

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudios de la forunculosis en pez cebra mediante *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) y con una sonda fluorescente del sideróforo amonabactina

Estudos da forunculosis no peixe cebra mediante *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* marcada coa proteína verde fluorescente (GFP) e cunha sonda fluorescente do sideróforo amonabactina

Studies of furunculosis in zebrafish by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* labeled with the green fluorescent protein (GFP) and with a fluorescent probe of the siderophore amonabactin

Alumna: Ana Rodríguez Pedrouzo

Curso: 2021-2022. **Convocatoria:** Junio 2022

Directores: Mónica Folgueira Otero, Carlos Jiménez González

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dra. Mónica Folgueira Otero y Dr. Carlos Jiménez González por todo el apoyo, ayuda y confianza depositada en mí a la hora de emprender este trabajo.

A todos los que me ayudaron a desarrollar el trabajo y me enseñaron gran cantidad de cosas, Diana, Miguel, Diego.

A mi familia y amigas, por darme ayudarme a alcanzar mis metas, soportarme y animarme en los momentos más duros de la carrera. A mi pareja, por confiar siempre en mí, por formar parte de este camino y de los que vendrán.

Por último, a mis compañeros de grado, por todos los momentos vividos, buenos y malos. Gracias Lucía y Carlota por haber aparecido en mi vida y por poder compartir con vosotras todos estos años.

RESUMEN

El pez cebra (*Danio rerio*) es un potencial organismo modelo en el estudio de las enfermedades que afectan a los peces en la acuicultura, así como en su tratamiento posterior. Este trabajo se centra en el estudio de la forunculosis en el pez cebra, patología provocada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, que genera grandes pérdidas económicas en la industria acuícola. Se evaluó la mortalidad y las propiedades fluorescentes de *A. salmonicida* marcada con dos sondas fluorescentes en larvas de pez cebra. Las sondas empleadas son la proteína verde fluorescente (GFP) y un conjugado sideróforo amonabactina - sulforodamina B (AMB-SRB), cuyas propiedades se analizaron mediante microscopia de fluorescencia convencional y de barrido láser confocal. Se obtuvieron imágenes de la distribución de ambas sondas en las larvas de pez cebra y, en consecuencia, de *A. salmonicida*. Se demostró que la bacteria provoca un efecto nocivo sobre el pez cebra, llegando a provocar la muerte al exponerse a la mayor concentración ensayada. En cuanto a la fluorescencia de las sondas, la señal de ambas se observa en el tracto digestivo, mostrándose mayor intensidad con la bacteria marcada con GFP. Estos resultados son útiles para profundizar en el estudio de la forunculosis en peces de acuicultura.

Palabras claves: forunculosis, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, pez cebra, sondas fluorescentes, microscopia de fluorescencia, proteína verde fluorescente (GFP), conjugado sideróforo amonabactina – sulforodamina (AMB-SRB).

RESUMO

O peixe cebra (*Danio rerio*) é un potencial organismo modelo no estudo das enfermidades que afectan aos peixes na acuicultura, así como no seu tratamento posterior. Este traballo céntrase no estudo da furunculose no peixe cebra, patoloxía provocada por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, que xera grandes perdas económicas na industria acuícola. Avaliouse a mortalidade e as propiedades fluorescentes de *A. salmonicida* marcada con dúas sondas fluorescentes en larvas de peixe cebra. As sondas empregadas son a proteína verde fluorescente (GFP) e un conxugado sideróforo amonabactina - sulforodamina B (AMB-SRB), cuxas propiedades foron analizadas mediante microscopia de fluorescencia convencional e de varrido láser confocal. Obtivéronse imaxes da distribución de ambas sondas nas larvas de peixe cebra e, en consecuencia, de *A. salmonicida*. Demostrouse que a bacteria provoca un efecto nocivo sobre o peixe cebra, chegando a provocar a morte ao exponerse á maior concentración probada. En canto á fluorescencia das sondas, o sinal de ambas obsérvase no tracto dixestivo, mostrándose maior intensidade coa bacteria marcada con GFP. Estes resultados son útiles para profundizar no estudo da furunculose en peixes de acuicultura.

Palabras claves: furunculose, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, peixe cebra, sondas fluorescentes, microscopia de fluorescencia, proteína verde fluorescente (GFP), conxugado sideróforo – sulforodamina B (AMB-SRB).

ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is a potential model organism in the study of diseases that affect fish in aquaculture, as well as in their subsequent treatment. This work focuses on the study of furunculosis in zebrafish, a pathology caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, which generates large economic losses in the aquaculture industry. Mortality and fluorescent properties of *A. salmonicida* labeled with two fluorescent probes were evaluated in zebrafish larvae. The probes used are the green fluorescent protein (GFP) and the siderophore amonabactin - sulforhodamine B conjugate (AMB-SRB), whose properties were analyzed by conventional and confocal laser scanning fluorescence microscopy. Images of the distribution of both probes in zebrafish larvae and, consequently, of *A. salmonicida* was obtained. The bacteria was shown to cause a harmful effect on zebrafish, leading to death upon exposure to the highest concentration tested. As for the fluorescence of the probes, the signal of both is observed in the digestive tract, showing great intensity with the bacteria labeled with GFP. These results are useful to deepen the study of furunculosis in aquaculture fish.

Keywords: furunculosis, *A. salmonicida*, zebrafish, fluorescent probes, fluorescence microscopy, green fluorescent protein (GFP), siderophore amonabactin – sulforhodamine B conjugate (AMB-SRB).

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
$\lambda_{em/ex}$	Longitud de onda de emisión/excitación
ABC	<i>ATP Cassete</i>
ADNc	Ácido desoxirribonucleico circular
AMB	Amonabactina
CICA	Centro de Investigación Científicas Avanzadas
CM9	Medio mínimo de Miller con casaminoácidos al 0.2 %
CN	Control negativo
Da	Dalton
dpf	Días post-fecundación
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<i>gfp</i>	<i>Green fluorescent protein gene</i>
Gly	Glicina
h	Horas
HV	Higher values
M	Molar
OD ₆₀₀	Densidad Óptica medida a una longitud de onda de 600 nm
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
PBP	<i>Periplasmic Binding Protein</i>
PM	Peso molecular
RD	Real Decreto
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
Subsp.	Subespecie
SRB	Sulforodamina-B
Tyr	Tirosina
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PEZ CEBRA (<i>DANIO RERIO</i>).....	1
1.2	AEROMONAS SALMONICIDA Y FORUNCULOSIS.....	2
1.3	PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)	3
1.4	SONDA SIDERÓFORO – FLUORÓFORO	4
1.4.1	SIDERÓFOROS.....	4
1.4.2	SONDA FLUORESCENTE AMONABACTINA (AMB) – SULFORODAMINA B (SRB)6	6
2	OBJETIVOS.....	7
3	MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1	MANTENIMIENTO Y CRÍA DEL PEZ CEBRA.	8
3.2	MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i> .8	
3.2.1	MUTANTE <i>A. SALMONICIDA</i> SUBSP. <i>SALMONICIDA</i> MARCADO CON GFP	9
3.2.2	MUTANTE <i>A. SALMONICIDA</i> SUBSP. <i>SALMONICIDA</i> MARCADO CON AMB-SRB...9	
3.3	ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> EN LARVAS DE PEZ CEBRA.....	9
3.3.1	EXPOSICIÓN A LA BACTERIA <i>A. SALMONICIDA</i> SUBSP. <i>SALMONICIDA</i>	9
3.3.2	ENSAYO DE MORTALIDAD	10
3.3.3	ENSAYO DE FLUORESCENCIA	10
4	RESULTADOS.....	12
4.1	ENSAYO DE MORTALIDAD	12
4.2	ENSAYO DE FLUORESCENCIA.....	13
4.2.1	CEPA MUTANTE <i>A. SALMONICIDA</i> MARCADA CON GFP	13
4.2.2	CEPA MUTANTE <i>A. SALMONICIDA</i> MARCADA CON AMB-SRB.....	14
5	DISCUSIÓN.....	16
6	CONCLUSIONES	18
7	CONCLUSIÓNS.....	19
8	CONCLUSIONS.....	20
9	BIBLIOGRAFÍA.....	21

