70	GCTATACCAGGGGATGGAAGGAGGG (F) CGACTCTCAATATTGGCCAGCA (R)	[98]

PCR plates and carried out in an CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with an initial denaturation cycle of 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 68 °C for 10 s. Amplification was followed by a standard melting curve from 65 °C to 95 °C, in increments of 0.5 °C for 5 s at each step, to confirm that only one product was amplified and detected. Samples were run in parallel with two reference genes, beta-actin (ACTB2) and ribosomal proteins S4 (RPS4) [23], for cDNA normalization. Threshold values (Ct) were calculated and analyzed using CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Amplification at Ct < 40 was considered as a positive result, whereas Ct ≥ 40 or no amplification was considered negative.

Relative mRNA expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [24], normalizing with geometric average of two reference genes (ACTB2 and RPS4) and relative to non-treated fish from each control group.

2.4. Detection of serum specific IgM by ELISA

Antibody levels in fish sera were measured using ELISA. *Phdp* (strain Lg41/01) bacterin suspensions added with ECPs prepared according to Arijo et al. (2005) [12] were used as immobilized antigens. Briefly, ELISA flat-bottom 96-well plates (MaxiSorp immuno-plates, Nunc International, NY, USA) were incubated

overnight at 4 °C with the bacterin–ECPs suspension (50 µL/well). Then, plates were washed three times with PBS containing 0.25% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 200 µL/well of PBS-T supplemented with 3% (w/v) nonfat dry milk was added. Plates were incubated at 22 °C for 2 h and washed three times with PBS-T. Serial dilutions (1/250; 1/500; 1/1000; 1/2000) of fish serum samples were added and incubated at 22 °C for 2 h. Plates were again washed three times with PBS-T and 50 µL of anti-sole antibody developed in rabbit (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) against *S. senegalensis* IgM purified in our laboratory [25] was added to each well (dilutions 1/1000 in PBS-T containing 0.25% (w/v) BSA). Plates were incubated at 22 °C for 2 h and washed three times again with PBS-T. Then, 50 µL/well of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) developed in goat was added (dilution 1/5000 in PBS-T + BSA) and incubated at 22 °C for 1 h. Plates were washed three times again with PBS-T and 200 µL/well of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma Aldrich, Madrid, Spain) was added and incubated at 22 °C for 30 min in the dark. Chromogenic reaction was stopped by adding 3 M H₂SO₄ (50 µL/well) and plates were read spectrophotometrically at 492 nm using a Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Madrid, Spain).

2.5. Challenge

Ninety days post vaccination both non-vaccinated and vaccinated *S. senegalensis* specimens were challenged with *Phdp* to determine survival after infection. A total of 40 fish per vaccination group were divided into two aerated tanks (40 L) for experimental infection. *Phdp* cells were grown in tryptic soy broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSBs) at 22 °C for 24 h and suspended in PBS. Fish were anaesthetized with clove oil (100 ppm) and injected with 0.1 ml of the bacterial suspension (dose 1.2×10^5 CFU g⁻¹). Then, fish were returned to their respective tanks and mortality was recorded for 15 d. A control group inoculated with PBS was established for each vaccination treatment. Mortality was considered due to the pathogen when *Phdp* was isolated from internal organs of dead fish.

The relative percentage of survival (RPS) [26] was calculated to evaluate the efficacy of vaccination as: $[1 - (\% \text{ mortality in vaccinated fish} / \% \text{ mortality in controls})] \times 100$.

Surviving fish were anaesthetized 15 days after the challenge with *Phdp* and sampled for sera, head kidney and liver tissues. All the samples were immediately submerged in RNA later solution (Thermo Scientific) and stored at -80 °C. RNA extraction and reverse transcription to analyze each gene transcription was performed following the protocol previously detailed.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc, IBM Company, NY, USA). Normality and homogeneity of the data were previously assessed using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For non-normal data, logarithmic transformation was performed. The statistical significance of differences in qPCR values between control and vaccinated groups was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Tukey's test was used to analyze differences between each of the treatments. Survival data after fish challenge were analyzed using Kaplan-Meier analysis and log-rank test. Data of ELISA absorbance values in IP and IM vaccinated fish were analyzed using Student's t-test. Significance was set for $p < 0.05$.

2.7. Ethical statements

All procedures involving fish were conducted in strict

accordance with Guidelines established by the European Union (2010/63/UE) and the Spanish legislation (RD 1201/2005 and law 32/2007) for the use of laboratory animals. All experiments were approved by the Ethic Committee of Animal's Welfare of the University of Málaga (CEUMA).

3. Results

3.1. Experimental infection

Groups of unvaccinated and IM vaccinated fish and challenged with *Phdp* showed 76.9% and 50.0% mortality percentages, respectively, while no mortality was detected in IP vaccinated fish. Mortality started 3 days post-infection in both unvaccinated and IM vaccinated fish and increased until 7 days post-injection, with no mortality being detected after this period (Fig. 1). Kaplan-Meier survival analysis showed significant differences among assayed groups ($p < 0.05$) (Fig. 1). The RPS obtained in IP and IM vaccinated groups was 100% and 35%, respectively. Dead fish were analyzed and the presence of the pathogen was confirmed both in bacteriological and PCR assays.

3.2. Serum specific Ig levels

ELISA assays showed significant increases of specific antibodies against *Phdp* both in IM and IP vaccinated fish 90 days post-vaccination, indicating the ability to induce antibody production of both vaccination routes. However, sera from IP vaccinated fish showed higher antibody levels compared to sera from IM vaccinated fish (Fig. 2).

3.3. Gene transcription in vaccinated fish before challenge with *Phdp*

Relative transcription values of assayed genes in head kidney and liver of IP and IM vaccinated fish are shown in Table 2. The number of genes showing up-regulation was higher in head kidney, whereas genes exhibiting down-regulation were detected in the liver, regardless of the route of administration of the vaccine. In this way, IL-6 and CASP8 and CASP9 were down-regulated in the liver of all vaccinated fish (Table 2). However, differences depending on the route used were observed. Thus, significant up-regulation of genes such as C1q, TNF α , HP-1, HSP70 and especially C7, C9, LYS-C1 and TF were only detected in IP fish ($p < 0.05$). In addition, genes encoding complement components C3 and C4 were up-regulated in both

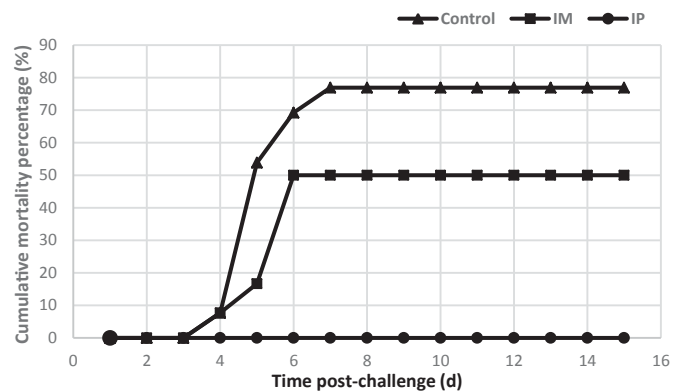


Fig. 1. Cumulative percentage mortality in vaccinated and control *S. senegalensis* groups after challenge with *P. damsela* subsp *piscicida*. Control: unvaccinated fish; IM: vaccination by immersion; IP: intraperitoneal vaccination.

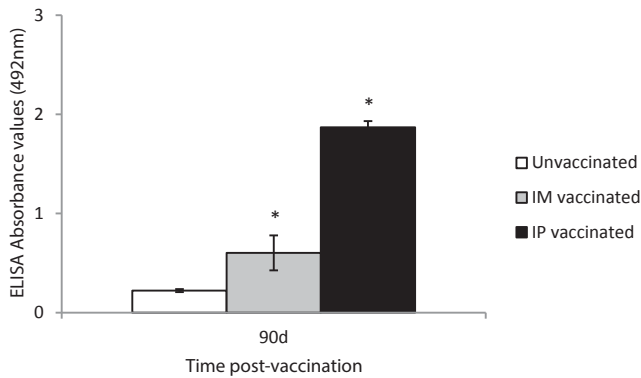


Fig. 2. Specific antibody absorbance values determined by ELISA in *S. senegalensis* sera 90 d post-vaccination. Fish received a dose of *P. damselae* subsp. *piscicida* bacterin preparation at the beginning of the experiment and a booster 30 d later. IM: vaccination by immersion; IP: intraperitoneal vaccination. Values correspond to the mean \pm SD of five fish. Asterisks indicate significant differences, according to Student's *t*-test, between unvaccinated and vaccinated groups ($p < 0.05$).

vaccination groups, though increased transcription was more noticeable in fish vaccinated by IP route.

3.4. Gene transcription in vaccinated fish surviving challenge with *Phdp*

Table 3 summarizes relative gene transcription values detected in head kidney and liver of unvaccinated, IP and IM vaccinated fish 15 days after the challenge with *Phdp*. In order to compare the differential response of vaccinated and unvaccinated fish to

infection by *Phdp*, values of each vaccination group were relativized to those of unvaccinated and non-infected fish. Like in vaccinated fish, specimens surviving infection showed different patterns of gene expression in the liver and head kidney.

In general, up-regulation of genes related to pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α was higher ($p < 0.05$) in the liver (up to 14 fold) than in the head kidney (up to 10 fold) of all fish. In addition, increased transcription of the genes encoding caspase 1, 8 and 9 was higher in the liver, especially in unvaccinated fish. On the other hand, transcription of genes related to components of complement was up-regulated in the head kidney of IP and unvaccinated fish, whereas in IM fish, up-regulation was only observed for C4 and C7 genes. In the case of the liver, only unvaccinated fish showed up-regulation of the complement genes assayed except for C4, but in general, increases of the transcription were lower than those observed in head kidney.

Significant changes in the transcription of genes encoding lysozyme G and C1 were detected in the head kidney of unvaccinated and IP fish, whereas only LYS-G increased transcription in IM fish. Up-regulation was especially notorious for LYS-G gene (ranging from 29 to 62 fold), and especially in the case of unvaccinated fish and IM vaccinated fish. Gene encoding PGLYRP1 was up-regulated in the head kidney of all fish ($p < 0.05$). Although lower values were observed, a similar pattern to LYS-G transcription was detected, with higher levels in unvaccinated fish followed by IM and IP vaccinated fish ($p < 0.05$). On the contrary, down-regulation was detected in the liver of unvaccinated and IP fish. Significant changes in the relative transcription of CD4⁺ gene were not detected in any of the samples analyzed.

Regarding the transcription of genes related to cell mediated cytotoxicity (CMC), the gene encoding MHC class I was up-regulated in the head kidney of all fish and only in the liver of IP fish whereas it was down-regulated in the liver of unvaccinated fish

Table 2

Relative gene transcription (normalized with ACTB2 and RPS4) in head kidney and liver of IP and IM vaccinated fish. All data are relative to unvaccinated fish. Values in bold (up-regulation) and italics (down-regulation) denote significant differences ($p < 0.05$) compared to unvaccinated fish. Different letters denote significant differences between vaccination routes. Results are presented as average \pm SE of five fish.

Gene code	Fold change			
	Head kidney		Liver	
	IP Vaccine	IM Vaccine	IP Vaccine	IM Vaccine
IL-1 β	1.06 \pm 0.28 (a)	<i>0.45 \pm 0.01 (a)</i>	0.94 \pm 0.13	0.97 \pm 0.11
IL-6	1.18 \pm 0.25	1.47 \pm 0.04	<i>0.32 \pm 0.07 (a)</i>	<i>0.43 \pm 0.10 (a)</i>
IL-8	1.25 \pm 0.21	0.71 \pm 0.07	<i>0.27 \pm 0.07 (a)</i>	0.55 \pm 0.12 (b)
TNF α	2.11 \pm 0.21 (a)	1.29 \pm 0.19 (b)	1.27 \pm 0.14	0.97 \pm 0.10
C1q	5.70 \pm 0.42 (a)	0.57 \pm 0.10 (b)	1.27 \pm 0.20	1.39 \pm 0.21
C3	3.16 \pm 0.38 (a)	2.48 \pm 0.42 (b)	1.39 \pm 0.16	0.77 \pm 0.12
C4	5.15 \pm 0.86 (a)	3.41 \pm 0.48 (b)	1.09 \pm 0.14 (c)	1.62 \pm 0.12 (d)
C7	19.28 \pm 3.78 (a)	1.38 \pm 0.13 (b)	0.78 \pm 0.21 (c)	2.14 \pm 0.29 (d)
C9	14.91 \pm 1.94 (a)	1.27 \pm 0.22 (b)	1.43 \pm 0.11	0.89 \pm 0.15
LYS-C1	19.36 \pm 3.44 (a)	1.28 \pm 0.23 (b)	0.60 \pm 0.11	1.36 \pm 0.17
LYS-G	1.01 \pm 0.19	1.20 \pm 0.25	0.83 \pm 0.16	0.73 \pm 0.18
PGLYRP1	1.18 \pm 0.16	1.25 \pm 0.17	1.49 \pm 0.21	0.70 \pm 0.21
CD4	1.01 \pm 0.08	0.81 \pm 0.16	0.60 \pm 0.11	1.41 \pm 0.23
CD8 α	0.76 \pm 0.27	0.60 \pm 0.07	0.66 \pm 0.13	0.70 \pm 0.10
MHC 1B	0.80 \pm 0.13	1.25 \pm 0.31	0.62 \pm 0.14 (a)	<i>0.40 \pm 0.08 (b)</i>
CASP1	0.83 \pm 0.09	0.99 \pm 0.11	<i>0.28 \pm 0.15 (a)</i>	0.81 \pm 0.12 (b)
CASP8	0.97 \pm 0.10	1.32 \pm 0.24	<i>0.21 \pm 0.08 (a)</i>	<i>0.30 \pm 0.09 (a)</i>
CASP9	1.11 \pm 0.18	1.36 \pm 0.21	<i>0.44 \pm 0.11 (a)</i>	<i>0.34 \pm 0.06 (a)</i>
TRAF-3	1.42 \pm 0.13	1.48 \pm 0.05	1.17 \pm 0.19	1.35 \pm 0.20
NCCRP-1	0.60 \pm 0.13	1.46 \pm 0.13	<i>0.41 \pm 0.11 (a)</i>	0.83 \pm 0.09 (b)
HAMP-1	1.52 \pm 0.08 (a)	1.84 \pm 0.32 (a)	0.85 \pm 0.10	1.01 \pm 0.11
TF	19.30 \pm 3.19 (a)	0.90 \pm 0.11 (b)	1.53 \pm 0.11 (c)	1.56 \pm 0.12 (c)
HP-1	1.99 \pm 0.23 (a)	0.70 \pm 0.05 (b)	0.76 \pm 0.16	1.11 \pm 0.12
GP96	1.25 \pm 0.11	1.21 \pm 0.12	0.90 \pm 0.12	0.71 \pm 0.10
HSP90AA	1.12 \pm 0.13	0.90 \pm 0.21	0.79 \pm 0.19	1.34 \pm 0.21
HSP90AB	0.85 \pm 0.10	0.83 \pm 0.17	0.88 \pm 0.08	0.81 \pm 0.08
HSP70	1.83 \pm 0.19 (a)	0.51 \pm 0.21 (b)	<i>0.38 \pm 0.06 (c)</i>	0.99 \pm 0.20 (d)

Table 3
Relative gene transcription (normalized with ACTB2 and RPS4) in head kidney and liver of vaccinated (90 d post-vaccination) *S. senegalensis* specimens surviving challenge with *P. damsela* subsp. *piscicida*. IP Vaccine: intraperitoneally vaccinated; IM Vaccine: fish vaccinated by immersion. All data are relative to unvaccinated and non-infected fish. Values in bold (up-regulation) and italics (down-regulation) denote significant differences ($p < 0.05$) compared to unvaccinated, non-challenged fish. Letters denote significant differences between vaccination routes for the same organ. Numbers denote significant differences between head kidney and liver for the same vaccination route. Results are presented as average \pm SE of five fish.

Gene code	Fold change					
	Head kidney			Liver		
	IP Vaccine	IM Vaccine	No Vaccine	IP Vaccine	IM Vaccine	No Vaccine
IL-1 β	0.69 \pm 0.09	0.95 \pm 0.19 (1)	1.05 \pm 0.13	0.62 \pm 0.09 (a)	2.25 \pm 0.31 (b)(2)	3.65 \pm 0.25 (c)
IL-6	3.85 \pm 0.37 (a)(1)	4.20 \pm 0.30 (b)(3)	8.18 \pm 1.95 (c)(5)	1.66 \pm 0.21 (α)(2)	6.68 \pm 2.11 (β)(4)	14.58 \pm 3.18 (γ)(6)
IL-8	2.18 \pm 0.11 (a)(1)	1.88 \pm 0.11 (b)(3)	10.36 \pm 1.43 (c)(5)	4.35 \pm 0.65 (α)(2)	4.80 \pm 0.25 (α)(4)	14.57 \pm 1.79 (β)(6)
TNF α	0.70 \pm 0.08 (a)	1.78 \pm 0.13 (b)	2.71 \pm 0.19 (c)	0.74 \pm 0.09 (α)	1.58 \pm 0.18 (β)	2.27 \pm 0.36 (γ)
C1q	3.15 \pm 0.12 (a)(1)	0.82 \pm 0.17 (b)(3)	2.94 \pm 0.19 (a)(5)	1.10 \pm 0.11 (α)(2)	1.73 \pm 0.21 (β)(4)	1.84 \pm 0.19 (β)(6)
C3	5.07 \pm 0.39 (a)(1)	1.39 \pm 0.15 (b)	1.91 \pm 0.20 (c)(3)	1.32 \pm 0.19 (α)(2)	1.12 \pm 0.22 (α)	2.09 \pm 0.19 (β)(3)
C4	5.68 \pm 1.01 (a)(1)	3.57 \pm 0.41 (b)(3)	5.77 \pm 0.49 (a)(5)	0.87 \pm 0.08 (2)	0.99 \pm 0.19 (4)	1.32 \pm 0.12 (6)
C7	1.69 \pm 0.18 (a)(1)	1.66 \pm 0.12 (a)(3)	2.14 \pm 0.30 (b)(5)	0.93 \pm 0.11 (α)(2)	0.70 \pm 0.07 (α)(4)	1.98 \pm 0.17 (β)(5)
C9	5.27 \pm 0.62 (a)(1)	0.98 \pm 0.11 (b)	5.30 \pm 0.73 (a)(3)	1.21 \pm 0.19 (α)(2)	1.12 \pm 0.18 (α)	1.85 \pm 0.25 (β)(4)
LYS-C1	3.11 \pm 0.19 (a)(1)	0.66 \pm 0.08 (b)	1.81 \pm 0.22 (c)(3)	0.72 \pm 0.07 (2)	0.83 \pm 0.12 (4)	0.97 \pm 0.18 (4)
LYS-G	29.82 \pm 4.88 (a)(1)	50.63 \pm 5.19 (b)(3)	62.05 \pm 6.82 (b)(5)	0.87 \pm 0.09 (2)	1.00 \pm 0.18 (4)	1.43 \pm 1.21 (6)
PGLYRP1	2.41 \pm 0.19 (a)(1)	4.37 \pm 1.26 (b)(3)	6.00 \pm 0.59 (c)(5)	<i>0.32 \pm 0.06</i> (α)(2)	0.95 \pm 0.15 (β)(4)	<i>0.36 \pm 0.08</i> (α)(6)
CD4	0.86 \pm 0.16	0.90 \pm 0.14	0.80 \pm 0.11	1.15 \pm 0.19	1.15 \pm 0.20	0.98 \pm 0.17
CD8 α	0.76 \pm 0.14	0.66 \pm 0.10 (1)	0.63 \pm 0.11 (3)	1.42 \pm 0.14 (α)	3.15 \pm 0.31 (β)(2)	2.22 \pm 0.27 (γ)(4)
MHC 1B	1.66 \pm 0.19 (a)(1)	2.26 \pm 0.14 (b)(3)	2.87 \pm 0.28 (c)(5)	4.43 \pm 0.52 (α)(2)	0.89 \pm 0.12 (β)(4)	0.34 \pm 0.07 (γ)(6)
CASP1	1.01 \pm 0.13 (1)	0.87 \pm 0.15 (3)	1.21 \pm 0.14 (5)	1.82 \pm 0.27 (α)(2)	2.02 \pm 0.26 (α)(4)	19.32 \pm 2.88 (β)(6)
CASP8	3.90 \pm 0.21 (a)(1)	5.55 \pm 0.25 (b)(3)	4.95 \pm 0.40 (b)(5)	6.22 \pm 0.95 (α)(2)	3.24 \pm 0.73 (β)(4)	6.95 \pm 0.87 (α)(6)
CASP9	1.00 \pm 0.15 (a)(1)	1.21 \pm 0.14 (a)(3)	1.56 \pm 0.19 (b)(5)	1.91 \pm 0.11 (α)(2)	2.39 \pm 0.72 (α)(4)	4.04 \pm 0.34 (β)(6)
TRAF-3	0.92 \pm 0.29	1.02 \pm 0.09	1.20 \pm 0.21	0.56 \pm 0.11	0.87 \pm 0.21	1.26 \pm 0.11
NCCRP-1	1.01 \pm 0.12 (a)	1.62 \pm 0.12 (b)(1)	5.46 \pm 1.18 (c)(3)	1.28 \pm 0.16 (α)	3.55 \pm 0.64 (β)(2)	19.08 \pm 3.79 (γ)(4)
HAMP-1	2.35 \pm 0.31 (a)(1)	4.06 \pm 0.45 (b)(3)	6.06 \pm 0.48 (c)(5)	1.52 \pm 0.18 (α)(2)	1.16 \pm 0.17 (β)(4)	2.46 \pm 0.19 (γ)(6)
TF	5.46 \pm 0.23 (a)(1)	0.83 \pm 0.12 (b)(3)	4.41 \pm 0.14 (c)(5)	0.67 \pm 0.12 (α)(2)	<i>0.45 \pm 0.09</i> (β)(4)	<i>0.41 \pm 0.07</i> (β)(6)
HP-1	2.49 \pm 0.33 (a)(1)	0.88 \pm 0.12 (b)	1.89 \pm 0.12 (c)(3)	0.92 \pm 0.15 (α)(2)	0.71 \pm 0.09 (α)	2.00 \pm 0.35 (β)(3)
GP96	0.67 \pm 0.11	1.30 \pm 0.13	0.96 \pm 0.11 (1)	0.86 \pm 0.10 (α)	0.83 \pm 0.12 (α)	2.05 \pm 0.20 (β)(2)
HSP90AA	1.08 \pm 0.14	1.16 \pm 0.28	1.33 \pm 0.28	1.25 \pm 0.15	0.95 \pm 0.14	1.01 \pm 0.11
HSP90AB	2.04 \pm 0.24 (a)(1)	2.14 \pm 0.14 (a)(3)	3.28 \pm 0.82 (b)(5)	1.33 \pm 0.10 (2)	0.88 \pm 0.21 (4)	1.16 \pm 0.12 (6)
HSP70	1.73 \pm 0.20 (a)(1)	0.66 \pm 0.17 (b)(3)	1.89 \pm 0.14 (a)(5)	<i>0.49 \pm 0.18</i> (α)(2)	1.64 \pm 0.19 (β)(4)	1.56 \pm 0.10 (β)(6)

