



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Interacción entre el piojo de mar *Lepeophtheirus salmonis* y sus hospederos: desarrollo de vacunas contra este ectoparásito

Interaction between Lepeophtheirus salmonis sea lice and their hosts: vaccines development against this ectoparasite

Gabriela Rudd Garcés^{*1}, María del Carmen Luzardo Lorenzo² y Yamila Carpio González³

¹ Dpto de Genética y Biotecnología, Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical, La Habana. Cuba

² Dpto. de Bioquímica. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba

³ División de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana. Cuba

* Autor para correspondencia:
gabyrudd.22@gmail.com

RESUMEN

Las infestaciones por piojos de mar (Copepoda, *Caligidae*) representan unos de los desafíos mayores que ha enfrentado la industria salmonera en los últimos años, extendiéndose a otras especies de peces en cultivo y a las poblaciones salvajes de salmónidos. El control de este fenómeno por vacunas puede ser un método seguro y eficaz contra estos ectoparásitos, pero hasta el momento no existe una vacuna comercial disponible. Para desarrollar una formulación vacunal exitosa es preciso conocer la interacción que se establece durante el proceso de infestación entre el hospedero y el parásito; de ahí la necesidad de estudiar a fondo el sistema inmune de peces en su interacción con los piojos de mar, lo que resulta aún un reto en la Inmunología. El antígeno a seleccionar constituye otro aspecto de importancia, con vistas a la obtención de respuestas inmunes potentes para el control de las infestaciones por estos crustáceos. Asimismo, resulta necesario el uso de un adyuvante que, además de potenciar la baja respuesta de anticuerpos típica de los peces, no produzca efectos secundarios no deseados como melanización y adherencias. En este trabajo se presenta una visión general de la interacción entre el piojo de mar *Lepeophtheirus salmonis* y sus hospederos, así como el estado actual del desarrollo de candidatos vacunales contra este ectoparásito.

Palabras clave: piojos de mar, respuesta inmune en peces, vacunas, antígenos, adyuvantes

ABSTRACT

Infestations of sea lice (Copepoda, Caligidae) are a major health hazard for salmon farming industry in recent years, spreading to other species of farmed fish and wild salmonid populations. Vaccination could be a safe and effective method against these ectoparasites, but until now there are no commercially available vaccines. To develop a successful vaccine formulation is necessary to know the immunological interaction between host and

Recibido: 2017-02-19

Aceptado: 2017-04-08

*parasite during infestation; hence the need to deeper study of immune system, which is still a challenge in Immunology. Target antigen is another important issue to obtaining strong immune responses to control these infestations. Also, it is necessary to use a proper adjuvant to enhance the typical low antibodies responses of fishes without side-effects such as melanization and adhesions. This paper presents an overview of available studies on interaction between *Lepeophtheirus salmonis* and their hosts, as well as the current state development of vaccine candidates against this ectoparasite.*

Keywords: sea lice, fish immune response, vaccines, antigens, adjuvants

INTRODUCCIÓN

La acuicultura, actividad económica de gran importancia para la producción de alimentos, constituye uno de los sectores fundamentales para garantizar a la población mundial un alimento proteico seguro y de alta calidad (Bostock *et al.*, 2010). Dentro de este sector económico la industria salmonera tiene gran importancia debido al costo elevado de estos peces en el mercado (16% del valor total de los peces cultivados a nivel mundial) (FAO, 2012). En las últimas décadas esta industria se ha visto muy perjudicada por diversas enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan a los salmones de cultivo. Entre ellas, las infestaciones por los piojos de mar han ganado notoriedad, recibiendo la atención de científicos, políticos, los medios de comunicación y el público en general en todos los países en los que existe la cría del salmón como práctica industrial (FAO, 2007). Estos ectoparásitos constituyen el patógeno marino más expandido en la industria salmonera, extendiéndose en los últimos años a otras especies de peces en cultivo y a las poblaciones salvajes de salmónidos (Torrisen *et al.*, 2013). Las pérdidas anuales en la acuicultura mundial debido a las afectaciones directas e indirectas por estos ectoparásitos superan los 450 millones de dólares estadounidenses (Costello, 2009). Este estimado representó un 6% del valor total de la producción de salmónidos.

Estos crustáceos se alimentan del mucus, la piel y la sangre de sus hospederos afectando el crecimiento, la fecundidad y la supervivencia de los mismos (Skugor *et al.*, 2008). Además, provocan un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de infecciones secundarias que pueden ocasionar la muerte del pez si no son tratadas adecuadamente (Heuch *et al.*, 2005).

Lepeophtheirus salmonis es la especie de mayor impacto económico en el hemisferio norte (Sutherland *et al.*, 2014) debido a que infesta varias especies de salmónidos de gran importancia económica (Mordue y Birkett, 2009).

Existen pocos tratamientos comercialmente disponibles para el control de estas infestaciones basados fundamentalmente en el empleo de agentes químicos y farmacológicos. Sin embargo, hay evidencias que demuestran el desarrollo de resistencia a dichos tratamientos (Fast, 2013). Esto, unido a la necesidad de disminuir los costos y los riesgos ambientales asociados a ellos, son factores que propician el desarrollo de nuevas alternativas para el control de estos ectoparásitos. En este sentido, la vacunación es el método más apropiado para el control de los piojos de mar en peces teleósteos desde el punto de vista económico, ecológico y ético (Rombout *et al.*, 2014).

El desarrollo de vacunas requiere el conocimiento de la biología de los peces (ciclo de vida, sistema inmune, en otros), así como la de los patógenos, y las interacciones que se establecen entre ambos. Existe poco conocimiento de los mecanismos inmunológicos por los cuales los peces adquieren protección contra los piojos de mar y la patología de la infestación, lo que dificulta el diseño de vacunas. Hasta el presente no se ha desarrollado una vacuna exitosa contra estos ectoparásitos (Martínez, 2012); por lo que se hace necesaria la identificación de antígenos que resulten inmunógenos potentes y efectivos para la prevención y el control de las infestaciones por estos crustáceos.

En este trabajo se presenta una visión general de la interacción entre el piojo de mar *Lepeophtheirus salmonis* y sus hospederos, haciendo énfasis en las características de la respuesta inmune en los peces, así como el estado actual del desarrollo de candidatos vacunales contra este ectoparásito.

DESARROLLO

Características generales de los piojos de mar

Los piojos del mar son parásitos copépodos del orden *Siphonostomatoida*, familia *Caligidae*. Dentro de esta familia existen 36 géneros que incluyen aproximadamente

42 especies del género *Lepeophtheirus* y 300 de *Caligus*. Numerosos estudios refieren que estos ectoparásitos son hospederos de varias especies de virus y bacterias que pueden infectar a los peces tales como: el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, el virus de la necrosis pancreática infecciosa, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Piscirickettsia salmonis*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio* spp. (Burka et al., 2011).

Entre todas las especies de calígidos, *L. salmonis* es el piojo del mar que más afecta a la industria salmonera en el hemisferio norte y se conoce ampliamente su biología e interacción con sus hospederos (Burka et al., 2011). Se encuentra distribuido en el Pacífico noroccidental, Norte América, Noruega, Irlanda y Escocia. Entre sus hospederos se encuentran más de diez especies de salmónidos de gran importancia económica como: el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha de mar (*Salmo trutta*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón chinook (*O. tshawytscha*), el salmón coho (*O. kisutch*) y el salmón rosado (*O. gorbuscha*) (Mordue y Birkett, 2009).