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo perteneciente a la familia Cyprinidae y subfamilia Rasborinae. Se caracteriza por su pequeño tamaño, entre 4 y 6 cm de longitud, cuerpo fusiforme comprimido lateralmente y con singulares franjas alternas claras y oscuras (*Figura 1*) que le dan su nombre común. (Spence et al., 2008). Esta especie presenta dimorfismo sexual y, en cuanto a la reproducción, son ovíparos con fecundación externa y tiempo de generación corto (Spence et al., 2008) (Moreno, 2013).



Figura 1: Visión lateral de un ejemplar de *Danio rerio* Longfin (TL) (Ruffieux, 2020).

En los últimos años, el pez cebra se ha convertido en uno de los organismos vertebrados más importante empleado como modelo en investigación (Talbot & Holpkins, 2000). Las características que lo hacen idóneo para su manipulación experimental son numerosas. Se trata de un pez pequeño, robusto, con rápido desarrollo (alcanzan la madurez sexual a los 3-4 meses), elevadas tasas de reproducción durante todo el año y gran número de descendientes (varios cientos de huevos por puesta), lo que permite mantener grandes cantidades de los mismos de forma sencilla y económica en el laboratorio. Por otro lado, la fecundación es externa y los embriones son transparentes (el desarrollo embrionario se observa en la *Figura 2*), lo que permite realizar un seguimiento del desarrollo de los órganos y los efectos de ciertos tratamientos farmacológicos o toxicológicos y también de manipulaciones genéticas empleando técnicas no invasivas (Moreno, 2013) (MacRae & Peterson, 2015).

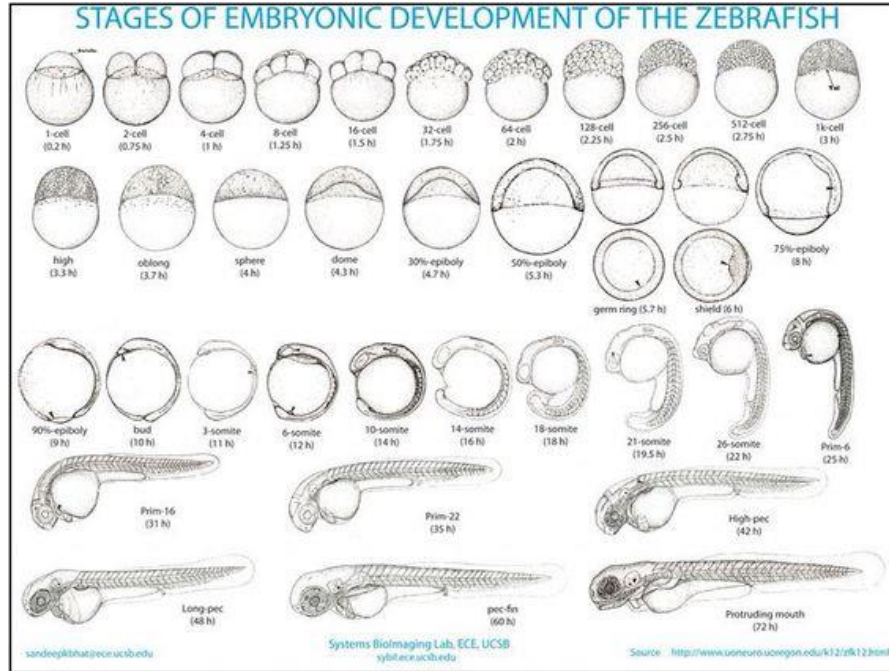


Figura 2: Estadios del desarrollo embrionario de *Danio rerio* (Kimmel et al., 1995).

Este organismo modelo ha sido de gran utilidad en numerosas áreas científicas, haciendo posible importantes avances en lo relativo al desarrollo de vertebrados y al modelado de enfermedades, incluso enfermedades infecciosas humanas. Además, el origen y desarrollo de una enfermedad en el pez cebra se parecen estrechamente al de peces salvajes y de piscifactorías enfermas (Spence et al., 2008) (Rowe, Withey, & Neely, 2014). Existen muchas formas de infección del pez cebra con patógenos, los cuales tienen que superar las barreras de defensa naturales para entrar en el cuerpo. Estas barreras son la mucosa externa, la epidermis y las escamas del pez. Una de las formas de infección es la inmersión de los individuos en agua con una concentración determinada del patógeno, también la inyección directa de bacterias en el huésped, entre otras (Rowe, Withey, & Neely, 2014).

1.2 AEROMONAS SALMONICIDA Y FORUNCULOSIS

Las bacterias del género *Aeromonas* son Gram-negativas, con forma de bacilos y anaeróbicas facultativas, responsables de numerosas enfermedades en peces, anfibios y réptiles al encontrarse principalmente en ambientes acuáticos (Dallaire-Dufresne et al., 2014). Sin embargo, también pueden encontrarse en el medio ambiente, desencadenando infecciones en humanos como gastroenteritis, conjuntivitis, septicemia y endocarditis. Las especies de *Aeromonas* son especialmente conocidas por las grandes pérdidas económicas que provocan en acuicultura a causa de sus infecciones y elevada resistencia

a antibióticos comunes, lo que hace relevante su estudio y prevención (Rowe, Withey, & Neely, 2014) (Janda & Abbott, 2010).

A. salmonicida es una especie psicrófila, que mide entre 1.3 y 2.0 por 0.8 y 1.3 μm , no móvil y compuesta por cinco subespecies (*salmonicida*, *achromogenes*, *masoucida*, *pectinolytica* y *smithia*). *A. salmonicida* (subsp. *salmonicida*) es el agente causante de la forunculosis en gran diversidad de peces (rodaballo, trucha, dorada, salmón), especialmente en los salmónidos. Esta enfermedad puede afectar de forma aguda con una septicemia acompañada de hemorragias en las aletas y falta de apetito, hasta de manera grave o crónica con septicemia acompañada de hemorragias en músculos y órganos internos, somnolencia e hinchazón ocular (Janda & Abbott, 2010). La temperatura óptima de crecimiento de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, en lo sucesivo denominada simplemente *A. salmonicida*, es de entre 22 y 25 °C (Dallaire-Dufresne et al., 2014).

