



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN
ANIMAL, BROMATOLOGÍA y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

**RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE LA DORADA
(*Sparus aurata*) FRENTE A *Photobacterium damsela*
*subsp. piscicida***

**Félix Acosta Arbelo
Las Palmas de Gran Canaria, 2002**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Tesis Doctoral presentada por **D. Félix Antonio Acosta Arbelo**

Dirigida por el **Dr. D. Fernando Real Valcárcel**

El Director

El Doctorando

Fernando Real Valcárcel

Félix Acosta Arbelo

Las Palmas de Gran Canaria, 2002

FERNANDO REAL VALCÁRCEL, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que D. Félix Antonio Acosta Arbelo, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA DE LA DORADA (*Sparus aurata*) FRENTE A *Photobacterium damselae subsp. piscicida***", el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, 2002

Fdo. Fernando Real Valcárcel

***A mi familia, y
en especial a Patri,
mi amor lindo***

ÍNDICE



ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ESQUEMAS.....	I
ABREVIATURAS.....	IX
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II.1.- ESTUDIO DE LA PASTERELOSIS.....	7
II.1.1.- Importancia de la enfermedad en acuicultura continental y marina.....	7
II.1.2.- Etiología.....	9
II.1.3.- Epidemiología.....	15
II.1.4.- Patogenia.....	18
II.1.5.- Clínica.....	21
II.1.6.- Lesiones.....	23
II.1.6.1.- Lesiones macroscópicas.....	23
II.1.6.2.- Lesiones microscópicas.....	25
II.1.7.- Diagnóstico.....	30
II.1.8.- Control de la enfermedad.....	34
II.1.8.1.- Quimioterapia.....	34
II.1.8.2.- Inmunoprofilaxis.....	35
II.2.- MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN DE LOS TELEÓSTEOS.....	39
II.2.1.- Sistema inmune.....	39
II.2.1.1.- Órganos linfoides primarios.....	40
II.2.1.2.- Órganos linfoides secundarios.....	41
II.2.2.- Sistema inmune celular.....	42
II.2.2.1.- Macrófagos.....	42
II.2.2.2.- Granulocitos.....	45
II.2.2.3.- Células citotóxicas no específicas.....	46

II.2.3.- Mecanismos para destruir microorganismos fagocitados.....	47
II.2.3.1.- Mecanismos oxígeno dependientes.....	48
III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
III.1.- ANIMALES SOMETIDOS A ESTUDIO.....	55
III.2.- ORIGEN Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Photobacterium damsela</i> subespecie piscicida UTILIZADAS.....	56
III.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	57
III.4.- MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS EN CADA EXPERIENCIA.....	58
III.4.1.- EXPERIENCIA I.- Actividad bactericida del óxido nítrico y los peroxinitritos sobre <i>Photobacterium damsela</i> subespecie piscicida.....	58
III.4.2.- EXPERIENCIA II.- Peces infectados experimentalmente con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>.....	68
III.4.2.1.- Experiencia preliminar.....	68
III.4.2.2.- Infección experimental.....	69
III.4.2.3.- Inoculación de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	71
III.4.2.4.- Determinación de la concentración de nitritos en el suero sanguíneo.....	72
III.4.2.5.- Determinación de L-citrulina.....	76
III.4.2.6.- Aislamiento de macrófagos.....	78
III.4.2.7.- Extracción del ARN.....	79
III.4.2.8.- Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	81
III.4.2.9.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	81

III.4.3.-EXPERIENCIA III.- Inmunización frente a <i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida e infección posterior”	86
III.4.3.1.- Elaboración de la vacuna.....	87
III.4.3.2.- Protocolo de inmunización.....	88
III.4.3.3.- Determinación de la concentración de nitratos y L-citrulina en cultivos de macrófagos <i>in vitro</i>	89
III.4.3.4.- Estudio de la “explosión respiratoria”	91
III.4.3.5.- Producción de los factores activadores de los macrófagos (MAF).....	92
III.4.3.6.- Determinación de la “explosión respiratoria”	92
III.5.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	97
IV.- RESULTADOS	99
IV.1.- COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÁPSULA EN <i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida	99
IV.2.- EXPERIENCIA I	99
IV.2.1.- Actividad bactericida del óxido nítrico y los peroxinitritos sobre <i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida	99
IV.2.1.1.- Toxicidad del óxido nítrico.....	99
IV.2.1.2.- Toxicidad de los peroxinitritos.....	102
IV.3.- EXPERIENCIA II	106
IV.3.1.- Experiencia preliminar	106
IV.3.2.- Respuesta de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) frente a la infección experimental con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida	107
IV.3.2.1.- Determinación de nitritos en el suero sanguíneo	107
IV.3.2.2.- Determinación de L-citrulina en el suero sanguíneo.....	110
IV.3.2.3.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible... ..	113

IV.4.- EXPERIENCIA III.....	113
IV.4.1.- Respuesta inmune de la dorada (<i>Sparus aurata</i>) tras la vacunación con bacterina de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>. Comparación de los resultados con los peces infectados experimentalmente.....	113
IV.4.1.1.- Determinación de nitritos en el suero sanguíneo	113
IV.4.1.2.- Determinación de L-citrulina en el suero sanguíneo.....	116
IV.4.1.3.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible...	118
IV.4.2.- Producción de nitritos y L-citrulina por los macrófagos obtenidos de peces inmunizados.....	119
IV.4.2.1.- Determinación de nitritos.....	119
IV.4.2.2.- Determinación de L-citrulina.....	123
IV.4.3.- Estudio de la “explosión respiratoria”.....	126
VI.- TABLAS Y FIGURAS.....	127
VII.- DISCUSIÓN.....	161
VII.1.- EXPERIENCIA I.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LOS PEROXINITRITOS SOBRE <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>.....	164
VII.2.- EXPERIENCIA II.- RESPUESTA INMUNE DE LAS DORADAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>.....	168
VII.2.1.- Respuesta de la dorada frente a la infección experimental con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>.....	172
VII.2.2.- Respuesta inmune de la dorada tras la vacunación con bacterina de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y posterior infección.....	174
VIII.- CONCLUSIONES.....	181
IX.- RESUMEN.....	185
X.- SUMMARY.....	189

XI.- BIBLIOGRAFÍA.....	193
XII.- ANEXOS.....	225
ANEXO I.- DIRECCIONES DE LABORATORIOS Y CASAS COMERCIALES DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....	
XIII.- AGRADECIMIENTOS.....	227

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS



TABLAS

Tabla 1.-	Características bioquímicas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	12
Tabla 2.-	Principales diferencias bioquímicas entre <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> , otras pasterelas clínicas, <i>V. anguillarum</i> y <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	13
Tabla 3.-	Aislamientos de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	16
Tabla 4.-	Cepas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> utilizadas en este estudio.....	56
Tabla 5.-	Diluciones de la curva patrón de nitrato sódico.....	75
Tabla 6.-	Diluciones de la curva patrón de L-citrulina.....	77
Tabla 7.-	Protocolo de ciclos de la PCR.....	83
Tabla 8.-	Efecto del óxido nítrico en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	130
Tabla 9.-	Concentraciones de nitritos obtenidas en función de la concentración de SNAP añadida, y valores medios de supervivencia.....	131
Tabla 10.-	Efecto de la N-acetil penicilamina sobre la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	132
Tabla 11.-	Efecto del SIN-1 en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> capsulada.....	134



Tabla 12.-	Efecto del SIN-1 en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> no capsulada.....	134
Tabla 13.-	Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> capsulada.....	136
Tabla 14.-	Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> no capsulada.....	136
Tabla 15.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente.....	138
Tabla 16.-	Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente.....	140
Tabla 17.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	143
Tabla 18.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa DI-21 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	143
Tabla 19.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y tratadas con L-NAME.....	145



Tabla 20.-	Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	147
Tabla 21.-	Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa DI-21 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	147
Tabla 22.-	Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y tratadas con L-NAME.....	149
Tabla 23.-	Niveles de nitritos detectados en el suero de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con peces no infectados.....	152
Tabla 24.-	Niveles de L-citrulina detectados en el suero de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con peces no infectados.....	154
Tabla 25.-	Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, tratados con MAF, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	156
Tabla 26.-	Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, no tratados con MAF, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	156



Tabla 27.-	Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, tratados con MAF, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	158
Tabla 28.-	Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, no tratados con MAF, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	158
Tabla 29.-	Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida <i>in vitro</i> por los macrófagos de doradas no inmunizadas.....	160
Tabla 30.-	Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida <i>in vitro</i> por los macrófagos de doradas inmunizadas sin Adyuvante de Freund.....	160
Tabla 31.-	Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida <i>in vitro</i> por los macrófagos de doradas inmunizadas con Adyuvante.....	160

FIGURAS

Figura 1.-	Formación de óxido nítrico y L-citrulina a partir de Arginina.....	50
Figura 2.-	Esquema general de la reacción espectrofotométrica para la determinación de nitritos.....	74
Figura 3.-	Esquema del gradiente de percoll para la obtención enriquecida de macrófagos.....	79
Figura 4.-	Presencia de cápsula en función del medio de cultivo.....	129



Figura 5.-	Efecto del óxido nítrico en la supervivencia de <i>Photo-bacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	130
Figura 6.-	Concentraciones de nitritos obtenidas en función de la concentración de SNAP añadida, y valores medios de supervivencia.....	131
Figura 7.-	Efecto de la N-acetil penicilamina sobre la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	132
Figura 8.-	Efecto del SIN-1 en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	133
Figura 9.-	Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	135
Figura 10.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente.....	137
Figura 11.-	Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente.....	139
Figura 12.-	Resultado de la PCR para detectar iNOS en la experiencia preliminar.....	141
Figura 13.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	142
Figura 14.-	Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y tratadas con L-NAME.....	144



Figura 15.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	146
Figura 16.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> y tratadas con L-NAME.....	148
Figura 17.- Resultado de la PCR para detectar iNOS en la infección experimental.....	150
Figura 18.- Niveles de nitritos detectados en el suero de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con peces no infectados.....	151
Figura 19.- Niveles de L-citrulina detectados en el suero de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con peces no infectados.....	153
Figura 20.- Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	155
Figura 21.- Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, después de la infección con <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	157



Figura 22.- Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, infectadas con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*..... 159

ESQUEMAS

ESQUEMA 1.- Esquema de las reacciones químicas producidas *in vitro* por los donadores e inhibidores de óxido nítrico y peroxinitritos usados en el experimento..... 60

ESQUEMA 2.- Acción del óxido nítrico y los peroxinitritos..... 65

ESQUEMA 3.- Estudio comparado del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos..... 66

