

En las últimas décadas la producción en acuicultura ha sufrido un enorme crecimiento, superando actualmente a las capturas de las pesquerías. Sin embargo, esta producción se ve afectada por la aparición de enfermedades en los distintos sistemas de cría de peces. Entre ellas, las causadas por parásitos producen pérdidas económicas significativas. La dorada (*Sparus aurata*) es un pez marino producido principalmente en el mar Mediterráneo. En la presente tesis doctoral se estudian dos parásitos entéricos de la dorada: *Enteromyxum leei* (Myxozoa) y *Enterospora nucleophila* (Microsporidia). Ambos parásitos representan una amenaza para el cultivo de la dorada y no existen vacunas ni tratamientos frente a ellos. Hasta la fecha, para ninguno de los dos parásitos se ha establecido un cultivo *in vitro*, y sólo para *E. leei* se ha conseguido establecer un modelo de mantenimiento de la infección *in vivo*. La dificultad para aislar estos parásitos ha obstaculizado el estudio y desarrollo de medidas preventivas o paliativas. La presente tesis pretende incrementar el conocimiento sobre estos parásitos y sus relaciones con el hospedador, sentando las bases para generar soluciones que puedan ser aplicadas en la acuicultura.

En el caso de *E. leei*, la disponibilidad de un protocolo de infección experimental posibilitó multitud de trabajos previos sobre la relación parásito-hospedador, que han supuesto una base sólida de conocimiento para esta tesis. El objetivo general con este parásito fue estudiar la inmunidad adquirida inducida en la dorada y la posibilidad de generar herramientas de diagnóstico y vacunas frente a esta enfermedad.

La inmunidad adquirida de la dorada frente a *E. leei* se demostró utilizando peces que habían sobrevivido a una infección previa con *E. leei* y peces que nunca antes habían estado en contacto con el parásito. Ambos tipos de peces se retaron con el patógeno mediante exposición vía efluente. Los resultados mostraron que los peces re-expuestos no se infectaron y que esta resistencia tiene una duración de al menos 16 meses. Además, la resistencia parece estar correlacionada con altos niveles de inmunoglobulina (Ig) M específica en sangre, y una alta expresión de Igs, en concreto, las formas solubles, incluso antes de la re-exposición al parásito. También se demostró que la respuesta adquirida conlleva un aumento de otros factores inmunitarios a nivel local y sistémico, como la expresión de genes relacionados con citotoxicidad (*granzima A*), actividad del complemento (*c3* y *fucolectina*), y peroxidasa sérica. Asimismo, y al contrario que los peces expuestos por primera vez, los peces re-expuestos mostraron un fenotipo de resolución de la inflamación tanto en intestino como en riñón anterior (baja expresión de *il1b* y *hsp90α*, y alta de *il10*).

El siguiente paso se enfocó a afinar el protocolo de infección mediante efluente con *E. leei*, estudiando la infección a distintos tiempos de exposición, temperaturas y densidades de población. Para ello, se realizaron dos infecciones por efluente a dos temperaturas (18°C constantes y 25,6°C de media), a distintos tiempos de exposición al efluente, y con distintas densidades. Los resultados mostraron que una semana de exposición es suficiente para transmitir la infección de *E. leei* por efluente, independientemente de la temperatura. Además, en exposiciones a bajas temperaturas (18oC), la respuesta inmunitaria frente al parásito (producción de anticuerpos específicos) de los peces fue menor que a altas temperaturas (25,6oC). De esta forma, aunque la prevalencia de infección fue mayor a temperaturas más altas, la mayor activación del sistema inmune hizo que la progresión de la infección a lo largo del intestino fuera menor. Entre las conclusiones se pueden destacar que el mantenimiento de peces infectados junto con peces sanos dentro de un mismo tanque siempre conlleva mayores prevalencias independientemente de la temperatura, y por tanto, eliminar sistemáticamente peces con síntomas podría bajar sustancialmente la prevalencia. Por otro lado, los efectos sobre la

prevalencia de infección derivados de altas densidades de peces o tiempo de exposición al parásito se acentúan a temperaturas a bajas.

Tras la demostración de la respuesta adaptativa eficaz frente a *E. leei*, y al disponer de un modelo de infección más afinado, que permitía tiempos de exposición más cortos, se realizó un ensayo de inmunización pasiva utilizando suero de peces resistentes para testar la posible capacidad protectora de los anticuerpos específicos. Los resultados mostraron que el suero con anticuerpos específicos efectivamente consigue ralentizar la invasión del intestino por el parásito y disminuir los síntomas de la enfermedad (bajada de crecimiento, pérdida de reservas lipídicas en el hígado, etc.). Paralelamente, se realizó un análisis del repertorio de las regiones variables de la IgM e IgT del intestino de dichos peces resistentes para conocer en detalle el tipo de respuesta inducida por el parásito. Se detectó la inducción de una respuesta policlonal en las células B IgM e IgT positivas, probablemente como parte de una estrategia de evasión del sistema inmunitario por parte del parásito. Sin embargo, la cantidad de anticuerpos específicos (pese a no ser una respuesta monoclonal) fue suficiente para conferir protección al individuo.