Este ectoparásito tiene un ciclo de vida compuesto por ocho estadios: nauplius I-II, copepoditos (etapa infecciosa), chalimus I-II, pre-adultos y adultos, siendo algunos de vida libre o parasitaria (Fig. 1) (Hamre et al., 2013). Todas estas etapas se separan entre sí por procesos de muda (Burka et al., 2011).

En las tres primeras etapas de vida, *L. salmonis* forma parte del plancton marino. Su tamaño en este período es de 0,4 a 0,7 mm de largo y vive de sus reservas endógenas (Boxaspen, 2006). La dispersión y óptimo desarrollo de estas etapas planctónicas está influenciada por la temperatura, la luz y las corrientes; su supervivencia depende de una salinidad por encima del 25% (Burka et al., 2011). Una vez terminada la fase de nauplio se desarrolla el primer estadio infeccioso denominado copepodito, con un tiempo de vida limitado para encontrar un hospedero del cual alimentarse, ya que hasta ese momento depende de la reserva de energía endógena que posea (Heuch et al., 2000). El copepodito localiza a su hospedero mediante quimio-recepción, debido a que presenta en sus anténulas receptores específicos a sustancias del tegumento del pez (Burka et al., 2011). Luego de la etapa de copepodito, *L. salmonis* continúa su desarrollo a través de dos estadios de chalimus, los cuales se caracterizan por el desarrollo de un filamento frontal (Hamre et al., 2013). Esta estructura posee componentes adhesivos únicos que le permiten fijarse a sus hospederos (Burka et al., 2011).

L. salmonis termina su desarrollo con los estadios pre adulto y adulto; en estas etapas los machos son más móviles que las hembras, las cuales desarrollan un complejo genital muy grande que forma la mayor parte del cuerpo (Burka et al., 2011). Una vez maduros, los

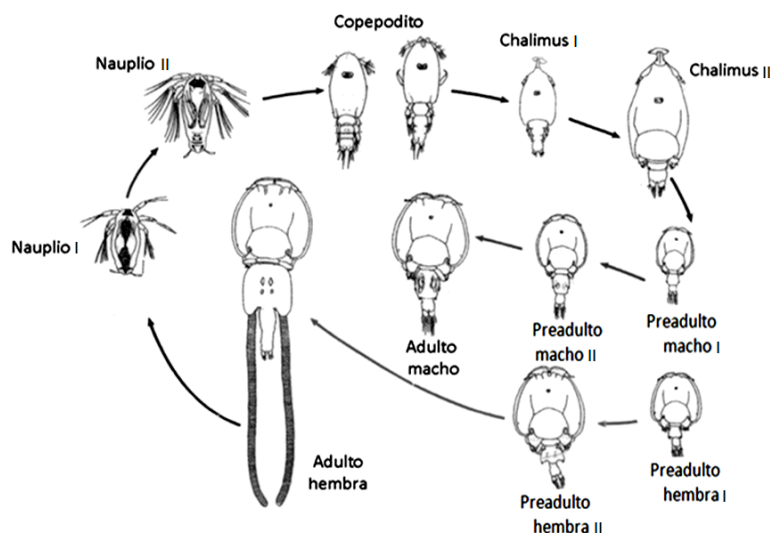


Figura 1. Estadios del ciclo de vida de *Lepeophtheirus salmonis*: nauplio I-II, copepodito, chalimus I-II, pre-adultos y adultos [Tomado de Schram et al., (1998) y modificado según actualizaciones de Hamre et al. (2013)].

Figure 1. *Lepeophtheirus salmonis* stadiums life cycle: nauplius I-II, copepodid, chalimus I-II, pre-adults and adults [Taken of Schram et al., (1998) and modified according to upgrades of Hamre et al. (2013)].

machos fertilizan internamente a las hembras. Luego de la cópula, las hembras producen varias cadenas de huevos; el número de estos depende de la etapa del año, la temperatura, el fotoperíodo y del hospedero en el cual se desarrolle (Boxaspen, 2006). En general, las hembras de *L. salmonis* producen 285 huevos por cadena (Fast, 2013). Estos ectoparásitos conservan estas estructuras hasta la eclosión de los nauplios, momento en que se desintegran y las larvas se unen al plancton (Boxaspen, 2006).

Respuesta inmune de los peces ante las infestaciones por piojos de mar

Los peces óseos poseen sistemas inmunitarios innatos y adaptativos capaces de llevar a cabo respuestas humorales y celulares. Esencialmente, los sistemas defensivos de los peces teleósteos tienen numerosos componentes similares a los sistemas inmunes de mamíferos (Rubio, 2010), pero cuentan también con componentes y funciones especiales que difieren profundamente con sus similares en otras especies y que aún son pobremente comprendidas (Penagos *et al.*, 2009).

La primera línea de defensa ante una infección en los peces constituye su sistema inmune innato. Este incluye las barreras físicas como la piel y las superficies mucosas, además de una variedad de leucocitos y diversos componentes solubles que inhiben indistintamente el crecimiento de microorganismos infecciosos (Penagos *et al.*, 2009).

El componente celular principal en la respuesta inmune innata son los macrófagos. Además de su función como células presentadoras de antígenos en la respuesta inmune adquirida, representan los principales fagocitos de los peces, secretan citoquinas proinflamatorias, aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades y juegan un papel central en la patogénesis de algunas entidades particulares, tales como la estreptocosis y la aeromoniasis, en las cuales son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evitar su destrucción (Ewart *et al.*, 2008).

También existen leucocitos granulares en peces, denominados al igual que en mamíferos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos, aunque no aparecen siempre en las distintas especies y sus funciones biológicas no son idénticas. Los neutrófilos, al igual que sus análogos de mamíferos, tienen funciones fagocíticas,

quimiotácticas y bactericidas, actividad de mieloperoxidasa, participan en el estallido respiratorio y poseen la capacidad de degranulación de gránulos primarios. Por otro lado, la función de los eosinófilos no es clara, pero se encuentran fácilmente en procesos inflamatorios, en los cuales liberan su contenido granular, por lo que se han comparado con los mastocitos de mamíferos (Palic *et al.*, 2007).

Una característica peculiar del sistema inmune de los peces, es la presencia de los denominados centros melanomacrófagos (CMMs) principalmente en el bazo y también en riñón, hígado, gónadas, tiroides y timo. Estos se asemejan a los centros germinales del bazo y los nódulos linfoides de los mamíferos. Están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas (Ferguson, 2006). El papel de los CMMs en respuesta a la infección es aún especulativo; en infecciones por bacterias intracelulares y por nodavirus, los CMMs aumentan en número y sus células atrapan grandes cantidades de antígeno, con el aumento en su interior de la cantidad de pigmentos (Hernández *et al.*, 2008). A pesar de que en los peces no existen ganglios linfáticos, placas de Peyer ni tejidos linfoides asociados a mucosas (ampliamente caracterizados en mamíferos y aves) hay evidencias claras de un sistema inmune innato de mucosas desde los primeros estadios de vida de los peces. Además del bajo pH gástrico, la acción de las enzimas digestivas, la bilis y el mucus descritos en mamíferos, el sistema inmune de mucosas en los peces incluye otra serie de propiedades defensivas. Dentro de estas propiedades están: la activación y aumento en número y tamaño de las células productoras de mucus, branquiales e intestinales, en respuesta casi siempre a infecciones bacterianas o sustancias irritantes presentes en el agua; la producción y eliminación de anticuerpos en la bilis; la migración de células productoras de anticuerpos a las mucosas branquial e intestinal; la existencia de poblaciones bacterianas nativas asociadas al epitelio intestinal y pilórico que interfieren con la adhesión y, posiblemente, con el ingreso de bacterias patógenas a los tejidos del pez y, por último, la endocitosis por los enterocitos, de partículas intactas, macromoléculas y de bacterias y sus antígenos, tanto de la microbiota nativa como de patógenos en todos los segmentos intestinales de larvas y adultos (Penagos *et al.*, 2009).