1.3 PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)

La proteína verde fluorescente (GFP), producida por la medusa *Aequorea victoria*, es una proteína monomérica que presenta fluorescencia verde al ser irradiada con luz ultravioleta (UV) (Reid & Flynn, 1992). Se determinó su estructura de barril- β , el cual está formado por once hebras que rodean una hélice- α central como se observa en la *Figura 3*. Este plegamiento polipeptídico restringe al cromóforo y lo aísla del disolvente (Remington, 2011). El cromóforo se forma gracias a la ciclación y oxidación de tres aminoácidos internos (Ser 65, Tyr 66 y Gly 67) pertenecientes a la hélice central. Concretamente, el proceso de formación consta de tres etapas: una primera bastante lenta en la que ocurre el plegamiento de las proteínas sin ninguna modificación del cromóforo, una segunda en la que se cicla el tripéptido del cromóforo y, por último, la oxidación lenta del cromóforo ciclado (*Figura 4*) (Reid & Flynn, 1992).

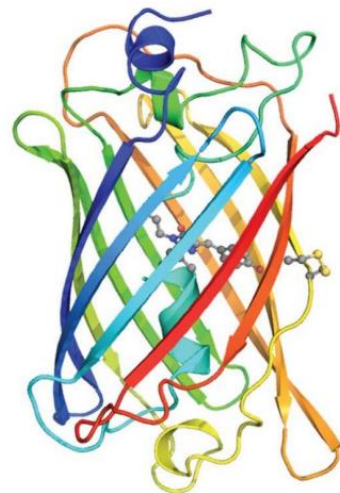


Figura 3. Diagrama esquemático de la estructura de GFP (Remington, 2011).

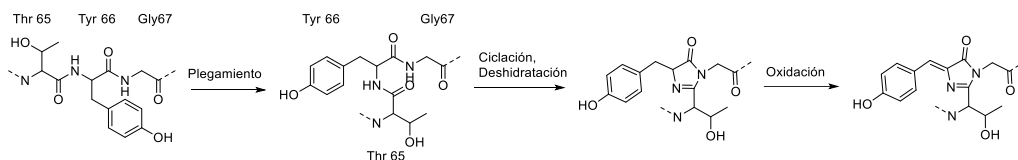


Figura 4. Esquema molecular de formación del cromóforo de GFP (Reid & Flynn, 1992).

La proteína verde fluorescente (GFP), que se codifica a partir del gen *gfp*, presenta fluorescencia intrínseca sin necesidad de ningún otro cofactor en huéspedes heterólogos (Southward & Surette, 2002). Esta expresión heteróloga del ADNc del *gfp* ha hecho posible la generación de proteínas con diferentes intensidades de fluorescencia o, incluso, modificaciones en sus espectros de excitación y emisión mediante mutación (Chalfie, 1995). Esto, junto con su detección no invasiva, ha hecho que la GFP y sus derivados se empleen en biología celular, biología del desarrollo, neurobiología y ecología como biomarcadores en la expresión génica, en la localización de proteínas en tejidos vivos y fijados y en las interacciones proteína-proteína (Chalfie, 1995) (Chalfie & Kain, 2005) (O'Toole et al., 2004). Es destacable el uso relativamente reciente de GFP como marcaje en bacterias, siendo de gran importancia para la biología celular microbiana (Southward & Surette, 2002). Las aplicaciones y tecnologías de la GFP están aumentando enormemente y algunas empresas la están usando en el descubrimiento de fármacos, en la evaluación de vectores virales para terapia génica humana, en el control de plagas, entre otras, por su fácil manipulación y bajo coste en comparación con otros marcadores como la luciferasa y la β -galactosidasa (Chalfie & Kain, 2005).

Este cromóforo puede encontrarse en forma aniónica o neutra, por ello se observan dos bandas de absorción y excitación en su espectro. La forma neutra absorbe radiación UV a unos 395 nm y la emite a 508 nm, mientras que la forma aniónica absorbe a unos 475 nm y emite a 503 nm, siendo fluorescente en ambos casos (Remington, 2011).

1.4 SONDA SIDERÓFORO – FLUORÓFORO

1.4.1 SIDERÓFOROS

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (PM=500-1500 Da) con elevada afinidad y selectividad por el hierro, que son sintetizados y utilizados por muchos microorganismos como bacterias y hongos (Hider & Kong, 2010). El hierro es un elemento esencial para estos organismos, actuando como cofactor de numerosas enzimas implicadas en procesos metabólicos y participando en procesos como la síntesis de ácidos

nucleicos, reparación del DNA y regulación génica (Hider & Kong, 2010) (Klemm, Vejborg, & Hancock, 2010).

Muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas sintetizan los sideróforos como mecanismo para captar el hierro que necesitan, por ejemplo, cuando infectan a un huésped. Los sideróforos pueden ser clasificados en función del tipo de ligando bidentado de su estructura en catecolatos, hidroxamatos y α -hidroxicarboxilatos. Las bacterias suelen secretarlos al medio extracelular, donde forman el complejo sideróforo-Fe(III), y seguidamente lo reintroducen por diferentes mecanismos en función del microorganismo (Wilson et al., 2016).

A. salmonicida es una bacteria Gram negativa, es decir, presenta una membrana externa de fosfolípidos y lipopolisacáridos junto con una capa de peptidoglicano, seguido del espacio periplasmático y finalmente se encuentra la membrana interna. Los complejos sideróforo-Fe(III) son reconocidos por proteínas de membrana externas (OMP), que sufren un cambio conformacional y los introducen en el periplasma. Una vez aquí, las proteínas de unión periplásmicas (PBP) los transportan a la membrana interna, donde un transportador de tipo ABC (dependiente de ATP) los bombea al citoplasma. Finalmente, el hierro se libera por acción de una reductasa o degradación enzimática del sideróforo (Fan & Fang, 2021). (Raines et al., 2015).

El equipo de investigación de PRONAMAR, conjuntamente con el equipo de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela liderado por el profesor M. Lemos, descubrió que *A. salmonicida* produce dos tipos de sideróforos de tipo catecolato: acinetobactina y amonabactinas (Balado et al., 2015). Además, lograron determinar que FstB es la proteína de membrana externa (OMP) que reconoce acinetobactina, mientras que FstC es la que reconoce las amonabactinas. También encontraron que la proteína FstC se caracteriza por su gran plasticidad ya que es capaz de reconocer complejos férricos de distintas variantes estructurales de las amonabactinas y que es necesaria la presencia de una estructura de tipo biscatecolamida en el compuesto para que tenga lugar el reconocimiento molecular (Rey-Varela et al., 2019).