($p < 0.05$). On the other hand, NCCRP-1 gene showed up-regulation both in the head kidney and in the liver of IM and especially in the case of unvaccinated fish and CD8 α up-regulation was only observed in the liver of unvaccinated and IM specimens.

Up-regulation of genes related with the iron homeostasis such as those encoding hepcidin, transferrin and haptoglobin was detected in the head kidney of unvaccinated and IP fish ($p < 0.05$). Thus, relative HAMP-1 transcription increased in the head kidney of all surviving fish, regardless of the vaccination treatment and in the liver of both unvaccinated and IP vaccinated fish. In the case of TF

and HP-1, whilst up-regulation was observed only in the head kidney of unvaccinated and IP fish, liver TF transcription was down-regulated in unvaccinated and IM fish ($p < 0.05$).

Changes in the transcription of genes encoding four heat shock proteins were studied in surviving *S. senegalensis* specimens. All fish showed increased head kidney HSP90AB transcription ($p < 0.05$), whereas only slight changes were observed for HSP70 gene. Regarding the liver, a slight up-regulation in GP96 and HSP70 genes was detected in unvaccinated fish, and only for HSP70 in IM fish.

4. Discussion

4.1. Antibodies in vaccinated fish

The intraperitoneal vaccination induced more effective protection immunity in *S. senegalensis* than the vaccination by immersion. This fact can be related to the higher antibody level observed in those specimens receiving intraperitoneal vaccination treatment.

The vaccine formulation used in the present study consisted in a bacterin suspension supplemented with ECPs. Similarly, the bacterin added with ECPs preparation was used for serum antibody determination in ELISA assays. For this reason, the antibody titles reported correspond to those against antigens located on the surface of bacterial cells as well as soluble factors produced by the pathogen. The first type may facilitate the opsonization of *Phdp* cells and their elimination by phagocytic cells. In addition, these specific antibodies could be involved in the triggering of the classical complement pathway mediated by C1q complex. In this context, antibodies against surface cell antigens may be considered protective. On the other hand, the antibodies against soluble factors present in ECPs could be directed against components such as *Phdp* AIP56 toxin. In this way, these antibodies could neutralize the selective apoptosis to macrophages and neutrophils induced by this toxin [27,28]. Thus, the protection induced by the intraperitoneal vaccination could also be related to the presence of both protective and neutralizing antibodies in fish sera. However, more research is necessary to confirm the role of each antibody type.

4.2. Gene transcription in vaccinated fish before challenge

Vaccination resulted in different gene transcription modulation depending on the organ examined and the vaccination route used. Thus, C1q, TNF α , HP-1, HSP70 and especially C7, C9, LYS-C1 and TF up-regulation was detected in IP fish while IM fish did not show significant changes in these gene transcription. The complement system has an essential role in clearance of pathogenic microorganisms through induction of inflammation, elimination of apoptotic cells and modulation of adaptive immune response [29–31] [32]. The activity of component C1q is crucial because by its binding to immune complex induces pathogen recognition [33], activation of classical complement pathway [34], viral neutralization [35], phagocytosis [36] and cell migration [37]. In addition, it is a link between innate and adaptive immunity by modulation of antigen presenting cells, lymphocytes B and fibroblasts [35,38]. Activation of the complement, including C7 and C9, results in the formation of the membrane attack complex (MAC), which kills bacteria by disrupting their membranes [39]. This way, the absence of mortality in IP fish detected in this study points out to a relevant role of complement in the protective response developed after IP vaccination against *Phdp*. Besides, IP vaccinated fish showed significant increased transcription of the genes encoding these components only in the head kidney. Similar results were reported by Guo et al. (2016) [40], who suggested that the MAC complex components were more effectively triggered by Gram negative bacteria in the head-kidney than in the liver of fish.

Expression of LYS-C can be modulated by fish pathogens and pathogen associated molecular patterns (PAMPs) [41]. In this way, up-regulation after bacterial infection and lipopolysaccharide (LPS) inoculation has been reported in *S. senegalensis* [42]. In the present study, LYS-C1 transcription modulation observed in IP vaccinated fish may be mediated by PAMPs displayed in *Phdp* ECPs or bacterin cells. Increased LYS-C1 gene transcription after bacterial challenge may suggest an important role in the defense of fish against *Phdp* infections for this type of lysozyme [43,44]. This role is also supported by the up-regulation observed in the IP group, which was

resistant to *Phdp* challenge. Several studies have reported high levels of this lysozyme in the liver and head kidney of fish challenged with bacterial pathogens [45,46]. However, in the present study notorious up-regulation of LYS-C1 transcription was only detected in the head kidney of IP *S. senegalensis* specimens.

Proliferation and persistence of pathogens in the host require mechanisms to compete for iron acquisition [47,48]. Different modulation of the transcription of iron homeostasis related genes was detected in the head kidney of IP and IM fish, with significant up-regulation of HP-1 and, especially, TF observed only in IP fish. On the other hand, HAMP-1 relative transcription increased in the head kidney of both IP and IM fish. In this sense, hepcidin has a dual function in fish, with a role during infection and iron homeostasis [49,50]. This dual function is related to the host control of the pathogen thanks to its antimicrobial effect and to the contribution to create low iron levels in fish blood infected by *Phdp* [51]. On the other hand, transferrin has the ability to chelate iron and haptoglobin combines with hemoglobin facilitating the hepatic recycling of hemo iron. In this way, an important role in the control of *Phdp* infections in *S. senegalensis* can be attributed to both proteins, considering the ability to use hemoglobin as a source of iron by this pathogen [52]. On the other hand, transferrin has been described both as negative and positive acute phase protein in fish [53,54]. Though *Phdp* infection results in decreased TF liver transcription [55], after vaccination, we have observed increased TF transcription in *S. senegalensis* head kidney. This situation might help induction of nitric oxide production and macrophage phagocytic activity as it has been reported for *E. tarda* infections [56,57]. Thus, results obtained in the present study indicate that protection against *Phdp* infection may be related to the ability to maintain low iron availability by the fish.

Finally, HSPs are involved in the acute phase response and have been proposed as immunological regulators against microbial pathogens [58,59]. HSP70 family protein is key to regulate fundamental cellular events that promote the survival of cells exposed to different stressors such as bacterial infections [60]. HSPs, included HSP70, have effects in cell signaling and immunity through cell surface receptors expressed on different cell types [61,62] including antigen-presenting cells (APCs) [63]. The binding of HSP to antigenic peptides facilitates their transport into APCs [64] and their delivery to major histocompatibility class I molecules and the adaptive immunity.

Globally, the results obtained showed better immune status in IP vaccinated fish, capable to face *Phdp* infection with no mortality, as it was observed in IP challenged soles. Identification of predictors of vaccine-induced protection represents an attractive alternative to reduce the use of animals in challenges and increase animal welfare. Plotkin (2010) [65] defines a surrogate of vaccine-induced protection as a quantified immune response that substitutes for the, perhaps unknown, specific response closely related to protection. Similarly, Bridle et al. (2012) [66] found a biosignature of 17 differentially expressed genes which considered a surrogate of protection against *Yersinia ruckeri* infection of Atlantic salmon. Based on our results, a biosignature comprised of relative transcription of LYS-C1, HAMP-1, TF, HP-1, HSP70 and complement components C1q, C3, C4, C7, C9; encoding genes could act as a surrogate of protection against *Phdp* infection and predict success after IP vaccination before challenge in *S. senegalensis*.

4.3. Immune response in liver and head kidney of fish after the challenge

Gene transcription was differentially modulated in surviving *S. senegalensis* specimens depending on the previous vaccination status. Thus, although LYS-G was not up-regulated by vaccination,

subsequent *Phdp* infection resulted in increased transcription, the highest fold change values corresponding to unvaccinated fish. Similarly, increased LYS-G transcription has been observed in other fish species infected with *Phdp* [67–69]. Most g-type lysozymes have no signal peptide, suggesting an intracellular location of the enzyme [41,69,70]. On the other hand, increased LYS-G transcription has been reported after inoculation with LPS [69]; however, this up-regulation is stronger after infection by intracellular pathogens such as *Francisella noatunensis* and *Edwardsiella tarda*, with even absence of up-regulation by non invasive pathogens such as *Vibrio harveyi* [71–73]. In the present work, lack of LYS-G up-regulation by *Phdp* vaccination together with its increased transcription after infection, points out to a role of intracellular invasion in LYS-G induction. Thus, whilst the bacterin would not be able to invade host cells, viable bacteria would enter fish cells and induce LYS-G transcription. In this context, the weaker up-regulation of challenged IP vaccinated fish compared to unvaccinated ones may be explained by the lower invasion rates expected after IP vaccination.

Similarly, gene encoding PGLYRP1 was up-regulated in the head kidney of all surviving fish, although the highest up-regulation was detected in unvaccinated fish followed by IM and IP fish. Pathogen-specific immune responses are coordinated and dependent upon the activation of specific pathogen recognition receptors present on leukocytes such as macrophages. Peptidoglycan recognition protein 1 plays key roles in the innate immune system of mammals as PGLYRP1 modulates innate immunity via PAMPs recognition and microbicidal activity [74].

Our results show higher up-regulation of pro-inflammatory genes such as IL-6, IL-8 and IL-1 β in the liver of unvaccinated fish compared to the head kidney. In addition, increased TNF α relative transcription was detected in both unvaccinated and IM vaccinated soles surviving *Phdp* infection. Increased TNF α levels are associated to microbial infection [75,76]. Roca et al. (2008) [77] demonstrated that fish endothelial cells are the main target cells of TNF α promoting the expression of E-selectin and chemokines, and suggesting that this cytokine is mainly involved in the recruitment rather than in the activation of phagocytes. This pro-inflammatory response detected in our study could be higher in the liver due to the additional IL-1 β and caspase 1 up-regulation, especially notorious in unvaccinated fish. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine [78] that can induce the release of other cytokines capable to trigger immune cells of both innate and adaptive immunity such as macrophages, lymphocytes and NCC cells [79–81]. On the other hand, the inflammasome is a cellular multiprotein complex that responds to a diverse range of microbial stress and damage signals resulting in direct activation of caspase 1 and subsequent induction of the secretion of pro-inflammatory cytokines [82]. In our study, jointly up-regulation of CASP1 and IL-1 β , IL-6 and IL-8 may indicate, according to Costas et al. (2014) [83], that caspase 1 probably activates pro-inflammatory cytokines. Results obtained in the present study show strong up-regulation of genes involved in the inflammatory response to *Phdp* infection, both in the liver and in the head kidney that can be partially mitigated by previous vaccination, especially IP vaccination.

Increased relative transcription of genes encoding caspase 8 and caspase 9 detected in the liver of all infected fish could be related to the up-regulation of genes encoding pro-inflammatory cytokines, especially high in liver. One of the effects of the inflammatory process involves migration of leukocytes, including phagocytes. Thus, *Phdp* AIP56 toxin induces selective apoptosis to macrophages and neutrophils [27] through a caspase-dependent apoptotic pathway [84]. Higher transcription levels of genes related to inflammation in the liver could indicate increased number of AIP56 toxin target cells, leading to more detrimental effect of *Phdp* AIP56

in this organ.

MHC I plays, together with MHC class II, a pivotal role in mediating antigen recognition by lymphocytes through the interaction with TCR molecules [14], class I being a key player in initiating an immune response against intracellular pathogens by helping cytotoxic lymphocytes recognize and kill cells presenting bacteria-derived peptides in their surfaces [85]. MHC I up-regulation observed in all fish surviving *Phdp* infection could be the result of a cytotoxic mediated immune response that leads to the elimination of the target cell by apoptosis. However, this point needs further study as CD8 α and MHC I gene transcription were not jointly up-regulated. In addition, down-regulation of gene encoding MHC I observed in the liver of unvaccinated fish could be attributed to a potential immune-suppression because the classical function of MHC class I molecules is the presentation of processed intracellular peptides to CD8 $^{+}$ lymphocytes, allowing the activation of T cells [86]. In this context, the infections caused by some fish viruses and pathogenic bacteria induce up-regulation of MHC I gene [85,87]. Similarly, increased transcription of CD8 α gene has been reported during infections with the intracellular pathogen *E. tarda* [88]. Although data obtained in our study do not seem to show a direct relation between MHC class I and CD8 α gene transcription, it could be suggested that up-regulation of MHC I gene both in the kidney and in the liver of IP group, would facilitate the recognition of *Phdp* antigens intracellularly processed by CD8 $^{+}$ lymphocytes. This fact could contribute to the absence of mortality observed in this fish group. In this way, IM fish did not show MHC I down-regulation unlike unvaccinated fish, which showed the highest mortality rate.

NCCRP-1, is a receptor present in NCC cells (NCC) able to recognize the natural killer target antigen (NKTag) on a broad range of target cells [89] and ultimately produce target cell lysis [90]. The notable increased transcription of NCCRP-1 gene in the liver of unvaccinated fish may be associated to the intracellular character of *Phdp* infection [91] and to a cytotoxic response mediated by NCCRP-1. Only, IM fish showed up-regulation of this latter gene in their liver and head kidney, although increased rates were lower than those detected in unvaccinated fish.

In our study, the up-regulation of hepcidin and haptoglobin encoding genes observed in unvaccinated soles corroborates data for hepcidin observed in sea bass [51], gilthead seabream [92] and Senegalese sole [15] infected with *Phdp*.

Núñez-Díaz et al. (2016) [15] reported increased TF transcription in Senegalese sole specimens 30 d post-inoculation with sublethal doses of *Phdp*; in the present work, unvaccinated fish showed up-regulation in the kidney but down-regulation in the liver 15 d post-infection. These results might be explained by a more extensive damage in the liver of unvaccinated fish due to the higher bacterial dose inoculated in the present work. Higher levels of transferrin may hinder iron uptake for *Phdp* and restrict pathogen proliferation [93]. In addition, transferrin contributes to the recovery of the fish from infection-associated anaemia [55] as well as promotes transferrin-mediated macrophage activation [57]. On the other hand, hepatic down-regulation of transferrin encoding gene and weaker gene up-regulation in the head kidney of unvaccinated and IM vaccinated fish suggest an important role of transferrin in the defense against *Phdp* infections, probably facilitating *Phdp* survival in the liver. This situation would be the outcome of a more extensive pathogen proliferation in IM and unvaccinated fish and it can be related to the higher transcription levels of genes related to apoptosis previously described.

Finally, up-regulation of HSP70 and HSP90 has been linked to the reduction of apoptosis in different cellular types, blocking extrinsic and intrinsic apoptotic pathways by interfering with caspase activation [94,95]. The up-regulation of genes encoding

HSPs proteins could be a response to liver and head kidney damage due to *Phdp* infection. In this sense, IP fish showed up-regulations of HSP70 and HSP90AB genes in the head kidney whereas in IM and unvaccinated fish up-regulation was detected in both liver and head kidney.

In short, *S. senegalensis* infection by *Phdp* is associated to late inflammatory response and increased lysozyme G gene transcription. Survival to *Phdp* infection results in the modulation of the same genes up-regulated by IP vaccination, supporting the bio-signature proposed in the present work; however, inflammatory response is also displayed by infected fish. The higher resistance to *Phdp* infection observed in IP vaccinated fish could be related to a weaker inflammatory response, facilitating MHC I antigen processing and lower iron availability to the pathogen.

Funding

This work was supported by Junta de Andalucía and co-financed by FEDER funds (Grant P10-RNM-6338).

Acknowledgements

Authors are thankful to Oscar Revilla for help in sample collection. J.A. Núñez-Díaz thanks Junta de Andalucía for research grant.