Los mecanismos primarios de la inmunidad innata que se activan ante una infestación por *L. salmonis*

son los componentes de la inflamación, el complemento y la respuesta de la fase aguda (Skugor *et al.*, 2008). En este sentido, Sutherland *et al.*, (2014) realizaron un estudio de reto con *L. salmonis* en salmón rosado, salmón del Atlántico y salmón chum, con el objetivo de comprobar qué mecanismos de la inmunidad se activaban ante esta situación de estrés. Como resultado obtuvieron que numerosos componentes inmunes innatos se sobreexpresaron, como la proteína amiloide de la fase aguda del suero, que incrementó sus niveles en todas las especies estudiadas. Por otra parte, en la piel del salmón rosado se indujeron las citocinas proinflamatorias IL (interleucina) -1β y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), las cuales promueven la quimiotaxis, el aumento de la respuesta inmune celular, la producción de otras citocinas y el control de la respuesta de la fase aguda. Estos procesos son importantes en la regulación de la inflamación local y sistémica (Sutherland *et al.*, 2014).

Un estudio realizado por Tadiso *et al.*, (2011) reveló que la respuesta inflamatoria ante una infección por piojos de mar es bifásica, donde en cada etapa se expresan distintos componentes del sistema inmune innato. En la primera fase, durante los estadios de copepoditos hasta chalimus, se expresan en la piel y el bazo, genes que codifican la IL- 1β , la IL-12, el receptor de IL-1 (IL-1R), el TNF- α , la enzima cicloxigenasa 2 (COX-2), la prostaglandina E2 (PGE2) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC: del inglés *Major Histocompatibility Complex*) de clase I y de clase II. Durante los estadios de chalimus se suprime la expresión de estos productos génicos, además de moléculas involucradas en la presentación de antígenos, quimocinas involucradas en el reclutamiento de células T y de proteasas en el bazo. Posteriormente, a partir del proceso de muda de chalimus a pre-adultos aumenta de nuevo la expresión de algunos de estos marcadores de inflamación (IL- 1β , IL-10, PGE2 y TNF- α). También se observó la expresión de varias metaloproteasas de matriz (MM) como la MM9 (gelatinasa) y la MM13 (colagenasa 3) como marcadores de la segunda fase de expresión y de la transición de la respuesta aguda a crónica (Tadiso *et al.*, 2011).

La segunda línea de defensa en los peces es la inmunidad adaptativa o adquirida. Aunque estos organismos no tienen médula ósea ni nódulos linfoides, el timo, el riñón y el bazo asumen el papel de órganos de respuesta. La inmunidad adquirida puede dividirse en celular y humoral, dependiendo en gran medida

de linfocitos T y B. Similar a como ocurre en mamíferos, la inmunidad adquirida humoral en peces involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B que se diferencian en células plasmáticas y de memoria que responden para producir y secretar anticuerpos antígeno-específicos. Por otro lado, la inmunidad adquirida mediada por células involucra el reconocimiento por las células T de antígenos expuestos en la superficie de las células presentadoras de antígenos, en asociación con moléculas del MHC, que inducen la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC, CD8+), células T auxiliares (LTA, CD4+) secretoras de citocinas y células supresoras (Penagos *et al.*, 2009).

En los mamíferos las inmunoglobulinas (Ig) se dividen en cinco clases dependiendo de su región constante: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Durante mucho tiempo se pensó que el isotipo IgM era el único que existía en los peces; durante la última década se descubrieron dos nuevos isotipos en peces teleosteos: IgD e IgT/IgZ (Zhu *et al.*, 2013). Aunque la IgM representa la clase más abundante, la respuesta inmune fuerte ante una infección o vacunación es mayormente detectada en el plasma, mientras que en los tejidos mucosales (ej. intestino, piel o branquias) los títulos permanecen bajos (Salinas *et al.*, 2011). Asimismo, se ha demostrado que la IgM recubre una parte significativa de la piel, el intestino y la microbiota nasal (Tacchi *et al.*, 2014). La IgD se identificó en el plasma de la trucha y del pez gato, pero en este último carece de la región variable y se sugiere que pueda funcionar como una molécula de reconocimiento de patrones innatos (Xu *et al.*, 2016).

Además de IgM e IgD, los peces teleosteos tienen un tercer tipo de inmunoglobulina: la IgT, denominada también IgZ, que se identificó por vez primera en el 2005 a nivel de genoma (Hansen *et al.*, 2005). Excepto el pez gato y el pez-arroz japonés o medaka común, las demás especies de peces óseos expresan este anticuerpo (Fillatreau *et al.*, 2013). La IgT es la principal inmunoglobulina que se expresa en el intestino y el tejido mucoso durante experimentos de retos con patógenos y también tiene un rol prevalente en la capa de la microbiota encontrada en estas superficies. Recientemente se descubrió un nuevo linaje de células B que expresan sólo IgT y es el subconjunto más abundante de este tipo celular en el intestino, la piel y los tejidos linfoides nasales. La IgT es la inmunoglobulina de mucosas más antigua entre las existentes en vertebrados. Los descubrimientos recientes sobre sus funciones en la inmunidad mucosal representan

un desafío al paradigma previo de que la especialización de los isotipos de anticuerpos en las respuestas mucosales y sistémicas ocurrió durante la evolución de los tetrápodos (Xu *et al.*, 2016).

Un aspecto importante de la respuesta inmunitaria específica de los peces óseos es la memoria inmunológica, propiedad de los linfocitos que permite una producción más rápida y pronunciada de anticuerpos tras una exposición secundaria al mismo antígeno (Rubio, 2010). Existen muy pocos estudios en salmónidos que examinen si la respuesta de anticuerpos específicos contra el piojo de mar resulta protectora. Esto se debe a que la respuesta inducida contra estos parásitos es baja en comparación a la inducida contra otros patógenos como bacterias y virus (Fast *et al.*, 2002). Estudios en *S. salar* infestado por *L. salmonis* evidenciaron un aumento de la expresión de IgM e IgT en el bazo y la piel como un indicio de una respuesta humoral (Tadiso *et al.*, 2011). Esta respuesta de anticuerpos, así como la susceptibilidad diferencial que existe en los salmónidos ante una infestación por *L. salmonis* sugieren que debe existir alguna forma de selección genética o de inmunoestimulación que pueda incrementar la inmunidad de los hospederos contra estos ectoparásitos (Fast, 2013).