1.4.2 SONDA FLUORESCENTE AMONABACTINA (AMB) – SULFORODAMINA B (SRB)

La síntesis de conjugados sideróforo-fluoróforo es muy interesante para estudiar los mecanismos de captación de Fe(III) por parte de los organismos que secretan sideróforos o para detectar la presencia de Fe(III) (Zheng & Nolan, 2012). Los conjugados con el fluoróforo sulforodamina B (SRB) son una buena elección, ya que su fluorescencia no se ve extinguida al coordinarse con el Fe(III) (Cisneros-Sureda et al., 2022).

La sonda AMB-SRB, preparada por el grupo PRONAMAR que se muestra en la *Figura 5*, al igual que la GFP, absorbe radiación de una determinada longitud de onda y emite parte de la energía en forma de luz. Concretamente, el fluoróforo SRB presenta un pico de excitación a 554 nm y uno de emisión a 576 nm (Thermo Fisher Scientific Corporation, 2021). Para su síntesis se llevó a cabo una reacción tipo *click*, concretamente una sulfamichael entre un bloque previamente construido de maleimida-SRB y un análogo de amonabactina tiolado (AMB-tiol). Este grupo ha demostrado recientemente que es captada por *A. salmonicida* en medio deficiente de hierro y que la introduce a través de la FstC. Además, es selectiva para *A. salmonicida* frente a las dos bacterias patógenas de peces *Vibrio anguillarum* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estos resultados abren la posibilidad para su aplicación en la detección de esta bacteria patógena en la industria acuícola (Cisneros-Sureda et al., 2022).

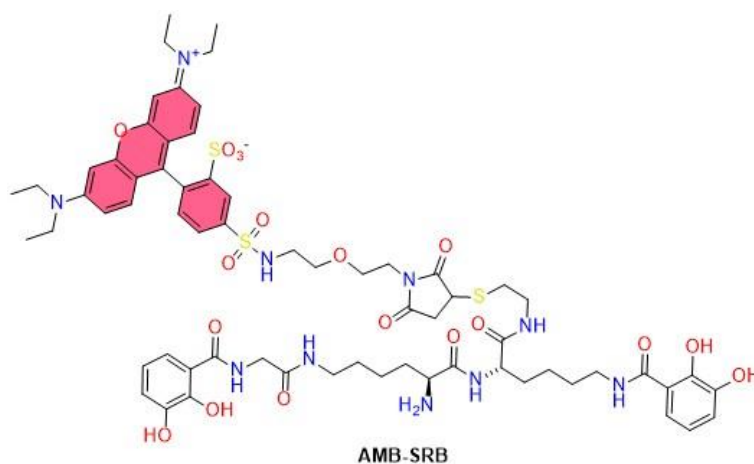


Figura 5. Estructura de la sonda fluorescente AMB-SRB

2 OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es realizar un estudio de la forunculosis en el pez cebra empleando la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) y con la sonda fluorescente AMB-SRB, basada en el sideróforo de tipo amonabactina, para llevar a cabo una monitorización de la infección. Para ello se plantearon 3 objetivos específicos:

1. Evaluar la mortalidad y signos de enfermedad tras la exposición a *A. salmonicida* en larvas de pez cebra (*Danio rerio*).
2. Analizar las propiedades fluorescentes, internalización y distribución de un mutante de *A. salmonicida* marcado con la proteína verde fluorescente (GFP) en larvas de pez cebra.
3. Analizar las propiedades fluorescentes, internalización y distribución de un mutante de *A. salmonicida* marcado con el conjugado amonabactina (AMB) – sulfurodamina B (SRB) en larvas de pez cebra.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MANTENIMIENTO Y CRÍA DEL PEZ CEBRA.

El tratamiento y manipulación tanto de los peces adultos como de los embriones y las larvas se ha desarrollado siguiendo la normativa de experimentación animal recogida en el RD 53/2013 y la Directiva 10/63/UE. Los individuos de pez cebra (*Danio rerio*) empleados pertenecen a la línea salvaje *Tupfel long fin* (TL). Los adultos se mantienen a una temperatura de 28°C y bajo ciclos de luz de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad en un sistema de acuarios comercial (Aquaneering) en el CICA.

El pez cebra presenta dimorfismo sexual, por lo que, es posible distinguir el sexo de los ejemplares. Para obtener la puesta, la tarde del día anterior se separaron machos y hembras adultos en orden de 1 macho : 1 hembra o 1 macho : 2 hembras en tanques de cría con agua del sistema de acuarios del que proceden, dejándolos durante toda la noche a 28°C en oscuridad. Al día siguiente, al encenderse la luz, se estimula la puesta y fecundación. Luego se recogieron los huevos con una rejilla, se depositaron en placas Petri con agua desclorada autoclavada y se dejaron 4 días en una estufa a 28°C hasta la exposición a la bacteria.

3.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO *AEROMONAS SALMONICIDA*

En primer lugar, se preparó una disolución de 2,2'-dipiridilo 0.01 M (15.6 mg/mL en H₂O Milli-Q y esterilizada con filtros 0.2 µm) y de la sonda AMB-SRB 0.721 mM (1 mg/mL en EtOH:H₂O Milli-Q).

Las dos cepas de *A. salmonicida* empleadas se cultivaron a 25 °C en medio mínimo de Miller con casaminoácidos al 0.2 % (CM9) deficiente en hierro con la adición del 2,2'-dipiridilo. A continuación, se muestran los ingredientes y cantidades necesarias para la preparación del medio CM9.

INGREDIENTES	PREPARACIÓN DEL MEDIO
1. Sales M9 10X	Sales M9 10X..... 100 mL
Na ₂ HPO ₄ 60 g	Glucosa 50%..... 10 mL
KH ₂ PO ₄ 30 g	Casaminoácidos 20%..... 10 mL
NaCl..... 50 g	CaCl ₂ -MgSO ₄ 1 mL

NH ₄ Cl..... 10 g	H ₂ O destilada.....879 mL
H ₂ O destilada..... 1000 mL	Para medio sólido, disolver 6 g (0.6%) de agarosa en el agua y esterilizar en autoclave, añadiendo los demás componentes asépticamente
Ajustar pH a 7.2 con NaOH	
2. Glucosa 50%	
3. Casaminoácidos 20%	
4. CaCl ₂ 0.01 M (1.47 g/L)	
5. MgSO ₄ 0.1 M (12.04 g/L)	
Esterilizar todo en autoclave	

3.2.1 MUTANTE *A. SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA* MARCADO CON GFP

La cepa de *A. salmonicida* con el gen de la proteína GFP integrado en su genoma fue suministrada por el grupo del Dr. Manuel Lemos de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

A 3 mL de medio mínimo CM9 se le añadieron 9 µL de 2,2'-dipiridilo 0.01 M (30 µM) y la bacteria marcada con GFP con un asa de siembra en condiciones asépticas. Se dejó incubando a 25°C y 200 rpm toda la noche. Al día siguiente, se siguió el crecimiento de la bacteria midiendo la OD₆₀₀ empleando un espectrómetro mySPEC (Modo = Cubeta; Longitud de la Trayectoria = 10 mm), hasta valores de 0.6-0.8, lo que significa una concentración viable de 4.8 x 10⁸ - 6.4 x 10⁸ bacterias/mL.