References

- [1] L.P. Ho, J.H.Y. Lin, H.C. Liu, H.E. Chen, T.Z. Chen, H.L. Yang, Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *Fish Shellfish Immunol.* 30 (2011) 412–419.
- [2] J.L. Romalde, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen, *Int. Microbiol.* 5 (2002) 3–9.
- [3] R. Wang, J. Feng, Y. Su, L. Ye, J. Wang, Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity, *Veterinary Microbiol.* 162 (2013) 957–963.
- [4] A.B. Boxall, L.A. Fogg, P.A. Blackwell, P. Kay, E.J. Pemberton, A. Croxford, Veterinary medicines in the environment, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180 (2004) 1–91.
- [5] K. Haya, L.E. Burrige, B.D. Chang, Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry, *ICES J. Mar. Sci.* 58 (2001) 492–496.
- [6] F.C. Cabello, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 1137–1144.
- [7] T. Hastein, R. Gudding, O. Evensen, Bacterial vaccines for fish—an update of the current situation worldwide, *J. Dev. Biol.* 121 (2005) 55–74.
- [8] F. Andreoni, R. Boiani, G. Serafini, G. Amagliani, S. Dominici, G. Riccioni, R. Zaccone, M. Mancuso, G. Scapigliati, M. Magnani, Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate, *Vaccine* 31 (2013) 820–826.
- [9] Y. Fukuda, R. Kusuda, Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis, *Fish Pathol.* 20 (1985) 421–425.
- [10] B. Magariños, J.L. Romalde, J.L. Barja, S. Núñez, A.E. Toranzo, Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages, *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathologist* 19 (1999) 159–161.
- [11] S. Morais, C. Aragao, E. Cabrita, L.E.C. Conceição, M. Constela, B. Costas, J. Dias, N. Duncan, S. Engrola, A. Estevez, E. Gisbert, E. Mananós, L.M.P. Valente, M. Yúfera, M.T. Dinis, New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential, *Rev. Aquac.* 6 (2014) 1–37.
- [12] S. Arijo, R. Rico, M. Chabrillon, P. Díaz-Rosales, E. Martínez-Manzanares, M.C. Balebona, A.E. Toranzo, M.A. Moriñigo, Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup) against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *J. Fish Dis.* 28 (2005) 33–38.
- [13] I. Zorrilla, M.C. Balebona, M.A. Moriñigo, C. Sarasquete, J.J. Borrego, Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup), *J. Fish Dis.* 22 (1999) 167–172.
- [14] S. Ferrareso, A. Bonaldo, L. Parma, F. Buonocore, G. Scapigliati, P.P. Gatta, L. Bargelloni, Ontogenetic onset of immune-relevant genes in the common sole (*Solea solea*), *Fish Shellfish Immunol.* 57 (2016) 278–292.
- [15] J.A. Núñez-Díaz, M. Fumanal, J.M. Mancera, M.A. Moriñigo, M.C. Balebona, Two routes of infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are effective in the modulation of the transcription of immune related genes in *Solea senegalensis*, *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 179 (2016) 8–17.
- [16] P. Díaz-Rosales, M. Chabrillon, M.A. Moriñigo, M.C. Balebona, Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions, *J. Fish Dis.* 26 (2003) 305–308.
- [17] P.V. Liu, Survey of haemolysis production among species of pseudomonads, *J. Bacteriol.* 74 (1957) 718–727.
- [18] C.R. Osorio, M.D. Collins, A.E. Toranzo, J.L. Barja, J.L. Romalde, 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2942–2946.
- [19] N. Silver, S. Best, J. Jiang, S.L. Thein, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR, *BMC Mol. Biol.* 7 (2006) 33.
- [20] M.W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians, Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper—excel-based tool using pair-wise correlations, *Bio-technol. Lett.* 26 (2004) 509–515.
- [21] C.L. Andersen, J.L. Jensen, T.F. Orntoft, Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, *Cancer Res.* 64 (2004) 5245–5250.
- [22] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paeppe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002). RESEARCH0034.
- [23] C. Infante, M.P. Matsuoka, E. Asensio, J.P. Canavate, M. Reith, M. Machado, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR, *BMC Mol. Biol.* 9 (2008) 1–12.
- [24] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [25] A. Medina, J.M. Mancera, E. Martínez-Manzanares, M.A. Moriñigo, S. Arijo, Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup), *Fish Shellfish Immunol.* 47 (2015) 377–380.
- [26] D.F. Amend, Potency testing of fish vaccines, *Dev. Biol. Stand.* 49 (1981) 447–454.
- [27] A. Do Vale, C. Costa-Ramos, A. Silva, D.S.P. Silva, F. Gärtner, N.M.S. Dos Santos, M.T. Silva, Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 988–1003.
- [28] M.T. Silva, N.M.S. Dos Santos, A. Do Vale, AIP56: a novel bacterial apoptogenic toxin, *Toxins* 2 (2010) 905–918.
- [29] J.O. Sunyer, J.D. Lambris, Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates, *Immunol. Rev.* 166 (1998) 39–57.
- [30] A.A. Korotaevskiy, L.G. Hanin, M.A. Khanin, Non-linear dynamics of the complement system activation, *Math. Biosci.* 222 (2009) 127–143.
- [31] P. Gal, L. Barna, A. Kocsis, P. Zavodszky, Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences, *Immunobiology* 212 (2007) 267–277.
- [32] G. Le Fricc, C. Kemper, Complement: coming full circle, *Archivum Immunol. Ther. Exp.* 57 (2009) 393–407.
- [33] M. Matsushita, A. Matsushita, Y. Endo, M. Nakata, N. Kojima, T. Mizuochi, T. Fujita, Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10127–10131.
- [34] U. Kishore, K.B. Reid, C1q: structure, function, and receptors, *Immunopharmacology* 49 (2000) 159–170.
- [35] U. Kishore, R. Ghai, T.J. Greenhough, A.K. Shrive, D.M. Bonifati, M.G. Gadjeva, P. Waters, M.S. Kojouharova, T. Chakraborty, A. Agrawal, Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q, *Immunol. Lett.* 95 (2004) 113–128.
- [36] M. Tahtouh, F. Crog, J. Vizioli, P.E. Sautiere, C.C. Van, M. Salzet, M.R. Daha, J. Pestel, Lefebvre, Evidence for a novel chemotactic C1q domain containing factor in the leech nerve cord, *Mol. Immunol.* 46 (2009) 523–531.
- [37] S.S. Bohlsón, D.A. Fraser, A.J. Tenner, Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 33–43.
- [38] J.O. Sunyer, H. Boshra, G. Lorenzo, D. Parra, B. Freedman, N. Bosch, Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity, *Immunol. Res.* 27 (2003) 549–564.
- [39] T. Katagiri, I. Hirano, T. Aoki, Molecular analysis of complement component C8b and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Immunogenetics* 50 (1999) 43–48.
- [40] B. Guo, C. Wu, Z. Lv, C. Liu, Characterisation and expression analysis of two terminal complement components: C7 and C9 from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, *Fish Shellfish Immunol.* 51 (2016) 211–219.
- [41] M. Ponce, E. Salas-Leiton, A. García-Cegarra, A. Boligno, O. Coste, C. Infante, E. Gisbert, L. Rebordinos, M. Machado, Genomic characterization, phylogeny and gene regulation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*), *Fish Shellfish Immunol.* 31 (2011) 925–937.
- [42] M.A. Fernández-Trujillo, J. Porta, M. Machado, J.J. Borrego, M.C. Álvarez, J. Béjar, c-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern, *Fish Shellfish Immunol.* 25 (2008) 697–700.
- [43] S. Wei, Y. Huang, J. Cai, X. Huang, J. Fu, Q. Qin, Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus*

- coioides*, Fish Shellfish Immunol. 33 (2012) 186–196.
- [44] X. Zhang, F.X. Wu, M. Sun, Q.Y. Sang, Y.J. Wang, X.K. Wang, Study on antimicrobial and antiviral activities of lysozyme from marine strain S-12-86 *in vitro*, Agric. Sci. China 7 (2008) 112–116.
- [45] S. Li, D. Wang, H. Liu, J. Yin, T. Lu, Expression and antimicrobial activity of c-type lysozyme in taimen (*Hucho taimen*, Pallas), Dev. Comp. Immunol. 63 (2016) 156–162.
- [46] X. Ye, L. Zhang, Y. Tian, A. Tan, J. Bai, S. Li, Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*, Dev. Comp. Immunol. 34 (2010) 501–509.
- [47] A. Do Vale, B. Magariños, J.L. Romalde, M.L. Lemos, A.E. Ellis, A.E. Toranzo, Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Dis. Aquatic Org. 48 (2002) 109–115.
- [48] C.R. Osorio, S. Juiz-Río, M.L. Lemos, A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island, Microbiology 152 (2006) 3327–3341.
- [49] P. Pereiro, A. Figueras, B. Novoa, A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload, Fish Shellfish Immunol. 32 (2012) 879–889.
- [50] P.N. Rodrigues, S. Vazquez-Dorado, J.V. Neves, J.M. Wilson, Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Dev. Comp. Immunol. 30 (2006) 1156–1167.
- [51] F. Mosca, S. Ciulli, D. Volpatti, N. Romano, E. Volpe, C. Bulfon, M. Massimini, E. Caccia, M. Galeotti, P.G. Tiscar, Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection, Veterinary Immunol. Immunopathol. 162 (2014) 83–95.
- [52] B. Magariños, J.L. Romalde, M.L. Lemos, J.L. Barja, A.E. Toranzo, Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish, Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994) 2990–2998.
- [53] M. Reyes-Becerril, C. Angulo, M. Angulo, F. Ascencio, Changes in transferrin gene expression after exposure to iron and *Aeromonas hydrophila* infection in yellow snapper (*Lutjanus argentiventris*), Agri Gene 1 (2016) 79–87.
- [54] S. Bayne, L. Gerwick, The acute phase response and innate immunity of fish, Dev. Comp. Immunol. 25 (2001) 725–743.
- [55] J.V. Neves, J.M. Wilson, P.N. Rodrigues, Transferrin and ferritin response to bacterial infection: the role of the liver and brain in fish, Dev. Comp. Immunol. 33 (2009) 848–857.
- [56] S. Mohapatra, T. Chakraborty, M.A. Reza, S. Shimizu, T. Matsubara, K. Ohta, Short-term starvation and realimentation helps stave off *Edwardsiella tarda* infection in red sea bream (*Pagrus major*), Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 206 (2017) 42–53.
- [57] J.L. Stafford, M. Belosevic, Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation, Dev. Comp. Immunol. 27 (2003) 539–554.
- [58] Y.Y. Sung, T.H. MacRae, Heat Shock Proteins and disease control in aquatic organisms, J. Aquac. Res. Dev. 3 (2011) 1–10.
- [59] T. Warger, N. Hilf, G. Rechtsteiner, P. Haselmayer, D.M. Carrick, H. Jonuleit, P. von Landenberg, H.G. Rammensee, C.V. Nicchitta, M.P. Radsak, H. Schild, Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses, J. Biol. Chem. 281 (2006) 22545–22553.
- [60] F. Zeng, C. Tee, M. Liu, V. Sherry, B. Dixon, B.P. Duncker, N.C. Bols, The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethanesulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells, Aquat. Toxicol. 146 (2014) 45–51.
- [61] A. Murshid, J. Theriault, J. Gong, S.K. Calderwood, Receptors for extracellular heat shock proteins, Methods Mol. Biol. 787 (2001) 289–302.
- [62] J. Gong, B. Zhu, A. Murshid, H. Adachi, B. Song, A. Lee, C. Liu, S.K. Calderwood, T Cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1, J. Immunol. 183 (2009) 3092–3098.
- [63] J. Theriault, S.S. Mambula, T. Sawamura, M.A. Stevenson, S.K. Calderwood, Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells, FEBS Lett. 579 (2005) 1951–1960.
- [64] P. Srivastava, Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses, Annu. Rev. Immunol. 20 (2002) 395–425.
- [65] S.A. Plotkin, Correlates of protection induced by vaccination, Clin. Vaccine Immunol. 17 (2010) 1055–1065.
- [66] A.R. Bridle, B.F. Koop, B.F. Nowak, Identification of surrogates of protection against yersiniosis in immersion vaccinated Atlantic salmon, PLoS One 7 (2012) e40841.
- [67] R.M. Jimenez-Cantizano, C. Infante, B. Martín-Antonio, M. Ponce, I. Hachero, J.I. Navas, M. Manchado, Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*), Fish Shellfish Immunol. 25 (2008) 57–65.
- [68] R. Wang, J. Feng, C. Li, S. Liu, Y. Zhang, Z. Liu, Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection, Fish Shellfish Immunol. 35 (2013) 136–145.
- [69] F. Buonocore, E. Randelli, P. Trisolino, A. Facchiano, D. de Pascale, G. Scapigliati, Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), Mol. Immunol. 62 (2014) 10–18.
- [70] D.M. Irwing, Z. Gong, Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes, J. Mol. Evol. 56 (2003) 386–389.
- [71] G.H. Fu, Z.Y. Bai, J.H. Xia, P. Liu, G.H. Yue, Analysis of two lysozyme genes and antimicrobial functions of their recombinant proteins in asian seabass, PLoS One 8 (2013) e79743.
- [72] M. Seppola, K.R. Bakkemo, H. Mikkelsen, B. Myrnes, R. Helland, D.M. Irwing, I.W. Nilsen, Multiple specialised goose-type lysozymes potentially compensate for an exceptional lack of chicken-type lysozymes in Atlantic cod, Sci. Rep. 6 (2016) 28318.
- [73] B.R. Mohanty, P.K. Sahoo, Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection, Fish Shellfish Immunol. 28 (2010) 613–621.
- [74] C.C. Tydell, J. Yuan, P. Tran, M.E. Selsted, Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties, J. Immunol. 176 (2006) 1154–1162.
- [75] K. Ishibe, T. Yamanishi, Y. Wang, K. Osatomi, K. Hara, K. Kanai, K. Yamaguchi, T. Oda, Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*, Fish Shellfish Immunol. 27 (2009) 386–389.
- [76] M.E. Pressley, I.P.E. Phelan, P.E. Witten, M.T. Mellon, C.H. Kim, Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebra fish, Dev. Comp. Immunol. 29 (2005) 501–513.
- [77] F.J. Roca, I. Mulero, A. Lopez-Munoz, M.P. Sepulcre, S.A. Renshaw, J. Meseguer, V. Mulero, Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF-alpha is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes, J. Immunol. 181 (2008) 5071–5081.
- [78] C.J. Secombes, T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K.J. Laing, C. Cunningham, J. Zou, Cytokines and innate immunity of fish, Dev. Comp. Immunol. 25 (2001) 713–723.
- [79] R.N. Apte, S. Dotan, M. Elkabets, M.R. White, E. Reich, Y. Carmi, X. Song, T. Dvoznik, Y. Krelin, E. Voronov, The involvement of IL-1b in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions, Cancer Metastasis Rev. 25 (2006) 387–408.
- [80] D.Q. Lu, J.X. Bei, L.N. Feng, Y. Zhang, X.C. Liu, J.L. Wang, Interleukin-1beta gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction, Mol. Immunol. 45 (2008) 857–867.
- [81] C. Yuan, X. Pan, Y. Gong, A. Xia, G. Wu, J. Tang, X. Han, Effects of *Astragalus polysaccharides* (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L, Int. Immunopharmacol. 8 (2008) 51–58.
- [82] Y. Lai, R.L. Gallo, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, Trends Immunol. 30 (2009) 131–141.
- [83] B. Costas, A. Couto, R. Azeredo, M. Machado, A. Krogdahl, A. Oliva-Teles, Gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune responses are modulated after feeding with purified antinutrients, Fish Shellfish Immunol. 30 (2014) 173–181.
- [84] C. Costa-Ramos, A. Do Vale, P. Ludovico, N.M.S. Dos Santos, M.T. Silva, The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways, Fish Shellfish Immunol. 30 (2011) 173–181.
- [85] U. Fischer, K. Utke, T. Somamoto, B. Kollner, M. Ootake, Cytotoxic activities of fish leucocytes, Fish Shellfish Immunol. 20 (2006) 209–226.
- [86] H. Dirscherl, S.C. McConnell, J.A. Yoder, J.L.O. de Jong, The MHC class I genes of zebrafish, Dev. Comp. Immunol. 46 (2014) 11–23.
- [87] S.M. Jørgensen, D.L. Hetland, C.M. Press, U. Grimholt, T. Gjoen, Effect of early infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection on expression of MHC pathway genes and type I and II interferon in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues, Fish Shellfish Immunol. 23 (2007) 576–588.
- [88] M. Yamasaki, K. Araki, T. Nakanishi, C. Nakayasu, A. Yamamoto, Role of CD4 β and CD8 α T cells in protective immunity against *Edwardsiella tarda* infection of ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*, Fish Shellfish Immunol. 36 (2014) 299–304.
- [89] L. Jaso-Friedmann, J.H. Leary III, J. Warren, R.A. McGraw, D.L. Evans, Molecular characterization of a protozoan parasite target antigen recognized by nonspecific cytotoxic cells, Cell. Immunol. 176 (1997) 93–102.
- [90] L. Jaso-Friedmann, J.H. Leary III, D.L. Evans, The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties, Dev. Comp. Immunol. 25 (2001) 701–711.
- [91] M.V. López-Dóriga, C.A. Barnes, N.M.S. Dos Santos, A.E. Ellis, Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum, Microbiology 146 (2000) 21–30.
- [92] C. Pellizzari, A. Krasnov, S. Afanasyev, N. Vitolo, R. Franch, S. Pegolo, T. Patarnello, L. Bargelloni, High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney, Fish Shellfish Immunol. 34 (2013) 1269–1278.
- [93] B. Fouz, E.G. Biosca, C. Amaro, High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin, J. Appl. Microbiol. 82 (1997) 157–167.

- [94] D. Lanneau, M. Brunet, E. Frisan, E. Solary, M. Fontenay, C. Garrido, Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation, *J. Cell. Mol. Med.* 12 (2008) 743–761.
- [95] J.H. Zhao, X.L. Meng, J. Zhang, Y.L. Li, Y.J. Li, Z.M. Fan, Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen glucose deprivation injury: role of HSP70 and inhibition of apoptosis, *J. Huazhong Univ. Sci. Tech. [Med. Sci.]* 34 (2014) 18–22.
- [96] D. Montero, V. Benitez-Dorta, M.J. Caballero, M. Ponce, S. Torrecillas, M. Izquierdo, M.J. Zamorano, M. Machado, Dietary vegetable oils: effects on the expression of immune-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestine, *Fish Shellfish Immunol.* 44 (2015) 100–108.
- [97] M.J. Prieto-Alamo, N. Abril, I. Osuna-Jimenez, C. Pueyo, *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR, *Aquat. Toxicol.* 91 (2009) 312–319.
- [98] E. Salas-Leiton, V. Anguis, B. Martin-Antonio, D. Crespo, J.V. Planas, C. Infante, J.P. Canavate, M. Machado, Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response, *Fish Shellfish Immunol.* 28 (2010) 296–302.
- [99] I. Osuna-Jimenez, T.D. Williams, M.J. Prieto-Alamo, N. Abril, J.K. Chipman, C. Pueyo, Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays, *Fish Shellfish Immunol.* 26 (2009) 699–706.
- [100] M. Machado, E. Salas-Leiton, C. Infante, M. Ponce, E. Asensio, A. Crespo, E. Zuasti, J.P. Canavate, Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup), *Gene* 416 (2008) 77–84.



Full length article

Use of *in vivo* induced technology to identify antigens expressed by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* during infection of Senegalese sole (*Solea senegalensis*)



J.A. Núñez-Díaz^a, M. Fumanal^a, E. Viguera^b, M.A. Moriñigo^a, M.C. Balebona^{a,*}

^a Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Universidad de Málaga, Área de Genética, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2017

Received in revised form

22 March 2017

Accepted 26 March 2017

Available online 28 March 2017

Keywords:

IVIAT

Virulence

Antigen

Antibody

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*

ABSTRACT

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), the causative agent of photobacteriosis, is an important pathogen in marine aquaculture that affects many different fish species worldwide, including *Solea senegalensis*, an important fish species for aquaculture in the south of Europe.

Bacteria express different repertoires of proteins in response to environmental conditions and when invading a host, sense *in vivo* environment and adapt by changing the expression of specific proteins. In the case of pathogens, identification of genes with up-regulated expression *in vivo* compared to *in vitro* conditions might give an insight into the genes relevant to the bacterial virulence.

In the present work, *in vivo* induced antigen technology (IVIAT) has been used to search for *Phdp* genes only expressed or up-regulated in infected *S. senegalensis*. An expression library from *Phdp* was assayed against pooled sera from convalescent *S. senegalensis* specimens and 18 clones were positive, indicating that proteins encoded are expressed by *Phdp* during *S. senegalensis* infection and are immunogenic for this fish species. In addition, five proteins were reactive against adsorbed sera, indicating their *in vivo* induced character. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, serine hydroxy methyltransferase and alanyl-tRNA synthetase, involved in amino acid and nucleotide metabolism, the protein with antioxidant activity alkyl hydroperoxide reductase and a non-ribosomal peptide synthetase responsible for the synthesis of the siderophore piscibactin have been identified as antigens induced in *Phdp* during *S. senegalensis* infection. Proteins induced during *in vivo* growth of *Phdp* represent promising targets for the development of novel antimicrobial or prophylactic agents in the treatment and prevention of photobacteriosis.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Solea senegalensis is an important fish species in marine aquaculture in the south of Europe due to its high price, market demand and high growth potential of the industry [1,2]. However, infectious outbreaks affecting this species impose limits to the industry and include photobacteriosis as one of the most important diseases restricting *S. senegalensis* cultures.