ESQUEMA 4.- Experiencia preliminar..... 84

ESQUEMA 5.- Infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*..... 85

ESQUEMA 6.- Experiencia de inmunización e infección posterior..... 95

ESQUEMA 7.- Estudio de la “Explosión respiratoria” y determinación de óxido nítrico y L-citrulina..... 96



ABREVIATURAS



ADnc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo

BHIB: Caldo Infusión Cerebro Corazón

BHIA: Infusión Cerebro Corazón Agar

CAT: Catalasa

DEPC: Dietil pirocarbamato

DL₅₀: Dosis letal cincuenta

ECps: Productos extracelulares

EPC: Célula epitelial de carpa

FBS: Suero fetal bovino

fg: Fentogramo

g: Fuerza de gravedad

Go: Glucosa oxidasa

gr: Gramo

HBSS: Solución balanceada de Hank

hrs: Horas

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

Kb: Kilobases

l: Litro

L-NAME: N^ω-nitro-l-arginina metil ester

LPS: Lipopolisacáridos

MAF: Factores activadores de los macrófagos

mg: Miligramo

min: Minuto

ml: Mililitro



MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-bromuro de difeniltetrazolium

NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato

NaCl: Cloruro sódico

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

nmol: Nanomoles

O₂⁻: Anión superóxido

ON: Óxido nítrico

P/S: Penicilina/estreptomicina

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pg: Picogramo

rpm: Revoluciones por minuto

SIN-1: 3-Morfolinosydnnonimina, HCl

SNAP: N-(β-D-Glucopyranosil)-N²-acetil-S-nitroso-D,L-penicilamina

SOD: Superóxido dismutasa

TNF-α: Factor de necrosis tumoral humano α

u.f.c.: Unidades formadoras de colonias

UI: Unidades internacionales

X: Xantina

Xo: Xantina oxidasa

μ: Micra

μg: Microgramo

μl: Microlitro

μm: Micrómetro



INTRODUCCIÓN



Photobacterium damsela subsp. *piscicida*, anteriormente conocida como *Pasteurella piscicida*, es el agente causal de la pasterelosis en los peces, una enfermedad descrita por primera vez en 1963 en poblaciones naturales de perca blanca (*Morone americanus*) y lubina estriada (*Morone saxatilis*) en la bahía de Chesapeake de EEUU (SNIEZKO y cols., 1964). En 1969, este patógeno demostró su importancia económica en la acuicultura del Japón, provocando grandes pérdidas en esta industria piscícola (KUSUDA y YAMAOKA, 1972). Aunque hasta hace algunos años Europa se consideraba libre de esta enfermedad, a comienzos de la década de los noventa empiezan a detectarse brotes epidémicos en diferentes países europeos, entre los que cabe citar, Francia (BAUDIN LAURENCIN y cols., 1991), Italia (CESCHIA y cols., 1991), España (TORANZO y cols., 1991, BALEBONA y cols., 1992; REAL y cols., 1997), Grecia (BAKOPOULOS y cols., 1995), Portugal (BAPTISTA y cols., 1996), Turquía (CANDAN y cols., 1996), Noruega (SPEILBERG y cols., 1991), Escocia (JONES y COX, 1999) y Malta (BAKOPOULOS y cols., 1997).

En la actualidad la expansión de la pasterelosis ha llegado a convertirse en un problema de primer orden en la acuicultura mundial. En el Archipiélago Canario es una de las enfermedades de mayor prevalencia y repercusión económica para la acuicultura, con una tendencia de presentación estacional, en épocas estivales. En los últimos años se ha intentado aclarar el mecanismo de acción patógena de esta bacteria, y aunque poco conocido hasta el



momento, si ha sido descrito que la presencia en determinadas condiciones de un polisacárido capsular en esta bacteria (BONET y cols., 1994), hace mucho más virulento a este patógeno (MAGARIÑOS y cols., 1996b; LÓPEZ-DORIGA y cols., 2000).

La respuesta inmune inespecífica de los peces frente a determinados patógenos es todavía un terreno poco explorado.

El óxido nítrico (ON) es un radical libre que se forma biológicamente a partir de la arginina por la acción de una familia de enzimas óxido nítrico sintasa. Esta familia de enzimas presenta tres isoformas, de las que dos son enzimas que se expresan de forma constitutiva, y que inicialmente se caracterizaron en neuronas (nNOS) y células endoteliales de mamíferos (eNOS), (MAYER y HEMMENS, 1997; KNOWLES y MONCADA, 1994; NATHAN y XIE, 1994). En cambio, una tercera isoforma, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se regula a nivel transduccional y transcripcional, es una isoforma no constitutiva que se asocia a la defensa celular inespecífica, actuando allí donde es requerida por la respuesta inmune celular (XIE y NATHAN, 1994; SCHMIDT y WALTER, 1994).

En los peces, inicialmente, la actividad de la óxido nítrico sintasa se describió asociada a las formas constitutivas de la enzima (eNOS y nNOS) (SCHOOR y PLUMB, 1994; SODESTROM y cols., 1995; WONG y cols., 1998).



Los cultivos primarios de macrófagos y las líneas celulares de macrófagos producen óxido nítrico cuando son estimulados con lipopolisacáridos bacterianos (NEUMMAN y cols., 1995; WANG y cols., 1995).

El óxido nítrico (NO) y los radicales superóxido (O_2^-) que se forman durante la “explosión respiratoria”, pueden reaccionar para formar peroxinitritos ($ONOO^-$), una de las especies de moléculas reactivas de nitrógeno, considerados también como un potente radical libre (ISCHIOROPOULOS y cols., 1992).

El óxido nítrico y los peroxinitritos son capaces de atacar diferentes tipos de enzimas como la citocromo oxidasa (STHUER y NATHAN, 1989), ribonucleótido reductasa (LEPOIVRE y cols., 1991), citocromo p450 (WINK y cols., 1993), aldolasa (KHAL y cols., 1978), y también enzimas que contienen un centro hierro-sulfurado como diferentes tipos de óxido reductasas (HYMAN y ARP, 1991) y la acotinasas (DRAPIER y HIBBS, 1988).

Este conjunto de enzimas esenciales inactivadas por el ON y los $ONOO^-$ comprometen las funciones fisiológicas que controlan, y por tanto genera un escenario de incompatibilidad con la vida, tanto para bacterias, virus, parásitos como células tumorales.

La forma inducible de la óxido nítrico sintasa así como el aumento de las tasas de ON séricas han sido demostradas



recientemente en peces (LAING y cols., 1996 y 1999, WANG y cols., 2001). Una secuencia parcial del gen de la iNOS ha sido descrita en peces (LAING y cols., 1999). La primera secuencia del gen de expresión de la iNOS en peces la describieron WANG y cols. (2001) en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Sin embargo, la expresión de esta enzima en los peces no se detectó *in vivo* hasta hace poco tiempo, y fueron CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b), los cuales tras infectar truchas arcoiris con *Renibacterium salmoninarum* encontraron incrementos de nitritos séricos, además de detectar la pauta de expresión de la enzima utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia parcial de LAING y cols. (1999).

El desconocimiento de cómo influyen algunos de estos eslabones en los mecanismos de patogenicidad de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (como la presencia o no de cápsula), y su implicación en la respuesta inmune inespecífica de la dorada, nos ha hecho plantearnos en este trabajo los siguientes objetivos:

1. CONOCER EL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
2. INVESTIGAR CÓMO INFLUYE LA INFECCIÓN POR *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EN LA DORADA (*Sparus aurata*) CON RESPECTO A LA VARIACIÓN DE LAS



CONCENTRACIONES DE NITRITOS Y L-CITRULINA EN EL SUERO SANGUÍNEO Y EN LOS MACRÓFAGOS AISLADOS DE ESTOS PECES.

3. CONSTATAR SI EXISTE CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LOS PECES DE ESTUDIO Y EL PERIODO DE TIEMPO POSTINOCULACIÓN EN QUE LAS CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO Y CITRULINA SE DETECTAN EN EL SUERO SANGUÍNEO.
4. COMPROBAR SI LA PRESENCIA DE CÁPSULA EN LA ESPECIE BACTERIANA EN ESTUDIO -*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*- INFLUYE EN LOS VALORES SEÑALADOS EN EL PUNTO ANTERIOR.
5. COMPARAR LOS VALORES DE LAS VARIABLES SEÑALADAS EN EL OBJETIVO 2 OBTENIDOS EN EL CURSO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON AQUELLOS OBTENIDOS EN DORADAS PREVIAMENTE INMUNIZADAS CON UNA BACTERINA, CON Y SIN ADYUVANTE DE FREUND INCOMPLETO.
6. DETECTAR LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (INOS), EN LOS TEJIDOS DE DORADA, Y EVALUAR SU CINÉTICA DE PRODUCCIÓN EN PECES INFECTADOS Y EN



LOS PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II.1.- ESTUDIO DE LA PASTERELOSIS

II.1.1.- Importancia de la enfermedad en acuicultura continental y marina.

En un principio esta enfermedad se denominó como pseudotuberculosis debido a la aparición de granulomas en el medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) y perca blanca (*Roccus americanus*). Posteriormente, pasó a llamarse pasterelosis, la cual es una enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas a las empresas que afecta. Este es un patógeno capaz de provocar mortalidades masivas en peces salvajes y en la acuicultura. Entre 1963 y 1967 se desarrollaron graves epizootias en la costa este de Estados Unidos, a partir de las cuales la industria acuícola en esa región decreció en un 42%. La única causa significativa de este decrecimiento se encontró en los brotes de la antiguamente encuadrada como *Pasteurella piscicida* (SINDERMAN, 1990).

HAWKE y cols. (1987) describen un brote de pasterelosis donde en un periodo de tres semanas mueren 49000 alevines, lo cual supuso un 80% del colectivo de peces.

En el primer brote de pasterelosis descrito en España, TORANZO y cols. (1991) reflejaron que se vieron afectados 26000 alevines en un periodo de 4 semanas, lo que suponía un 40% del colectivo.



BALEBONA y cols. (1992) describieron un brote de esta enfermedad en lubinas del sudoeste de España, donde entre septiembre y octubre de 1991 murieron 30000 peces, lo que supuso un 15% del total de animales producidos.

En una granja piscícola de jurel (*Pseudocaranx dentex*) en Japón, se produjo un brote de pasterelosis que provocó una pérdida de 10.000 animales en un mes, lo cual suponía el 34% del total de juveniles de la explotación (NAKAI y cols., 1992).

CANDAN y cols. (1996) estudiaron en Turquía un brote de este proceso, con unas pérdidas de unos 18250 peces, lo que representó el 9% del colectivo en un periodo de dos semanas.

En Portugal, BAPTISTA y cols. (1996) describen el primer brote de pasterelosis, donde se observaron mortalidades diarias entre 0.9 y 11%. Dicha enfermedad afectó a toda la población de alevines.