3.2.2 MUTANTE *A. SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA* MARCADO CON AMB-SRB

La cepa mutante de *A. salmonicida*Δ*ent*, obtenida por el grupo del Dr. M. Lemos en la USC no produce sideróforos. Esta cepa se cultiva en presencia de la sonda fluorescente AMB-SRB en lugar de marcarse con GFP. El cultivo se hace de igual forma que el de *A. salmonicida* marcada con GFP pero adicionando 54 µL de la sonda AMB-SRB (13 µM) y la bacteria se encuentra en este caso en un criovial preservado a -80 °C.

3.3 ESTUDIOS *IN VIVO* EN LARVAS DE PEZ CEBRA

3.3.1 EXPOSICIÓN A LA BACTERIA *A. SALMONICIDA* SUBSP. *SALMONICIDA*

Se utilizaron larvas de pez cebra de 4 días post-fecundación (dpf), que se colocaron, con una pipeta Pasteur, en pocillos con 500 µL de agua desclorada autoclavada.

Se llevaron a cabo dos clases de experimentos: de mortalidad en presencia de la bacteria y de fluorescencia. En ambos casos, las larvas fueron expuestas a dos concentraciones de bacterias, del orden de 10^7 bacterias/mL (50 μ L de cultivo) y de 10^6 bacterias/mL (5 μ L de cultivo).

3.3.2 ENSAYO DE MORTALIDAD

Para el ensayo de mortalidad se utilizó una placa de 12 pocillos (Nuclon™ Delta Surface; ThermoFisher Scientific, EE. UU.) con 10 larvas de 4 dpf por pocillo. Se empleó una concentración de 10^7 bacterias/mL en 4 de los pocillos y una concentración de 10^6 bacterias/mL en otros 4, además de mantener 2 pocillos como control negativo sin exposición a bacterias. Las placas se incubaron a 28°C en oscuridad y se visualizaron cada 24 h hasta las 72 h empleando un estereomicroscopio, con el fin de visualizar signos de enfermedad que desencadenan la muerte como la ausencia de latido del corazón o de circulación sanguínea, así como cambios en el comportamiento de natación o falta de movimiento. Transcurridas las 72 h, los embriones se eutanasiaron con una sobredosis de anestésico metanosulfato de triclaína (MS-222, 150 mg/mL; Sigma-Aldrich, EE. UU.) en agua de los acuarios y se congelaron a -20°C.

El número de muertes se cuantificó y se calculó el porcentaje de mortalidad según la *Ecuación 1*.

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{n^{\circ} \text{ embriones muertos}}{n^{\circ} \text{ total embriones}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

3.3.3 ENSAYO DE FLUORESCENCIA

Por otro lado, el ensayo de fluorescencia se testó en placas de 4 pocillos con 6 larvas de 4 dpf por pocillo. Se utilizó una concentración de 10^7 bacterias/mL en 2 pocillos y 10^6 bacterias/mL en otros 2, tanto en el caso de *A. salmonicida* marcada con GFP como del mutante de *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB. Se mantuvieron también 2 pocillos como controles negativos, a los que no se añadieron bacterias. Las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad y la observación se llevó a cabo a las 24 y 48 h usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600FN, Servicio de Apoyo a la Investigación SAI, UDC). Previo a la observación, las larvas se lavaron 3 veces con agua desclorada autoclavada para eliminar las bacterias del medio y se anestesiaron con una dosis controlada de metanosulfato de triclaína al 150 mg/mL.

Para observar el carácter fluorescente del mutante *A. salmonicida* marcado con GFP y su localización en los embriones, se empleó el filtro eGFP (rango de excitación de 405.7 a 488 nm), mientras que con el mutante de *A. salmonicida* marcado con AMB-SRB se utilizó el filtro TRITC (307.2 a 561.0 nm). Además del microscopio fluorescente, para el análisis de la fluorescencia y distribución de la bacteria mutante marcada con AMB-SRB se utilizó también el microscopio confocal Nikon A1R (SAI) ($\lambda_{\text{ex}}= 561.4$ nm, $\lambda_{\text{em}}= 570-620$ nm, HV= 185, Offset= -1), obteniendo imágenes en campo claro y de fluorescencia más precisas. Al finalizar cada ensayo, las larvas se eutanasiaron de nuevo con una sobredosis de triclaína y se congelaron. El ensayo con *A. salmonicida* marcada con GFP se repitió 3 veces, mientras que con *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB se realizó 1 vez.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAYO DE MORTALIDAD

Tras 24 horas de la exposición a la bacteria ya se observaron síntomas evidentes de enfermedad en las larvas sometidas a una mayor concentración de *A. salmonicida*, concretamente una natación errática o anormal. A partir de las 24-48 horas se detectaron los primeros ejemplares muertos en los pocillos con la mayor concentración de bacteria (10^7 bacterias/mL): 4/40 larvas muertas (10% de mortalidad) a las 48 h y 26/40 larvas muertas (65% de mortalidad) a las 72 h, así como ausencia de natación en alguna de las larvas vivas, mientras que en los que contenían menos concentración (10^6 bacterias/mL) no murió ningún individuo incluso pasadas las 72 horas de estudio, aunque sí mostraron aparente malestar en la natación. En el control negativo (CN) sólo falleció una de las larvas de pez cebra a las 24 h y el resto presentaban una natación activa, sin ningún signo de incomodidad hasta finalizar el experimento.

En la *Figura 6* se representan gráficamente los porcentajes de mortalidad calculados (sumando todas las réplicas) para cada concentración ensayada en función del tiempo. De forma que, se observa un incremento de la mortalidad con el tiempo con la concentración de 10^7 bacterias/mL, mientras que con 10^6 bacterias/mL se mantiene a 0.

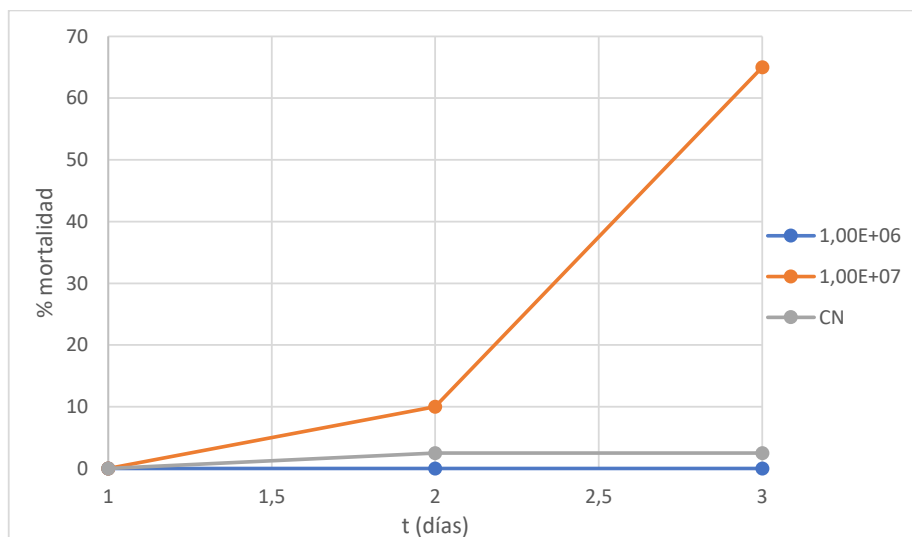


Figura 6. Evolución de la tasa de mortalidad de las larvas de pez cebra expuestas a *A. salmonicida* en las dos concentraciones ensayadas (10^6 bacterias/mL y 10^7 bacterias/mL) y en el control negativo (CN).