El piojo de mar *L. salmonis*, al igual que otros parásitos artrópodos, puede secretar sustancias para modular la respuesta inmune de sus hospederos y favorecer su alimentación. En las secreciones de *L. salmonis* y en el mucus de salmones del Atlántico infestados se han identificado varias proteasas semejantes a tripsinas del intestino de estos crustáceos (Kvamme *et al.*, 2004). Estas proteasas tienen un papel fundamental en la invasión a los tejidos del hospedero y en la evasión de la respuesta inmune, ya que actúan como vasodilatadores, anticoagulantes y agentes necrosantes (Fast *et al.*, 2007). El parásito segrega mayores proporciones de proteasas de bajo peso molecular en respuesta al mucus de la trucha arcoíris y del salmón del Atlántico, respecto al mucus de salmón coho. Esto sugiere que las especies hospederas más resistentes pueden bloquear la producción de estas proteasas por los ectoparásitos, mientras que las más susceptibles pueden estimular su producción (Fast *et al.*, 2003). Adicionalmente, en estas secreciones se encuentran otras proteínas que suprimen el sistema inmune de los peces como la PGE2, la catepsina L (Lewis *et al.*, 2014) y una proteína semejante a peroxinectina (Wotton *et al.*, 2013). La PGE2 es un vasodilatador potente que tiene un efecto importante sobre

la inmunidad ya que suprime la proliferación de los linfocitos en los peces infectados (Fast, 2012). La proteína semejante a peroxinectina mantiene la respuesta inflamatoria localizada en el sitio de infección y modula la respuesta de anticuerpos y la polarización de la respuesta hacia Th2. En general, estas secreciones pueden inducir un estrés sistémico y una respuesta inflamatoria que conlleva a una inmunosupresión del hospedero (McClure *et al.*, 2004). El deterioro en factores de transcripción celulares como NF- κ B y la reacción de fase aguda se han observado en salmones infectados por *L. salmonis*. El factor de transcripción NF- κ B media la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y tiene un importante papel en la diferenciación de macrófagos en tipo pre o antiinflamatorios. La inhibición de NF- κ B puede provocar alteraciones en las respuestas inmunes, dejando al hospedero indefenso ante las infecciones secundarias (Lewis *et al.*, 2014).

En este sentido, Lewis *et al.*, (2014) realizaron un estudio experimental en el cual la línea celular SHK-1 derivada de leucocitos de riñón anterior pertenecientes a tres especies de salmones (rosado, chum y del Atlántico) se incubó con las secreciones de *L. salmonis*, ya que éstas producen sustancias farmacológicamente activas que modifican la expresión génica de mediadores de la inflamación en estos tipos celulares. Como resultado se observó una supresión de la expresión de NF- κ B en las tres especies al inicio de la infección. Además, se redujo la expresión de IL-1 β , MHC I y MHC II en macrófagos de riñón del salmón del Atlántico luego de su incubación con PGE2. Esto pudiera ser un mecanismo mediante el cual este parásito evita la activación completa de la respuesta inmune específica, principalmente la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos. El salmón rosado fue la única especie que mostró una importante regulación durante las 48 horas siguientes a la infección, ya que incrementó la expresión de la proteína C reactiva (proteína de fase aguda), activadora de la cascada del complemento.

Vacunas en peces

La vacunación ofrece varias ventajas con respecto a la administración de fármacos. Estas ventajas incluyen la acción sostenida en el tiempo producto de la inducción de una memoria inmunológica, así como la ausencia de fármacos residuales en la carne. Por otra parte, el empleo de la vacunación como método de

control de infecciones evita la contaminación de otras especies de invertebrados y del ecosistema en general. Una ventaja adicional es la baja probabilidad de que se desarrolle resistencia, y en caso de ocurrir, se puede contrarrestar a través de la modificación o inclusión de nuevos componentes antigénicos. Además, el costo de la vacunación es relativamente bajo, ya que los antígenos pudieran expresarse como proteínas recombinantes o emplearse vacunas de ADN (Raynard *et al.*, 2002).

Hasta el momento, para la mayoría de las infecciones en peces, no se conocen los mecanismos inmunológicos a través de los cuales se adquiere protección, lo que dificulta en gran medida el diseño de vacunas de forma racional, no basadas únicamente en ensayo y error (Martínez, 2012). En la actualidad se puede hablar de dos tipos de productos vacunales: las vacunas en las que el antígeno no se expresa en el pez y aquellas con replicación en el organismo hospedero. Las vacunas sin replicación inducen una excelente protección cuando se administran por inyección con un adyuvante adecuado. Entre estas se pueden destacar distintos tipos (Vendrell *et al.*, 2013).

Las vacunas inactivadas, las cuales se elaboran con microorganismos muertos previamente fermentados e inactivados. En peces se utilizan, generalmente, frente a patógenos bacterianos, aunque se han desarrollado vacunas inactivadas contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa en *S. salar* y frente a la enfermedad hemorrágica de la carpa con cierto éxito. Generalmente se administran intraperitonealmente con adyuvantes oleosos (Martínez, 2012).

Las vacunas de subunidades están compuestas por subunidades antigénicas que pueden ser de distinta naturaleza como: lipopolisacáridos, extractos ribosómicos, proteínas purificadas o sintetizadas químicamente. Estas vacunas se suelen emplear cuando se han aislado los componentes responsables de la inmunogenicidad del agente infeccioso. Su producción es sencilla, eficiente y barata (Martínez, 2012). Un ejemplo de vacuna de subunidades recombinantes es la desarrollada por Kuzyk *et al.*, (2001) frente a *P. salmonis* en salmón coho, la cual redujo la mortalidad de los salmones al 24%.

Las vacunas sintéticas, que están elaboradas a partir de la síntesis exclusiva de fragmentos peptídicos considerados esenciales para desencadenar una respuesta inmunológica. Sin embargo, hoy en día no están disponibles para peces ya que, aunque son seguras,

estables y sencillas, es necesario conocer más sobre la respuesta inmune en teleósteos y el papel de las células inmunitarias para que sean eficaces y rentables (Martínez, 2012). Estudios experimentales realizados por Coeurdacier *et al.*, (2003), mediante vacunas elaboradas con péptidos sintéticos obtenidos de la cápsida del nodavirus causante de la encefalopatía y retinopatía vírica de la lubina, demostraron una disminución de la mortalidad en un 4% respecto a la obtenida en el grupo control (31%).

Por otro lado, las vacunas con replicación en el hospedero ofrecen una mayor protección porque son capaces de estimular una respuesta inmune más completa. Dentro de este grupo se encuentran: las vacunas atenuadas, las vacunas con vectores recombinantes y las vacunas de ADN con plásmidos (Vendrell *et al.*, 2013).

Las vacunas atenuadas se formulan con el agente patogénico completo, pero su función vital está inactivada. Debido a esto producen un efecto similar a una infección real (con una cepa atenuada) y, como la propagación de la cepa la llevan a cabo los peces vacunados, la diseminación del antígeno en la población tendría lugar durante un largo período de tiempo. Su suministro es simple y las dosis requeridas son bajas debido a la diseminación del patógeno por los individuos vacunados (Martínez, 2012). El mayor inconveniente es la seguridad biológica, debido al riesgo de liberar un organismo vivo al medio y de que la cepa vacunal revierta su virulencia (Vendrell *et al.*, 2013). Desde finales de la década de 1990 existe una vacuna atenuada con licencia, desarrollada por Shoemaker *et al.* (1999), contra *Edwardsiella ictaluri* que resulta eficaz cuando se aplica por inmersión en alevines de pez gato.