En Canarias el primer brote de esta enfermedad fue descrito por REAL y cols. (1997), viéndose afectados los animales juveniles de una explotación de lubinas, observándose mortalidades de unos 2000 peces diarios durante una semana. Estas cifras se han mantenido constantes en brotes sucesivos ocurridos de forma rutinaria cada verano desde ese año.



En Salmón Atlántico (*Salmo salar*), JONES y COX (1999) en su descripción de la enfermedad, reflejan una mortalidad muy baja, siendo esta desde abril a octubre, de un 6% total.

II.1.2.-Etiología

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*, anteriormente denominada *Pasteurella piscicida*, es un bacilo gram negativo inmóvil con una tinción bipolar (AUSTIN y AUSTIN, 1999), y no produce esporas. El tamaño de las células varía con las condiciones de cultivo. KOIKE y cols. (1975) describen tamaños desde 0.6-1.2 X 0.8-2.6 μm . Son polimórficas y pueden ser observadas desde formas de micrococos hasta largos bacilos dependiendo de las condiciones de cultivo. Para su cultivo se han usado diferentes medios como son el Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar Triptona-Neopeptona, Agar Levadura-Peptona, Agar leche y Agar Sangre, todos conteniendo entre un 1.5 y un 2% de NaCl (EGUSA, 1992). Observándose en estos medios colonias redondas, incoloras, semi-transparentes en forma de “gotas de rocío” y de consistencia pegajosa. En Agar Nutritivo también se cultiva pero su crecimiento no es tan bueno, siendo también inadecuado en otros medios líquidos como el Caldo Nutritivo y el Agua de Peptona. Aunque mal, algunas cepas seleccionadas pueden crecer en Agar MacConkey. No crece en Agar Salmonella-Shigella. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* presenta un metabolismo anaerobio facultativo (AUSTIN y AUSTIN, 1999).



El estudio de los caracteres tintoriales de esta bacteria fue muy controvertido hasta hace unos años al definir una de sus características más básicas, como la de si es o no una bacteria gram-negativa. KIMURA y KITAO (1971) afirmaron que el cultivo inicialmente es positivo y luego se vuelve negativo. SIMIDU y EGUSA (1972) describen que la bacteria retiene el cristal violeta cuando realizamos la tinción, pero que la decoloración no es igual de efectiva que en otros gram negativos. KUBOTA y cols. (1972) afirman que la bacteria exhibe una reacción gram positiva cuando la tinción es llevada a cabo sobre muestras de tejido. KUSUDA y YAMAOKA (1972) así como KOIKE y cols. (1975) afirman que la bacteria es gram-negativa. Descripciones posteriores como las de YASUNAGA (1983, 1984), TUNG y cols. (1985), UEKI y cols. (1990), TORANZO y cols. (1991), BALEBONA y cols. (1992), CANDAN y cols. (1996), BAPTISTA y cols. (1996), REAL y cols. (1997), KAWAKAMI y cols. (1999) y JONES y COX (1999) la describen siempre como una bacteria gram negativa.

Las propiedades bioquímicas de *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida* han sido descritas por numerosos autores. SNIEZKO y cols. (1963), JANSSEN y SURGALLA (1968), KIMURA y KITAO (1971), SIMIDU y EGUSA (1972), KUSUDA y YAMAOKA (1972) describieron las características bioquímicas de *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida* coincidiendo todos ellos de forma general en el comportamiento bioquímico de esta bacteria, exhibiendo unas características típicas como son el ser



inmóvil, oxidasa y catalasa positiva, tener un metabolismo fermentativo, ser sensible a la acción del agente vibriostático O/129 (AUSTIN y AUSTIN, 1999), no producir gas a partir de la glucosa y ser halófila (JANSEN y SURGALLA, 1968; MAGARIÑOS y cols., 1992a). Las características bioquímicas de los diferentes aislados de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* a lo largo del tiempo se muestran en la Tabla 1 (JANSEN y SURGALLA, 1968; YASUNAGA y cols., 1983, 1984; TORANZO y cols., 1991).

Esta bacteria se diferencia desde un punto de vista bioquímico del resto de bacterias pertenecientes al Género *Pasteurella* por no crecer a 37°C, por ser halófila y por no reducir los nitratos (MAGARIÑOS y cols., 1992a).



Tabla 1.- Características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

Gram	-	D-Tartrato	-
Tinción bipolar	-	Gelatinasa	-
Movilidad	-	Caseinasa	-
Crecimiento en:		Lipasa (Tween 80)	+
Agar Nutritivo	+	Fosfolipasa	+
Agar Marino	+	Amilasa	-
Caldo Nutritivo	+	Hemólisis de eritrocitos:	
Agua de Peptona	+	Oveja	+
Agar BHI+ 2% NaCl	+	Salmón	+
Agar SS	-	Rodaballo	+
Agar Sangre + 2% NaCl	+	Trucha	-
Agar McConkey	-	Producción de ácido a partir de:	
Crecimiento a:		Glucosa	+
5°C	-	Manosa	+
10°C	-	Galactosa	+
15°C	+	Fructosa	+
25°C	+	Maltosa	-
30°C	+	Sucrosa	-
37°C	-	Ramnosa	-
Crecimiento en:		Arabinosa	-
0% de NaCl	-	Amigdalina	-
0.5% de NaCl	+	Melibiosa	-
3% de NaCl	+	Manitol	-
5% de NaCl	-	Inositol	-
Citocromo oxidasa	+	Sorbitol	-
Catalasa	+	Glicerol	-
Rojo de metilo	+	Xilosa	-
Voges Proskauer	+	Lactosa	-
Producción de :		Trealosa	-
Índol	-	Rafinosa	-
Nitrato	-	Celibiosa	-
Amonio	-	Dextrina	-
Citrato	-	Inulina	-
Sulfídrico	-	Glicógeno	-
O/F (Glucosa)	F	Adonitol	-
Gas de glucosa	-	Inositol	-
Arginina dehidrolasa	+	Dulcitol	-
Lisina decarboxilasa	-	Eritritol	-
Ornitina decarboxilasa	-	Salicina	-
Triptófano desaminasa	-	Esculina	-
β-Galactosidasa	-		
Ureasa	-		
Resistencia a:			
Agente Vibriostático O/129	-		
Novobiocina	-		

+ Reacción positiva; - Reacción negativa; F Metabolismo fermentativo

Una serie de características bioquímicas que diferencian sin lugar a dudas a esta bacteria de otros patógenos comunes en acuicultura como son *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*



subsp. salmonicida, así como de otras *Pasteurellas sp.* son descritas por MAGARIÑOS y cols. (1992a). Dichas diferencias se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Principales diferencias bioquímicas entre *Photobacterium damselae subespecie piscicida*, otras pasterelas clínicas, *V. Anguillarum* y *Aeromonas salmonicida subespecie salmonicida*.

Especies	Ph. <i>Damselae</i> <i>subsp.</i> <i>piscicida</i>	P. <i>Multocida</i>	P. <i>Haemolítica</i>	A. Salmonicida <i>subsp.</i> <i>salmonicida</i>	V. <i>anguillarum</i>
Movilidad	-	-	-	-	+
Producción de Gas de glucosa:	-	-	-	+	-
Arginina dehidrolasa	+	-	-	+	+
Indol	-	+	-	-	+
Reducción de nitrato	-	+	+	+	+
Gelatinasa	-	-	-	+	+
Crecimiento a 37°C	-	+	+	-	V
Requerimiento de NaCl	+	-	-	-	+
Sensibilidad :					
O/129	S	S	S	R	S
Novobiocina	S	S	V	R	S

+ Reacción positiva; - Reacción negativa; V Reacción variable

MAGARIÑOS y cols. (1992a) han encontrado que todos los aislados del continente europeo, Japón y EEUU son bioquímicamente y antigénicamente similares, teniendo también patrones electroforéticos en sus lipopolisacáridos similares, así como unos perfiles similares en las proteínas de membrana.



SAKAI y cols. (1993) encontraron que seis de sus aislados presentaban una superficie hidrofóbica y que eran capaces de aglutinar eritrocitos de oveja.

Al obtener los perfiles de ácidos grasos de diferentes aislados de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*, ROMALDE y cols. (1995c) describen la similitud existente entre estos perfiles.

GAUTHIER y cols. (1995) basándose en el estudio del ARN ribosómico y relacionándolo con el ADN completo y con las características bioquímicas, reasigna a *Pasteurella piscicida* en una subespecie de *Photobacterium damsela*, aunque THYSSEN y cols. (1998) basándose en estudios morfológicos y bioquímicos concluyen que *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* está relacionado con especies del Género *Photobacterium* pero es fácilmente distinguible de *Photobacterium damsela* subespecie *damsela*, y que no se encuentra ninguna evidencia para encuadrarla como una subespecie de *Photobacterium damsela*.

La caracterización de cepas de esta bacteria utilizando la “*Amplified fragment length polymorphism*” (AFLP) realizada por THYSSEN y cols. (2000), demuestra que existe una homología entre *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* y *Photobacterium damsela* subespecie *damsela* de un 77%, lo cual ratifica la idea de una proximidad taxonómica. A pesar de todo esto



la denominación de “pasterelosis” se mantiene más por motivos de tipo histórico que por taxonómicos (DALY, 1999).

II.1.3.- Epidemiología

Photobacterium damsela subespecie *piscicida* ha sido aislada de peces enfermos en EEUU de América (SNIEZKO y cols., 1963; JANSSEN y SURGALLA, 1968; LEWIS y cols., 1970; HAWKE y cols., 1987), Japón (KIMURA y KITAO, 1971; KUSUDA y YAMAOKA, 1972; ONISHI y cols., 1982; YASUNAGA y cols., 1983, 1984; NAKAI y cols., 1992; KAWAKAMI y cols., 1999), Taiwan (TUNG y cols., 1985), España (TORANZO y cols., 1991; BALEBONA y cols., 1992; REAL y cols., 1997), Francia (BAUDIN LAURENCIN y cols., 1991), Grecia (BAKOPOULOS y cols., 1995), Turquía (CANDAN y cols., 1996), Italia (CESCHIA y cols., 1991), Portugal (BAPTISTA y cols., 1996), Malta (BAKOPOULOS y cols., 1997a), Noruega (SPEILBERG y cols., 1991), y Escocia (JONES y COX, 1999).

Además, este patógeno primario ha sido aislado de numerosas fuentes, afectando tanto a especies salvajes como de piscifactoría. Las diferentes especies afectadas se detallan en la Tabla 3 (obtenida del trabajo de DALY, 1999 y completada por nosotros).