4.2 ENSAYO DE FLUORESCENCIA

4.2.1 CEPA MUTANTE *A. SALMONICIDA* MARCADA CON GFP

Se estudió la fluorescencia en las larvas expuestas a *A. salmonicida* marcada con GFP a las 24 y 48 horas de la exposición a dos concentraciones distintas de la bacteria, así como en el control. Se observó una mayor intensidad de fluorescencia en las larvas expuestas a una concentración de 10^7 bacterias/mL, siendo estos los resultados que se presentan. En un primer ensayo, se estudiaron a las 2.5 h de la exposición, pero dado que la diferencia de fluorescencia entre las larvas control y las marcadas no era apreciable, se decidió aumentar el tiempo de exposición.

Las larvas de pez cebra presentaron autofluorescencia en el vitelo, como se observa en las larvas control de la *Figura 7A*, que persistió durante todo el experimento. En las larvas expuestas con *A. salmonicida* marcada con GFP, además de mayor intensidad de fluorescencia en la zona del vitelo, también se observó en el tracto digestivo hasta la cloaca. A las 24 horas de la exposición, se distinguieron estructuras individuales fluorescentes en el interior del tracto digestivo (*Figura 7E*), aumentando de manera notoria a las 48 horas (*Figura 7C y 7F*).

Aunque la fluorescencia en las larvas expuestas a una concentración de bacterias de 10^6 mL⁻¹ también aumentó de las 24 a las 48 horas frente al control, la fluorescencia observada fue significativamente menor que en las expuestas a una concentración de 10^7 bacterias/mL.

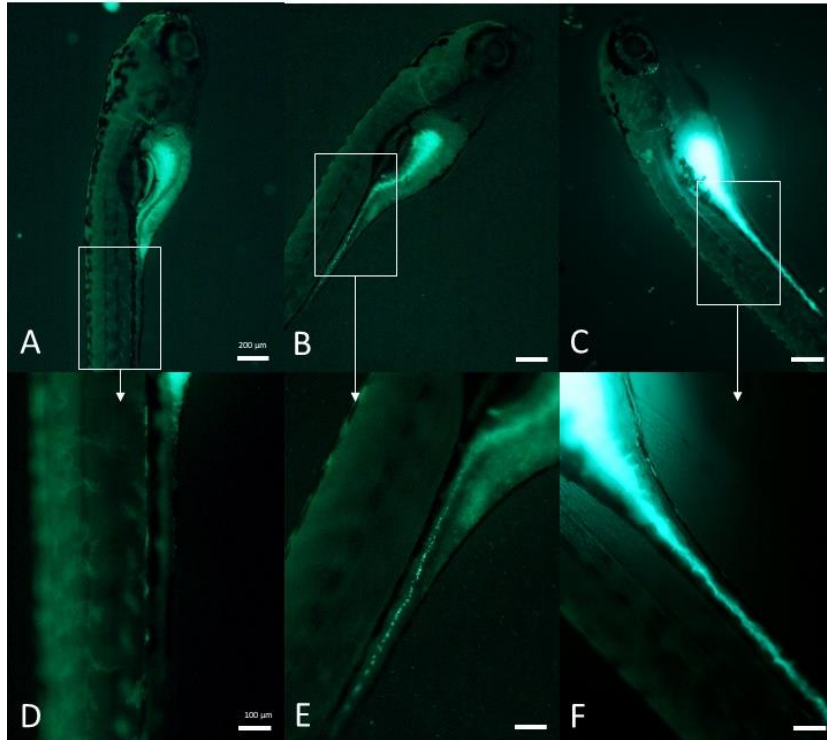


Figura 7. Fotografías de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) tomadas con el microscopio de fluorescencia. A) Control. B) Tras 24 horas de la exposición a *A. salmonicida* marcada con GFP. C) Tras 48 horas de la exposición. D) Detalle del control a nivel del tracto digestivo. E) Detalle de B a nivel del tracto digestivo. F) Detalle de C a nivel del tracto digestivo. Barras de escala: 200 μm (A-C), 100 μm (D-F)

4.2.2 CEPA MUTANTE *A. SALMONICIDA* MARCADA CON AMB-SRB

En este caso, no se observó la fluorescencia de forma tan clara al emplear el microscopio de fluorescencia convencional, por lo que se decidió usar también el microscopio confocal a las 48 horas de la exposición a una concentración de la cepa mutante de *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB de 10^7 bacterias/mL.

En las larvas expuestas a *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB, apenas se apreciaron diferencias en la fluorescencia con respecto a las larvas control a las 24 h. A las 48 h, la fluorescencia de las larvas expuestas fue más apreciable, aunque para visualizarla con mayor precisión se tuvo que emplear el microscopio confocal. Tanto en las larvas control como en los ejemplares expuestos a una concentración de 10^7 bacterias/mL se observó fluorescencia, aunque su intensidad fue mayor en las expuestas a la bacteria, como se puede apreciar en la *Figura 8*. Al igual que en el ensayo con *A. salmonicida* marcada con GFP, la fluorescencia se observó en el tracto digestivo.

