

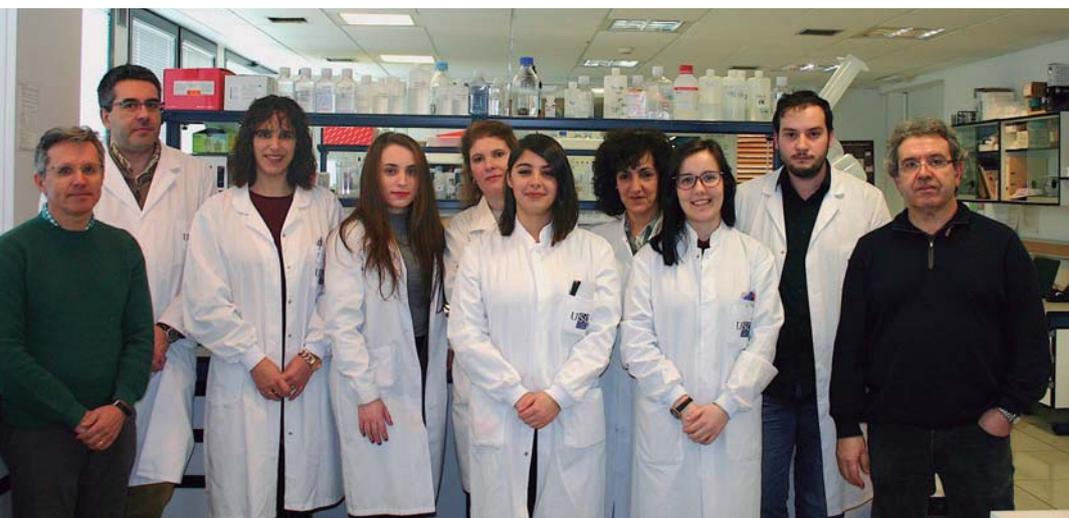
Escuticociliatosis: una grave parasitosis en la piscicultura del rodaballo

Jesús Lamas Fernández¹ y José Manuel Leiro Vidal²



¹Departamento de Biología Funcional, Instituto de Acuicultura

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios, Universidad de Santiago de Compostela.



Miembros del grupo de investigación de Inmunobiología de la escuticociliatosis del Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios y del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela.

El grupo de investigación de Inmunobiología de la escuticociliatosis está conformado por miembros de dos departamentos de la Universidad de Santiago de Compostela: el de Microbiología y Parasitología, y el de Biología Funcional, actuando como coordinadores los Profesores Jesús Lamas Fernández y José Manuel Leiro Vidal. El grupo se forma alrededor del año 2006 con la pretensión de aunar los conocimientos y experiencia relacionados con la inmunología celular en peces, aportada por los miembros del área de Biología Celular, y con los relativos a la Parasitología, sobre la idea de abordar un estudio integral de la interrelación hospedador-parásito producida en el ámbito de una enfermedad muy grave, denominada escuticociliatosis que ocasiona grandes pérdidas económicas en las piscifactorías del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.) en Galicia (Iglesias *et al.* 2001). Esta enfermedad está producida por un escuticociliado anfitriónico denominado *Philasterides dicentrarchi*, un protozoo originalmente de vida libre pero que, bajo determinadas condiciones, se puede transformar en un patógeno histiófago muy virulento para los peces planos en cultivo.

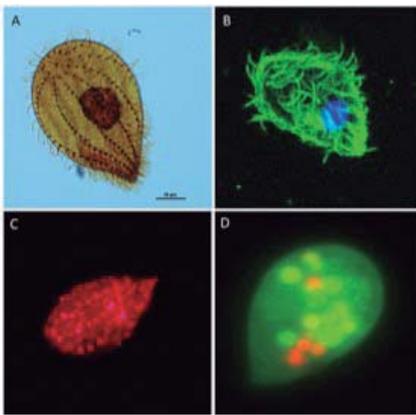
Por tanto, los objetivos principales de nuestro grupo de investigación se fundamentan en el desarrollo de métodos de prevención y control eficaces frente a esta enfermedad basados en el desarrollo de vacunas y de potenciales fármacos efectivos frente al parásito. Sin embargo, para la erradicación completa de esta enfermedad probablemente sea necesario recurrir a la combinación de varias actuaciones preventivas relacionadas con el manejo de los peces (higiene y control del estrés), mejora de la calidad parasitológica del agua mediante el empleo de agentes desinfectantes, administración en el alimento de compuestos que fortalezcan el sistema inmunitario de los peces y fármacos capaces de destruir al parásito, así como la aplicación de vacunas.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Las líneas de investigación a desarrollar, están relacionadas estrechamente con los objetivos multidisciplinarios descritos anteriormente, incluyendo: biología y epidemiología, immuno-