En base a estos resultados, se realizó una búsqueda de antígenos de *E. leei* que pudieran ser utilizados como candidatos para la producción de vacunas o herramientas de diagnóstico. Para ello, se ensambló un transcriptoma *de novo* utilizando una muestra mixta de intestino de dorada y parásito. Los transcritos ensamblados se filtraron por medio de blastn con dos bases de datos: una de Teleosteos y otra de Cnidarios/Myxozoos. Se obtuvieron 14.356 transcritos pertenecientes a *E. leei*, que constituyeron el transcriptoma del parásito y se utilizaron para la búsqueda de dianas antigénicas mediante estudios *in silico* y proteómicos. La búsqueda *in silico* se utilizó para la identificación de candidatos de diagnóstico y se basó en programas predictivos utilizando como parámetros niveles altos de expresión y localización extracelular. El estudio proteómico se centró en la búsqueda de candidatos vacunales realizando un western blot con sueros de peces resistentes y antígeno de *E. leei* y secuenciando las bandas reconocidas por los anticuerpos específicos, mediante espectrometría de masas. Se obtuvieron doce candidatos que se utilizarán para generar proteínas recombinantes para la producción de vacunas. Por otro lado, los resultados de la búsqueda *in silico* dieron lugar a 7 transcritos, que están siendo utilizados para la producción de anticuerpos monoclonales para su uso en diagnóstico.

En cuanto a los estudios relacionados con *E. nucleophila*, debido a que es una enfermedad emergente y descrita muy recientemente, el punto de partida fue mucho más básico. Las muestras de este parásito sólo se pueden obtener de brotes naturales en piscifactorías y hasta el momento no se había descrito un protocolo de mantenimiento *in vivo*. Por ello, primero se realizó un estudio de caracterización de la patología de la infección a partir de peces infectados naturalmente. En etapas tempranas de la infección, el parásito se localiza principalmente en el intestino, pero meses después, la prevalencia en intestino baja e incrementa en los órganos hematopoyéticos y el estómago. Se detectó una correlación entre intensidad de infección y reducción de crecimiento. Los signos clínicos de la infección consistieron en una reducción significativa del crecimiento, emaciación, y palidez de las paredes intestinales. A nivel celular, en los casos más graves se observó hiperplasia en el epitelio intestinal y proliferación de células rodlet, un elevado número de linfocitos en la base del epitelio e infiltración de granulocitos acidófilos en el epitelio intestinal. Además, en la submucosa, se observó la producción de granulomas formados por macrófagos y rodeados por linfocitos y granulocitos. También en la submucosa, se describió una gran abundancia de células B (IgM<sup>+</sup> e IgT<sup>+</sup>), y mastocitos (His<sup>+</sup>).

Finalmente se probaron varias formas de transmisión horizontal de *E. nucleophila* con el objetivo de desarrollar un modelo de mantenimiento *in vivo*, para facilitar futuros estudios con este parásito. Las vías de transmisión probadas fueron: cohabitación, efluente e intubación oral y anal. Se consiguió la transmisión el parásito con todas las vías, pero se produjo una disminución de la prevalencia a lo largo del tiempo en todos los casos excepto por vía anal. Variables como la temperatura, la dosis, y el estado de los peces donantes parecen ser más determinantes que la ruta seleccionada para la transmisión. Entre las rutas probadas, la intubación anal parece ser la más prometedora, ya que se mantiene en un plazo de tiempo más prolongado, pero ninguna de ellas fue capaz de reproducir los signos clínicos de la infección observados en las infecciones naturales.

En resumen, los estudios con *E. leei* demuestran que la vacunación frente a este parásito es factible, ya que la dorada es capaz de montar una respuesta específica eficaz y duradera frente al patógeno. En consecuencia, se identificaron unos candidatos muy prometedores para el desarrollo de métodos de diagnóstico y vacunas de gran utilidad en la acuicultura. Además, en esta tesis se describe en detalle la patología ocasionada por el patógeno emergente *E. nucleophila* y se exploran diferentes vías de transmisión experimental. Estos resultados presentan un gran avance en nuestro conocimiento de la enfermedad y ayudarán a optimizar protocolos de infección *in vivo* que facilitarán el estudio de este desconocido parásito para encontrar soluciones aplicables en el cultivo de la dorada.