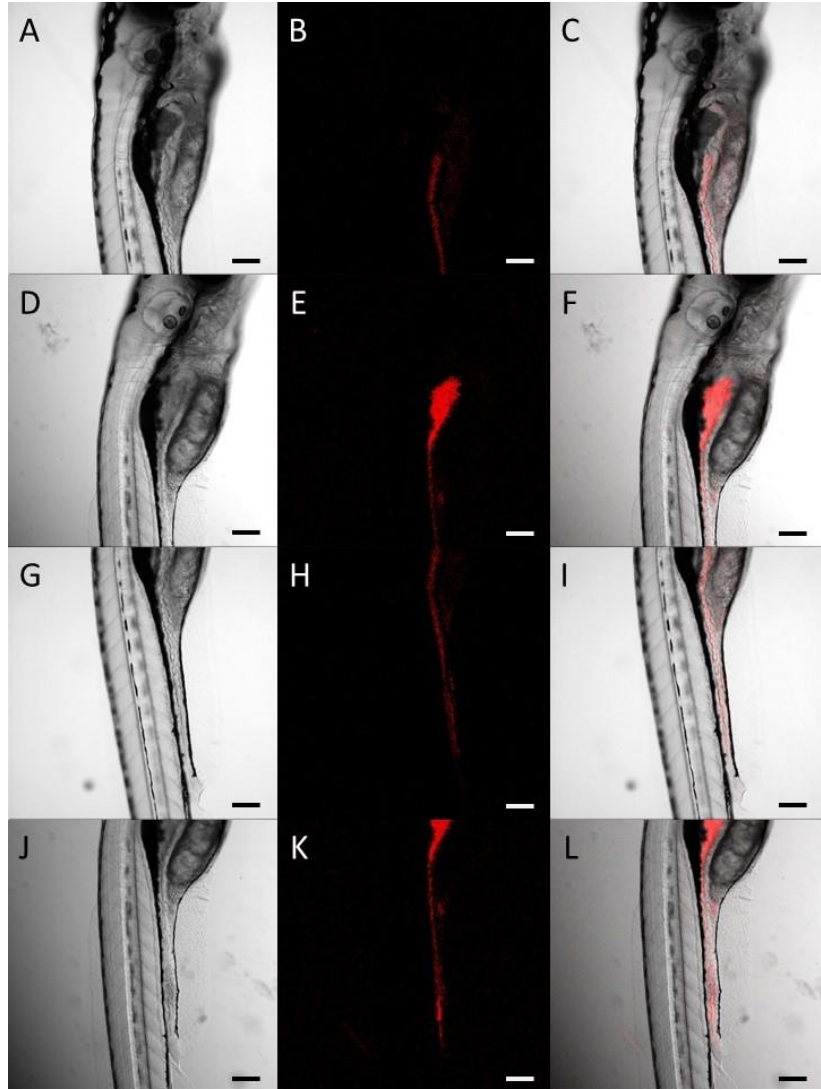


Figura 8. Fotografías de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) tomadas con el microscopio confocal. A-C/G-I) Control. D-F/J-L) Tras 48 horas de la exposición a *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB. A/D/G/J) Campo claro. B/E/H/K) Fluorescencia. C/F/I/L) Superposición de fluorescencia y campo claro. Barra de escala: 100 μ m.

5 DISCUSIÓN

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo modelo ideal para el estudio del desarrollo y evolución de enfermedades. Dada la gran importancia del estudio de patologías en peces en el sector acuícola, en este trabajo se decidió evaluar los efectos de la forunculosis, provocada por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, en larvas de pez cebra a través de un ensayo de mortalidad, así como estudiar las regiones más afectadas o en las que se concentra mayor cantidad de la bacteria marcada a través de un ensayo de fluorescencia. Este pez es transparente en sus primeros días de vida, lo que permite el seguimiento de la enfermedad visualmente. Además, el hecho de recurrir a larvas y no a peces adultos, permite no infringir muchas de las leyes actuales sobre bienestar y experimentación animal.

En el estudio de mortalidad llevado a cabo a dos concentraciones de *A. salmonicida* (10^7 y 10^6 mL⁻¹), se pudo demostrar el daño que provoca la patología sobre las larvas de pez cebra. Ambas concentraciones desencadenan cambios en el comportamiento de los organismos, aunque sólo la de 10^7 bacterias/mL provoca la muerte en el rango de tiempo ensayado. Con la mayor concentración de bacteria ensayada, se obtuvo un 65% de mortalidad a las 72 horas, lo que significa que la bacteria es patógena para el pez cebra. En un estudio previo (Lin et al., 2007), se infectaron peces cebra adultos con dos bacterias patógenas, *A. salmonicida* y *Staphylococcus aureus*, provocando también la muerte de los individuos.

El estudio publicado por O'Toole y col. en el 2004 (O'Toole et al., 2004) sirvió de ejemplo de infección de larvas de pez cebra, concretamente con *Vibrio anguillarum* marcado con GFP. En el presente trabajo, las imágenes de fluorescencia obtenidas tras la exposición de las larvas de pez cebra a *A. salmonicida* marcada con GFP parecen mostrar también infección bacteriana. La diferencia entre los resultados de ambos es el tiempo de exposición de las larvas y la fluorescencia observada. En el caso de *V. anguillarum*, las larvas marcadas se visualizaron a las 2 y 6 horas de la exposición, observándose una elevada fluorescencia en el tracto digestivo y en la superficie cutánea. Sin embargo, en el caso de *A. salmonicida*, se tuvo que esperar entre 24 y 48 horas para que se pudiera visualizar la fluorescencia de una forma clara y esta se limitó al tracto digestivo. Este resultado sugiere que la infección con *V. anguillarum* es más rápida que con *A. salmonicida*.

No hay precedentes bibliográficos sobre la infección en larvas de pez cebra con conjugados de sideróforos con fluoróforos, como es el caso de la sonda AMB-SRB, siendo este el primer ejemplo donde se llevó a cabo este tipo de estudios. Las imágenes de las larvas expuestas a *A. salmonicida* marcada con AMB-SRB mostraron, de nuevo, fluorescencia en la región del tracto digestivo, aunque menos intensa que con GFP. Por tanto, ambas sondas sirven para detectar las zonas de las larvas de pez cebra que resultan ser más afectadas por la bacteria *A. salmonicida*. Los resultados obtenidos permiten considerar al pez cebra como un organismo modelo para el estudio de la forunculosis y extender el ensayo a otras especies de peces. Además, cabe destacar que los complejos de tipo sideróforo-fluoróforo son de especial interés para el desarrollo de nuevos antimicrobianos mediante la conjugación de análogos de sideróforos con antibióticos conocidos empleando la estrategia de *Caballo de Troya*.

6 CONCLUSIONES

La evaluación preliminar de los efectos de la forunculosis en larvas de pez cebra y las propiedades fluorescentes de *A. salmonicida* marcada con GFP y AMB-SRB permitió establecer las siguientes conclusiones:

1. Las pruebas de mortalidad llevadas a cabo en larvas de pez cebra confirmaron el malestar de los ejemplares tras la exposición, incluso a las concentraciones más bajas ensayadas. La mayor concentración de *A. salmonicida* (10^7 bacterias/mL) provocó un 65% de mortalidad de las larvas tras 72 horas de exposición.
2. La fluorescencia de *A. salmonicida* marcada con las sondas fluorescentes GFP y AMB-SRB se observó en el tracto digestivo de las larvas de pez cebra. La fluorescencia detectada fue mayor con el marcaje con GFP.
3. Tanto el uso del pez cebra como organismo modelo, como la utilización de ambas sondas, resultaron ser útiles en los estudios de infección por bacterias patógenas en peces y abre las puertas a futuras investigaciones e innovaciones en el sector de la acuicultura.
4. Este es el primer trabajo en el que se estudia la infección bacteriana en el pez cebra utilizando una bacteria marcada con una sonda fluorescente basada en un análogo de sideróforo producido por la propia bacteria conjugado con un fluoróforo.