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), the causative agent of photobacteriosis, is an important pathogen in marine aquaculture that affects many different fish species worldwide,

especially in Mediterranean countries and Japan [3–5]. Virulence factors of this pathogen include a polysaccharide capsular layer [6,7] and a metalloprotease A-B exotoxin that induces apoptosis in fish macrophages and neutrophils [8]. In addition, *Phdp* has been reported to be weakly or moderately adherent, capable of translocating over surfaces thanks to twitching motility, and invasive in some fish cell lines [9,10]. The adherence is mediated by a protein or glycoprotein receptor and an actin microfilament dependent mechanism seems to be involved [11]. However, information on the virulence factors contributing to the invasion of fish cells is still scarce. Furthermore, ability to scavenge iron from its host by using high-affinity iron binding siderophores has also been reported in *Phdp* [12].

The only commercial vaccine available against *Phdp* infections consists of an ECP-enriched bacterin used in Europe with variable

* Corresponding author.

E-mail address: balebona@uma.es (M.C. Balebona).

results [5]. Investigation on the antigens eliciting protective immune response is being carried out and several antigens have been proposed as potential vaccine candidates. Thus, Heat Shock Protein 60 (Hsp60), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), enolase and a 17 kDa lipoprotein have been reported as antigens conferring protection in cobia (*Rachycentron canadum*) [13,14] and another lipoprotein (PDP_0080) identified by reverse vaccinology has been found effective in *Dicentrarchus labrax* [15]. However, the protection has not been evaluated in *S. senegalensis*, and information on *Phdp* antigens eliciting protective response in this highly susceptible species is scarce.

It is well established that bacteria express different repertoires of proteins under *in vitro* culture conditions compared to *in vivo* conditions due to missing *in vivo* signals, such as those coming from the interaction with host cells, extracellular environment, and restriction in nutrients such as free iron. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT) is an immunological technique that uses antisera from an infected host to identify pathogen antigens that are expressed *in vivo* [16,17]. Thus, it allows for the detection of immunogenic epitopes in proteins not expressed by bacteria during *in vitro* growth.

In the present work, an expression library of *Phdp* Lg41/01 has been screened to identify clones immunoreactive against *S. senegalensis* sera convalescent from a *Phdp* infection in order to identify antigens expressed by the pathogen during *S. senegalensis* infection and determine their potential *in vivo* induced character.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) (strain Lg41/01) was isolated from diseased cultured *S. senegalensis* [18] and cultured in tryptic soy broth (Oxoid Ltd., UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSBs) at 22 °C for 24 h. Genomic DNA from *Phdp* strain Lg41/01 was used to construct a protein expression library. *E. coli* BL21 (DE3), used as a host strain for recombinant protein expression, was cultured in Luria-Bertani (LB) (Difco, USA) broth and incubated at 37 °C. All strains were stored at –80 °C in media supplemented with 15% glycerol. When appropriate, kanamycin (kan) was added to LB medium (30 µg/mL). The pET30 plasmid expression system (Novagen, USA) was used to construct the *Phdp* Lg41/01 genomic expression library.

2.2. Construction of genomic expression library

An expression library was constructed with pET30c vector (Novagen), in which clones were inserted under the control of the T7 promoter. Genomic DNA from *Phdp* was isolated according to Martínez et al. (1998) [19] by salting out extraction and isopropanol precipitation, resuspended in MilliQ water and cut in 1000–3500 bp fragments by using HydroShear (GeneMachines, USA), at speed codes 8–10 for 30 cycles. DNA of the required size range (1000–3500 bp) was treated with Fast DNA End Repair Kit (Thermo Scientific, Spain). Repaired *Phdp* DNA was purified using GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) in order to eliminate enzymes and salts from the previous repairing step. DNA fragment size was checked on agarose gels before ligation into pET30c plasmid (Novagen, USA). Briefly, pET30c vector was digested with *EcoRV* (Thermo Scientific), purified from agarose electrophoresis gel and dephosphorylated with calf intestinal phosphatase (Thermo Scientific) according to manufacturer's recommendations. The ligation mixture was used to transform chemically competent *E. coli* BL21 (DE3) cells by heat shock (42 °C, 30 s) and transformants were selected on LB plates supplemented with kanamycin (30 µg/

mL) (Kan-LB) and incubated at 37 °C overnight. Colonies grown on LB plates were picked and used to inoculate microtiter wells containing LB broth supplemented with 15% glycerol. The quality of the library was assessed by PCR amplification using T7 promoter (5'-TAATACGACTACTATAGGG-3') and T7 terminator (5'-GCTAGT-TATTGCTCAGCGG-3') primers and electrophoresis on agarose gels of a random sample to determine the presence and size of inserts. Transformants were stored at –80 °C.

2.3. Fish challenge and convalescent sera collection

Senegalese sole (*S. senegalensis*) specimens (130 ± 15 g mean body weight, N = 40) were supplied by Planta de Cultivos Marinos (CASEM, University of Cádiz, Puerto Real, Cádiz, Spain). Fish were transferred to the facilities at the University of Málaga (Málaga, Spain) and randomly stocked in two separated tanks (20 fish per tank) under optimal stocking density (7 kg m⁻²) with recirculating aerated seawater at 20–22 °C (35 g L⁻¹ salinity). Animals were fed daily (1% body mass) with pelleted food (Skretting, Spain) and acclimatized to laboratory conditions for 2 weeks before experiments. The day before, fish were checked for health status by random sampling of 6 fish specimens (3 per tank) and microbiological analysis of internal organs on tryptic soy agar (Oxoid Ltd., UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSAs). In addition, absence of *Phdp* in internal organs was checked by PCR assays according to Osorio et al. (1999) [20]. *Phdp* Lg41/01 strain (LD50 = 2.2 × 10⁴ CFU g⁻¹, determined by intraperitoneal injection in *S. senegalensis* specimens) was grown in TSBs at 22 °C for 24 h and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) to 10⁵ CFU mL⁻¹ (final concentration). Fish were anaesthetized with clove oil (100 ppm) and specimens intraperitoneally injected with the bacterial suspension (dose 10⁴ CFU g⁻¹). Control fish were injected with the same volume of sterile phosphate buffered saline (PBS). Thirty days post-infection fish specimens were transferred to a new tank containing clove oil (200 ppm) to euthanize. Peripheral blood was sampled by caudal puncture of surviving specimens and sera obtained by allowing the blood to clot at room temperature. Collected sera were stored as single samples at –80 °C until assayed.

2.4. Determination of specific antibody presence by ELISA

Antibody levels in fish sera were measured using ELISA. *Phdp* (strain Lg41/01) cells were used as immobilized antigens. Briefly, ELISA flat-bottom 96-well plates (MaxiSorp immuno-plates, Nunc International, USA) were incubated at 4 °C overnight with the bacterial suspension (50 µl/well). Then, plates were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.25% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 200 µl/well of PBS-T supplemented with 3% (w/v) skim milk was added. Plates were incubated at 22 °C for 2 h and washed with PBS-T three times before adding serial dilutions (1:500; 1:1000; 1:2000) of fish serum samples and incubation at 22 °C for 2 h. Plates were washed again with PBS-T three times and 50 µl of anti-sole antibody developed in rabbit (Sigma Aldrich, Spain) against *S. senegalensis* IgM purified in our laboratory [21] was added to each well [dilution 1/1000 in PBS-T containing 0.25% (w/v) bovine serum albumin (BSA)]. After incubation at 22 °C for 2 h plates were washed again with PBS-T three times. Then, 50 µl/well of anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma Aldrich) developed in goat was added (dilution 1/5000 in PBS-T + BSA) and incubated at 22 °C for 1 h. After a new wash step, 200 µl/well of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma Aldrich) was added and plates incubated at 22 °C for 30 min in the dark. Chromogenic reaction was stopped by adding 50 µl/well of 3 M H₂SO₄ and plates were read spectrophotometrically at 490 nm using a

Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Spain).

2.5. Adsorption of fish sera

After checking the presence of specific antibodies, equal volumes of sera from surviving *S. senegalensis* specimens were pooled and sequentially adsorbed against *in vitro* grown *Phdp* and *E. coli* BL21 (DE3) cells and lysates according to Handfield et al. (2000) [16]. Briefly, pooled fish sera were mixed with *Phdp* cells (10^9 CFU mL⁻¹) grown *in vitro* as detailed above and incubated with gentle shaking at 4 °C, overnight. Cells were removed by centrifugation (10,000×g, 15 min, 4 °C) and this step was repeated three times. Then, sera were adsorbed to non-denatured and heat denatured sonicated *Phdp* cell lysates bound to nitrocellulose membranes. Finally, similar adsorption steps to *E. coli* BL21 (DE3) cells (10^{11} CFU mL⁻¹) harboring pET30c vector were carried out. The efficacy of each adsorption step was assessed by determining serum antibody titers against *Phdp* by ELISA. Adsorbed sera were aliquoted and stored at -80 °C until use.

2.6. Screening of the antigenic proteins expressed *in vivo* by *Phdp*

Transformed *E. coli* BL21 (DE3) cells were transferred from microtiter plates to a new plate containing fresh Kan-LB and incubated at 37 °C for 4 h. Then, 1 mM isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG, Thermo Scientific) was added and incubated at 37 °C for 4 h to induce gene expression of the cloned inserts. Aliquots of induced clones were transferred to 0.45 μ m pore-size nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Spain). Spots were air dried and bacterial lysis was performed by sequential transfer of the membrane on nitrocellulose filters soaked in 10% (w/v) SDS (10 min), denaturing solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, 5 min), two steps in neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris base, for 5 min) and two final steps in sodium citrate solution (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0, 15 min). Then, membranes were blocked with 3% skim milk and incubated with pooled adsorbed or non-adsorbed sera (1:5000 dilution) from convalescent fish at 4 °C overnight.

Clones reacting with serum antibodies were detected by using anti-sole antibody (Sigma Aldrich, Spain) developed in rabbit (dilution 1:8000 in PBS-T+3% milk) and anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Sigma Aldrich, Spain) developed in goat (dilution 1:5000 in PBS-T+3% milk). Detection of positive spots was carried out with tetramethylbenzidine (TMB, Sigma Aldrich) in dark at room temperature. Chromogenic reaction was stopped by adding distilled water.

Each positive clone was confirmed in a second round and the plasmids purified using phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction and isopropanol precipitation and resuspended in MilliQ water. *Phdp* DNA inserted in the vector was sequenced in both directions by using pET30-upstream and downstream specific primers (Novagen). The genes included in the inserts and their presumptive encoding proteins were determined by sequence comparison against nucleotide and protein databases at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Presence of open reading frames (ORF) was determined with ORF Finder tool from NCBI. In the case of inserts containing more than one gene, proteins were separated on SDS-PAGE gels and sent for identification by MALDI-TOF (Servicio Central de Apoyo a la Investigación, University of Cordoba, Spain). In all the cases, the results were compared with a negative control [*E. coli* BL21 (DE3) containing pET30c]. The cellular locations of the proteins were predicted using SignalP3.0 and LipoP1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> and <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>, respectively).

2.7. Gene expression analysis by quantitative real-time PCR

The expression of putative *in vivo* expressed genes in *Phdp* under *in vitro* culture and during *ex vivo* infection of *S. senegalensis* head kidney cells was assessed by RT-qPCR. For *in vitro* culture, *Phdp* Lg41/01 was grown in TSBs at 22 °C and cells collected at mid-exponential and stationary phase. Effect of iron availability on selected gene expression was determined in *Phdp* cultures grown in the presence of dipyrindyl (100 μ M) or FeCl₃·6H₂O (100 μ M) at 22 °C until mid-exponential and stationary phase. To study the effect of the oxidative stress on gene transcription, *Phdp* cells were grown in TSBs until mid-exponential phase and methyl viologen (0.2 mM), which generates superoxide radicals, was added. Cultures were incubated 6 h further before centrifugation according to Diaz-Rosales et al. (2006) [22]. On the other hand, the oxidative agent peroxyntrite (Calbiochem, Merck Millipore, France) was added to mid-exponential phase cultures to achieve 1 mM (final concentration) and cells were recovered after 2 h incubation. In all the cases, survival of *Phdp* to stress treatments was checked previously. Triplicate cultures were carried out for each growth condition and cell pellets obtained after centrifugation (5000×g, 10 min, 4 °C), frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis.

Ex vivo assays were performed to obtain information about the effect of bacterial contact with head kidney cells on the transcription of *Phdp* *in vivo* expressed genes. For *ex vivo* assays, head kidney from five healthy *S. senegalensis* specimens were individually isolated and passed through a sterile 100 μ m nylon mesh with L-15 medium (Gibco, USA) containing 2% fetal calf serum (FCS; Sigma Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich) and 10 U mL⁻¹ sodium heparin. The cell suspension was washed ($\times 3$) and adjusted to 10^7 cells mL⁻¹ in L-15 medium without antibiotics. Cell viability was determined by the exclusion test with trypan blue (Sigma Aldrich) (0.5% in PBS). Volumes of 100 μ l were added to 1.5 mL microtubes and maintained at 22 °C overnight until bacterial challenge assay was performed. *Phdp* Lg41/01 was grown in TSBs at 22 °C until mid-exponential phase and bacterial concentration adjusted to 10^9 CFU mL⁻¹. Then, bacterial suspension (10 μ l) was added to each 1.5 mL microtube containing 100 μ l of head kidney cell suspensions in L-15 medium. Ratio fish cell:bacteria was 1:10. Microtubes were incubated at 22 °C for 0, 30, 60, 120 min and 6 h and non-inoculated head kidney cell suspensions were used to determine cell viability during the assay. *In vitro* cultures of *Phdp* in L-15 medium were used as negative controls for relative qPCR quantification.

At the end of the incubation, total RNA from *Phdp* cells was extracted with TRI Reagent (Sigma Aldrich) according to manufacturer's instructions. RNA quality was checked by running an aliquot on an agarose gel and quantified in a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) via A_{260/280nm} and A_{260/230nm} readings. DNase treatment (Life Technologies, Spain) was carried out to ensure complete removal of DNA. Reverse transcription was performed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with 1 μ g of total RNA in a total volume of 10 μ l incubated at 37 °C during 60 min. To analyze gene transcription, amplifications were performed in a final volume of 10 μ l. Reaction mixture contained 5 μ l of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0.5 μ l of each primer set (10 μ M), 1 μ l of template cDNA and 3 μ l of DEPC-water. Seven genes including *irp1*, *irp2*, *ahpC*, *alaRS*, *sod*, *impdh* and *shmt*, were selected for gene expression analysis using RT-qPCR and 16S rRNA was used as reference gene (Table 1). qPCR was performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with an initial denaturation cycle at 95 °C for 60 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 60 s. Amplification was followed by a standard melting curve from 65 °C to 95 °C, in

Table 1
List of primers used in the present study.

Gen	Code	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
Alkyl hydroperoxide reductase	<i>ahpC</i>	ATGGTGGTATTGGCCCTGTT (F) CATTGAGCTGGGCACACTTC (R)	250
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>impdh</i>	TGCTGATGGTGGTATCCGTT (F) GACATCGCACCAAGAGAACC (R)	177
Superoxide dismutase	<i>sod</i>	AGACGCACTAGAACCACACA (F) GGGCTTAGACAGTGCCAGTA (R)	213
Non-ribosomal peptide synthetase involved in siderophore biosynthesis 1	<i>irp1</i>	GCTACAGAGCCGCTATTG (F) CTTCATCTTGCCAGTAGCCA (R)	202
Non-ribosomal peptide synthetase involved in siderophore biosynthesis 2	<i>irp2</i>	AGGAGCAATTCAGCAGATT (F) CGTTGTTCTCGGTCGGTATT (R)	226
Serine hydroxyl methyl transferase	<i>shmt</i>	CGGAACTTTATGCAGCCATT (F) CAATGGCAAGTTGTTCTGCT (R)	201
Alanyl-tRNA synthetase	<i>alaRS</i>	GTGTTAAGCATGGGCGATT (F) CCTTGTCCACCACAGAAGCA (R)	232
16S rRNA	<i>16S rRNA</i>	AACTGGCAGGCTAGAGTCTT (F) CACAACTCCAAGTAGACAT (R)	198

increments of 0.5 °C for 5 s at each step, to confirm that only one product was amplified and detected. Samples were run in parallel with 16S rRNA reference gene. Threshold values (Ct) were calculated and analyzed using CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Amplification at Ct < 40 was considered as a positive result, whereas Ct ≥ 40 or no amplification was considered negative. Relative mRNA expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001), normalizing with the reference gene (16S rRNA) and relative to non-treated samples.

Specific primers were designed using Primer 3 and AmplifX software according to known qPCR restrictions (size, Tm difference between primers, % GC content and self-dimer or cross-dimer formation). In order to obtain accurate results, PCR efficiency ($E = (10^{[-1/\text{slope}] - 1}) \times 100$) was checked to ensure optimized and reproducible assays.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc, IBM Company, NY, USA). Results are shown as means ± standard error of the mean (SEM). Normality and homogeneity of the data were previously assessed using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For non-normal data logarithmic transformation was performed. The statistical significance of differences in qPCR values between control and treated groups was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Tukey's test was used to analyze differences between the treatments. Significance was set for $p < 0.05$.

2.9. Ethical statements

All procedures involving fish were conducted in strict accordance with Guidelines established by the European Union (2010/63/UE) and the Spanish legislation (RD 1201/2005 and law 32/2007) for the use of laboratory animals. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Malaga.

3. Results

3.1. Adsorption of sera from convalescent fish and removal of the antibodies recognizing *in vitro* expressed antigens

Mortality was observed only in the infected group within the first 6 days post-infection (35% cumulative mortality), whilst no mortality was recorded in the control group. Mortality due to *Phdp*

infection was confirmed by isolation of the pathogen from dead fish.

Specific antibody titers against *Phdp* were determined in the sera from each surviving *S. senegalensis* specimen. All fish showed significantly higher antibody titers compared to non-infected fish. Thus, equal volumes of sera from infected fish were mixed and used to prepare adsorbed sera for screening assays. The adsorption efficiency was evaluated based on the immunoreactivity of the sera after each adsorption step with whole and lysed *Phdp* cells grown *in vitro*. A progressive reduction in reactivity against *in vitro* grown *Phdp* cells was detected after the adsorption rounds, especially after the first adsorption step (Fig. 1). Thus, following adsorption steps substantially removed antibodies against *in vitro* expressed antigens resulted in relative enrichment in antibodies recognizing *in vivo* expressed antigens.

3.2. Screening of proteins expressed during *Phdp* infection of *S. senegalensis*

According to the Clarke–Carbon expression: $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$ where N is the number of recombinants; p is the desired probability and f is insert size/genome size, a total of 6500 recombinants will provide tenfold coverage of *Phdp* genome ($p = 99\%$). In the present work, the library from Lg14/01 constructed in *E. coli* BL21 (DE3)

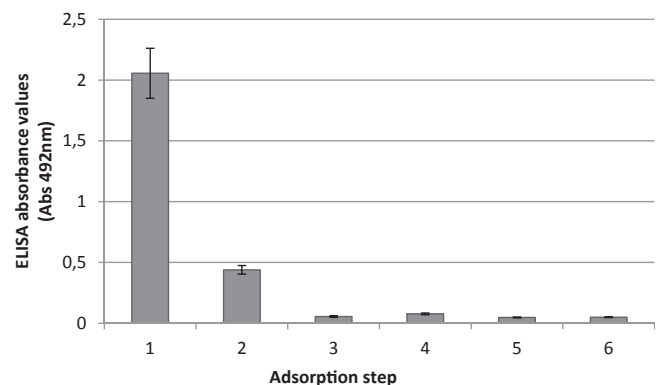


Fig. 1. ELISA antibody determination of pooled sera from convalescent *S. senegalensis* specimens after sequential adsorption steps. Plates were coated with *Phdp* lysed cells. Absorbance (Abs 492 nm) values have been corrected for background and dilution during adsorption steps. (1) Non adsorbed sera; (2) sera adsorbed with *Phdp* whole cells; (3) sera adsorbed with *Phdp* lysates; (4) sera adsorbed with heat denatured *Phdp* lysates; (5) sera adsorbed with *E. coli* BL21 (DE3) lysates and (6) adsorbed sera.

consisted of 7000 recombinants. To evaluate the insert size, plasmids from 50 random clones were purified and insert sequences amplified by PCR. Results indicated that more than 95% of plasmids contained inserts with sizes ranging from 1000 to 3000 bp (Fig. 2).