Tabla 3.- Aislamientos de *Photobacterium damsela* subespecie piscicida

	Especie	País	Referencia
Perca blanca	<i>Roccus americanus</i>	EEUU	Sniezko y cols., 1964 Janssen y Surgalla 1968
Lacha tirana	<i>Brevoortia tyrannus</i>	EEUU	Lewis y cols., 1970
Mugil común	<i>Mugil cephalus</i>		
Mugil común	<i>Mugil cephalus</i>	Francia	B. Laurencin y cols., 1991
Medregal del Japón	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japón	Kimuar y Kitao 1971
Ayu	<i>Pecoglossus altivelis</i>	Japón	Kusuda y Miura 1972
Black sea bream	<i>Mylio macrocephalus</i>	Japón	Onishi y cols., 1982
Red sea bream	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Japón	Yasunaga y cols., 1983,1984
Oval file fish	<i>Navodan modestus</i>	Japón	Yasunaga y cols., 1983,1984
Largescale blackfish	<i>Girella punctata</i>	Japón	Kawakami y cols., 1999
Jurel	<i>Pseudocaranx dentex</i>	Japón	Nakai y cols., 1992
Snakehead fish	<i>Channa maculata</i>	Taiwan	Tung y cols., 1985
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	España	Balebona y cols. 1992
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Francia	B. Laurencin y cols., 1991
Lubina estriada	<i>Morone saxatilis</i>	EEUU de América	Sniezko y cols., 1964 Hawke y cols., 1987
Pejerrey	<i>Atherina boyeri</i>	Italia	Ceschia y cols., 1991
Bocinegro	<i>Pagrus</i>	Italia	Ceschia y cols., 1991
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	España	Toranzo y cols., 1991 Real y cols., 1997
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	Portugal	Batista y cols., 1996
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Turquía	Canean y cols., 1996
Salmón Atlántico	<i>Salmo salar</i>	Noruega	Speilberg y cols., 1991
Salmón Atlántico	<i>Salmo salar</i>	Escocia	Jones y Cox 1999

La fuente de infección ha sido motivo de discusión durante mucho tiempo, siendo el agua de mar uno de los puntos más discutidos. Así, JANSSEN y SURGALLA (1968) observaron que la



bacteria moría en 3 días al ponerla en agua estéril con un 1.7% de NaCl, lo cual llevó a pensar que la temperatura y la salinidad son factores restrictivos que hacían que *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* no pudiera vivir mucho tiempo fuera del hospedador. TORANZO y cols. (1982) afirman de acuerdo con JANSSEN y SURGALLA (1968) que *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* sólo es capaz de sobrevivir en agua de mar no más de 3-5 días, sugiriendo que la forma de transmisión es por contacto directo pez a pez.

MAGARIÑOS y cols. (1994a) describen a este agente causal con capacidad suficiente para sobrevivir en agua de mar, estando en ella en un estado viable pero no cultivable, y manteniendo la capacidad patógena sobre el rodaballo (*Psettdodes belcheri*).

Utilizando la técnica de ribotipado, MAGARIÑOS y cols. (1997b) estudian 29 cepas de esta bacteria con orígenes y hospedadores diferentes, con el fin de establecer si la técnica es útil para estudios epidemiológicos y para la clasificación taxonómica. El estudio reveló la aparición de dos ribotipos bien diferenciados, uno perteneciente a cepas europeas y otro a cepas japonesas. De esto se concluye que la utilización del ribotipado es una técnica útil tanto en estudios epidemiológicos como taxonómicos.



ROMALDE y cols. (1999) sugieren la posibilidad de una manera de infección hasta el momento no descrita como es la vía vertical, detectando la presencia de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* en gónadas, huevos, fluido ovárico y seminal.

En un estudio de distintas cepas de esta especie mediante la técnica de “*Random amplified polymorphic DNA*” (RAPD) para estudiar la posición taxonómica de diferentes cepas europeas y japonesas, MAGARIÑOS y cols. (2000) observaron que las cepas japonesas y europeas pertenecen a dos taxones diferentes, a pesar de compartir similares hospedadores, por lo cual esta técnica se presenta como una de las de elección a la hora de realizar estudios epidemiológicos en patógenos de peces.

II.1.4.- Patogenia

Una vía de infección no clara es el agua. Para comprobar el interés que tiene en los mecanismos de transmisión MAGARIÑOS y cols., (1994a) realizaron un estudio en el que hicieron infecciones por baño en doradas y rodaballos, obteniendo que las doradas eran susceptibles de infectarse con una DL_{50} de 10^5 - 10^6 células/ml, mientras que el rodaballo se mostraba resistente y no se infectaba por esta vía.

El mecanismo de acción patógena de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* no está demasiado claro, aunque el hecho provocar lesiones granulomatosas durante la infección



crónica, sugiere que esta bacteria es capaz de resistir dentro de las células fagocíticas del hospedador (TORANZO y cols., 1991).

Los estudios realizados en cuanto a la interacción de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* con macrófagos han dado unos resultados contradictorios. Bacterias morfológicamente intactas han sido encontradas dentro de macrófagos *in vitro* (KUBOTA y cols., 1970; NELSON y cols., 1981; NOYA y cols., 1995a y b), sugiriendo estos resultados que esta bacteria es capaz de invadir macrófagos. SKARMETA y cols. (1995) así como ARIJO y cols. (1998) en estudios realizados *in vitro* han demostrado que los macrófagos de diferentes especies de peces estudiados: (trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*) presentan actividad bactericida frente a *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. BARNES y cols. (1999) explican los resultados de los autores anteriores, al observar que este patógeno es incapaz de soportar el ataque oxidativo que experimenta durante el metabolismo respiratorio del macrófago.

Es posible que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* pueda eludir los mecanismos de defensa del hospedador y de los agentes antimicrobianos manteniéndose viable dentro de células no fagocíticas (MAGARIÑOS y cols., 1996b), aspecto ya demostrado por la capacidad que presenta esta bacteria de invadir diferentes líneas celulares de peces (MAGARIÑOS y cols., 1996b; YOSHIDA y cols., 1997). La habilidad para invadir células es uno de los



factores determinantes de la virulencia de una bacteria, aspecto que se ha comprobado en bacterias que afectan a seres humanos como *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* (GALAN y cols., 1994; ZIEGER y GALAN 1995). Dentro de los patógenos de peces esta capacidad invasiva ha sido demostrada en *Aeromonas hydrophila* (LEUNG y cols., 1996; TAN y cols., 1998) y *Vibrio anguillarum* (WANG y cols., 1998). ROMALDE y MAGARIÑOS (1997) describen la capacidad de adherencia e invasión de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* en diferentes líneas celulares de peces, como débil o moderada. Solamente presenta una capacidad de adherencia alta en presencia de células intestinales de peces (MAGARIÑOS y cols., 1996b; LOPEZ-DORIGA y cols., 2000), lo cual abre la posibilidad a estos tejidos para darle continuidad a una infección en un animal portador.

La adherencia de *Photobacterium damsela subespecie piscicida* a las diferentes células parece estar mediada por un receptor proteico o glicoproteico de la superficie bacteriana, y el mecanismo de internalización de la bacteria es a través de unos microfilamentos actina-dependientes (MAGARIÑOS y cols., 1996b), aunque estos autores han indicado que *Photobacterium damsela subespecie piscicida* es capaz de mantenerse viable dentro de la célula al menos 2 días, pero no se ha demostrado la capacidad de diseminarse de una célula a otra, ni tampoco que la internalización de la bacteria suceda por un mecanismo específico. VICTORIA LOPEZ-DORIGA y cols. (2000) confirman la capacidad invasiva y



adherente de este agente comprobando la presencia intracelular de la bacteria en células epiteliales de carpa (EPC), donde ésta se mantuvo viable entre 7 y 9 días, no produciéndose ninguna división bacteriana dentro de las células a diferencia de lo que ocurre con otras bacterias (FINLAY y FALKOW, 1988).

Los ECPs son letales para trucha y rodaballo, lo cual indica que éstos deben jugar un importante papel en el mecanismo de acción patógena de esta bacteria (MAGARIÑOS y cols., 1992a).

MAGARIÑOS y cols. (1992b) han demostrado que los productos extracelulares (ECPs) de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* presentan actividad fosfolipasa y hemolítica sobre eritrocitos de oveja, salmón y rodaballo, pero no sobre eritrocitos de trucha. Si bien se ha demostrado que el polisacárido capsular que presenta esta bacteria cuando crece bajo las condiciones adecuadas (BONET y cols., 1994), juega un papel importante en la virulencia de este patógeno, provocando que la DL₅₀ se pueda reducir hasta 4 logaritmos (MAGARIÑOS y cols., 1996a). De la misma forma, la disponibilidad de hierro y los ECPs intervienen en la virulencia (MAGARIÑOS y cols., 1994b y 1992a).

II.1.5.- Clínica

Una de las principales características de esta enfermedad es la ausencia de signos patognomónicos, pudiéndose encontrar manifestaciones clínicas en los peces infectados, pero no de forma



específica y exclusiva de esta enfermedad. Además, ROBERTS (1978) reconoce que una de las características de esta enfermedad es que virtualmente no se producen anomalías externas en los peces afectados.

Algunos síntomas de la enfermedad, como son la debilidad de los peces e irse al fondo de las redes donde morían ya eran descritos por KUBOTA y cols. (1970a y b y 1972).

SNIESZKO y cols. (1964) describen en la “pseudotuberculosis” de la perca blanca (*Roccus americanus*), la presencia de pequeñas zonas hemorrágicas en las agallas y en la base de las aletas, además de un aumento de la pigmentación de la piel.

La presencia de estos signos inespecíficos se repiten de forma rutinaria en la mayoría de las descripciones de la enfermedad, y sólo en alguna ocasión se observa algún síntoma de localización corporal distinta, como los descritos por TORANZO y cols. (1991) y BAPTISTA y cols. (1996), los cuales observaron la aparición de hemorragias en la zona de la cabeza.

La forma de presentación de la enfermedad no es constante, siendo de forma aguda en peces marinos y el salmón, y presentando una forma crónica en especies como el ayu (*Plecoglossus altivelis*) y el medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) (ROBERTS 1978).



II.1.6.- Lesiones

II.1.6.1.- Lesiones macroscópicas

KUBOTA y cols. (1970a,b y 1972) describen en la pseudotuberculosis del medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) la presencia de gran número de puntos blancos en bazo y riñón fundamentalmente, pudiendo en ocasiones observar dichos puntos blancos en corazón, hígado y páncreas, así como en mucha menor frecuencia en vejiga natatoria, agallas, mesenterio y peritoneo. Estos puntos son pequeños, no superando nunca el tamaño de unos pocos milímetros. Su forma normalmente es esférica, viéndose a veces algunos de morfología irregular. La presencia de estos focos se asocia a cuadros crónicos más que a muertes de forma aguda, la cual en las especies marinas es lo más común (TORANZO y cols., 1991; BALEBONA y cols., 1992).