Las vacunas con vectores recombinantes tienen como principio la inserción de genes codificadores de antígenos protectores en virus o bacterias que se administran al hospedero, donde se replican sin causar enfermedad, produciendo gran cantidad de antígeno recombinante capaz de estimular el sistema inmune del hospedero. La principal ventaja es la posibilidad de crear vacunas polivalentes que podrían estimular simultáneamente la protección frente a varios patógenos. Actualmente se están investigando vacunas basadas en proteínas recombinantes frente a *P. salmonis*, agente responsable de la septicemia rickettsial de los salmónidos (Vendrell *et al.*, 2013).

Las vacunas de ADN con plásmidos se basan en la administración de un plásmido de expresión eucariota que codifica para una o varias proteínas patógenas, capaz de expresar dicho antígeno de modo eficaz y con una correcta conformación dentro del hospedero. La inmunización con ADN recombinante ofrece ventajas sobre los métodos convencionales, ya que al parecer no provoca efectos secundarios, tiene una gran estabilidad y además suele conferir una protección eficaz contra las enfermedades virales (Martínez, 2012). Lorenzen y LaPatra, (2005) plantean que una sola inyección intramuscular con pocos microgramos de ADN induce, en salmónidos de criadero, una protección rápida y duradera contra los agentes causales de enfermedades de gran importancia económica como el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa o el virus de la septicemia hemorrágica.

Los principales métodos de vacunación en los peces son la inmersión en una solución vacunal, inyección intraperitoneal (requiere que el animal tenga más de 15 g de peso), inyección intramuscular (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral. Otros métodos que se han investigado son la infiltración anal y el método de *spray* (Penagos *et al.*, 2009). Actualmente, la vía más utilizada es la intraperitoneal. Esta ruta es muy efectiva a la hora de inducir protección, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite la adición de adyuvantes que estimulen la protección durante un tiempo mayor. Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que induce en los peces y la estimulación deficiente de inmunidad a nivel de superficies, hacen que la inyección de vacunas se limite a ciertas especies de peces, a determinados patógenos y a sistemas de producción particulares, como es el caso de la vacunación de salmónidos contra patógenos bacterianos. También es un método posible para la administración de virus inactivados o incluso partículas virales semejantes a virus (VLPs) (Martínez, 2012). Estudios previos de vacunación intraperitoneal con VLPs frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa en trucha arcoíris demostraron una disminución de la mortalidad aun sin la utilización de adyuvantes (Shivappa *et al.*, 2005).

Además de las vacunas, existen otros métodos que han resultado factibles en la estimulación del sistema inmune de peces y en el tratamiento frente a diversos patógenos. Tal es el caso del empleo de inmunoestimuladores, los cuales son principalmente elementos

estructurales de microorganismos, que basan su funcionamiento en la estimulación del sistema inmune innato. Dentro de los inmunoestimuladores más utilizados en peces se encuentran los β -glucanos, los oligodeoxinucleótidos CpG, los lipopolisacáridos y las bacterias benéficas denominadas probióticos. Los estudios realizados en peces se han enfocado en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de las respuestas celulares y humorales, la modulación de la transcripción génica y los efectos de resistencia frente a patógenos de interés; mostrando, de manera general, efectos positivos sobre el estado inmunológico de los peces y su resistencia a enfermedades (Vásquez *et al.*, 2012).

Vacunas contra ectoparásitos

Los ectoparásitos complejos son, probablemente, los organismos contra los cuales sea más difícil desarrollar una vacuna. Esto se debe a que viven en el exterior del hospedero y los órganos que están en contacto con él evolucionan constantemente, de forma tal que el sistema inmune no los reconozca y por tanto, no logre dañarlos o destruirlos (Raynard *et al.*, 2002). El control de las infestaciones por ectoparásitos se ha basado principalmente en el empleo de acaricidas, pero se ha demostrado que no son efectivos ni rentables, debido a que los parásitos han desarrollado resistencia ante ellos y además son perjudiciales para el ambiente. La vacunación es una alternativa emergente que demostró tener ventajas sobre los acaricidas respecto al costo-beneficio, prevención de la polución ambiental y la aparición de resistencia (Canales *et al.*, 2010). Adicionalmente, el desarrollo de vacunas basadas en antígenos de artrópodos vectores es una alternativa para el control de las infestaciones y la capacidad del vector de transmitir virus y bacterias perjudiciales para la salud humana y animal (Moreno-Cid *et al.*, 2013).

El desarrollo de vacunas contra ectoparásitos es todavía incipiente y complejo. Hasta el momento sólo existe una vacuna comercialmente disponible Gavac y es contra la garrapata del ganado tropical, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Can (Willadsen, 2004). El enfoque utilizado para desarrollar esta vacuna está basado en el empleo de un antígeno oculto, los cuales son moléculas del parásito que no entran en contacto con el sistema inmune del hospedero durante las infestaciones (Willadsen *et al.*, 1988). Esto provoca que los parásitos no desarrollen estrategias para escapar a la acción de una repuesta contra ellos

(Nuttall, 2006). En este sentido, el antígeno oculto empleado en Gavac es Bm86, una glicoproteína presente en la parte externa de la membrana celular digestiva del intestino de la garrapata (Bastos *et al.*, 2010). El modo de acción de la vacuna consiste en que los anticuerpos contra Bm86 presentes en la sangre del hospedero sean ingeridos por las garrapatas, estos se unen a las células digestivas del intestino y causan un incremento en la permeabilidad de la membrana celular, lo que conlleva posteriormente a la lisis celular. Como resultado del daño al intestino, aumenta la tasa de mortalidad y en las hembras sobrevivientes hay una reducción de la fecundidad (de la Fuente *et al.*, 2005). La seguridad y eficacia de las vacunas basadas en el antígeno Bm86 se han demostrado en numerosos experimentos y su uso comercial por más de 10 años (Cobon *et al.*, 1995; Willadsen *et al.*, 1996; de la Fuente *et al.*, 1998, 1999, 2007; Jonsen *et al.*, 2000; García-García *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004; Willadsen *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2016).

La tecnología del ADN recombinante ha permitido la producción de antígenos a gran escala para el desarrollo y comercialización de vacunas contra vectores ectoparásitos. *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* son los sistemas de expresión más utilizados para la producción de estos antígenos debido a su rápida multiplicación y bajo costo industrial (Canales *et al.*, 2010).