The genomic expression library was screened by immunoblot assay with both pooled adsorbed and non-adsorbed sera from convalescent *S. senegalensis* specimens. In the first round, a total of 118 clones with reactivity compared to negative control (*E. coli* BL21 (DE3)) were selected. In the second screening, 18 out of 118 candidate clones showed positive reactivity in at least two of three replicate screens with non-adsorbed sera and only five clones were confirmed as positive against adsorbed sera from convalescent *S. senegalensis* specimens. Sequences of these inserts were analyzed to determine the presence of open reading frames (ORF) and were compared against GenBank database (NCBI) using BLASTn searches. Among 18 clones, no clone contained inserts encoding identical proteins with other clones. Table 2 shows the proteins encoded by *Phdp* insert sequences identified in reactive clones, the actual or putative functions and the predicted cellular location of the ORFs identified.

Identified genes were allocated into different functional categories (Table 2). Thus, proteins expressed by *Phdp* during *S. senegalensis* infection and reactive to this fish sera include some involved in replication, DNA conformation and cell division, others

involved in amino acid and nucleotide synthesis and metabolism, cell wall metabolism as well as antioxidant activity and iron acquisition mechanisms and one intramembrane serine protease. All these proteins can be considered as *in vivo* expressed antigenic proteins (IVE), whilst those detected with adsorbed sera will be considered as *in vivo* induced antigenic proteins (IVIAT). Thus, only five clones gave positive reaction against adsorbed sera from convalescent fish, indicating that the proteins encoded are expressed only during *S. senegalensis* infection. These proteins included one transport and metabolism related protein: inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (Impdh), the protein with antioxidant activity alkyl hydroperoxide reductase (AhpC); two proteins related to translation, ribosomal structure and biogenesis: serine hydroxyl methyl transferase (Shmt) and alanyl-tRNA synthetase (Alars) as well as the non-ribosomal peptide synthetase Irp2, involved in the biosynthesis of the siderophore piscibactin.

3.3. *In vitro* transcription of candidate genes with qPCR

Iron plays an important role during microbial infection, when it is a limiting factor for microbial growth. In this way, the host counts on different strategies to keep this metal linked to high-affinity proteins and maintain low free iron levels. In order to determine the effect of iron availability on gene expression, *Phdp* cells were

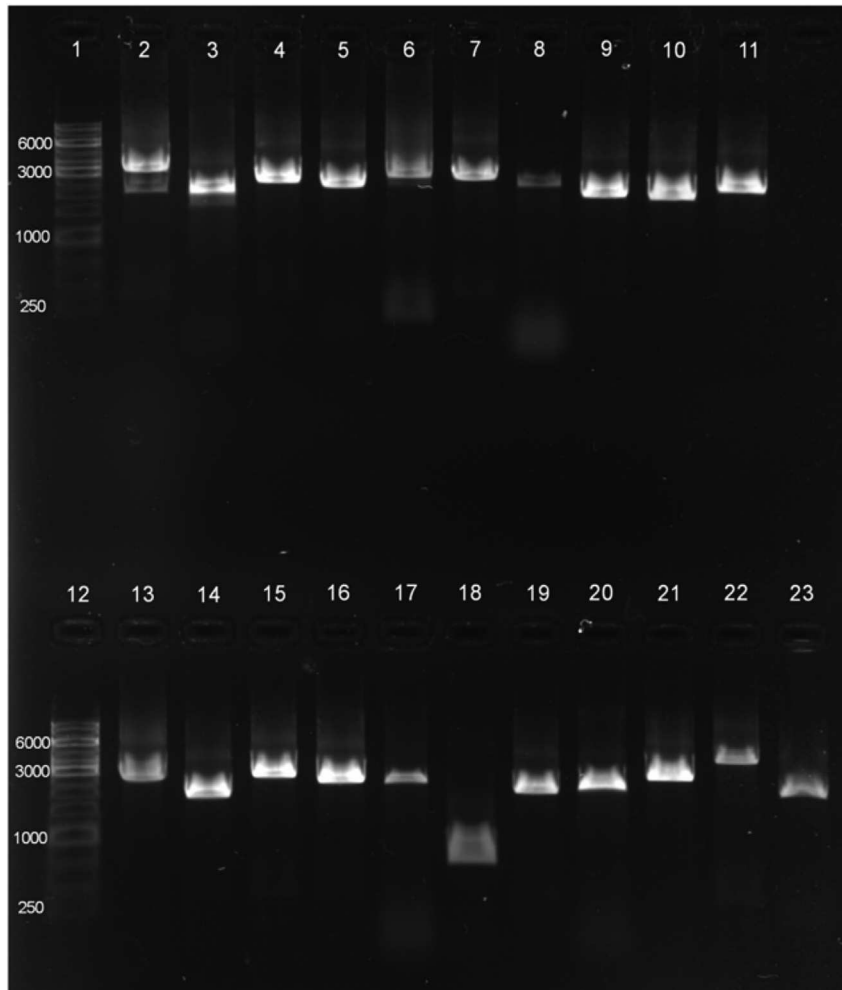


Fig. 2. PCR analysis of insert fragments of *Phdp* Lg41/01 expression library. More than 95% of plasmids contained single DNA inserts with sizes ranging from 1000 to 3000 bp. Lanes 1 and 12: DNA marker; Lane 2–23: twenty one randomly selected recombinant plasmids.

Table 2

List of proteins identified in the present study. Proteins highlighted in bold were detected with adsorbed sera and considered as *in vivo* induced antigen proteins (IVIAT). Predicted cellular location was determined by SignalP3.0 and LipoP1.0 software.

Functional category	Identification	Accession	Predicted cellular location
Replication, recombination and repair	DNA gyrase subunit B	WP_044180341.1	Cytoplasm
	Recombination associated protein RdgC	WP_044176475.1	Cytoplasm
Iron acquisition	Non-ribosomal peptide synthetase Irp2	AKQ52531	Membrane
Transport and metabolism	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	EEZ41661.1	Cytoplasm
	Arginine decarboxylase catabolic	AEU10010.1	Cytoplasm
	Serine hydroxy methyl transferase	WP_005300693.1	Cytoplasm
	Glutamine amidotransferases class-II (GATase)	WP_044179637.1	Cytoplasm
	Putative amidotransferase	AEU09986.1	Cytoplasm
	Diguanylate phosphodiesterase	WP_044178285.1	Membrane/ Cytoplasm
	Alkyl hydroperoxide reductase	WP_005298372.1	Cytoplasm
Antioxidant activity	Superoxide dismutase	WP_005298367.1	Periplasm
	Lytic transglycosylase	WP_044174705.1	Outer cell membrane
Cell envelope and wall metabolism	Murein transglycosylase	WP_044178572.1	Periplasm
	23S rRNA methyltransferase	WP_044175535.1	Cytoplasm
Translation, ribosomal structure and biogenesis	Alanyl-tRNA synthetase	WP_044174517.1	Cytoplasm
	Chromosome partitioning protein ParA	WP_014386679.1	Cytoplasm
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	Putative transposase	AEU10011.1	Cytoplasm
Mobile and extrachromosomal element functions	Intramembrane serine protease GlpG	WP_044173910.1	Membrane
Other			

grown under iron-limiting and replete conditions and transcription of *in vivo* induced genes was determined by qPCR. In addition to *in vivo* induced genes selected based on IVIAT technology, *irp1* and *sod* genes, encoding for the non-ribosomal peptide synthetase Irp1 involved in piscibactin synthesis, and the iron type superoxide dismutase Sod, respectively, were assayed. Results obtained (Fig. 3) indicate up-regulation of *irp1*, *irp2* and *ahpC* genes in cells grown under iron-restricted conditions, whilst *sod* up-regulation was observed with high iron concentrations. On the contrary, iron overload resulted in down-regulation of the genes involved in piscibactin expression, *irp1* and *irp2*. No changes in transcription of *alars*, *impdh* and *shmt* genes were observed depending on iron availability (Fig. 3).

Oxidative stress induced by the production of superoxide with methyl viologen or peroxyxynitrite resulted also in the up-regulation of *irp1*, *irp2*, *ahpC* and *sod* genes (Fig. 3), whilst no significant changes in *alars*, *impdh* and *shmt* genes were detected.

Finally, co-incubation of *Phdp* with kidney cells from *S. senegalensis* has resulted in up-regulation of all the genes selected (Fig. 4). This up-regulation was observed after 30 min incubation and lasted 6 h in the case of *irp1*, *irp2*, *ahpC*, *sod*, *alars* and *impdh*, whilst started after 120 min co-incubation in the case of *shmt*. Results shown in Fig. 4 indicate that expression in *S. senegalensis* kidney cells of genes selected by IVIAT technology is up-regulated in assayed *ex vivo* conditions, though further assays need to be carried out to determine *in vivo* gene expression.

4. Discussion

Environmental stimuli determine the gene expression of organisms. Thus, bacteria invading a host sense *in vivo* environment and adapt by inducing or repressing the expression of specific genes. In the case of pathogens, identification of genes with *in vivo* up-regulated expression compared to *in vitro* conditions might give an insight into the genes relevant to the bacterial virulence [23].

IVIAT allows for the identification of immunogenic antigens uniquely expressed during host infection. In addition, unlike other techniques, IVIAT does not rely on infected animal assays, only sera from convalescent animals being required. IVIAT has been used to identify *in vivo* induced antigens in several pathogens mainly during human and cattle infections [16,23,24]. At present, very few works have applied this technique to fish pathogens [25–28] and no study about *Phdp* on *S. senegalensis* has been reported yet.

However, these few studies have allowed the identification of protective antigens used in a DNA vaccine against *Edwardsiella tarda* [29].

In our study, an expression library from *Phdp* has been assayed against pooled sera from convalescent *S. senegalensis* specimens and resulted in 18 clones giving reactivity. This indicates that the proteins encoded are expressed by *Phdp* during fish infection and at the same time, they are immunogenic for this fish species. In addition, five proteins were reactive against adsorbed sera, indicating their *in vivo* induced expression. *Phdp* proteins identified during *S. senegalensis* infection are involved in different functions including replication and cell division, substrate transport and metabolism, cell wall metabolism, antioxidant activities and iron acquisition, among others. Although *in vivo* expressed genes may not be identical in different fish species, it is noteworthy that Ho et al. (2011) [13] observed immunoreactivity of 2D electrophoresis protein spots identified as DNA gyrase subunit B with sera from cobia recovered from a natural outbreak of photobacteriosis. Similarly, results obtained in the present work indicate the expression of this protein by *Phdp* during infection of *S. senegalensis*. DNA gyrase subunit B is a type II topoisomerase that negatively supercoils closed circular double-stranded DNA in an ATP-dependent manner in order to modulate DNA topology and maintain chromosomes with negative supercoiling [30]. DNA gyrase subunit B is used in cellular processes that involve strand separation, such as DNA replication, transcription, recombination and repair. Likewise, recombination associated protein RdgC, also a cytoplasmic located protein involved in recombination and DNA repair has been found to be immunogenic and expressed by *Phdp* in *S. senegalensis* specimens. In addition, two transglycosylases (lytic transglycosylase and murein transglycosylase) with outer cell membrane predicted location have been expressed during *S. senegalensis* infection. These proteins cleave the *N*-acetylmuramic acid- β -1,4-*N*-acetylglucosamine linkage in the peptidoglycan and degrade the cell wall in the periplasm located between the outer membrane and the inner membrane. Lytic transglycosylases are responsible for creating space within the peptidoglycan sacculus for its biosynthesis and recycling, cell division, and the insertion of structures such as flagella and secretion systems. In addition, they participate in antibiotic resistance by the synthesis of second messengers to control the expression of β -lactamases and in the release of peptidoglycan-derived pathogen-associated molecular patterns as a virulence mechanism [31]. Thus, given their

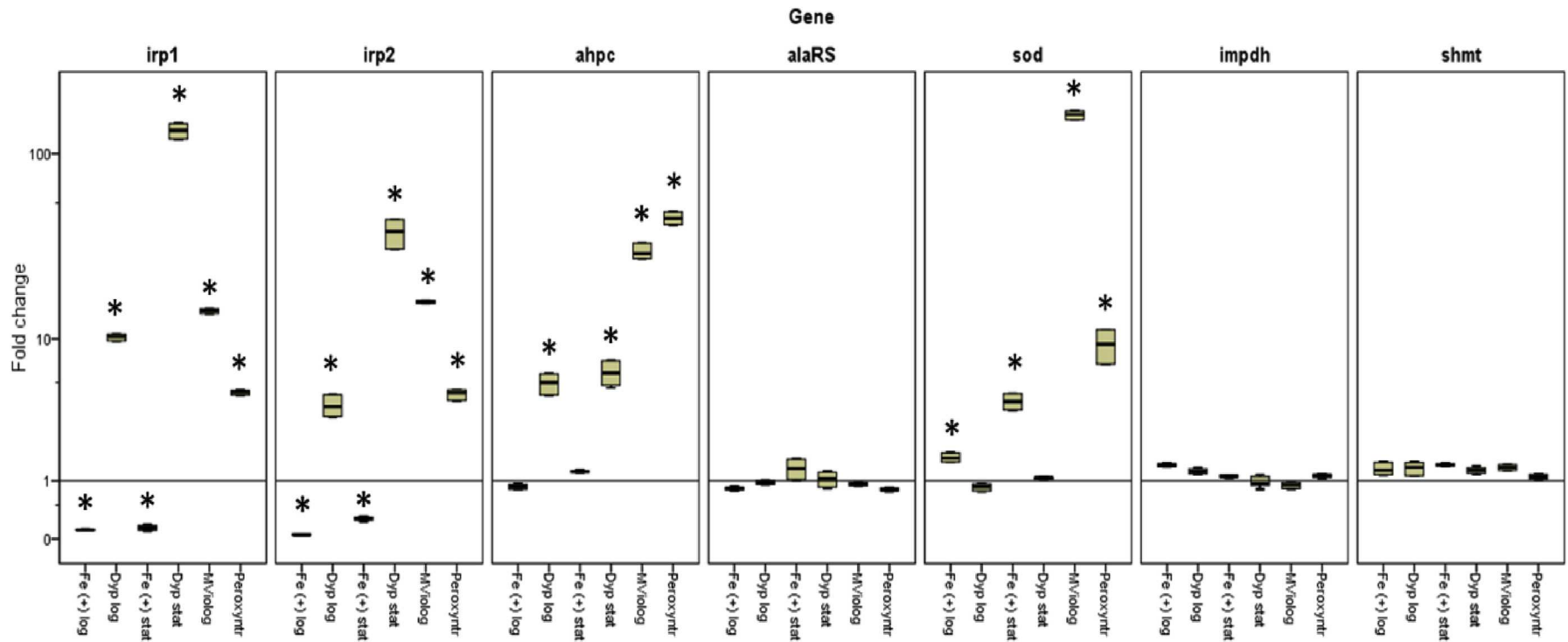


Fig. 3. Relative transcription of *in vivo* expressed genes in *P. damsela* subsp. *piscicida* cells grown under high and limiting iron conditions and exposed to superoxide and peroxynitrite radicals. Peroxynitr: *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for 2 h in the presence of peroxynitrite (1 mM) before sampling. MVIolog: *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for 6 h in the presence of the superoxide generator methyl viologen (0.2 mM) before sampling. Dyp log and Dyp stat: *Phdp* cells were grown in broth added with the iron chelant 2,2'-dipyridyl (100 μ M) until log or stationary phase, respectively. Fe (+) log and Fe (+) stat: *Phdp* cells were grown in broth added with FeCl₃ (100 μ M) until log or stationary phase, respectively. qPCR data were normalized against *16S rRNA* gene and fold change values calculated at each sampling time relative to non-treated cells (growth in TSBs) based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values represent the mean of three independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$) compared to non-treated bacteria cells have been indicated with an asterisk (*).

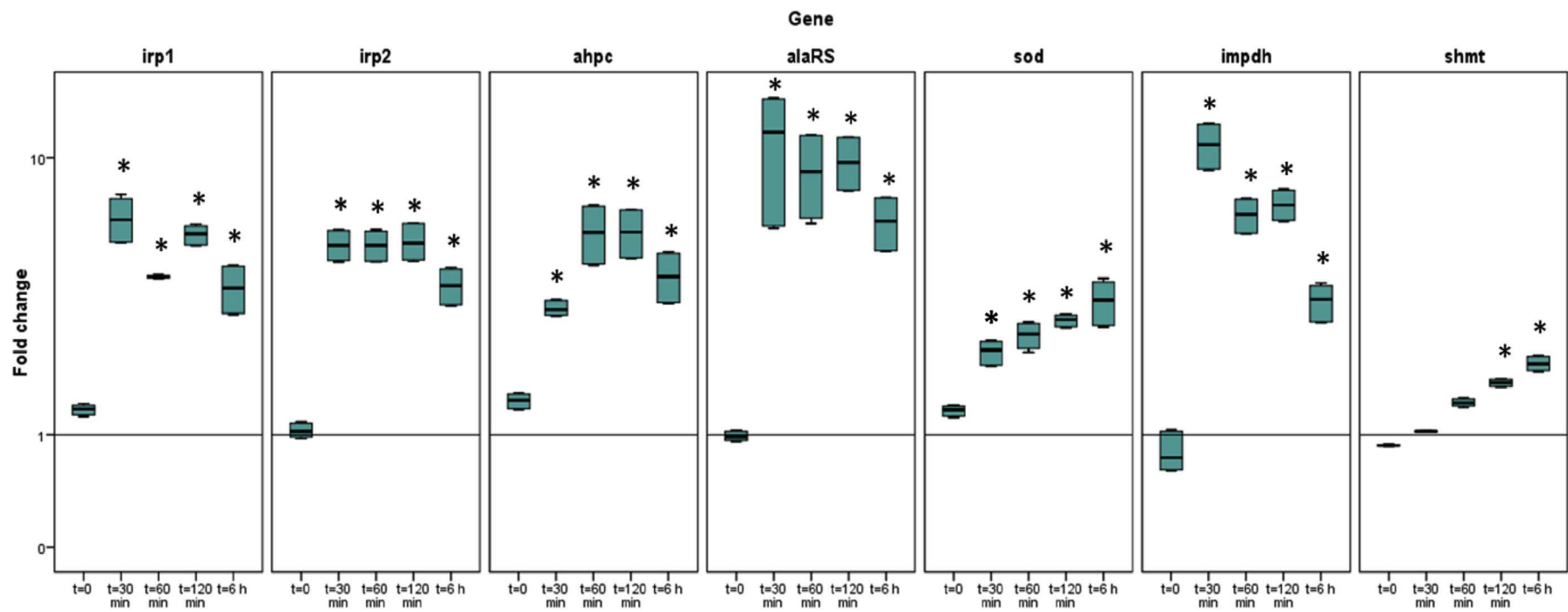


Fig. 4. Relative transcription of *in vivo* expressed genes in *P. damselae* subsp. *piscicida* cells during *ex vivo* infection of *S. senegalensis* head kidney. *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for different times with sole cells before sampling. qPCR data were normalized against *16S rRNA* gene and fold change values calculated at each sampling time relative to cells grown in *in vitro* conditions (L-15 medium) based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Values represent the mean of five independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$) compared to non-treated bacteria cells have been indicated with an asterisk (*).

important role in bacterial cell wall metabolism, the lytic transglycosylases may constitute attractive new targets for the development of new vaccines against *Phdp*.

In addition, proteins involved in amino acid biogenesis and metabolism, transfer of amino groups and uptake of carbohydrates from the extracellular environment are immunogenic and expressed by *Phdp* during *S. senegalensis* infection. Expression of three proteins included in these functional categories has been induced in *S. senegalensis*, thus they are considered *in vivo* induced antigens. They include alanyl-tRNA synthetase, serine hydroxyl methyl transferase and inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. The *in vivo* induced character of the proteins encoded by *alars*, *impdh* and *shmt* genes in *Phdp*, indicate the *in vivo* expression of genes involved in recognizing and responding to the *in vivo* environment, including those involved in energy metabolism and use of alternate energy sources. Moreover, the cytoplasmic predicted location of these proteins may indicate the recognition and internalization of the pathogen by macrophages and other phagocytosing cells that would lyse, process and display cellular components as epitopes to lymphocyte cells. In this way, *Phdp* has been reported as an intracellular pathogen capable to enter and survive in both fish phagocytic and non-phagocytic cells [9,11,32].