logía, diagnóstico, y prevención y control de la enfermedad.

En relación con la línea sobre el estudio de la biología y epidemiología, hemos de mencionar que nuestro grupo fue el primero en identificar el agente etiológico de la escuticociliatosis en el rodaballo en cultivo, demostrando que era el mismo que afectaba a la lubina, un ciliado histiófago denominado *P. dicentrarchi* (Iglesias *et al.* 2001; de Felipe *et al.* 2017) (Fig. 1A). Posteriormente desarrollamos un método de cultivo *in vitro* axénico para cultivar los ciliados masivamente y poder obtener el antígeno necesario para la preparación de vacunas (Iglesias *et al.* 2003a), así como desarrollar un procedimiento de criopreservación para conservar indefinidamente los ciliados manteniendo su virulencia (Folgueira *et al.* 2017). También hemos puesto a punto una técnica de infección experimental para validar la eficacia de vacunas, pudiendo demostrar las vías de penetración del ciliado que le permiten invadir y desarrollar la infección sistémica en el hospedador



Philasterides dicentrarchi. Morfología de un trofozoito teñido con plata amoniaca (A); cilios inmunoteñidos conteniendo alfa-tubulina (B); mitocondrias activas teñidas con MitoTracker Red CMXRos (C); variaciones en el pH intravacuolar mediante tinción con naranja de acridina.

(Paramá *et al.* 2003). Hemos demostrado que ese ciliado presenta una elevada variabilidad intraespecífica que se refleja en la existencia de varias cepas en diferentes piscifactorías, e incluso dentro de la misma piscifactoría (Budiño *et al.* 2011), lo que tiene una gran relevancia a la hora del desarrollo de vacunas.

En la línea de la inmunobiología de la escuticociliatosis, hemos demostrado que el ciliado es capaz de modular la capacidad opsonizante del suero y el estrés oxidativo de las células fagocíticas del rodaballo indicando su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria innata del hospedador (Leiro *et al.* 2004); sin embargo, el factor crítico en la defensa del hospedador frente a *P. dicentrarchi* lo constituyen factores humorales como el complemento, activado a través de la vía clásica (Piazzon *et al.* 2011).

Con la línea de prevención y control, intentamos buscar nuevos fármacos y desarrollar vacunas eficaces frente a la escuticociliatosis. En relación al uso potencial de fármacos frente a esta enfermedad, nuestros estudios se han centrado en la síntesis química y la evaluación *in vitro* de antiprotozoarios comerciales y, sobre todo, de productos naturales como los polifenoles (Leiro *et al.* 2004), investigando su mecanismo de acción a nivel del metabolismo energético del ciliado (Morais *et al.* 2013). El empleo de agentes antioxidantes nos ha permitido descubrir que este escuticociliado posee rutas metabólicas más propias de plantas que de animales como, por ejemplo, la existencia de una oxidasa alternativa en la respiración mitocondrial (Mallo