El riñón lo podemos encontrar aumentado de tamaño y anémico. El bazo se ve también aumentado de tamaño y de color rojo oscuro. El hígado se suele ver hiperémico y algo aumentado de tamaño (DALY, 1999).

NOYA y cols. (1993) inocularon tanto la bacteria como los ECPs de varias cepas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* en doradas para estudiar los cambios histológicos que estos provocaban en los peces, observando la inexistencia de



lesiones externas e internas, a excepción de un oscurecimiento de la superficie dorsal y lateral del cuerpo de los peces inoculados.

En la descripción de la enfermedad en Salmón Atlántico (*Salmo salar*) JONES y COX (1999) observan como lesiones macroscópicas más importantes, hemorragias petequiales en intestino grueso y superficie peritoneal, y puntos blancos en hígado, bazo y corazón. Con el tiempo se apreció también una peritonitis generalizada así como la formación de pseudomembranas difteroides entre los órganos y la vejiga natatoria.

II.1.6.1.- Lesiones microscópicas

KUBOTA y cols. (1970a y b y 1972) describieron en la “pseudotuberculosis” del medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) lesiones en diferentes órganos, correspondiéndose los puntos blancos localizados en el bazo y riñón, con colonias bacterianas.

En el hígado se observan muy pocas bacterias, siendo la lesión microscópica más característica la formación de granulomas, donde la parte central necrótica se rodea por una cápsula epitelióide (KUBOTA y cols., 1970b).

En su trabajo sobre la pasterelosis de la lubina estriada (*Morone saxatilis*), HAWKE y cols. (1987) describen los cambios



histológicos encontrados en los peces, observándose en el bazo una necrosis aguda multifocal del tejido linfoide caracterizada por la pérdida de células, necrosis por coagulación, cariorrexis y por la presencia de muchas bacterias. En el hígado, encontraron una moderada necrosis aguda multifocal de los hepatocitos con una prominente cariorrexis. También observaron muchas bacterias en los sinusoides y dentro de los vasos hepáticos. Grandes áreas del hígado mostraron zonas de hiperplasia de las células reticuloepiteliales de revestimiento de los sinusoides hepáticos. En el páncreas observaron también una necrosis aguda multifocal, acompañada con la pérdida o reducción del tamaño de los gránulos de zimógeno. Sin embargo, no se detectó infiltrado inflamatorio en ninguno de los tejidos afectados.

En el estudio en España del primer brote de esta enfermedad en dorada, TORANZO y cols. (1991) encontraron alteraciones histológicas, tanto en peces infectados de forma natural como experimentalmente, una necrosis aguda con infiltrado de eritrocitos y la presencia de muchas bacterias en capilares y espacios intersticiales en bazo y riñón. En el hígado se observó la presencia de una necrosis multifocal moderada de los hepatocitos, así como la presencia de bacterias en los sinusoides y espacios hepáticos. Las lesiones crónicas (granulomas) sólo fueron encontradas en peces con infección natural, después de que estos fueron tratados y habían superado el brote de la enfermedad. En



los peces de la infección experimental no se encontró ningún animal con granulomas.

NOYA y cols. (1993) inocularon cepas vivas y los ECPs de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* en doradas para estudiar los cambios histológicos que estos provocaban en los peces. Observando los diferentes órganos describieron las siguientes lesiones: en la sangre de ambos grupos de peces el número de leucocitos, principalmente neutrófilos y eosinófilos, aumentó considerablemente. También se apreciaron abundantes leucocitos inmaduros y eritrocitos degenerados. Algunos de los peces inoculados con bacterias mostraron septicemia, observándose que neutrófilos y monocitos contenían a menudo bacterias fagocitadas, y que un porcentaje elevado de estas células sufría necrosis. En la cavidad peritoneal observaron neutrófilos, macrófagos y abundantes eosinófilos. Estos macrófagos y neutrófilos presentaban gran cantidad de bacterias fagocitadas.

Los peces inoculados con ECPs y procesados en las primeras horas después de la inyección no manifestaron lesiones importantes. A partir de las 24 hrs aumentó el número de macrófagos en la pulpa roja, en los sinusoides y rodeando los elipsoides. Estos macrófagos estaban hipertrofiados y contenían abundantes eritrocitos fagocitados. En los peces inoculados con bacterias también se incrementó el número de macrófagos, los cuales contenían principalmente bacterias. Estos macrófagos se



localizaban fundamentalmente en áreas perielipsoidales. Con el tiempo se formaban colonias de diferentes tamaños, aunque sin llegar a constituir granulomas. Asimismo, se apreció un ligero aumento de leucocitos inmaduros.

El riñón, tanto de las doradas inyectadas con ECPs como las inoculadas con bacterias, mostró dilatación de los sinusoides, en los cuales aparecían numerosos macrófagos, melanomacrófagos y leucocitos inmaduros. También se produjo un aumento de macrófagos en el tejido hematopoyético y un incremento de células en mitosis, lo cual estaba unido a una disminución de las formas más maduras de leucocitos y eritrocitos. En las doradas inoculadas con los ECPs estos macrófagos contenían abundantes eritrocitos fagocitados, mientras que en los inoculados con bacterias presentaban gran cantidad de bacterias. A partir del tercer o cuarto día aparecían colonias de diferente tamaño dispersas por todo el tejido hematopoyético. En ninguno de los peces estudiados se detectaron alteraciones en la nefrona.

Las branquias de ambos grupos de peces mostraron infiltración de neutrófilos y macrófagos con restos celulares fagocitados, en los espacios interlaminares de las laminillas primarias y secundarias. Esta infiltración se hace más patente con el tiempo, y en los peces más afectados, incluso las células epiteliales de las laminillas se encuentran degeneradas, presentando granos de distinto tamaño en su citoplasma.



En el hígado, no se han detectado lesiones en los peces inoculados con los ECPs. En los peces inoculados con bacterias, éstas forman colonias e invaden el parénquima hepático. Rodeando a estas colonias no se han apreciado alteraciones importantes. Por otra parte, el hígado de los peces que no fue invadido no parece sufrir ningún tipo de alteración.

En el corazón se produjo un incremento en el número y tamaño de los gránulos de las células endoteliales de la cavidad ventricular. Algunas de estas células muestran vacuolas. También se ha detectado una ligera pericarditis en algunos de los peces inoculados con bacterias, la cual va asociada a una colonización bacteriana del epicardio. En ningún caso las fibras musculares resultaron afectadas.

El intestino es el menos afectado, y sólo se ha observado infiltración celular en la lámina propia de algunos de los peces inoculados.

En la musculatura se ha comprobado que los ECPs no producen lesiones y que las bacterias tampoco parecen multiplicarse ni constituir colonias. Solamente se han podido observar lesiones en las zonas donde se realizaron las inyecciones con bacterias. En estas zonas las fibras musculares aparecen a menudo degeneradas, apreciándose una intensa infiltración leucocitaria. En ningún caso se llegaron a formar granulomas.



Además, en todos los órganos donde se formaron colonias bacterianas, se observó una ausencia total de alteraciones alrededor de las mismas. Por otra parte, se ha podido constatar que hay una clara relación entre el efecto patológico y el tiempo que tarda el pez en morir.

En la descripción de la enfermedad en Salmón Atlántico (*Salmo salar*), JONES y COX. (1999) observaron como lesiones microscópicas, la presencia de diferentes áreas de necrosis coagulativa en bazo, hígado y riñón.

II.1.7.- Diagnóstico

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* puede crecer en diferentes medios de cultivo suplementados con NaCl a una concentración final del 2-3%. La identificación de esta bacteria se puede realizar por pruebas bioquímicas clásicas (SMIBERT y KRIEG, 1981; WEST y COLSWELL, 1984) y por características morfológicas. La Tabla 1 muestra las propiedades bioquímicas de esta bacteria (JANSEN y SURGALLA, 1968; YASUNAGA y cols., 1983, 1984 y TORANZO y cols., 1991).

KENT y cols. (1982) describieron el uso del sistema miniaturizado API 20E como una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad, dando la bacteria resultados positivos a Arginina dehidrolasa, Glucosa, Galactosa, Manosa y Fructosa, y negativo al resto de pruebas de la galería. SANTOS y cols. (1993) evalúan la



utilidad del sistema miniaturizado API 20E para identificar a esta bacteria obteniendo como resultado que ninguna de las cepas usadas pudo ser identificada como *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*, debido a que el perfil de esta bacteria no se encuentra incluido en la base de datos de este sistema.

KITAO y KIMURA (1974); KAWAHARA y cols. (1986) describen como técnica de diagnóstico para esta enfermedad, el uso de anticuerpos fluorescentes para detectar la bacteria en tejidos de peces infectados.

La técnica de hibridación del ADN fue utilizada por ZHAO y AOKI (1989) para evaluar la presencia de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* a partir de colonias bacterianas crecidas en medios de cultivo, pero la sensibilidad de esta técnica no fue descrita. También usaron la misma técnica para detectar directamente la bacteria sobre tejido (bazo y riñón), siendo capaces de detectar 3.9 ng de ADN, o 10^5 células de este agente patógeno.

ZHAO y AOKI (1992) describieron el uso de la técnica de PCR para el diagnóstico de la infección por *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* utilizando unos cebadores elaborados a partir de la secuencia génica de un plásmido específico de esta bacteria y con un peso molecular de 5.1 Kb.



Un estudio comparativo realizado por ROMALDE y cols. (1995a) entre la técnica de aglutinación tradicional y unos sistemas para aglutinación en látex fabricados por Bionor®, muestra que en ambos casos se detectaron todas las cepas usadas de esta especie, no existiendo reacciones cruzadas con otros patógenos importantes en acuicultura como son *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*, ni con otras bacterias pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae*. Sí hubo diferencias notables en cuanto a la sensibilidad, donde los sistemas con látex sólo detectaron a partir de 10^{10} bacterias por ml. La técnica de aglutinación en placa fue capaz de detectar a partir de 10^7 bacterias por ml.

ROMALDE y cols. (1995b) evaluaron el sistema Aquararid-Pp de Bionor® para la detección de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* observando que es una buena herramienta de diagnóstico al detectar todas las cepas del estudio, y que su especificidad también era buena al no tener reacciones cruzadas con otros patógenos importantes en acuicultura como son *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*, ni con otras bacterias pertenecientes a la Familia *Pasteurellaceae*. La sensibilidad de la prueba permitió detectar 10^6 bacterias por 0.5 gr de tejido.