Estudios recientes sugieren que las proteínas quiméricas basadas en la subolesina son buenos candidatos como antígeno oculto para el control de infestaciones por artrópodos vectores (Canales *et al.*, 2010). En este sentido, Moreno-Cid *et al.*, (2013) compararon el efecto de la vacunación en ratones con dos quimeras Q38 y Q41, basadas en la fusión de varios epitopos B conformacionales de las subolesinas de *Ixodes scapularis* y *Aedes albopictus*. Ambas proteínas se expresaron en *E. coli* y se adyuvaron con Montanide ISA 50v2 para potenciar la respuesta inmune. Además realizaron un ensayo de reto con *Ixodes ricinus*, *A. albopictus* y *Phlebotomus perniciosus* para probar el efecto de la vacunación en la fertilidad, muda, ovoposición y mortalidad de estos ectoparásitos. Como resultado, la respuesta de anticuerpos generada por los ratones contra ambas quimeras fue significativamente mayor respecto al grupo control. La inmunización con la quimera Q41 redujo la supervivencia y fertilidad de los mosquitos en un 99%, mientras que la vacunación con Q38 mostró un mayor efecto en la disminución de la ovoposición en mosquitos (28%) y ácaros (26%).

Además de la subolesina, el factor de elongación 1a y la ubiquitina son nuevos candidatos para el control de las infestaciones por ectoparásitos (Almazán *et al.*, 2012). En este sentido, Almazán *et al.*, (2012) obtuvieron en *E. coli* tres proteínas quiméricas: SUB-MSP1a, EF1a-MSP1a y UBQ-MSP1a constituidas por la subolesina, el factor de elongación 1a (EF1a) y la ubiquitina (UBQ) de *R. microplus* fusionadas a la proteína MSP1a de la superficie de la bacteria *Anaplasma marginale*, respectivamente. Con el objetivo de evaluar el efecto protector de las quimeras, se realizó un ensayo de inmunización y reto en vacas con tres formulaciones vacunales compuestas por las proteínas y el adyuvante Montanide ISA 50v2. Finalmente, la vacunación con la quimera SUB-MSP1a mostró la mayor eficacia (81%) en el control de las infestaciones por *R. microplus*.

Con el propósito de evaluar la eficacia de la proteína SUB-MSP1a en el control de las infecciones secundarias por ectoparásitos vectores Torina *et al.*, (2014) realizaron un ensayo de inmunización en grupos de ganado vacuno (N=66) y ovino (N=256) bajo condiciones de campo. Como resultado obtuvieron que el principal efecto de la vacunación en las vacas fue la reducción del porcentaje de animales infestados pero no se redujo el grado de infestación, mientras que en las ovejas el efecto fue el opuesto que en las vacas. Además, se mostró una disminución en el peso de las hembras de ectoparásitos colectados en ambos grupos de animales. En cuanto a las infecciones secundarias, se encontró una baja seroprevalencia de *Babesia bigemina* en vacas y de *A. marginale* en ovejas. Estos resultados proveen nuevas evidencias para respaldar que las vacunas basadas en subolesina tienen efecto doble en el control de las infestaciones por ectoparásitos y en la transmisión de patógenos microbianos.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en vacunas contra garrapatas, el concepto de antígeno oculto que se utilizó para desarrollar exitosamente la vacuna Gavac lo siguieron varios grupos de investigadores interesados en desarrollar una vacuna exitosa contra los piojos de mar (Reilly y Mulcahy, 1993; Grayson *et al.*, 1995; Raynard *et al.*, 2002). El modo de acción de una vacuna contra los piojos de mar estaría basado en que el parásito ingiera los anticuerpos del salmón. Estos anticuerpos podrían interactuar con proteínas presentes en las células del intestino, ocasionando un daño que impida el correcto funcionamiento del mismo. Esto conllevaría a una reducción de

la nutrición, la fisiología, la sobrevivencia o la fecundidad del patógeno (Raynard *et al.*, 2002).

Para que este enfoque sea válido es necesario que exista una semejanza biológica en la relación parásito-hospedero y en la fisiología digestiva del piojo de mar con los parásitos hematófagos de mamíferos. Además, las propiedades físicas y bioquímicas del intestino de este parásito deben permitir que los anticuerpos del salmón funcionen. Se conoce que la sangre es un componente importante en la dieta de hembras adultas de *L. salmonis*, a diferencia de los machos adultos y pre-adultos. Sin embargo, existen diferencias importantes entre el consumo de sangre del piojo de mar y los parásitos hematófagos, como la garrapata del ganado. Las garrapatas, a diferencia de los piojos, tienen en la boca estructuras especializadas para la ingestión de sangre y consumen una gran cantidad en relación al tamaño de su cuerpo. Los piojos de mar no sólo se alimentan de la sangre de sus hospederos, sino también del mucus y de la piel, por lo que ingieren pocos anticuerpos en comparación con las garrapatas. Por tanto, se debe identificar un antígeno crítico que pueda causar el mayor daño con poca exposición de anticuerpos (Raynard *et al.*, 2002).

En los últimos años se investigaron varias proteínas con el objetivo de utilizarlas como candidatos vacunales en el control de las infestaciones por piojos de mar. Entre estas moléculas se encuentran las tripsinas, catepsinas, proteínas semejantes a la vitelogenina y proteínas de adhesión al hospedero (Ross *et al.*, 2008). En este sentido, Ross *et al.*, (2012) obtuvieron un antígeno quimérico basado en la tripsina de *L. salmonis* y epitopos T del virus del tétano. Para probar la efectividad del mismo realizaron un ensayo de inmunización y reto en *S. salar*. Los peces se inmunizaron con dos formulaciones de la vacuna con tripsina: A/B (tripsina recombinante + epitopos T del virus del tétano) y Y/Z: (sólo tripsina recombinante) y, como adyuvante, se utilizó Montanide ISA 763 A VG. Como resultado obtuvieron que los peces tratados con la vacuna A/B mostraron la mayor reducción de piojos de mar por centímetro y gramo de pez, que los tratados con la vacuna Y/Z.

Por otra parte, Carpio *et al.*, (2011) y Carpio *et al.*, (2013) caracterizaron un nuevo gen denominado *my32* (ortólogo de las proteínas akirin-2 de mamíferos y subolesina de artrópodos) en las especies *Caligus rogercresseyi* (*my32-Cr*) y *L. salmonis* (*my32-Ls*).

Estos investigadores evaluaron la función del gen *my32-Cr* mediante experimentos con ARN de interferencia (ARNi) y observaron una reducción del número de ectoparásitos en los grupos de peces tratados. Ambas proteínas se expresaron en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos bajo condiciones desnaturalizantes obteniéndose con un 95% de pureza. Además, en un ensayo de inmunización y reto con la proteína *my32-Cr* adyuvada en Montanide 888 VG obtuvieron una reducción significativa del número de parásitos por pez, principalmente en la segunda generación de los piojos de mar (Carpio *et al.*, 2011). Adicionalmente, demostraron la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos específicos en tilapias (*O. niloticus*) y en ratones (*Mus musculus*), en un ensayo de inmunización con la proteína *my32-Ls* adyuvada en Montanide 888 VG (Carpio *et al.*, 2013).

Siguiendo esta línea, Acosta *et al.*, (2014) realizaron un ensayo de inmunización en tilapias con la proteína *my32-Ls* y el péptido antimicrobiano de tilapia Oreochromicin-1 formulados en Montanide 888 VG. A los 28 días post-inmunización la respuesta de anticuerpos IgM anti-*my32-Ls* generada por los peces resultó significativa respecto al grupo control. Estos resultados indican que la proteína *my32* puede ser un blanco prometedor para el desarrollo de una vacuna que controle las infestaciones por piojos de mar.