Alanyl-tRNA synthetases are aminoacyl-tRNA synthetases (AaRS), essential enzymes that ligate amino acids to cognate tRNA molecules. Apart from its role in protein biosynthesis, AaRS participate in the aminoacylation of unfinished polypeptides in stalled ribosomes, making possible the recycling of stalled ribosomes by the addition of proteolysis-inducing tags. This activity is considered as a mechanism of bacterial adaptation to stressed conditions [33]. Herbert et al. (2002) [34] observed diminished *in vivo* survival in a *Haemophilus influenzae* mutant with impaired alanyl tRNA synthetase activity, suggesting that this activity is essential to the organism in an *in vivo* environment. AaRS are also involved in a number of regulatory processes via their product, the charged tRNA, and the control of the expression of amino acid biosynthetic operons by the level of tRNA aminoacylation *in vivo* is well-documented [35,36]. Similarly, although also expressed *in vitro*, *Phdp* expresses 23S rRNA methyltransferase during *S. senegalensis* infection. This activity, which specifically methylates adenine in 23S rRNA, plays a crucial role in the proofreading step at the peptidyl transferase center and contributes to ribosomal fidelity [37]. Thus, contribution of this protein to avoid errors during protein synthesis should also be considered.

Serine hydroxymethyl transferase activity, another antigen induced during *Phdp* infection of *S. senegalensis*, catalyzes the reversible interconversion of serine and glycine with tetrahydrofolate (THF) acting as the one-carbon carrier. This reaction serves as the major source of one-carbon groups required for the biosynthesis of purines, thymidylate, methionine, and other important biomolecules. A study with miniTn5 mutants of *Brucella suis* indicates that *B. suis* serine hydroxyl methyl transferase gene (*glyA*) is required for intracellular multiplication in human macrophage THP-1 cells [38]. In addition, *glyA* mutants of *Vibrio cholerae* and *Salmonella typhimurium* show attenuated virulence for mouse [39,40] and Bogard et al. (2012) [41] have reported absence of colonization ability in *V. cholerae glyA* mutants, considering serine hydroxyl methyl transferase as a virulence factor required for intestinal colonization. Similarly, *S. senegalensis* may represent an intra host environment in which glycine production or conversion of glycine to THF are essential for *Phdp*, making the pathogen up-regulate serine hydroxy methyl transferase expression. These results suggest this protein as a possible new target in the control of photobacteriosis.

Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (*Impdh*) is widely distributed and it is entailed in the purine nucleotide metabolism.

This enzyme catalyzes the conversion of inosine 5'-monophosphate to xanthosine 5'- monophosphate with the concomitant reduction of NAD to NADH. *Impdh* participates in the first step of guanosine 5'-triphosphate synthesis, playing a key role in the regulation of cell proliferation and differentiation [42,43]. Although its role in virulence for fish has not been determined yet, Shin et al. (2009) [44] reported presence of antibodies against *Lactococcus garviae Impdh* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). In the present work, we have observed *impdh* induced expression during *Phdp ex vivo* growth. The role of *Impdh* as an important virulence factor has been reported for several species, including *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Riemerella anatipestifer* [45–47]. Zhang et al. (2009) [48] found attenuation of an *S. suis* type 2 isogenic mutant lacking *Impdh* in various animal models, and Zhou et al. (2014) [49] reported the implication of *Impdh* in adhesion and invasion of *S. suis* serotype 2 to cell lines. In this way, *Impdh* has been identified as a plasminogen receptor (PlgR) on the surface of *Staphylococcus aureus*. *S. aureus*-bound plasminogen can be converted to plasmin by host plasminogen activator (PA) or staphylococcal PA and facilitate bacterial penetration tissues [50]. Like in *S. aureus*, *Phdp Impdh* could enhance *Phdp* penetration tissues during infections.

Alexandre et al. (2015) [43] identified two classes of bacterial *Impdh*: class I with an octameric organization and cooperative kinetics, and class II being either tetrameric or octameric, and exhibiting michaelian kinetics. *Impdhs* from Gram-negative bacteria belong to class I, whilst *Impdh* from Gram negative and Gram positive bacteria are found in class II and exhibit different kinetics. On the other hand, only class II *Impdhs* would be predicted to exist in eukaryotes [51]. Thus, significant differences in kinetic properties and sensitivity to inhibitors make possible the inhibition of bacterial *Impdh* without interfering in host *Impdh*. The crucial role played by *Impdh* in the regulation of the intracellular guanine nucleotide pool leads to consider the inhibitors against *Impdh* a promising strategy for the development of broad-spectrum antibiotics [52]. In this way, Chiu et al. (2010) [42] have observed decreased *Impdh* in *V. parahaemolyticus* treated with cationic antimicrobial peptides.

ROS are important components of the host immune response and at the same time, they are signal to pathogens, indicating contact with the host [53]. Two proteins involved in antioxidant activities have been found to be expressed by *Phdp* in *S. senegalensis*: superoxide dismutase (Sod) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC). Transcription of *ahpC* has been up-regulated in iron-limiting conditions. Diaz-Rosales et al. (2006) [22] reported lower Sod and catalase levels in *Phdp* grown under iron-depleted conditions, these cells being also more susceptible to killing by sole phagocytes. AhpC proteins are the catalytic subunits of a family of peroxidases collectively called peroxiredoxins, or thiol peroxidases (TPx family) [54]. These enzymes constitute an important component of defense against oxidizing substrates, such as H₂O₂, organic peroxides, and peroxyxynitrite. They are involved both in the control of endogenous peroxides and in the inducible defense response to exogenous peroxides derived from environmental stress or the host, facilitating survival of pathogenic bacteria [55,56]. AhpC are involved in the virulence of several pathogens including *Pseudomonas aeruginosa* [57], *Salmonella typhimurium* [58], *Helicobacter pylori* [59,60]. Results obtained in the present work indicate *AhpC* expression and production of specific antibodies during *Phdp* infection in *S. senegalensis*. Barnes et al. (1999) [61] reported *in vitro* susceptibility of *Phdp* to oxidative stress suggesting a relevant role for hydrogen peroxide in the inactivation of the microorganism, and Diaz-Rosales et al. (2006) [22] observed increased survival to hydrogen peroxide in a virulent *Phdp* isolate. Thus, it may be expected that activities that cope with peroxide

radicals have an important role in *Phdp* virulence, especially considering that *Phdp* is able to invade host cells and behave as a facultative intracellular pathogen. In addition, *ahpC* expression increased in bacterial cells exposed to high superoxide and peroxynitrite radicals as well as in *ex vivo* grown cells. Similarly, *ahpC* up-regulation has been observed in *Burkholderia pseudomallei* during oxidative stress [62] and *Shigella dysenteriae* infecting piglets [63]. In this way, *Phdp* AhpC up-regulation during *S. senegalensis* infection could be mediated by oxidative stress, however, *in vivo* experiments to confirm this relationship need to be carried out.

AhpC from *B. pseudomallei* are immunogenic for mice [64] and O'Riordan et al. (2012) [60] reported protection against *Helicobacter pylori* infection in mice immunized with AhpC, which showed increased serum IgG levels. Although additional assays to determine the protection conferred by AhpC from *Phdp*, the immunogenic character of AhpC for *S. senegalensis* allows consider the use of AhpC as a potential vaccine candidate against *Phdp* infections.

Finally, a sequence with 100% identity to *irp2*, the gene encoding a non-ribosomal peptide synthetase involved in piscibactin synthesis has been found in clones reactive against adsorbed sera from *Phdp* infected *S. senegalensis* specimens, indicating the *in vivo* induced character of the encoded protein. Piscibactin is a phenolate-like siderophore with a chemical structure similar to that of yersiniabactin [65]. The *irp* gene cluster is required for the biosynthesis of the siderophore and it resembles *Yersinia* high pathogenicity island [66,67]. Osorio et al. (2006) [66] reported *irp2* expression in a strain of *Phdp* cultured with the iron chelant 2,2'-dipyridyl. Apart from iron modulation of *irp1* and *irp2* transcription in *Phdp* cells, in the present work, up-regulation of the genes involved in piscibactin synthesis has been observed in contact with kidney cells. Although assays in fish with and without iron overload need to be performed to confirm this premise, it could be considered that the *in vivo* induced character observed for this non-ribosomal peptide synthetase in *S. senegalensis* may be related to a low iron availability environment encountered by *Phdp* in the fish, a pathogen for which iron is essential. Indeed, this bacterial pathogen is able to obtain iron from haemin and haemoglobin as unique iron sources *in vitro* [12,68]. The location of the non-ribosomal peptide synthetase involved in piscibactin synthesis is the cell membrane [66], increasing the exposition to the components of the immune fish immune system and facilitating their role as early-recognized antigens, relevant features for a potential antigen in a vaccine preparation.

In short, proteins induced during *in vivo* growth of *Phdp* represent exciting targets for the development of novel antimicrobial or prophylactic agents in the prevention and treatment of photobacteriosis. In the present work, the proteins inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, serine hydroxyl methyl transferase and alanyl-tRNA synthetase, involved in aminoacid and nucleotide metabolism, the proteins with antioxidant activity alkyl hydroperoxide reductase and a non-ribosomal peptide synthetase responsible for the synthesis of the siderophore piscibactin have been identified as antigens induced in *Phdp* during *S. senegalensis* infection.

Funding

This work was supported by Junta de Andalucía and co-financed by FEDER funds (Grant P10-RNM-6338). JA Núñez-Díaz received a research grant from Junta de Andalucía.

Acknowledgments

Authors are thankful to J.M. Mancera for supplying fish and Eva

Arrebola for help in library preparation.

References

- [1] M.T. Dinis, L. Ribeiro, F. Soares, C. Sarasquete, A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal, *Aquaculture* 176 (1999) 27–38.
- [2] A.K. Imsland, L.E.C. Foss, M.T. Conceição, D. Dinis, E. Delbare, A. Schram, P. Kamstra, P. Rema, P. White, A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*, *Rev. Fish. Biol. Fish.* 13 (2003) 379–408.
- [3] J.L. Romalde, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen, *Int. Microbiol.* 5 (2002) 3–9.
- [4] R. Wang, J. Feng, Y. Su, L. Ye, J. Wang, Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity, *Vet. Microbiol.* 162 (2013a) 957–963.
- [5] F. Andreoni, M. Magnani, Photobacteriosis: prevention and diagnosis, *J. Immunol. Res.* (2014) 793817, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/793817>.
- [6] B. Magariños, R. Bonet, J.L. Romalde, M.J. Martínez, F. Congregado, A.E. Toranzo, Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish, *Microb. Pathog.* 21 (1996) 289–297.
- [7] S. Arijó, J.J. Borrego, I. Zorrilla, M.C. Balebona, M.A. Moriñigo, Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L) macrophages, *Fish. Shellfish Immunol.* 8 (1998) 63–72.
- [8] Do Vale, M.T. Silva, N.M.S. dos Santos, D.S. Nascimento, P. Reis-Rodrigues, C. Costa-Ramos, A.E. Ellis, J.E. Azevedo, AIP56, a novel plasmid encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils, *Mol. Microbiol.* 58 (2005) 1025–1038, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04893.x>.
- [9] F. Acosta, J. Vivas, D. Padilla, J. Vega, J. Bravo, V. Grasso, F. Real, Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., *J. Fish. Dis.* 32 (2009) 535–541.
- [10] S. Remuzgo-Martínez, M. Lázaro-Díez, D. Padilla, B. Vega, F. El Aamri, J.M. Ricardo, F. Acosta, J. Ramos-Vivas, New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: pili, motility and adherence to solid surfaces, *Vet. Microbiol.* 174 (2014) 247–254.
- [11] M.V. Lopez-Doriga, A.C. Barnes, N.M.S. Dos Santos, A.E. Ellis, Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum, *Microbiology* 146 (2000) 21–30.
- [12] B. Magariños, J.L. Romalde, M.L. Lemos, J.L. Barja, A.E. Toranzo, Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 2990–2998.
- [13] L.P. Ho, J.H.Y. Lin, H.C. Liu, H.E. Chen, T.Z. Chen, H.L. Yang, Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *Fish. Shellfish Immunol.* 30 (2011) 412–419.
- [14] G. Kato, K. Yamashita, H. Kondo, I. Hirono, Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder, *Vaccine* 33 (2015) 1040–1045.
- [15] F. Andreoni, R. Boiani, G. Serafini, G. Amagliani, S. Dominici, G. Riccioni, R. Zaccane, M. Mancuso, G. Scapigliati, M. Magnani, Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate, *Vaccine* 31 (2013) 820–826.
- [16] M. Handfield, L.J. Brady, A. Progulsk-Fox, J.D. Hillman, IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections, *Trends Microbiol.* 8 (2000) 336–339.
- [17] S.M. Rollins, A. Peppercorn, J.S. Young, M. Drysdale, A. Baresch, M.V. Bikowski, D.A. Ashford, C.P. Quinn, M. Handfield, J.D. Hillman, C.R. Lyons, T.M. Koehler, S.B. Calderwood, E.T. Ryan, Application of *in vivo* induced antigen technology (IVIAT) to *Bacillus anthracis*, *PLoS One* 3 (2008) e1824, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001824>.
- [18] P. Diaz-Rosales, M. Chabrilón, M.A. Moriñigo, M.C. Balebona, Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions, *J. Fish. Dis.* 26 (2003) 305–308.
- [19] G. Martínez, E.M. Shaw, M. Carrillo, S. Zanuy, Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood, *Biotechniques* 24 (1998) 138–139.
- [20] C.R. Osorio, M.D. Collins, A.E. Toranzo, J.L. Barja, J.L. Romalde, 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2942–2946.
- [21] J.M. Medina, E. Martínez-Manzanares Mancera, M.A. Moriñigo, S. Arijó, Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup), *Fish. Shellfish Immunol.* 47 (2015) 377–380.
- [22] P. Diaz-Rosales, M. Chabrilón, S. Arijó, E. Martínez-Manzanares, M.A. Moriñigo, M.C. Balebona, Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *J. Fish. Dis.* 29 (2006) 355–364.
- [23] S. Li, J. Song, H. Huang, W. Chen, M. Li, Y. Zhao, Y. Cong, J. Zhu, X. Rao, X. Hu, F. Hu, Identification of *in-vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human, *Microb. Pathog.* 63 (2013) 8–15.
- [24] L. Hang, M. John, M. Asaduzzaman, E.A. Bridges, C. Vanderspurt, T.J. Kirm,

- R.K. Taylor, J.D. Hillman, A. Progulsk-Fox, M. Handfield, E.T. Ryan, S.B. Calderwood, Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*, *PNAS* 100 (2003) 8508–8513.
- [25] X.D. Jiao, W. Dang, Y.H. Hua, L. Sun, Identification and immunoprotective analysis of an *in vivo*-induced *Edwardsiella tarda* antigen, *Fish. Shellfish Immunol.* 27 (2009) 633–638.
- [26] Y. Sun, W.J. Zheng, Y.H. Hu, B.G. Sun, L. Sun, *Edwardsiella tarda* Eta1, an *in vivo*-induced antigen that is involved in host infection, *Inf. Immun.* 80 (2012) 2948–2955.
- [27] S. Menanteau-Ledouble, H. Soliman, G. Kumar, M. El-Matbouli, Use of *in vivo* induced antigen technology to identify genes from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* that are specifically expressed during infection of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *BMC Vet. Res.* 10 (2014) 298. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/298>.
- [28] S. Menanteau-Ledouble, M. El-Matbouli, Antigens of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* specifically induced *in vivo* in *Oncorhynchus mykiss*, *J. Fish. Dis.* 39 (2016) 1015–1019.
- [29] Y. Sun, C.S. Liu, L. Sun, Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding a D15-like surface antigen, *Fish. Shellfish Immunol.* 30 (2011) 273–279.
- [30] F. Collin, S. Karkare, A. Maxwell, Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 479–497.
- [31] C. Artola-Recolons, M. Lee, N. Bernardo-García, B. Blázquez, D. Heseck, S. Bartual, K.V. Mahasenan, E. Lastochkin, H. Pi, B. Boggess, K. Meindl, I. Usón, J.F. Fisher, S. Mobashery, J.A. Hermoso, Structure and cell wall cleavage by modular lytic transglycosylase MitC of *Escherichia coli*, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 2058–2066. <https://dx.doi.org/10.1021/cb500439c>.
- [32] A.A. Elkamel, J.P. Hawke, W. Henk, R.L. Thune, *Photobacterium damsela* sub-species *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages, *J. Aquat. Anim. Health* 15 (2003) 175–183.
- [33] K.C. Keiler, Mechanisms of ribosome rescue in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 285–297.
- [34] M.A. Herbert, S. Hayes, M.E. Deadman, C.M. Tang, D.W. Hood, E.R. Moxon, Signature Tagged Mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for *in vivo* survival, *Microb. Pathog.* 33 (2002) 211–223.
- [35] H. Putzer, S. Laalami, A.A. Brakhage, C. Condon, M. Grunberg-Manago, Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 709–718.
- [36] T.J. Bullwinkle, M. Ibbá, Translation quality control is critical for bacterial responses to amino acid stress, *PNAS* 113 (2016) 2252–2257. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1525206113.
- [37] K.C. Baldrige, L.M. Contreras, Functional implications of ribosomal RNA methylation in response to environmental stress, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (2014) 69–89.
- [38] S. Kohler, V. Foulongne, S. Ouahrani-Bettache, G. Bourg, J. Teyssier, M. Ramuz, J.P. Liautaud, The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell, *PNAS* 99 (2002) 15711–15716.
- [39] D.S. Merrell, D.L. Hava, A. Camilli, Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*, *Mol. Microbiol.* 43 (2002) 1471–1491.
- [40] L. Jelsbak, H. Hartman, C. Schroll, J.T. Rosenkrantz, S. Lemire, I. Wallrodt, L.E. Thomsen, M. Poolman, M. Kilstrup, P.R. Jensen, J.E. Olsen, Identification of metabolic pathways essential for fitness of *Salmonella typhimurium* *in vivo*, *PLoS One* 9 (2014) e101869. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101869>.
- [41] R.W. Bogard, B.W. Davies, J.J. Mekalanos, MetR-regulated *Vibrio cholerae* metabolism is required for virulence, *mBio* 3 (2012). <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00236-12> e00236–12.
- [42] Y. Chiu, T.-Y. Kuo, C.-C. Lin, W.-J. Chen, Proteomic analysis reveals responsive proteins of *Vibrio parahaemolyticus* on exposure to cationic antimicrobial peptides, *J. Appl. Microbiol.* 110 (2010) 80–89.
- [43] T. Alexandre, B. Rayna, H. Munier-Lehmann, Two classes of bacterial IMPDHs according to their quaternary structures and catalytic properties, *PLoS One* 10 (2) (2015) e0116578. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116578>.
- [44] G.W. Shin, S.W. Nho, A.B. Park, H.B. Jang, I.S. Cha, M.A. Ha, Y.R. Kim, R.S. Dalvi, A.J. Joh, S. Jung, Comparison of antigenic proteins from *Lactococcus garvieae* KG (-) and KG (+) strains that are recognized by olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) antibodies, *Vet. Microbiol.* 129 (2009) 113–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.007>.
- [45] R. Zhang, G. Evans, F.J. Rotella, E.M. Westbrook, D. Beno, E. Huberman, A. Joachimiak, F.R. Collart, Characteristics and crystal structure of bacterial inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Biochemistry* 38 (1999) 4691–4700.
- [46] K.M. Kerr, M. Cahoon, D.A. Bosco, L. Hedstrom, Monovalent cation activation in *Escherichia coli* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.* 375 (2000) 131–137.
- [47] X. Wang, C. Ding, S. Wang, X. Han, S. Yu, Whole-genome sequence analysis and genome-wide virulence gene identification of *Riemerella anatipestifer* strain Yb2, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 5093–5102. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00828-15>.
- [48] X.H. Zhang, K.W. He, Z.T. Duan, J.M. Zhou, Z.Y. Yu, Y.X. Ni, C.P. Lu, Identification and characterization of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in *Streptococcus suis* type 2, *Microb. Pathog.* 47 (2009) 267–273.
- [49] J. Zhou, X. Zhang, K. He, K.H.W. Wang, Y. Ni, H. Zhu, Z. Yu, A. Mao, L. Lv, Characterization and proteome analysis of inosine 5-monophosphate dehydrogenase in epidemic *Streptococcus suis* Serotype 2, *Curr. Microbiol.* 68 (2014) 663–669.
- [50] T. Molkänen, J. Tyynela, J. Helin, N. Kalkkinen, P. Kuusela, Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase, *FEBS Lett.* 517 (2002) 72–78.
- [51] L. Hedstrom, IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition, *Chem. Rev.* 109 (2009) 2903–2928. <http://dx.doi.org/10.1021/cr900021w>. PMID: 19480389.
- [52] M. Makowska-Grzyska, Y. Kim, S.K. Gorla, Y. Wei, K. Mandapati, M. Zhang, et al., *Mycobacterium tuberculosis* IMPDH in complexes with substrates, products and antitubercular compounds, *PLoS One* 10 (2015) e0138976. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138976>.
- [53] J.M. Dubbs, S. Mongkolsuk, Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 5495–5503.
- [54] H.W. Wang, C.H. Chung, T.Y. Ma, H.C. Wong, Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 3734–3743.
- [55] B. Hofmann, H.J. Hecht, L. Flohe, Peroxiredoxins, *Biol. Chem.* 383 (2002) 347–364.
- [56] L.B. Poole, Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases, *Arch. Biochem. Biophys.* 433 (2005) 240–254.
- [57] G.H. Kaihama, J.R.F. Almeida, S.S. Santos, L.E.S. Netto LES, S.R. Almeida, R.L. Baldini, Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in bacterial virulence, *PLoS Pathog.* 10 (2014) e1004442. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004442>.
- [58] M. Hebrard, J.P. Viala, S. Meresse, F. Barras, L. Aussel, Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 4605–4614.
- [59] A.A. Olczak, R.W. Seyler Jr., J.W. Olson, R.J. Maier, Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency, *Inf. Immun.* 71 (2003) 580–583.
- [60] A.A. O'Riordan, V.A. Morales, L. Mulligan, N. Faheem, H.J. Windle, D.P. Kelleher, Alkyl hydroperoxide reductase: a candidate *Helicobacter pylori* vaccine, *Vaccine* 30 (2012) 3876–3884. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.002>.
- [61] A.C. Barnes, M.C. Balebona, M.T. Horne, A.E. Ellis, Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species, *Microbiology* 145 (1999) 483–494.
- [62] E. Peeters, A. Sass, E. Mahenthiralingam, H. Nelis, T. Coenye, Transcriptional response of *Burkholderia cenocepacia* J2315 sessile cells to treatments with high doses of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, *BMC Genomics* 11 (2010) 90. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-90>.
- [63] S. Kuntumalla, Q. Zhang, J.C. Braisted, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson, A. Donohue-Rolfe, S. Tzipori, R. Pieper, *In vivo* versus *in vitro* protein abundance analysis of *Shigella dysenteriae* type 1 reveals changes in the expression of proteins involved in virulence, stress and energy metabolism, *BMC Microbiol.* 11 (2011) 147. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-147>.
- [64] C. Reynolds, A. Goudet, K. Jenjaroen, M. Sumonwiriya, D. Rinchai, J. Musson, S. Overbeek, J. Makinde, K. Quigley, J. Manji, N. Spink, P. Yos, V. Wuthiekanun, G. Bancroft, J. Robinson, G. Lertmengkolchai, S. Dunachie, B. Maillere, M. Holden, D. Altmann, R. Boyton, T cell immunity to the alkyl hydroperoxide reductase of *Burkholderia pseudomallei*: a correlate of disease outcome in acute melioidosis, *J. Immunol.* 194 (2015) 4814–4824. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402862>.
- [65] M.A. Souto, A.J. Montaos, M. Rivas, C.R. Osorio Balado, J. Rodríguez, M.L. Lemos, C. Jiménez, Structure and biosynthetic assembly of piscibactin, a new siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, predicted from genome analysis, *Eur. J. Org. Chem.* (2012) 5693–5700. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201200818>.
- [66] C.R. Osorio, S. Juiz-Rio, M.L. Lemos, A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high pathogenicity island, *Microbiology* 152 (2006) 3327–3341. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.29190-0>.
- [67] C.R. Osorio, A.J. Rivas, M. Balado, J.C. Fuentes-Monteverde, J. Rodríguez, C. Jiménez, M.L. Lemos, M.K. Waldor, A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 5867–5879. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01580-15>.
- [68] F. Andreoni, R. Boiani, G. Serafini, I. Bianconi, S. Dominici, F. Gorini, M. Magnani, Expression, purification, and characterization of the recombinant putative periplasmic hemin-binding protein (hntB) of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Biosci., Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 1180–1183.