et al. 2013) (Fig. 1C), o de isoformas de pirofosfatasas inorgánicas translocadoras de H⁺ en vacuolas y sacos alveolares que, además de constituir importantes dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos (Mallo *et al.* 2015; Mallo *et al.* 2016), también tienen una gran relevancia a la hora de comprender los mecanismos de adaptación y transformación de organismos de vida libre en parásitos (Fig. 1D). Con respecto a la inmunoprofilaxis de la escuticociliatosis, pretendemos desarrollar una vacuna general que produzca una protección elevada y duradera. Nuestro grupo demostró que el parásito expresa antígenos de superficie que están relacionados con la generación de protección frente a la infección (Iglesias *et al.* 2003b) (Fig. 1B) y hemos desarrollado una vacuna con el ciliado inactivado que indujo una muy buena protección (Lamas *et al.* 2008); sin embargo, el adyuvante oleoso empleado en la vacuna provoca efectos secundarios adversos al pez (Noia *et al.* 2014) que se manifiestan en el incremento en la mortalidad y una disminución en su tasa de crecimiento.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las perspectivas futuras de nuestras investigaciones se centran en: mejorar la caracterización de las cepas del ciliado, incrementar los estudios genómicos y proteómicos para identificar y caracterizar antígenos protectores, desarrollar vacunas que contengan adyuvantes que produzcan menos efectos adversos, desarrollar métodos rápidos y específicos para cuantificar los niveles de ciliados en el agua y establecer parámetros de riesgo de infección en las piscifactorías y, finalmente, establecer dianas moleculares a nivel del metabolismo del parásito que nos aporten información para el diseño de nuevos fármacos frente a la enfermedad. Todos estos aspectos los estamos llevando a cabo actualmente a través de un proyecto europeo H2020 denominado ParafishControl, en el que se establecen las bases científicas y herramientas para prevenir y mitigar esta, y otras enfermedades parasitarias, de los peces de cultivo europeos.

BIBLIOGRAFÍA

Budiño B, Lamas J, Pata MP, Arranz JA, Sanmartín ML y Leiro J. (2011). Intraspecific variability in several isolates of *Philasterides dicentrarchi* (syn. *Miamiensis*

avidus), a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Vet Parasitol* 30: 1339-47.

de Felipe AP, Lamas J, Sueiro RA, Folgueira I y Leiro J. (2017). New data on flatfish scuticociliatosis reveal that *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are different species. *Parasitology* 144: 1394-411.

Folgueira I, de Felipe AP, Sueiro AR, Lamas J y Leiro J. (2017). Protocol for cryopreservation of the turbot parasite *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia). *Cryobiology* (en prensa).

Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Fernández J y Sanmartín ML. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Organ* 46: 47-55.

Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Aja C y Sanmartín ML. (2003a). *In vitro* growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Vet Parasitol* 111: 19-30.

Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Ubeira FM y Sanmartín ML. (2003b). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) expresses Surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology* 126: 125-34.

Lamas J, Sanmartín ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Ruiz de Ocenda MV, Barja JL y Leiro J. (2008). Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. *Aquaculture* 278: 22-6.

Leiro J., Arranz JA, Paramá A, Álvarez MF y Sanmartín ML. (2004). *In vitro* effect of the polyphenols resveratrol, mangiferin and (-)-epigallocatechin-3-gallate against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Dis Aquat Organ* 59: 171-4.

Mallo N, Lamas J y Leiro J. (2013). Evidence of an alternative oxidase pathway for mitochondrial respiration in the scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi*. *Protist* 164: 824-36.

Mallo N, Lamas J, Piazzon C, Leiro J. (2015). Presence of a plant-like proton-translocating pyrophosphatase in a scuticociliate parasite and its role as a possible drug target. *Parasitology* 142: 449-62.

Mallo N, Lamas J, de Felipe AP, Sueiro RA, Fontenla F y Leiro J. (2016). Enzymes involved in pyrophosphate and calcium metabolism as targets for anti-scuticociliate chemotherapy. *J Eukaryot Microbiol* 63: 505-15.

Morais P, Piazzon C, Lamas J, Mallo N y Leiro J. (2013). Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot. *Protist* 162: 206-17.

Noia M, Domínguez B, Leiro J, Blanco-Méndez J, Lu-zardo-Álvarez A y Lamas J. (2014). Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. *Fish Shellfish Immunol* 38: 244-54.

Paramá A, Iglesias R, Álvarez MF, Leiro J, Aja C y Sanmartín ML. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 217: 73-80.

Piazzon MC, Wiegertjes GF, Leiro J y Lamas J. (2011). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 30: 1339-47.