

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

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

José Alberto Núñez Díaz

Directores:

Dra. María Carmen Balebona Accino

Dr. Miguel Ángel Morfiño Gutiérrez

Defendida el 30 de junio de 2017 en la Universidad de Málaga

Realizada en la Facultad de Ciencias de la UMA

Mención internacional y *cum laude*

Resumen

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. Su desarrollo sostenible representa una alternativa que permita el aprovechamiento de los recursos pesqueros sin perjuicio de las poblaciones naturales de especies acuícolas. En España el consumo de productos pesqueros ha sido tradicionalmente elevado, encontrándose entre los 10 primeros países del mundo en importaciones de pescado. Actualmente el cultivo de peces en España está centrado en dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*); sin embargo, el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es una de las especies cuyo cultivo ha mostrado un claro crecimiento en los últimos años por las buenas perspectivas comerciales en el sur de Europa. El creciente interés en el cultivo del lenguado ha estado limitado por la irrupción de patologías en cualquiera de las etapas de crecimiento, traducándose 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*, siendo la región mediterránea especialmente proclive a sufrir estos brotes epizooticos.

Este patógeno de carácter oportunista se caracteriza por provocar la aparición de septicemia hemorrágica y la formación de nódulos blanquecinos en los órganos internos (hígado, riñón y bazo) del hospedador, siendo capaz de invadir fagocitos, evitar su eliminación, provocar la apoptosis celular y liberar al exterior nuevas bacterias para infectar las células adyacentes, contribuyendo a mantener un estado de infección crónica en el pez. Ante esta problemática, el control de las infecciones en la industria acuícola representa un aspecto crucial para el avance de la misma, por ello se propuso como objetivo de la Tesis presentada a concurso de la Sociedad Española de Acuicultura el profundizar en el conocimiento de la interacción entre el patógeno *Photobacterium*

damselae subsp. *piscicida* y el lenguado senegalés con vistas al desarrollo de estrategias para el control de la fotobacteriosis, por ello se ha estudiado la respuesta inmune del lenguado senegalés ante la infección y la vacunación con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Brevemente, en el caso de ejemplares de lenguado senegalés infectados con el patógeno de estudio se observó el incremento en la transcripción de genes relacionados con el metabolismo del hierro, así como componentes de la respuesta inmune innata relacionados con la inflamación, sistema del complemento, lisozima o proteínas de choque térmico en hígado y riñón cefálico. En cuanto a la vacunación con bacterina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, la vía intraperitoneal resultó ser la que mejor status inmunológico proporcionó a los ejemplares de lenguado senegalés para hacer frente a una infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Tomando en conjunto los resultados derivados de estos trabajos, se propuso el conjunto de marcadores constituido por los genes de la lisozima C, hepcidina, haptoglobina, transferrina, proteína de choque térmico 70 y los componentes 1q, 3, 4, 7 y 9 del sistema del complemento. Estos marcadores podrían actuar como indicadores de la protección frente a la fotobacteriosis y permitir predecir el éxito de una vacunación intraperitoneal antes de una posible infección.

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; siendo su estudio de gran relevancia en el conocimiento de la patogenicidad y en el diseño de vacunas más efectivas frente al patógeno. Por esto, en la presente Tesis se ha determinado la expresión de proteínas potencialmente antigénicas por parte de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* durante la infección en lenguado senegalés. La identificación de las proteínas antigénicas inducidas *in vivo* se ha realizado mediante la tecnología de antígenos inducidos *in vivo* (IVIAT) a partir de una genoteca de expresión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* generada en *E. coli* BL21 (DE3) con un tamaño de 7000 recombinantes. Se identificaron cinco proteínas IVIAT: péptido sintetasa no ribosómica (irp2) implicada en la síntesis de la piscibactina; alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) involucrada en la defensa ante el estrés oxidativo; alanil-ARNt sintetasa (AlaRS) vinculada en la aminoacilación de péptidos; serina hidroximetil transferasa (Shmt) descrita en la incorporación de carbohidratos desde el medio extracelular; e inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (Impdh) relacionada con la biosíntesis de nucleótidos. Por último, se ha realizado un estudio de la transcripción de genes del patógeno relacionados con la virulencia junto con los identificados mediante la metodología IVIAT, bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro* con exceso y limitación de hierro, y frente a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; y *ex vivo* en contacto con riñón cefálico de lenguado senegalés.

Palabras clave: *Solea senegalensis*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, IVIAT, vaccination, gene expression.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <https://hdl.handle.net/10630/15402>

- Núñez-Díaz J. A., Fumanal M., Mancera J. M., Moriñigo M. A., Balebona, M. C. (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 J. A., Fumanal M., Viguera E., Moriñigo M. A., Balebona M. C. (2017). Use of *in vivo* induced technology to identify antigens expressed by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* during infection of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 64: 446-456.
- Núñez-Díaz J. A., García de la Banda I., Lobo C., Moriñigo M. A., Balebona M. C. (2017). Transcription of immune related genes in *Solea senegalensis* vaccinated against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identification of surrogates of protection. *Fish and Shellfish Immunology*, 66: 455-465.