Un método para detectar a este agente infeccioso en el agua lo describieron REALI y cols. (1997). Para ello tomaron una muestra de agua y la filtraron por un filtro de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro y pusieron este filtro sobre un medio de cultivo (Agar



Marino con un 1% de manitol y 0.5 % de rojo fenol), siendo este método capaz de detectar la bacteria con 8 días de antelación a la aparición de un brote de enfermedad, lo cual permitió instaurar un tratamiento precoz frente a este patógeno.

BAKOPOULOS y cols. (1997b) desarrollaron un ELISA para detectar la presencia de esta bacteria. Para ello probaron cepas de diferentes orígenes tanto en cultivos *in vitro* como a partir de tejidos infectados. Estos autores obtuvieron que en cultivos *in vitro* y en tejidos infectados podían detectar valores desde 10^3 células/ml, lo cual indicaba que el método ELISA podía ser una herramienta rápida, fácil y específica para detectar a *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* en brotes de enfermedad.

La sensibilidad y especificidad del “Magnetic Beads-EIA” de BIONOR® AQUAEIA kit para el diagnóstico de pasterelosis fue demostrada por ROMALDE y cols. (1999). Detectando todas las cepas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* probadas hasta una dosis de 10^4 u.f.c./ml y dando resultados negativos para las cepas probadas de *Photobacterium damsela* subespecie *damsela* y *Ph. histaminum* hasta dosis de 10^9 - 10^{10} u.f.c./ml. El resultado fue positivo en gónadas, huevos, fluido ovárico y seminal, lo cual abre una puerta a la posibilidad de la transmisión vertical de la pasterelosis.



Para realizar el diagnóstico de la enfermedad, OSORIO y cols. (1999) diseñaron una serie de cebadores, a partir de una región conservada del ARN 16S de la bacteria, desarrollando una *Nested-PCR* la cual era capaz de detectar de forma específica sólo a *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*, discriminándola perfectamente de otros patógenos en acuicultura. Esta técnica presenta una sensibilidad que permite detectar entre 1-10 fg de ADN (20-200 células).

OSORIO y cols. (2000) para realizar el diagnóstico diferencial de la infección por *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* frente a *Photobacterium damsela* subespecie *damsela* utilizaron dos juegos de cebadores, uno a partir de una región conservada del ARN 16S de la bacteria y otro para el gen de la ureasa, desarrollando un método PCR, el cual fue capaz de detectar de forma específica sólo a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* discriminándolo perfectamente de *Photobacterium damsela* subespecie *damsela*, ya que esta última especie muestra dos bandas, una correspondiente al ARN 16S y otra al gen de la ureasa, en cambio *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* sólo muestra la banda del ARN 16S, lo cual revela que esta es una buena técnica para el diagnóstico de la enfermedad.



II.1.8.- Control de la enfermedad

II.1.8.1.- Quimioterapia

La susceptibilidad antibiótica de 60 cepas japonesas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* a 14 agentes quimioterápicos fue descrita por AOKI y KITAO (1985). Todas las cepas fueron sensibles a la ampicilina, 21 resistentes a furazolidona, y cinco a cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina y sulfamonometoxin, siendo detectado en estas cinco el plásmido R.

TAKASHIMA y cols. (1985) describieron las resistencias antibióticas de cepas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* de diferentes distritos del Japón. De 281 cepas probadas, 262 presentaban resistencia a la combinación de antibióticos formada por ampicilina, ácido nalidíxico, furazolidona, cloranfenicol, tetraciclina, kanamicina y sulfamonometoxin, siendo detectado el plásmido R en 168 cepas, contradiciendo los resultados previos de AOKI y KITAO (1985).

La efectividad del fluorfenicol en el tratamiento de la enfermedad provocada de forma experimental, así como la ineficacia de otros agentes como ácido oxolínico, ampicilina y nifurstirenato sódico fue descrita por YASUNAGA y YASUMOTO (1988).



TORANZO y cols. (1991) estudiaron el uso del cloranfenicol y la oxitetraciclina para el control del primer brote de pastereiosis en dorada descrito en España.

KIM y AOKI. (1993a, b y c, 1994, 1996a y b) han citado la presencia de diferentes plásmidos R transferibles, los cuales codifican resistencias a diferentes antibióticos usados en el tratamiento de la enfermedad. Estos antibióticos a los que *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* adquiere resistencia por transferencia de plásmidos son el fluorfenicol, cloranfenicol, sulfonamida, IS26-tetraciclina y kanamicina.

II.1.8.2.- Inmunoprofilaxis

Tres tipos de vacunas diferentes frente a la “pseudotuberculosis” del medregal del Japón fueron probadas por FUKUDA y KUSUDA (1985), una inactivando bacterias con formol, otra usando lipopolisacáridos (LPS) de la bacteria y la última utilizando los productos obtenidos en el sobrenadante de la centrifugación de bacterias que han sufrido un proceso de autólisis, utilizando dos vías de administración que fueron la inmersión y el spray. Los autores observaron una mejor protección en la vacuna elaborada con LPS por inmersión.

KUSUDA y HAMAGUCHI (1988) compararon la eficacia de tres bacterinas para prevenir la enfermedad, una inactivando bacterias con formol, otra inactivando bacterias a 75°C durante



una hora, y una última vacuna viva atenuada, todas ellas administradas por inmersión. La que mejor protección dio a los peces fue la vacuna viva atenuada, con un 75% de protección, la inactivada con formol ofreció una protección del 43%, y la bacterina producida por calentamiento no ofreció una protección significativa. Las dos vacunas que ofrecieron protección incrementaron de forma notable la actividad fagocítica en los peces.

El nivel de protección que los peces adquirieron tras ser inmunizados con antígenos P y S ribosómicos fue mayor que cuando eran inmunizados con lipopolisacáridos bacterianos,, tras ser sometidos a un ensayo de infección por baño con *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* (KUSUDA y cols., 1988).

MAGARIÑOS y cols. (1997a) comparan la eficacia de una vacuna elaborada con células bacterianas completas y de una vacuna compuesta por células completas enriquecidas con los ECPs inactivados contra pasterelosis en dorada, cuando ambas son administradas por baño. Sólo la vacuna enriquecida con los ECPs confirió protección contra las cepas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*, dando un porcentaje relativo de supervivencia del 38-40%. Los peces revacunados con la vacuna enriquecida no mostraron niveles de protección más elevados que



los peces vacunados solamente una vez. Asimismo, no se encontró correlación entre protección y niveles de anticuerpos aglutinantes.

MAGARIÑOS y cols. (1994c) describen la influencia del peso corporal en la protección de las doradas contra la infección por esta bacteria y comparan la eficacia de una vacuna elaborada con células bacterianas completas y de una vacuna compuesta por células completas enriquecidas con los ECPs inactivados de la bacteria. Se observó, al igual que en el trabajo anterior, la mayor efectividad de la vacuna enriquecida y que el peso del pez influía, pues cuando se usaron peces de unos 0.5 gr se incremento el nivel de protección obteniendo unos porcentajes relativos de supervivencia del 83.4% con relación al 38% obtenido en peces de 2 gr.

La efectividad de una vacuna contra la pasterelosis en medregal del Japón, usando una vacuna compuesta por lipopolisacáridos mezclados con bacterias inactivadas con cloroformo, administrada vía intraperitoneal fue estudiada por KAWAKAMI y cols. (1997). Esta vacuna confirió una alta protección a los peces frente a la infección natural y artificial, observándose un porcentaje relativo de supervivencia del 60%.

En un estudio en lubinas (*Dicentrarchus labrax*), para evaluar la inmunidad que adquirirían frente a una vacuna bivalente de *Vibrio anguillarum* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,



GRAVNINGEN y cols. (1998) inocularon peces de diferentes formas, una sola vez por inmersión a peces de 1 gr., otro grupo por inmersión con 1 gr. y revacunados por inmersión a los 5 gr y un tercer grupo vacunado por inmersión con 1 gr. y revacunado intraperitonealmente con 5 gr. Observaron que la mejor protección frente a ambas infecciones se obtiene por una vacunación y revacunación por inmersión.

KAWAKAMI y cols. (1998) estudiaron la inmunoestimulación no específica y los efectos adyuvantes de una bacterina de *Vibrio anguillarum*, M-glucano, chitín y adyuvante completo de Freund frente a pasterelosis en medregal del Japón. Todos los grupos fueron inoculados intraperitonealmente con una vacuna compuesta por lipopolisacáridos mezclados con bacterias inactivadas con cloroformo, y cada grupo a su vez, con un adyuvante diferente, siendo luego enfrentados a la bacteria viva a diferentes tiempos. El adyuvante que se mostró más efectivo fue el adyuvante completo de Freund, sin que su capacidad de protección fuera superior estadísticamente al de la vacuna sola. El resto de adyuvantes no mostró un efecto positivo a la hora de conferir inmunidad en los peces.

MAGARIÑOS y cols. (1999) evaluaron la protección de larvas de doradas de 50 días de edad frente a *Photobacterium damsela subespecie piscicida*, con una vacuna compuesta por células completas enriquecidas con los ECPs inactivados de la bacteria



(comercializada como DI). Estos autores administraron dicha vacuna por inmersión y por baño, obteniendo que los porcentajes relativos de supervivencia fueron para la inmersión de 84-90%, mientras que para el baño fueron de 77-80%, por lo que ellos recomiendan una primera vacunación a las larvas de unos 50 días y una revacunación cuando alcanzan los 2 gr de peso.

II.2.- MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LA INFECCIÓN EN LOS TELEÓSTEOS

II.2.1.- Sistema inmune

El sistema inmune de los teleósteos ha sido uno de los más estudiados, debido fundamentalmente a la importancia económica de algunas de las especies que lo componen, por su importancia como fuente de alimento para el ser humano. Este sistema inmune en muchos aspectos es similar al de los mamíferos, donde los órganos linfoides se encuentran divididos en primarios y secundarios.



II.2.1.1.- Órganos linfoides primarios

◆ Riñón

En los teleósteos el riñón es un órgano linfoide muy importante. Está localizado ventralmente a la espina dorsal, en la parte superior de la cavidad peritoneal. Se encuentra dividido en dos segmentos, una porción cefálica denominada “riñón anterior” y otra media y caudal denominada “riñón posterior”. Ambas porciones presentan actividad hematopoyética siendo mayor en la porción anterior, en la cual ha desaparecido la función renal (ELLIS y DE SOUSA, 1974; ZAPATA, 1979, 1981), y la posterior con función excretora. En general, las células linfohematopoyéticas están distribuidas al azar por el estroma del órgano y vasos sanguíneos (QUESADA y cols., 1990; PRESS y cols., 1994). Para algunos autores, el riñón de los teleósteos presenta una relación filogenética con la médula ósea de los vertebrados superiores (SMITH y cols., 1967; ZAPATA, 1979) en su capacidad de diferenciar células precursoras sanguíneas, y en general es considerado como una fuente postembrionaria de células hematopoyéticas (AL-ADHAMI y KUNZ, 1976).