El empleo de adyuvantes, potentes y seguros, constituye un aspecto de marcada relevancia en el diseño de una vacuna. Su papel principal es mejorar la presentación del antígeno al sistema inmune, preservar la integridad conformacional de éste y prolongar la exposición al sistema inmune del mismo. Debe ser biodegradable, biocompatible y efectivo después de una dosis única (Kurella *et al.*, 2000). Como se mencionó anteriormente, la serie de adyuvantes Montanide es ampliamente utilizada en estudios de inmunogenicidad en diversos grupos animales. Son adyuvantes oleosos compuestos por aceite mineral, desarrollados para preparar emulsiones tipo agua en aceite (W/O) (Tafalla *et al.*, 2013). El mecanismo de acción de este tipo de adyuvante consiste en la formación de un depósito en el sitio de inyección, permitiendo una liberación lenta del antígeno que mejora la estimulación de las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por lo tanto, pertenecen a la categoría de adyuvantes denominados facilitadores de la señal tipo 1 cuya función es, en primera instancia, la

presentación del antígeno a las células del sistema inmune (Martínez, 2012). Debido a su estabilidad, baja toxicidad y reactogenicidad (Roestenberg *et al.*, 2008) se recomienda su uso en vacunas para peces, en especial para salmónidos (Evensen, 2009).

Consideraciones finales

El desarrollo de vacunas eficaces para el control de las infestaciones por piojos de mar en la acuicultura requiere de una profunda investigación del ciclo de vida y la inmunología de estos ectoparásitos, además de las interacciones que establecen con sus hospederos durante la infestación. En la última década, con el desarrollo de la ingeniería genética, se han obtenido resultados promisorios en la obtención de candidatos vacunales que emplean como antígenos proteínas de unión al hospedero, tripsinas, entre otras, y Montanide vegetal (VG) como adyuvante. No obstante, no existe hasta el presente ninguna formulación vacunal que permita controlar las infestaciones de los salmónidos con piojos de mar.

AGRADECIMIENTOS

A Yamila Carpio González (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba) por la revisión crítica del manuscrito y sus útiles sugerencias.

LITERATURA CITADA

- Acosta, J., Y. Carpio, I. Valdés, J. Velázquez *et al.* (2014) Co-administration of tilapia alpha-helical antimicrobial peptides with subunit antigens boost immunogenicity in mice and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vaccine*. 32: 223–229.
- Almazán, C., O. Moreno-Cantú, J.A. Moreno-Cid, R.C. Galindo *et al.* (2012) Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. 30: 265–272.
- Bastos, R.G., M.W. Ueti, D.P. Knowles y G.A. Scoles (2010) The *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & vectors*. 3: 111.
- Bostock, J., B. McAndrew, R. Richards, K. Jauncey, *et al.* (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 365: 2897–2912.
- Boxaspen, K. (2006) A review of the biology and genetics of sea lice. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*. 63: 1304–1316.
- Burka, J.F., M.D. Fast, y C.W. Revie (2011) *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus Roger cresseyi*. *Fish Parasites: Pathobiology and Protection*. 22: 360–380.
- Canales, M., J.A. Moreno-Cid, C. Almazán, M. Villar *et al.* (2010) Bioprocess design and economics of recombinant BM86/BM95 antigen production for anti-tick vaccines. *Biochemical Engineering Journal*. 52: 79–90.
- Carpio, Y., L. Basabe, J. Acosta, A. Rodríguez *et al.* (2011) Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: a promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine*. 29: 2810–2820.
- Carpio, Y., C. García, T. Pons, D. Haussmann *et al.* (2013) Akirins in sea lice: first steps towards a deeper understanding. *Experimental parasitology*. 135: 188–199.
- Cobon, G., J. Hungerford, M. Woodrow, D. Smith *et al.* (1995) Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience, in: J. de la Fuente (Ed.) *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*, *Elfos Scientiae*, Havana: 163–176.
- Coeurdacier, J.L., Laporte, F. y Pepin, J.F. (2003) Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology*. 14: 435–447.
- Costello, M. J. (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases*. 32: 115–118.
- de la Fuente, J., C. Almazan, E.F. Blouin, V. Naranjo *et al.* (2005) RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology research*. 96: 137–141.
- de la Fuente, J., C. Almazan, M. Canales, J.M. Perez de la Lastra *et al.* (2007) A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle, *Animal Health Res. Rev.* 8: 23–28.
- de la Fuente, J., M. Rodríguez, M. Redondo, C. Montero *et al.* (1998) Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GavacTM against the cattle tick *Boophilus microplus*, *Vaccine*. 16: 366–373.
- de la Fuente, J., M. Rodríguez, C. Montero, M. Redondo *et al.* (1999) Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine GavacTM, *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 15: 143–148.
- Evensen, O. (2009) Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. En: Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). *The use*

- of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza: CIHEAM. 86: 177 - 186.
- Ewart, K.V., J. Williams, R.C. Richards, J.W. Gallant *et al.* (2008) The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Dev Comp Immunol.* 32: 380-390.
- FAO (2007). Food and Agricultural Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy.
- FAO (2012). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma, Italia.
- Fast, M.D. (2013) Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental and comparative immunology.* 43: 300-312.
- Fast, M.D., N.W. Ross, A. Mustafa, D.E. Sims *et al.* (2002) Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Diseases of aquatic organisms.* 52: 57-68.
- Fast, M.D., J.F. Burka, S.C. Johnson, y N.W. Ross (2003) Enzymes released from *Lepeophtheirus salmonis* in response to mucus from different salmonids. *The Journal of parasitology.* 89: 7-13.
- Fast, M.D., S.C. Johnson, T.D. Eddy, D. Pinto *et al.* (2007) *Lepeophtheirus salmonis* secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation. *Parasite immunology.* 29:179-189.
- Ferguson, HW. (2006) *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissue Responses in Teleosts, and Their Responses in Disease.* Second Edition. Scotian Press.
- Fillatreau, S., A. Six, S. Magadan, R. Castro *et al.* (2013) The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol.* 4: 28
- García-García, J.C., C. Montero, M. Redondo, M. Vargas *et al.* (2000) Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 18: 2275-2287.
- Grayson, T.H., R.J. John, S. Wadsworth, K. Greaves *et al.* (1995) Immunization of Atlantic salmon against the salmon louse: identification of antigens and effects on louse fecundity. *Journal of Fish Biology.* 47: 85-94.
- Hamre, L.A., C. Eichner, C.M. Caipang, S.T. Dalvin *et al.* (2013) The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two Chalimus stages. *PLoS ONE* 8(9): e73539.
- Hansen, J. D., E.D. Landis, R.B. Phillips (2005) Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102: 6919-6924.
- Hernández, E., J. Figueroa, C. Iregui (2008) Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis* spp.) fish-farm: Case study. *J Fish Dis.* 32: 247-252.
- Heuch, P.A., P.A. Bjørn, B. Finstad, J.C. Holst *et al.* (2005) A review of the Norwegian 'National Action Plan Against Salmon Lice on Salmonids': The effect on wild salmonids. *Aquaculture.* 246: 79-92.
- Heuch, P., J. Nordhagen, T. Schram (2000) Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research.* 31: 805-814.
- Jonsson, N.N., A.L. Matschoss, P. Pepper, P.E. Green *et al.* (2000) Evaluation of tick- GARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol.* 88: 275-285.
- Kurella, S., M. Manocha, L. Sabhnani, B. Thomas *et al.* (2011) New age adjuvants and delivery systems for subunit vaccines. *Indian J Clin Biochem.* 15: 83-100.
- Kuzyk, M.A., J. Burian, D. Machander, D. Dolhaine *et al.* (2001). An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine.* 19: 2337-2344.
- Kvamme, B.O., P. Frost, F. Nilsen (2004) The cloning and characterisation of full length trypsin from the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. *Molecular and Biochemical parasitology.* 136: 303-307.
- Lewis, D.L., D.E. Barker, R.S. McKinley (2014) Modulation of cellular innate immunity by *Lepeophtheirus salmonis* secretory products. *Fish & Shellfish Immunology.* 38: 175-183.
- Lorenzen, N., S.E. LaPatra (2005) DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue scientifique et Technique. International Office of Epizootics.* 24: 201-213.
- Martínez, S. (2012) *Modulación de la respuesta inmune en trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss) frente a distintas estrategias vacunales antivirales, España.* Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- McClure, C., K.L. Hammell, I.R. Dohoo, P. Nerette *et al.* (2004) Assessment of infectious salmon anaemia virus