7 CONCLUSIÓNS

A avaliación preliminar dos efectos da furunculose en larvas de peixe ceбра e as propiedades fluorescentes de *A. salmonicida* marcada con GFP e AMB-SRB levou ás seguintes conclusións:

1. As probas de mortalidade realizadas en larvas de peixe ceбра confirmaron o malestar dos exemplares tras a exposición, mesmo nas concentracións máis baixas ensaiadas. A maior concentración de *A. salmonicida* (10^7 bacterias/mL) provocou un 65% de mortalidade das larvas tras 72 horas de exposición.
2. A fluorescencia de *A. salmonicida* marcada coas sondas fluorescentes GFP e AMB-SRB obsérvouse no tracto dixestivo das larvas de peixe ceбра. A fluorescencia foi maior co marcaxe con GFP.
3. Tanto o uso do peixe ceбра coma organismo modelo, como a utilización de ambas sondas, pareceron ser útiles nos estudos de infección por bacterias patóxenas en peixes e abre as portas a futuras investigacións e innovacións no sector da acuicultura.
4. Este é o primeiro traballo no que se estuda a infección bacteriana no peixe ceбра utilizando unha bacteria marcada cunha sonda fluorescente baseada nun análogo de sideróforo producido pola propia bacteria conxugado cun fluoróforo.

8 CONCLUSIONS

Preliminary evaluation of the effects of furunculosis in zebrafish larvae and the fluorescent properties of *A. salmonicida* labeled with GFP and AMB-SRB led to the following conclusions:

1. Mortality tests carried out on zebrafish larvae confirmed that the discomfort of specimens after exposure, even at the lowest concentrations tested. The highest concentration of *A. salmonicida* (10^7 bacteria/mL) resulted in 65% mortality of larvae after 72 hours of exposure.
2. Exposition of zebrafish larvae to *A. salmonicida* labeled with GFP and AMB-SRB fluorescence probes displayed fluorescence in its digestive tract. This fluorescence was higher with GFP-labelling.
3. The use of zebrafish as a model organism, as well as the use of both probes, seems useful in this type of study and opens the door to future research and innovation in the aquaculture sector.
4. This is the first work in which bacterial infection in zebrafish is studied using a bacterium labeled with a fluorescent probe based on a siderophore analog produced by the bacterium itself conjugated with a fluorophore.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Balado, M., Souto, A., Vences, A., Careaga, V. P., Valderrama, K., Segade, Y., Rodríguez, J., Osorio, C., Jiménez, C., & Lemos, M. L. (2015). *Two Catechol Siderophores, Acinetobactin and Amonabactin, Are Simultaneously Produced by Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida Sharing Part of the Biosynthetic Pathway*. ACS Chemical Biology, 10(12), 2850–2860. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00624>
- Chalfie, M. (1995). *GREEN FLUORESCENT PROTEIN*. Photochemistry and Photobiology, 67: 509-544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Chalfie, M., & Kain, S. R. (2005). *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols* (2ª Ed.). John Wiley & Sons, 47:464.
- Cisneros-Sureda, J., Rey-Varela, D., Rodríguez, J., Balado, M., Lemos, M. L., & Jiménez, C. (2022). *Selective detection of Aeromonas spp. by a fluorescent probe based on the siderophore amonabactin*. Journal of Inorganic Biochemistry, 230:25. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-779242/v1>
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). *Virulence, genomic features, and plasticity of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida, the causative agent of fish furunculosis*. Veterinary Microbiology, 169(1-2), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.025>
- Fan, D., & Fang, Q. (2021). *Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics*. (E. B.V., Ed.) International Journal of Pharmaceutics, 597:12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>
- Fu, Y., & Finney, N. (2018). *Small-molecule fluorescent probes and their design*. (R. S. Chemistry, Ed.) Royal Society of Chemistry Advances, 8(51), 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/c8ra02297f>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). *Chemistry and biology of siderophores*. Natural Product Reports, 27(5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). *The genus Aeromonas: Taxonomy, pathogenicity, and infection*. Clinical Microbiology Reviews, 23(1), 35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B., & Schilling, T. (1995). *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Developmental Dynamics, 203(3), 253–310.
- Klemm, P., Vejborg, R. M., & Hancock, V. (2010). *Prevention of bacterial adhesion*. Applied Microbiology and Biotechnology, 88(2), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2805-y>
- Lin, B., Chen, S., Cao, Z., Lin, Y., Mo, D., Zhang, H., Gu, J., Dong, M., Liu, Z., & Xu, A. (2007). *Acute phase response in zebrafish upon Aeromonas salmonicida and Staphylococcus aureus infection: Striking similarities and obvious differences with mammals*. Molecular Immunology, 44(4), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.03.001>
- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). *Zebrafish as tools for drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery, 14(10), 721–731.

- Moreno, F. M. (2013). Trabajo de Fin de Grado. *Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (Danio rerio)*. Universidad del país Vasco. Facultad de Ciencia y Tecnología, Leioa.
- O'Toole, R., von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E., & Wolf-Watz, H. (2004). *Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 37(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2004.03.001>
- Raines, D. J., Sanderson, T. J., Wilde, E. J., & Duhme-Klair, A-K. (2015). *Siderophores*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11040-6>
- Reid, B. G., & Flynn, G. C. (1997). *Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein*. *Biochemistry*, 36(22), 6786–6791. <https://doi.org/10.1021/bi970281w>
- Remington, S. J. (2011). *Green fluorescent protein: A perspective*. *Protein Science*, 20(9) 1509–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.684>
- Rey-Varela, D., Cisneros-Sureda, J., Balado, M., Rodríguez, J., Lemos, M. L., & Jiménez, C. (2019). *The outer membrane protein fstc of aeromonas salmonicida subsp. salmonicida acts as receptor for amonabactin siderophores and displays a wide ligand plasticity. structure-activity relationships of synthetic amonabactin analogues*. *ACS Infectious Diseases*, 5(11), 1936–1951. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.9b00274>
- Rowe, H. M., Withey, J. H., & Neely, M. N. (2014). *Zebrafish as a model for zoonotic aquatic pathogens*. (E. Ltd, Ed.) *Developmental and Comparative Immunology*, 46(1), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.014>
- Ruffieux, L. (2020). *Studying zebrafish behaviour: robotics and automation*. Obtenido de <https://bionomous.ch/articles/robots-to-study-zebrafish-behaviours/>
- Southward, C., & Surette, M. (2002). *The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light*. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1191–1196. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03089.x>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Talbot, W. S., & Holpkins, N. (2000). *Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome*. *Genes & Development*, 14(7), 755–762. <https://doi.org/10.1101/GAD.14.7.755>
- Thermo Fisher Scientific Corporation (2021). *Certificate of Analysis (Sulforhodamine B)*. Life Technologies S103, Lote 2384022
- Wilson, B. R., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., & Hashimoto, K. (2016). *Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential*. *Trends in Molecular Medicine*, 22(12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Zheng, T., & Nolan, E. M. (2012). *Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens*. *Metallomics*. 4(9), 866–880. <https://doi.org/10.1039/c2mt20082a>