◆ Timo

Es un órgano par situado en la comisura dorsal del opérculo. El timo de los peces recuerda mucho al de los mamíferos en su estructura. Éste esta formado por linfocitos en diferentes grados de desarrollo, algunas células de tipo epitelial y macrófagos (ZAPATA,



1983; CHYLMONCZYK, 1992). Una de las características del timo de los mamíferos es la presencia de corpúsculos de Hassall, los cuales también han sido descritos en diversas ocasiones (GOOD y cols., 1966) en estudios de microscopía en lampreas y elasmobranquios (ZAPATA y cols., 1996a), pero no en teleósteos.

Estudios realizados por ZAPATA y COOPER (1990), CHYLMONCZYK (1992) y MANNING (1994) describen que el timo de los teleósteos además de ser parecido morfológicamente, presenta una función similar al de los vertebrados superiores, siendo una fuente de células T inmunocompetentes.

II.2.1.2.- Órganos linfoides secundarios

◆ Bazo

Se encuentra situado junto a la curvatura mayor del estómago. Éste presenta un color rojo oscuro y forma ovoide. Su cápsula es fibrosa y desprovista de músculo. Ésta, a diferencia de los mamíferos no emite trabéculas a través del parénquima del órgano (ELLIS y cols., 1989). Los peces que presentan un gran desarrollo del tejido linfoide en el riñón, no tienen un gran desarrollo del tejido linfoide del bazo (ZAPATA y cols., 1996b).

La función del bazo en la respuesta inmune ha sido relacionada fundamentalmente con la respuesta inmune secundaria (ELLIS y SOUSA, 1974; TATNER 1985).



◆ Tejido linfoide asociado al intestino

Este tejido se distribuye en acúmulos difusos a lo largo de la lámina propia y el epitelio del intestino de los teleósteos (DOGGET y HARRIS, 1991). Histológicamente, hay poca variación entre especies, caracterizándose por ser un tejido linfoide no encapsulado, compuesto por macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y diferentes tipos de granulocitos (TEMKIM y McMILLAN, 1986; ROMBOUT y cols., 1993).

II.2.2.- Sistema inmune celular

En este sistema defensivo están involucradas una gran variedad de células como son monocitos/macrófagos, granulocitos, y células citotóxicas no específicas.

II.2.2.1.- Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas móviles que podemos encontrar en diferentes localizaciones como: la sangre (donde se les denomina monocitos y son considerados los precursores de los macrófagos tisulares), órganos linfoides (en especial del riñón anterior) y cavidad peritoneal.

El estudio del sistema inmune, y en particular de los macrófagos exige ser capaz de obtenerlos de la forma más pura posible. Para enriquecer las preparaciones de macrófagos se utiliza la centrifugación en un gradiente de densidad, lo cual permite separar de forma efectiva los macrófagos de linfocitos y blastocitos,



debido a su estructura más grande y granular (SECOMBES, 1990). Sin embargo, este método hace difícil la separación de los macrófagos de los granulocitos, por lo que se puede realizar una extracción enriquecida en macrófagos obteniéndolos a partir de la cavidad peritoneal usando agentes flogísticos capaces de inducir una respuesta inflamatoria (SECOMBES, 1996). En dicha respuesta, los granulocitos aparecerán en los primeros días postinyección debido a su alta movilidad, mientras que los macrófagos aumentarán su presencia más tarde, momento que será el idóneo para recoger las células.

Para obtener cultivos aún más puros, se recurre a explotar características propias de los macrófagos como son las de adherirse a substratos y poder vivir durante semanas en cultivo.

La adherencia a superficies de cristal o plástico es un método rápido para aumentar la pureza de una extracción de macrófagos, técnica que además es rápida, pues puede ser realizada en 2-3 horas. Inmediatamente después del periodo de adherencia se retiran las células no adherentes, obteniéndose cultivos de macrófagos con una pureza superior al 95% (SECOMBES, 1996).

Los macrófagos pueden ser identificados por diversas vías, al ser mononucleados, positivos a la esterasa no específica y fosfatasa ácida y negativo a la peroxidasa (SECOMBES, 1996).



Funcionalmente, estas células pueden actuar como células accesorias para la respuesta de los linfocitos, desarrollando también su capacidad fagocítica, o pueden producir radicales libres de oxígeno y nitrógeno, pudiendo destruir patógenos como bacterias, virus y parásitos. Estas funciones pueden variar y tener unas más desarrolladas que otras en función del origen de los macrófagos (SECOMBES, 1990).

Algunos autores destacan la actividad antimicrobiana de los macrófagos por la producción de óxido nítrico (ON), así lo han demostrado diferentes trabajos, en los cuales macrófagos de ratón fueron estimulados con citoquinas y respondieron incrementando la producción de ON (MURRAY y TEITELBAUM, 1992; SCHNEEMANN y cols., 1993; SCHOEDON y cols., 1995; EVANS y cols., 1996). En macrófagos de rumiantes, también se ha demostrado la producción mayor de ON cuando se les estimuló con citoquinas o LPS (ALDER y cols., 1996).

En peces, algunos autores han logrado obtener respuestas de cultivos primarios de macrófagos y de líneas celulares de macrófagos en forma de producción de óxido nítrico cuando las estimularon con lipopolisacáridos bacterianos (NEUMMAN y cols., 1995; WANG y cols., 1995). Otros autores observaron diferentes respuestas en función de la cantidad de arginina en la dieta de los peces, y en los medios de cultivo donde se cultivaron los macrófagos (BUENTELLO y GATLIN, 1999). En un estudio



realizado con macrófagos de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), TAFALLA y NOVOA, (2000) describieron los requerimientos que estas células tenían para una correcta activación y producción de ON, demostrando que añadiendo a los macrófagos el factor de necrosis tumoral humano α (TNF- α), éstos producían mucho más ON.

Otros autores han utilizado los macrófagos para el estudio de la actividad que estos experimentan cuando entran en contacto con un agente extraño (bacteria, virus, parásito, etc.). Así, HARDIE y cols. (1996) trataron macrófagos con factores activadores de los macrófagos (MAF), los cuales fueron enfrentados con el patógeno de peces *Renibacterium salmoninarum*, observando un aumento en la “explosión respiratoria” (producción de O₂) y en la capacidad de inhibición del crecimiento de la bacteria.

En 1995, SKARMETA y cols. utilizaron macrófagos de trucha arcoiris, dorada y lubina para estudiar el efecto bactericida de la “explosión respiratoria” sobre *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, observando que los macrófagos de las tres especies tenían efecto bactericida sobre la bacteria.

II.2.2.2.- Granulocitos

En los teleósteos se han encontrado tres tipos de granulocitos que son neutrófilos, eosinófilos y basófilos (ELLIS, 1977; ROWLEY y cols., 1988; HINE, 1992; AINSWORTH, 1992).



Los neutrófilos y eosinófilos son los más comunes, estando presentes en la mayoría de las especies al contrario que los basófilos. (SECOMBES, 1996).

Estas células muestran una morfología y propiedades histoquímicas similares a los de mamíferos. Se encuentran en sangre, bazo, riñón, lesiones inflamatorias (ELLIS, 1989) y peritoneo (SECOMBES 1996).

Los granulocitos son muy móviles, especialmente los neutrófilos. Su actividad fagocítica fue cuestionada por algunos autores (ELLIS, 1981), pero hoy en día no existen dudas de esta capacidad por parte de los granulocitos (SECOMBES, 1996). Estas células producen moléculas reactivas de oxígeno, pero aún así su capacidad bactericida es pobre en relación con los macrófagos (SECOMBES, 1996).

Existen unos granulocitos menos móviles que encontramos en las agallas e intestino, los cuales presentan actividad frente a bacterias y helmintos patógenos (SECOMBES, 1996).

II.2.2.3.- Células citotóxicas no específicas

En peces, estas células son consideradas como las equivalentes a las células "*Natural Killer*" de los mamíferos, y pueden ser obtenidas de sangre, órganos linfoides e intestino.



Presentan una morfología similar a las de los monocitos (EVANS y cols., 1984) y tienen capacidad para lisar un gran número de líneas celulares tumorales de mamíferos (SECOMBES, 1996) y líneas celulares de peces cuando se infectan con virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (MOODY y cols., 1985), así como frente a protozoos (EVANS y JASO-FRIEDMANN, 1992).

II.2.3.- Mecanismos para destruir microorganismos fagocitados

Los fagocitos son capaces de destruir patógenos usando diversos métodos que podemos clasificar en dos categorías, los mecanismos dependientes del oxígeno y los no dependientes del oxígeno.

II.2.3.1.- Mecanismos Oxígeno Dependientes

Cuando una célula fagocítica ingiere una partícula, se produce un aumento en el oxígeno captado que es independiente de la respiración mitocondrial. A este fenómeno se le denomina “Explosión Respiratoria”. La explosión respiratoria de las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) presenta una clara actividad antimicrobiana (DINAUER y cols., 1993; NEUMAN y cols., 2001). Mediante la “explosión respiratoria”, las células fagocíticas producen diferentes radicales de oxígeno y nitrógeno que son tóxicos para las bacterias, virus, parásitos y células tumorales. Entre estos radicales destacan como moléculas oxígeno reactivas los aniones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^-), y como moléculas nitrógeno reactivas



encontramos el óxido nítrico (ON) y los peroxinitritos (ONOO-) (ELLIS, 1999).

Estos productos producidos por las células fagocíticas se dividen en dos clases:

♦ Moléculas Oxígeno Reactivas (MOR)

Estas moléculas son producidas por las células fagocíticas durante la “explosión respiratoria”, al contactar con bacterias o durante la fagocitosis (SECOMBES, 1996; LAMAS y ELLIS, 1994).

La producción de radicales libres de oxígeno durante la “explosión respiratoria” de las células fagocíticas de los peces ha sido minuciosamente estudiada desde hace tiempo (SECOMBES y FLETCHER, 1992).

En la “explosión respiratoria” la primera reacción que se produce es la reducción de un electrón de la molécula de oxígeno produciendo O_2^- , reacción que es catalizada por la enzima NADPH oxidasa, la cual se encuentra en la membrana plasmática de las células fagocíticas (SEGAL y ABO, 1993; XIA y ZWEIER, 1997).

Se ha demostrado la existencia de NADPH oxidasa en fagocitos de trucha y la producción de O_2^- por un mecanismo glucosa dependiente, hecho que habría que comprobar en otras especies de peces (SECOMBES y FLETCHER, 1992).