Influence of growth conditions on the transcription of genes encoding virulence factors in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

ABSTRACT

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), the causative agent of photobacteriosis, is an important pathogen in marine aquaculture that affects many different fish species worldwide, including *Solea senegalensis*, an important fish species for aquaculture in the south of Europe. It is well established that bacteria respond to many different extracellular signals in the environment and in the case of pathogens, it determines the outcome of host-pathogen interaction. In the present work, transcription of genes encoding virulence factors of *Phdp* under iron limited conditions, oxidative stress and *S. senegalensis* head kidney infection has been evaluated. Iron and peroxynitrite regulation of virulence genes encoding proteins involved in iron acquisition from heme compounds (Hut B and Hut D) and synthesis of exotoxins Aip56 and P53 was observed. However, no regulation iron or oxidative stress mediated regulation was detected for the gene encoding the lipoprotein PDP_0080, involved in adhesion to fish cells. Transcripts of all genes were detected when the pathogen infected *ex vivo* head kidney from *S. senegalensis*, thus indicating expression of virulence genes in host cells.

INTRODUCTION

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), is the causative agent of photobacteriosis. This pathogen has been reported to affect many different fish species in marine worldwide aquaculture, especially in Mediterranean countries and Japan (Romalde, 2002; Wang *et al.*, 2013; Andreoni & Magnani, 2014). Virulence factors of this pathogen include a metalloprotease A-B exotoxin abundantly secreted by virulent strains (Aip56) that induces apoptosis in fish macrophages and neutrophils (Do Vale *et al.*, 2005). The toxin is systemically disseminated in infected animals and destruction of macrophages and neutrophils (Do Vale *et al.*, 2003; Do Vale *et al.*, 2005; Do Vale *et al.*, 2007) leads to impairment of the phagocytic defense, favoring pathogen dissemination (Do Vale *et al.*, 2007) and release of phagocyte content causing tissue-damaging (Do Vale *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Do Vale *et al.*, 2016). Apart from

Aip56 protein, the second more abundant protein detected in the extracellular products of *Phdp* is a 53 kDa protein (P53) identified as a NIpC/P60 family protein. Although less characterized in *Phdp*, this family includes cell-wall related cysteine peptidases with homology to several Gram-negative bacterial proteins, many of them produced by pathogenic species (Grasso *et al.*, 2011).

Adhesion and invasion abilities are essential in the initial stages of infection. *Phdp* has been reported to be weakly or moderately adherent and invasive in some fish cell lines (Lopez-Doriga *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2009) but highly adhesive to intestinal cells (Magariños *et al.*, 1996). Andreoni *et al.* (2013) found a lipoprotein (PDP_0080) involved in the adherence of the bacterium to epithelial cells. Vaccination of *Dicentrarchus labrax* with this lipoprotein resulted in increased survival when fish were challenged with *Phdp*. Nevertheless, information on the virulence factors contributing to the invasion of fish cells is still scarce.

Furthermore, ability to scavenge iron from its host by using high-affinity iron binding siderophores has also been reported in *Phdp* (Magariños *et al.*, 1994; Osorio *et al.*, 2015). *Phdp* is also able to acquire iron from heme and hemoglobin *in vitro*. Thanks to an heme uptake system encoded in nine genes arranged in two operons, *hutWXZ* and *tonBexbBDhutBCD*, *Phdp* is able to secrete proteins to extract heme from the complex and deliver it to an outer membrane receptor. Then, heme is transported into the periplasm by a TonB system, crossing finally the cytoplasmic membrane by an ATP-binding cassette system (Andreoni *et al.*, 2009). In this system, *tonBexbBD* genes encode the components of the Ton system and *hutBCD* genes the periplasmic heme binding protein, the inner membrane permease and the ABC transporter ATPase (Juiz-Río *et al.*, 2005).

It is well established that bacteria respond to many different extracellular signals in the environment (Goh *et al.*, 2002). In the case of pathogens, *in vivo* environment is sensed by invading bacteria that adapt by inducing or repressing specific genes allowing the pathogen survive in the host and progression of the infection (Li *et al.*, 2013). One characteristic shared by host organisms is the presence of high affinity iron binding proteins that result in low iron availability environments. Pathogenic bacteria are able to modulate gene transcription according to iron levels (Osorio *et al.*, 2004; Allard *et al.*, 2006). In addition, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are important as part of the innate immune response. Activated macrophages produce

superoxide and nitric oxide during respiratory burst, both of them being able to convert into other reactive species, including peroxynitrite. ROS and RNS damage a variety of cellular macromolecules and thus elicit adaptive oxidative stress responses in bacteria intended to permit survival in the presence of this stress (Gobert & Wilson, 2016). In the present work, modulation of the transcription of selected genes encoding virulence factors of *Phdp* by iron availability and oxidative stress induced by superoxide and peroxynitrite has been evaluated. In addition, gene transcription in head kidney from *Solea senegalensis* in *ex-vivo* model has been determined.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) (strain Lg41/01) was isolated from diseased cultured *S. senegalensis* (Díaz-Rosales *et al.*, 2003) and cultured in tryptic soy broth (Oxoid Ltd., UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSBs) at 22 °C for 24 h. *Phdp* strain were stored at -80 °C in media supplemented with 15% glycerol.

Gene expression analysis by quantitative real-time PCR

The expression of virulence genes in *Phdp* under *in vitro* culture and during *ex vivo* infection of *S. senegalensis* head kidney cells was assessed by RT-qPCR. For *in vitro* culture, *Phdp* Lg41/01 was grown in TSBs at 22 °C and cells collected at mid-exponential and stationary phase. Effect of iron availability on gene expression was determined in *Phdp* cultures grown in the presence of dipyriddy (100 µM) or FeCl₃.6H₂O (100 µM) at 22 °C until mid-exponential and stationary phase. To study the effect of the oxidative stress on gene transcription, *Phdp* cells were grown in TSBs until mid-exponential phase and methyl viologen (0.2 mM), which generates superoxide radicals, was added. Cultures were incubated 6 h further before centrifugation according to Díaz-Rosales *et al.* (2006). On the other hand, peroxynitrite (Calbiochem, Merck Millipore, France) was added to mid-exponential phase cultures to achieve 1 mM (final concentration) and cells were recovered after 2 h incubation. In all the cases, survival of *Phdp* to oxidative stress treatments was checked previously. Triplicate cultures were

carried out for each growth condition and cell pellets obtained after centrifugation (5000 xg, 10 min, 4 °C), frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis.

For *ex vivo* assays, head kidney from five healthy *S. senegalensis* specimens (130 ± 15 g mean body weight) were individually isolated and passed through a sterile 100 µm nylon mesh with L-15 medium (Gibco, USA) containing 2% fetal calf serum (FCS; Sigma Aldrich) and 10 U mL⁻¹ sodium heparin. The cell suspension was washed and adjusted to 10⁷ cells mL⁻¹ in L-15 medium without antibiotics. Cell viability was determined by the exclusion test with trypan blue (Sigma Aldrich) (0.5% in PBS). Volumes of 100 µl were added to 1.5 mL microtubes and inoculated with the bacterial suspension. *Phdp* Lg41/01 was grown in TSBs at 22 °C until mid-exponential phase and bacterial concentration adjusted to 10⁹ CFU mL⁻¹. Then, bacterial suspension (10 µl) was added to each 1.5 mL microtube containing 100 µl of L-15 with head kidney cells of each fish. Ratio fish cell:bacteria was 1:10. Microtubes were incubated at 22 °C for 0, 30, 60, 120 min and 6 h. *In vitro* cultures of *Phdp* in L-15 medium were used as negative controls for relative qPCR quantification.

At the end of the incubation, total RNA from *Phdp* cells was extracted with TRI Reagent (Sigma Aldrich) according to manufacturer's instructions. RNA quality was checked by running an aliquot on an agarose gel and quantity spectrophotometrically determined in Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) via A_{260/280nm} and A_{260/230nm} readings. DNase treatment (Thermo Scientific) was carried out to ensure complete removal of DNA. Reverse transcription was performed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with 1 µg of total RNA. To analyze gene transcription, amplifications were performed in a final volume of 10 µl. Reaction mixture contained 5 µl of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 0.5 µl of each primer set (10 µM), 1 µl of template cDNA and 3 µl of DEPC-water. Relative transcription of genes encoding Aip56, HutB, HutD, P53 and the lipoprotein PDP_0080 was determined using qRT-PCR and *16S rRNA* was used as reference gene (Table 1). Specific primers were designed using Primer 3 and AmplifX software according to known qPCR restrictions (size, T_m difference between primers, % GC content and self-dimer or cross-dimer formation). In order to obtain accurate results, PCR efficiency ($E = (10^{[-1/\text{slope}]} - 1) \times 100$) was checked to ensure optimized and reproducible assays. qPCR was performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with an

initial denaturation cycle at 95 °C for 60 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 60 s. Amplification was followed by a standard melting curve from 65 °C to 95 °C, in increments of 0.5 °C for 5 s at each step, to confirm that only one product was amplified and detected. Samples were run in parallel with *16S rRNA* reference gene. The relative change in gene expression was recorded as comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak & Schmittgen, 2001), $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ target gene expression } ex \text{ vivo} - C_t \text{ reference gene expression } ex \text{ vivo}) - (C_t \text{ target gene expression } in \text{ vitro} - C_t \text{ reference gene expression } in \text{ vitro})$.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc, IBM Company, NY, USA). Results are shown as means \pm standard errors of the mean (SEM). Normality and homogeneity of the data were previously assessed using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For non-normal data a logarithmic transformation was performed. The statistical significance of differences in qPCR values between control and treated groups was determined by t-Student test. Tukey's test was used to analyze differences between each of the treatments. Significance was set for $p < 0.05$.

Ethical statements

All procedures involving fish were conducted in strict accordance with Guidelines established by the European Union (2010/63/UE) and the Spanish legislation (RD 1201/2005 and law 32/2007) for the use of laboratory animals. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Malaga.

RESULTS

Iron plays an important role during microbial infection, when it is a limiting factor for microbial growth. In this way, the host counts on different strategies to keep this metal linked to high-affinity proteins and maintain low free iron levels. In order to determine the effect of iron availability on gene expression, *Phdp* cells were grown

under iron-limiting and replete conditions and transcription of selected virulence genes was determined with qPCR. Results obtained indicate up-regulation of genes encoding the toxin Aip56, the protein P53 and the hemin binding and transport HutB and HutD proteins in cells grown under iron limiting conditions regardless the growth phase (Fig. 1). Furthermore, *hutB* and *hutD* genes were also down-regulated in bacterial cells grown under high iron concentrations. On the contrary, no modulation by iron availability was observed in the gene encoding the lipoprotein PDP_0080 (Fig 1). Increased relative transcription observed in iron limiting conditions was more noticeable in stationary phase cultures compared to log phase in the case of Aip56, P53 and HutD encoding genes, whilst no difference related to the growth phase was observed in *hutB*.

Reactive oxygen and nitrogen species can also be encountered by pathogens during host infection. Oxidative stress due to superoxide anions produced by methyl viologen did not modulate the transcription of assayed genes; however, Aip56 and P53 encoding genes were up-regulated by peroxyxynitrite, whilst no significant changes were observed in HutB, HutD and PDP_0080 encoding genes (Fig. 1).

Finally, co-incubation of *Phdp* with kidney cells from *S. senegalensis* has resulted in up-regulation of all the genes assayed, especially those encoding proteins involved in hemin binding HutB and HutD (Fig. 2). This up-regulation was observed 30 min post-incubation and lasted 6 h in the case of genes encoding Aip56, HutB and HutD, whilst values were similar to those in control cells after 60 min co-incubation in the case of PDP_0080 and 120 min in P53 protein. It is also noteworthy that although PDP_0080 encoding gene relative transcription did not change in bacteria grown under replete and limiting iron concentrations or oxidative stress, co-incubation with kidney cells resulted in transcription up-regulation (Fig.2).

DISCUSSION

Environmental stimuli determine the gene expression of organisms. Thus, bacteria invading a host sense *in vivo* environment and adapt by inducing or repressing the expression of specific genes. In the case of pathogens, understanding the influence of host environmental components regulating virulence gene transcription is relevant in order to develop strategies to control pathogen infection (Li *et al.*, 2013).

In the host environment, it is expected the contact of the pathogen with oxidative radicals. ROS are important components of the host immune response and at the same time, they are signal to pathogens, indicating contact with the host (Dubbs & Mongkolsuk, 2012). Superoxide is usually the species from which other ROS originate. Once produced, superoxide either rapidly reacts with surrounding molecules or dismutates to hydrogen peroxide, spontaneously or with the help of superoxide dismutase (Belikov *et al.*, 2015). On the other hand, nitric oxide (NO) is an ubiquitous free radical synthesized by the enzyme NO synthase (NOS) through the oxidation of L-arginine by numerous cell types, including macrophages, after activation by cytokines or pathogen-associated molecular patterns (Gobert & Wilson, 2016). Some authors consider that most of the cytotoxicity attributed to NO is rather due to peroxynitrite, produced from the reaction between NO and superoxide anion. Peroxynitrite interacts with lipids, DNA, and proteins via direct oxidative reactions or via indirect, radical-mediated mechanisms (Pacher *et al.*, 2007).

The Aip56 toxin is a zinc metalloprotease that acts by cleaving NF- κ B p-65. It has a N-terminal domain involved in binding and internalization into the cytosol of target cells (Silva *et al.*, 2013). Aip56 toxin seems to activate both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and induces activation of caspases 3, 8 and 9, loss of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c into the cytosol, and overproduction of ROS (Costa-Ramos *et al.*, 2011). Transcription of the gene encoding Aip56 has been up-regulated by low iron availability and peroxynitrite. These results indicate that iron depletion and potential oxidative stress in the host environment induce Aip56 encoding gene transcription. In addition, co-incubation of *Phdp* with *S. senegalensis* head kidney results in up-regulation of the gene encoding the toxin. Our results show that like in seabass, the toxin is expressed in sole and in higher levels than in laboratory conditions. On the other hand, P53, the second more abundant protein excreted by *Phdp*, is a NlpC/P60 protein homologous to several Gram-negative bacterial proteins present in highly invasive pathogens such as *Salmonella enterica* (Grasso *et al.*, 2011) and demonstrated to be required for pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis* (Parthasarathy *et al.*, 2012). In the present work, we have found that P53 transcription is regulated by iron and peroxynitrite in a similar way to Aip56 encoding gene. In addition, transcription of the gene encoding exoprotein P53 in contact with *S. senegalensis* head kidney cells has been demonstrated, with maximum relative

transcription levels 60 min post-infection, in contrast to *aip56*, which showed similar values along the first 2 h post-infection.

Iron is essential for pathogen survival in the host. In the case of *Phdp*, expression of a polysaccharide capsule is dependent on iron availability (Do Vale *et al.*, 2001) and positive correlation has been found between dietary iron and mortality in *Phdp* infection in seabass (Rodrigues y Pereira, 2004). *Phdp* is known to have ability to synthesize a siderophore named piscibactin and also use heme as source of iron through a system consisting of the proteins HutA, TonBExBD, HutBCD and HutWXZ. Thus, *hutB* encodes a periplasmic binding protein and *hutD* the ABC-transporter ATPase that transport heme into the cytoplasm (Juiz-Río *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 2010). In the present work, iron regulation of *hutB* and *hutD* transcription corroborated the results reported by Osorio *et al.* (2010); however, no changes were observed when *Phdp* was subjected to oxidative stress. In addition, as it was observed in *Psetta maxima* (Osorio *et al.*, 2010), *hutB* and *hutD* transcription has been detected in bacterial cells in contact with head kidney, thus suggesting expression of proteins involved in heme utilization by the bacteria during *S. senegalensis* infection. It is noteworthy that fold changes observed in these genes were higher when the pathogen was incubated with kidney cells. These results suggest the influence of new factors present in the host that may potentiate the effect of low iron availability.