- prevalence for different groups of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in New Brunswick. Journal of fish diseases. 27: 375-383.
- Mordue, A.J., M.A. Birkett (2009) A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae: Copepoda). Journal of Fish Diseases. 32: 3-13.
- Moreno-Cid, J.A., J.M. Pérez de la Lastra, M. Villar, M. Jiménez *et al.* (2013) Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. Vaccine. 31: 1187-1196.
- Nuttall, P.A., A.R. Trimnell, M. Kazimirova, M. Labuda (2006) Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunol. 28: 155-63.
- Palic, D., J. Ostoji, C. Andreasen, J. Roth (2007) Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. Dev Comp Immunol. 31: 805-816.
- Penagos, G., P. Barato, C. Iregui (2009) Sistema inmune y vacunación de peces. Acta Biol. Colomb. 14(1): 3 - 24.
- Raynard, R.S., I.R. Bricknell, P.F. Billingsley, A.J. Nisbet *et al.* (2002) Development of vaccines against sea lice. Pest Management Science. 58: 569-575.
- Reilly, P., M. Mulcahy (1993) Humoral antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) immunised with extracts derived from the ectoparasitic caligid copepods, *Caligus elongates* (Nordmann, 1832) and *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1838). Fish&shellfish immunology. 3: 59-70.
- Rodríguez, M., L. Méndez, M. Valdez, M. Redondo *et al.* (2004) Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac, Exp. Appl. Acarol. 34: 375-382.
- Roestenberg, M., E. Remarque, E. de Jonge, R. Hermsen *et al.* (2008) Safety and Immunogenicity of a Recombinant *Plasmodium falciparum* AMA1 Malaria Vaccine Adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. PLoS One. 3: 1-12.
- Rombout, J., G. Yang, V. Kiron (2014) Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. Fish & Shellfish Immunology. 40: 634-643.
- Ross, N.W., S.C. Johnson, M.D. Fast, K.V. Ewart (2008). Patente No. US 2008/0003233A1: Recombinant vaccines against Caligid copepods (sea lice) and antigen sequences thereof.
- Ross, N.W., S.C. Johnson, M.D. Fast, K.V. Ewart (2012): Patente No. US 8207132B2: Recombinant vaccines against Caligid copepods (sea lice) and antigen sequences thereof.
- Rubio, M. (2010) Inmunología de los peces óseos. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu. 1: 47-57.
- Salinas, I., Y. Zhang, O.J. Sunyer (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. Developmental and Comparative Immunology. 35: 1346-1365.
- Schram, T., J. Knutsen, P. Heuch, T. Mo (1998) Seasonal occurrence of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongates* (Copepoda: Caligidae) on sea trout (*Salmo trutta*), off southern Norway. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil. 55: 163-175.
- Shivappa, R.B., McAllister P. E., Edwards G. H., Santi N., *et al.* (2005) Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system. Developments in Biologicals. 121: 165-74.
- Shoemaker, C.A., P.H. Klesius, J.M. Bricker (1999). Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. Aquaculture. 176: 189-193.
- Skugor, S., K.A. Glover, F. Nilsen, A. Krasnov (2008) Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). BMC genomics. 9: 498.
- Suárez, M., J. Rubi, D. Pérez, V. Córdova, *et al.* (2016) High impact and effectiveness of Gavac™ vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. Livestock Science 187: 48-52.
- Sutherland, J.G., K.W. Koczka, M. Yasuike, S.G. Jantzen *et al.* (2014) Comparative transcriptomics of Atlantic *Salmo salar*, chum *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* during infections with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*. BMC Genomics. 15: 200.
- Tadiso, T.R. (2012) Molecular characterisation of key components of the mucosal immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) and transcriptome analysis of responses against the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*), Noruega. Tesis de doctorado, Universidad de Bergen, Noruega.
- Tadiso, T.M., A. Krasnov, S. Skugor, S. Afanasyev *et al.* (2011) Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed biphasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. BMC genomics. 12: 141.
- Tacchi, L., R. Musharrafieh, E.T. Larragoite, K. Crossey *et al.* (2014) Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. Nat. Commun. 5: 5205

- Tafalla, C., J. Bøgvold, y R.A. Dalmo (2013) Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 1016.
- Torina, A., J.A. Moreno-Cid, V. Blanda, I.G.F.de Mera *et al.* (2014) Control of tick infestations and pathogen prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with there combinant Subolesin Major Surface Protein 1a chimeric antigen. *Parasites & vectors*. 7: 1-15.
- Torrissen, O., S. Jones, F. Asche, A. Guttormsen, *et al.* (2013) Salmon lice—impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of fish diseases*. 36: 171-194.
- Vásquez, M.A., S.R. Iang, P.R. Eslava (2012) Inmunoestimulantes en teleosteos: Probióticos, b-glucanos y LPS. *Orinoquia*. 16: 1.
- Vendrell, D., J.L. Balcázar, I. Ruiz, I. De Blas *et al.* (2013). Principios generales sobre la vacunación en peces. *Bio Tecnología*. 9: 3.
- Willadsen, P. (2004) Anti-tick vaccines. *Parasitology*. 129: 367-387.
- Willadsen, P. (2006) Tick control: thoughts on a research agenda, *Vet. Parasitol.* 138: 161–168.
- Willadsen, P., R.V. McKenna, G.A. Riding (1988) Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int J Parasitol.* 8: 183-189.
- Willadsen, P., D. Smith, G. Cobon, R.V. McKenna (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91, *Parasite Immunol.* 18: 241–246.
- Wotton, H.J., J.M. Covelto, S.L. Purcell, M.D. Fast (2013) *Lepeophtheirus salmonis* responses during a cohabitation of infected and uninfected Atlantic salmon. *Can. Soc. Zool. Meeting, Guelph, ON, May*: 13–17.
- Xu, Z., F. Takizawa, D. Parra, D. Gomez *et al.* (2016) Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods. *Nature Communication*, 7: 1-14.
- Zhang, Y.A., I. Salinas, J. Li, D. Parra *et al.* (2010) IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*. 11: 827-835.
- Zhu, L., L. Nie, G. Zhu, L. Xiang (2013) Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*. 39: 39–62.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso