

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL**Nuevas perspectivas en el estudio de la piel y el moco de peces teleosteos.****Héctor Cordero Muñoz**Directores:Dra. M^a Ángeles Esteban Abad

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

Defendida el 21/11/2016 en la Universidad de Murcia.

Realizada en la Universidad de Murcia.

Mención Internacional, *Cum laude***Resumen**

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado la piel y el moco de teleosteos con especial énfasis en la inmunidad de dorada y de lubina. Concretamente, nos hemos centrado en la caracterización de la piel con diferenciación dorso-ventral, la respuesta inmune contra el principal virus en dorada (linfocistis), las condiciones óptimas de almacenamiento de moco para evaluar las actividades inmunes humorales, incluyendo la congelación (a -20°C ó a -80°C) y la liofilización, y comparando con moco fresco; así como también en la caracterización del mapa proteómico del moco de lubina y los cambios producidos por la administración del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11, el estrés por hacinamiento y las variaciones producidas por heridas crónicas. Para este propósito, hemos desarrollado estudios de histología para analizar la piel a nivel óptico (incluyendo tinciones con hematoxilina-eosina, PAS y tricrómico de Mallory), y a nivel electrónico cuantificando por análisis de imagen las regiones dorsal y ventral, desarrollando un protocolo para aislar células de la piel en ambas regiones, así como viendo el perfil de expresión génica de nueve citoquinas (il1b, tnfa, il6, il7, il8, il15, il18, il10 y tgfb) en ambas regiones y los cambios frente al patógeno *Photobacterium damsela ssp. piscicida*, y el probiótico Pdp11. En el brote natural de linfocistis, la replicación del virus se estudió la replicación del virus por PCR anillada, la respuesta humoral (IgM, complemento y peroxidasa en suero), la respuesta humoral contra el virus fue estudiada a través de los niveles de IgM, el complemento y la peroxidasa en suero, la respuesta celular a través peroxidasa y explosión respiratoria en leucocitos de riñón cefálico, y la expresión de marcadores inmunes como *ifn*, *irf3*, *mx*, *mhc2a*, *csf1r*, *ighm*, *tcra*, *hamp*, *il1b* y *ncgrp1*. Para estudiar las variaciones en la inmunidad humoral debido al almacenamiento del moco hemos evaluado proteínas totales, unión de lectinas a azúcares terminales, IgM, peroxidasa, lisozima, proteasa, antiproteasa, esterasa y fosfatasa alcalina, que son las principales actividades humorales que se evalúan habitualmente bajo distintos retos. Para estudiar los proteomas, realizamos la purificación de las proteínas de moco, separación de estas proteínas en 2-D usando la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e identificando esas proteínas luego a través de cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría masas en tándem (LC-MS/MS). Finalmente, para el análisis bioinformático de los datos generados se utilizó el servidor MASCOT aprovechando las bases de datos de NCBI y SwissProt. En el caso de los proteomas diferenciales, se utilizó el programa PDQuest Advanced para detectar los spots diferencialmente expresados en los geles de dos dimensiones. Como resultados, en primer lugar la microscopía óptica y electrónica reveló una mayor superficie celular y área de microcrestas en la región dorsal, pero mayor grosor epidérmico y niveles de apoptosis en la región ventral. Además, el perfil de expresión de citoquinas no se alteró por la exposición al patógeno o al probiótico en la región dorsal pero se alteró fuertemente en la región ventral. Por otro lado, el linfocistis, cuya replicación fue demostrada solo en el grupo infectado, provocó un descenso de la inmunidad adaptativa, y un incremento de la inmunidad citotóxica innata en el lugar de la infección. Respecto al moco de dorada, el almacenamiento por congelación o por liofilización disminuyó los niveles de unión de lectinas a azúcares terminales, y la lisozima y la proteasa, demostrando que la liofilización es el método menos recomendado ya que alteró los niveles de la mayoría de los parámetros, excepto IgM, antiproteasa y esterasa. A nivel proteómico, establecimos el primer mapa proteómico de lubina, contribuyendo a establecer marcadores de bienestar, muchos de ellos asociados a la inmunidad de la mucosa, necesario para un mejor entendimiento de las propiedades del moco en peces. Finalmente, la administración de Pdp11 incrementó los niveles

de varias proteínas relativas al inmunitario, mejorando la inmunidad de la mucosa; mientras que las proteínas identificadas en el moco después de heridas crónicas disminuyeron en los niveles en todos los casos, aumentando por tanto la susceptibilidad a infecciones.

Palabras clave: Peces, Inmunología, Proteoma, Piel, Mucus.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/10201/51766>

Cordero, H., Mauro, M., Cuesta, A., Cammarata, M., Esteban, M.A. (2016) In vitro cytokine profile revealed differences from dorsal and ventral skin susceptibility to pathogen-probiotic interaction in gilthead seabream. *Fish & Shellfish Immunology* 56: 188-191.

Cordero, H., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2016) Characterization of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune response under a natural lymphocystis virus (LCDV) outbreak. *Journal of Fish Diseases* 39: 1467-1476.

Cordero, H., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2016) Changes in the levels of humoral immune activities after storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) skin mucus. *Fish & Shellfish Immunology* 58: 500-507.

Cordero, H., Brinchmann, M.F., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2015) Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Proteomics* 23-24: 4008-4020.

Cordero, H., Morcillo, P., Cuesta, A., Brinchmann, M.F., Esteban, M.A. (2016) Differential proteome profile of skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after probiotic intake and/or overcrowding stress. *Journal of Proteomics* 132: 41-50.