Phdp is considered as a facultative intracellular pathogen capable to enter and survive in both fish phagocytic and non-phagocytic cells (Lopez-Doriga *et al.*, 2000; Elkamel & Thune, 2003; Acosta *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010). The lipoprotein PDP_0080 has been reported as involved in *Phdp* adhesion to fish cells (Andreoni *et al.*, 2013). In our work, we have found that transcription of the gene encoding this protein is not regulated by iron levels or oxidative stress due to superoxide anion or peroxy nitrite. However, up-regulation was observed when bacteria were in contact with *S. senegalensis* head kidney cells. Bacterial lipoproteins play a wide range of functions in the interaction with the host, including adhesion, translocation of virulence factors as well as evasion of immune system (Tokuda & Matsuyama, 2004; Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Results obtained indicate that although low iron availability or oxidative stress expected in host environment did not induce gene expression, other factors encountered by the bacteria in sole kidney cells are able to induce the transcription of the gene encoding the adhesion involved protein, making possible *Phdp* invasion of kidney cells.

Briefly, results obtained indicate the iron and peroxynitrite regulation of virulence genes encoding proteins involved in iron acquisition from heme compounds and synthesis of exotoxins Aip56 and P53. However, no regulation by iron or oxidative stress induced by peroxynitrite has been observed in the lipoprotein PDP_0080 involved in adhesion to fish cells. Transcripts of all genes were detected when the pathogen infected *ex vivo* head kidney from *S. senegalensis*, thus indicating expression of virulence genes in host cells.

Funding: This work was supported by Junta de Andalucía and co-financed by FEDER funds (Grant P10-RNM-6338). JA Nuñez-Díaz received a research grant from Junta de Andalucía.

Acknowledgments

Authors are thankful to J.M. Mancera for supplying fish.

References

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

Allard, M, Moisan, H, Brouillette, E, Gervais, AL, Jacques, M, Lacasse, P, Diarra, MS, Malouin, F (2006) Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model *in vivo*. *Microbes & Infection*, 8:1679-1690.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Amagliani, G, Dominici, S, Riccioni, G, Zaccone, R, Mancuso, M, Scapigliati, G, Magnani, M (2013) Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31:820-826.

Andreoni, F, Boiani, R, Serafini, G, Bianconi, I, Dominici, S, Gorini, F, Magnani, M (2009) Expression, purification, and characterization of the recombinant putative periplasmic hemin-binding protein (hutB) of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 73:1180-1183.

Andreoni, F, Magnani, M (2014) Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis. *Journal of Immunology Research*, 2014:-ID793817.

Belikov, AV, Schraven, B, Simeoni, L (2015) T cells and reactive oxygen species. *Journal of Biomedical Science*, 22:1-11.

Costa-Ramos, C, Do Vale, A, Ludovico, P, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2011) The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, 30:173-181.

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

Do Vale, A, Cabanes, D, Sousa, S (2016) Bacterial toxins as pathogen weapons against phagocytes. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-21.

Do Vale, A, Costa-Ramos, C, Silva, A, Silva, DSP, Gärtner, F, Dos Santos, NMS, Silva, MT (2007) Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. *Cellular Microbiology*, 9:988-1003.

Do Vale, A, Ellis, AE, Silva, MT (2001) Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44:237-240.

Do Vale, A, Marques, F, Silva, MT (2003) Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15:129-144.

Do Vale, A, Silva, MT, Dos Santos, NMS, Nascimento, DS, Reis-Rodrigues, P, Costa-Ramos, C, Ellis, AE, Azevedo, JE (2005) AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58:1025-1038.

Dubbs, JM, Mongkolsuk, S (2012) Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194:5495-5503.

Elkamel, AA, Thune, RL (2003) Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15:167-174.

Gobert, AP, Wilson, KT (2016) Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: A blessing in disguise. *Free Radical Biology & Medicine*, In press, Corrected proof.

Goh, E, Yim, G, Tsui, W, McClure, J, Surette, MG, Davies, J (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:17025-17030.

Grasso, V, Do Vale, A, Reis, MI, Real, F, Padilla, D, Acosta, F, Dos Santos, NMS (2011) Identification of the second most abundant protein secreted by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *15th EAFP International conference on diseases of fish and shellfish*.

Juiz-Río, S, Osorio, CR, Lemos, ML (2005) Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of hutA pseudogenes. *Archives of Microbiology*, 185:347-358.

Kovacs-Simon, A, Titball, RW, Michell, SL (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection & Immunity*, 79:548-561.

Li, S, Song, J, Huang, H, Chen, W, Li, M, Zhao, Y, Cong, Y, Zhu, J, Rao, X, Hu, X, Hu, F (2013) Identification of *in-vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human. *Microbial Pathogenesis*, 63:8-15.

Livak, KJ, Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25:402-408.

Lopez-Doriga, MV, Barnes, AC, dos Santos, NM, Ellis, AE (2000) Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, 146:21-30.

Magariños, B, Romalde, JL, Lemos, ML, Barja, JL, Toranzo, AE (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied & Environmental Microbiology*, 60:2990-2998.

Magariños, B, Romalde, JL, Noya, M, Barja, JL, Toranzo, AE (1996) Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 138:29-34.

Osorio, CR, Juiz-Río, S, Lemos, ML (2010) The ABC-transporter hutCD genes of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are essential for haem utilization as iron source and are expressed during infection in fish. *Journal of Fish Diseases*, 33:649-655.

Osorio, CR, Lemos, ML, Braun, V (2004) Identification of Fur regulated genes in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* using the Fur titration assay. *Biometals*, 17:725-733.

Osorio, CR, Rivas, AJ, Balado, M, Fuentes-Monteverde, JC, Rodríguez, J, Jiménez, C, Lemos, ML, Waldor, MK (2015) A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Applied & Environmental Microbiology*, 81:5867-5879.

Pacher, P, Beckman, JS, Liaudet, L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87:315-424.

Parthasarathy, G, Lun, S, Guo, H, Ammerman, NC, Geiman, DE, Bishai, WR (2012) Rv2190c, an NlpC/P60 family protein, is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 7:e43429.

Rodrigues, PN, Pereira, FA (2004) Effect of dietary iron overload on *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* pathogenicity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27:673-676.

Romalde, JL (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.

Silva, DS, Pereira, LMG, Moreira, AR, Ferreira-da-Silva, F, Brito, RM, Faria, TQ, Zornetta, I, Montecucco, C, Oliveira, P, Azevedo, JE, Pereira, PJB, Macedo-Ribeiro, S, Do Vale, A, Dos Santos, NMS (2013) The Apoptogenic Toxin AIP56 Is a Metalloprotease A-B Toxin that Cleaves NF- κ B p65. *PLoS Pathogen*, 9:e1003128.

Silva, MT, Do Vale, A, dos Santos, NM (2008) Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*, 13:463-482.

Tokuda, H, Matsuyama, S (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1693:5-13.

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

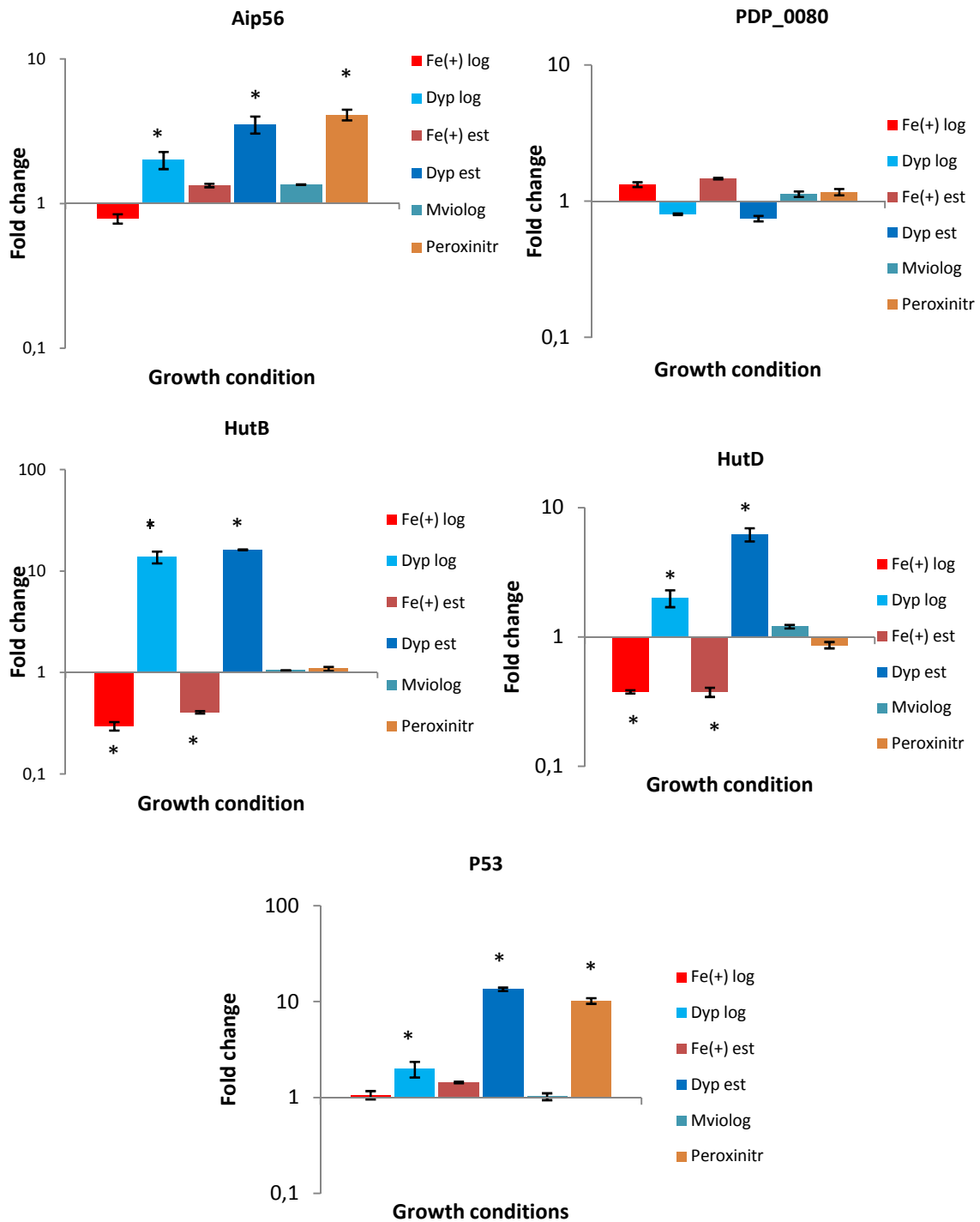


Figure 1. Relative transcription of *Phdp* genes encoding Aip56, PDP_0080, HutB, HutD and P53 in *Phdp* cells grown under high and limiting iron conditions and exposed to superoxide and peroxynitrite radicals. Fe (+) log and Fe (+) stat: *Phdp* cells were grown in broth added with FeCl₃ (100 μM) until log or stationary phase, respectively. Dyp log and Dyp stat: *Phdp* cells were grown in broth added with the iron chelant 2,2'-dipyridyl (100 μM) until log or stationary phase, respectively. MViolog: *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for 6 h in the presence of the superoxide generator methyl viologen (0.2 mM) before sampling. Peroxynitr: *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for 2 h in the presence of peroxynitrite (1 mM) before sampling. qPCR data were normalized against *16S rRNA* gene and fold change values calculated at each sampling time relative to non-treated cells (growth in TSBs) based on the 2^{-ΔΔCt} method. Values represent the mean of three independent experiments. Significant differences (*p* < 0.05, t-Student test) compared to non-treated bacteria cells have been indicated with an asterisk (*).

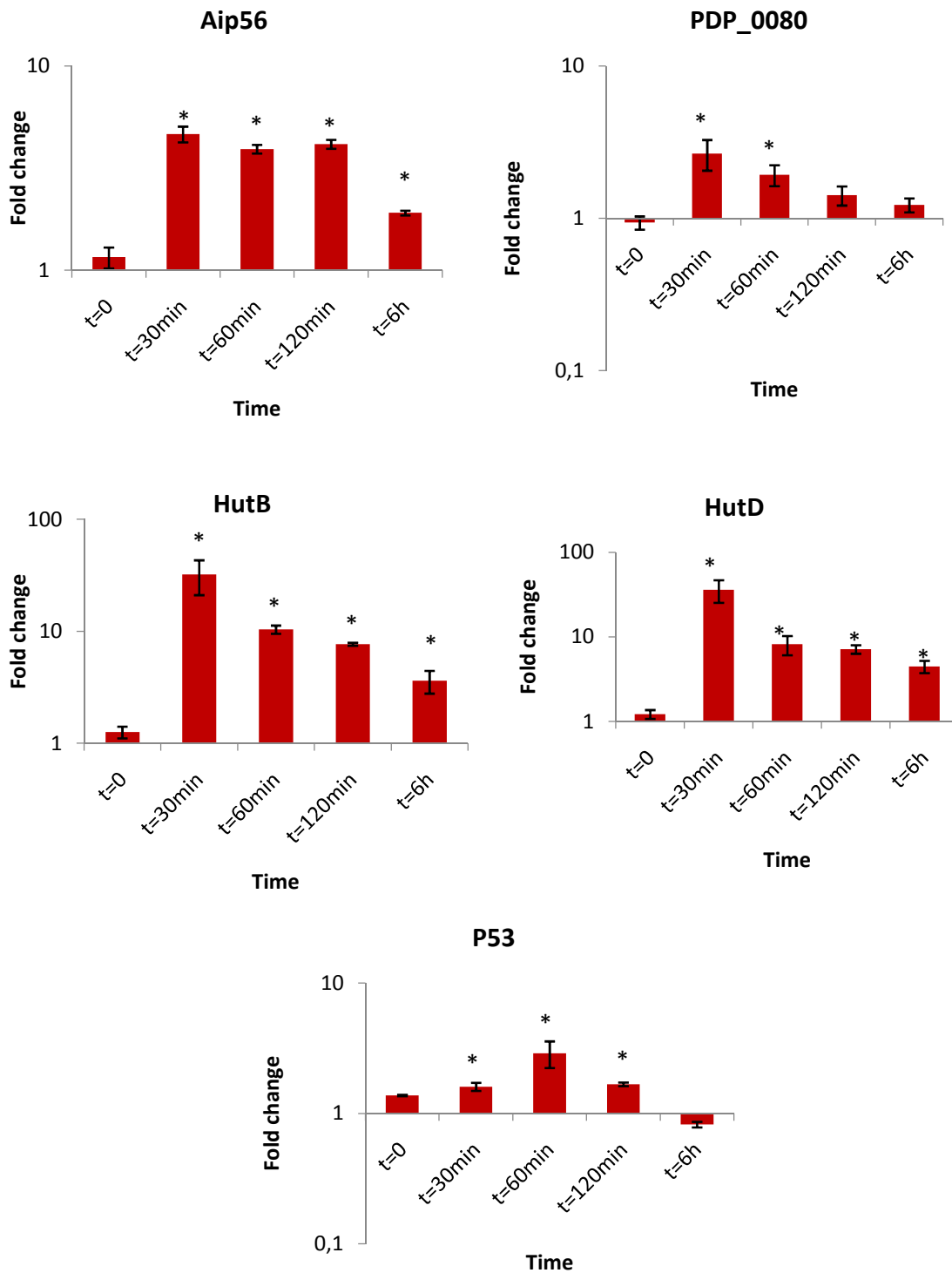


Figure 2. Relative transcription of *Phdp* genes encoding Aip56, HutB, HutD and PDP_0080 during *ex vivo* infection of *S. senegalensis* head kidney. *Phdp* cells were grown until log phase and then incubated for different times with sole cells before sampling. qPCR data were normalized against *16S rRNA* gene and fold change values calculated at each sampling time relative to cells grown in *in vitro* conditions (L-15 medium) based on the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Values represent the mean of three independent experiments. Significant differences ($p < 0.05$, t-Student test) compared to non-treated bacteria cells have been indicated with an asterisk (*).

Table 1. List of primers used in the present study.

Gen	Code	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
Apoptosis induced protein 56kD	<i>aip56</i>	GGTCGAAGCGATACAAGAGC (F) CCGTTGAAATCATCATCGTG (R)	207
Adhesion lipoprotein	<i>pdp-0080</i>	TGCAGGCCAACATCTAACAG (F) TTAGCTCAGCAGGGAATGGT (R)	158
periplasmic hemin binding protein	<i>hutb</i>	ACGGAGCATCGTTCTCAACT (F) TGGCATTGTTTTGATGGTTG (R)	264
ABC transporter ATPase	<i>hutd</i>	TGAACCCACATCTGCTCTTG (F) GCGGTTGGGGTTAGTACTTG (R)	201
Protein 53kD	<i>p53</i>	GGATTTGGCTACCTCGTTCA (F) CCCACGGAGCATTAAACATT (R)	249
16S ribosomal RNA	<i>16S rRNA</i>	AACTGGCAGGCTAGAGTCTT (F) CACAACTCCAAGTAGACAT (R)	198

La acuicultura ha experimentado un gran crecimiento durante las últimas décadas, siendo el sector relacionado con la producción animal que más ha crecido a nivel mundial. El creciente interés en el cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) ha estado limitado por la irrupción de patologías, que se han traducido en pérdidas económicas para el sector acuícola. Una de las principales patologías que más problemas ocasiona en esta especie es la fotobacteriosis causada por la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), siendo la región mediterránea especialmente proclive a sufrir estos brotes epizoóticos. Ante esta problemática, el control de las infecciones en la industria acuícola constituye un aspecto crucial para el avance de la misma. Los resultados derivados de la presente Tesis han demostrado que la infección de *S. senegalensis* con *Phdp*, tanto por vía intraperitoneal como por inmersión, induce la transcripción de genes del hospedador que codifican proteínas implicadas en la reducción de la disponibilidad de hierro para el patógeno, siendo el hígado el principal órgano involucrado en la respuesta inmune en los estadios iniciales de la infección. Además, se ha comprobado que someter a ejemplares de lenguado a inmunización con una preparación de bacterina y ECPs de *Phdp*, junto con adyuvante incompleto de Freund, por inyección intraperitoneal induce un mayor título de anticuerpos frente al patógeno e incrementa la transcripción de genes que codifican para la lisozima C1, el complemento y proteínas implicadas en el metabolismo del hierro. Todo ello asociado a una mayor resistencia de los ejemplares a la infección por *Phdp*.

Por otra parte, la adaptación de la bacteria al hospedador, requiere la regulación de la expresión de genes *in vivo* que desempeñan un importante papel en la enfermedad y pueden ser determinantes en la virulencia del patógeno. Por ello, mediante la tecnología de antígenos inducidos *in vivo* (IVIAT) se han identificado cinco proteínas inmunogénicas: alanil-ARNt sintetasa, serina hidroximetil transferasa, inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa, alquil hidropéroxido reductasa y la péptido sintetasa no ribosómica Irp2, inducidas en *Phdp* durante la infección de *S. senegalensis*. La transcripción de los genes que codifican a las mismas es inducida durante la infección *ex vivo* de riñón de *S. senegalensis*. Además, se ha demostrado que los niveles de hierro así como de radicales oxidantes superóxido y peroxinitrito regulan la transcripción de los genes que codifican las proteínas IVIAT alquil hidropéroxido reductasa y la péptido sintetasa no ribosómica Irp2. Por último, se ha comprobado que la presencia de peroxinitrito y las condiciones limitantes de hierro modulan la transcripción de los genes que codifican las proteínas extracelulares Aip56 y P53 implicadas en la virulencia de *Phdp*. Estas proteínas inmunogénicas pueden representar potenciales dianas para el diseño de nuevas estrategias profilácticas frente a la fotobacteriosis.



JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE ECONOMÍA Y CONOCIMIENTO



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

“Una manera de hacer Europa”