Existen estudios que indican que los aniones superóxido producidos por los macrófagos no son particularmente tóxicos para las bacterias patógenas en general, aunque *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* se muestra sensible a la acción del O_2^- (SKARMETA y cols., 1995), pero sí lo son todas en general al peróxido de hidrógeno y sus derivados (SHARP y SECOMBES, 1993; HARDIE y cols., 1996), moléculas que también se producen durante esta reacción.

HARDIE y cols. (1996) realizaron experimentos de activación de macrófagos de trucha arcoiris con MAF, describiendo el aumento de producción de MOR (O_2^- , H_2O_2) en los macrófagos tratados, y la inactivación de un mayor número de células de *Renibacterium salmoninarum* por parte de dichos macrófagos.

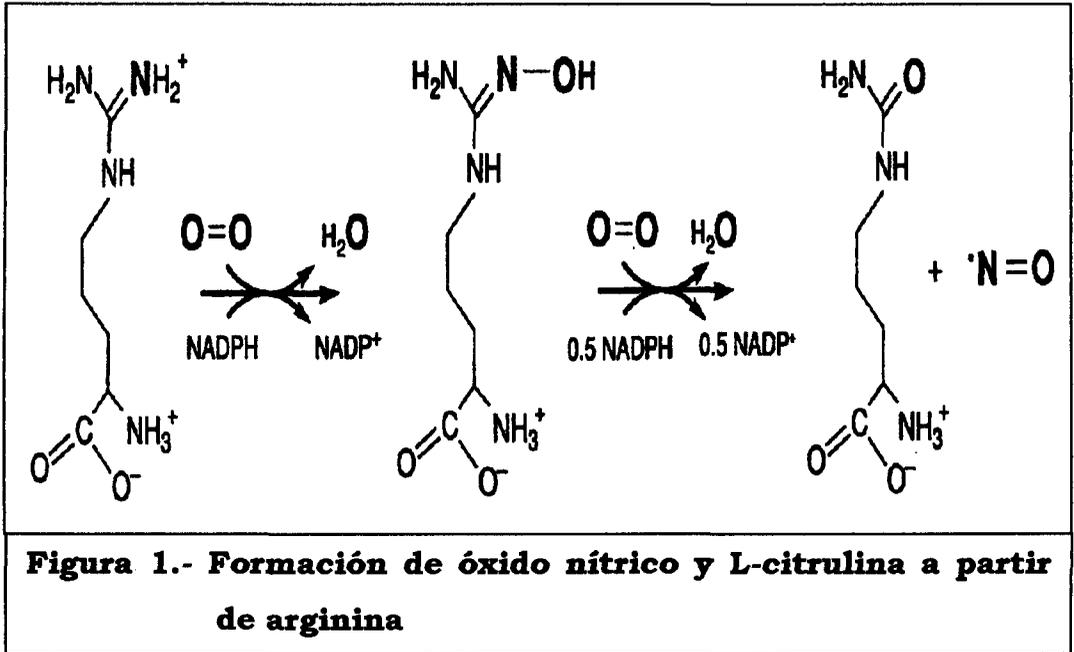
Tanto los macrófagos como los neutrófilos pueden generar MOR, aunque existen diferencias entre ambos tipos celulares. En salmón atlántico (*Salmo salar*) se ha descrito como después de una estimulación con ésteres de forbol existe una mayor producción de O_2^- por parte de los neutrófilos que de los macrófagos (LAMAS y ELLIS, 1994), aunque el pez gato (*Ictalurus punctatus*) parece ser un pobre productor de MOR (DEXIANG y AINSWORTH, 1991).

◆ Moléculas Nitrógeno Reactivas (MNR)

Dentro de este grupo se encuentran diferentes moléculas como el óxido nítrico (NO), peroxinitritos ($OONO^-$), nitratos (NO_3^-),



dióxido de nitrógeno (NO_2) y nitritos (NO_2^-), (NATHAN y SHILOH, 2000).



Una de las moléculas más significativas de las MNR es el óxido nítrico (ON), el cual fue estudiado en primer lugar en el sistema nervioso donde actúa como mensajero intra y extracelular (GARTHWAITE, 1991; BREDT y SYNDER, 1992). El ON se sintetiza a partir de la Arginina por la acción de una oxidasa de función mixta (Óxido Nítrico Sintasa, NOS), la cual hidroxila su carbono terminal para dar ON y L-citrulina (Figura 1).

En los mamíferos, se describe una óxido nítrico sintasa constitutiva (NOS), que se divide en dos tipos, la primera se



encuentra en el cerebro (nNOS), fundamentalmente en neuronas, y la otra en las células endoteliales (eNOS). Estas dos isoformas son Ca^{2+} /calmodulina dependientes (SCHMIDT y cols., 1992), presentando una acción muy rápida, con un bajo nivel de respuesta, y provocando su activación bajas concentraciones de ON. Además, existe una tercera isoforma, que es la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual se encuentra principalmente en macrófagos, pero también en células endoteliales, hepatocitos, condrocitos, células del epitelio de la retina y osteoblastos. La iNOS a diferencia de las otras dos isoformas, es Ca^{2+} /calmodulina independiente (SCHMIDT y cols., 1992). La expresión de la iNOS ocurre fundamentalmente en células fagocíticas cuando son estimuladas, ya sea experimentalmente (APPELBERG y ORME, 1993; KOPROWSKI y cols., 1993; KRÖNKE y cols., 1995) o en pacientes enfermos (CAMPBELL y cols., 1994; NICHOLSON y cols., 1996), su actuación es lenta, debido a que los genes que la expresan deben ser activados por un estímulo, aunque provoca unos mayores niveles de ON al final de dicha estimulación (CLARK y ROCKETT, 1996).

La expresión de la iNOS es importante en la destrucción de diversos patógenos, y aunque por sí solo, el ON en ocasiones no es lo suficientemente reactivo para destruir al patógeno, otros productos derivados de la aparición del ON como son los radicales hidroxilos (OH), dióxido de nitrógeno (NO_2), trióxido de nitrógeno (N_2O_3) así como la capacidad del ON de reaccionar con las MOR



para dar peroxinitritos (ONOO⁻), cuya actividad antiinfecciosa es mucho más potente (HIBBS, 1992).

Diversos autores han estudiado la actividad de estos compuestos frente a diferentes patógenos de mamíferos y de peces. Así, entre las especies bacterianas que han sido enfrentadas a estos metabolitos se incluyen *Escherichia coli* (BRUNELLI y cols., 1995), *Mycobacterium avium* (DOI y cols., 1993), *M. tuberculosis* (RHODAES y ORME, 1997), *Staphylococcus aureus* (KAPLAN y cols., 1996) las cuales se han mostrado más sensibles a los peroxinitritos que al NO puro.

Varias especies de patógenos en acuicultura también han sido probadas recientemente a la acción de estos compuestos nitrogenados. Entre ellas destacan *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* y *Yersinia ruckeri* (CAMPOS-PEREZ y cols., 2000a), así como el virus de la septicemia hemorrágica (VHS) (TAFALLA y cols., 1999) , los cuales también resultaron ser sensibles a la acción bactericida de estos compuestos.

En los peces, la NOS ha sido descrita en células del sistema nervioso de salmón atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*), lamprea (*Lampetra planeri*) y lamprea marina (*Petromyzon marinus*) por estudios histoquímicos buscando NADPH-diaforasa, la cual de manera indirecta revela la presencia de la NOS (HOPE y cols., 1991; SHOBER y cols., 1993; SHOBER y



cols., 1994; OSTHOLM y cols., 1994; ZIELINSKI y cols., 1996). Recientemente, en el pez cebra (*Brachydanio rerio*) se ha descrito la localización de la nNOS y de la iNOS en la retina, mediante inmunohistoquímica (SHIN y cols., 2000).

La actividad de la iNOS en estas especies fue un enigma hasta hace pocos años, pero en la actualidad existen estudios que describen detalladamente su funcionalidad (SHOOR y PLUMB, 1994). Estos autores detectaron la actividad de la iNOS después de inocular experimentalmente pez gato (*Ictalurus punctatus*) con *Edwardsiella ictaluri*. NEUMAN y cols. (1995) destacaron la formación de óxido nítrico por macrófagos de koi (*Carassius auratus*) estimulados con lipopolisacáridos, o con factores activadores de los macrófagos (MAF).

A partir de macrófagos aislados de riñón, se han descrito secuencias parciales de la iNOS en koi (*Carassius auratus*) (LAING y cols., 1996), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (LAING y cols., 1999; CAMPOS-PEREZ y cols., 2000b) y salmón Atlántico (*Salmo salar*) (ØYAN y cols., 2000). La primera descripción de la secuencia del gen de expresión de la iNOS fuera de mamíferos se realizó en trucha arcoiris por WANG y cols. (2001).



MATERIAL Y MÉTODOS



III.1.- ANIMALES SOMETIDOS A ESTUDIO

En nuestro estudio, los peces utilizados han sido doradas (*Sparus aurata*) con un peso comprendido entre 35-75 grs. Los peces se obtuvieron de la explotación situada en Arguineguín ("GRAMACAN S.A."), al Sur de la isla de Gran Canaria, siendo ésta una granja con un estado sanitario convencional, donde los animales con aproximadamente 2 gr llegan procedentes de la empresa CUPIMAR, de la Provincia de Cádiz, vacunados por inmersión frente a *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.

Los peces fueron transportados a nuestro módulo experimental situado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas de Taliarte. Éstos se organizaron en lotes pequeños, en tanques de 500 l, los cuales fueron continuamente oxigenados con burbujeo mediante difusores. Para el transporte los animales fueron sedados previamente con 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich S.A.) con el fin de evitar el estrés. Una vez en el laboratorio se hicieron grupos de 30 doradas cada uno, los cuales se mantuvieron en tanques de 1000 l a 22°C con aireación constante. Para su adaptación, se les mantuvo en los tanques durante un periodo de 10 días previo a los ensayos, comprobándose la ausencia de cualquier signo que hiciera sospechar el desarrollo de alguna enfermedad.

Los animales fueron alimentados mediante una toma diaria con una dieta comercial en *pellets* (ProAqua). Antes de iniciar



cualquier experiencia se comprobó la ausencia de patógenos mediante el cultivo de órganos internos de una muestra tomada al azar de cada lote.

III.2.- ORIGEN Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* UTILIZADAS

Las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizadas en este trabajo fueron cuatro, dos pertenecientes a nuestra colección de cepas clínicas (C2 y 94/99), otra de la colección de la Universidad de Santiago de Compostela, (DI-21), y la última perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), (ATCC 17911). Los datos de estas cepas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- Cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizadas en este estudio.

Cepas	Origen	Año de aislamiento	Fuente
C2	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	1997	Real y cols.
94/99	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	1999	Real y cols.
DI-21	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	1991	Toranzo y cols.,
ATCC 17911	Perca blanca (<i>Roccus americanus</i>)	1968	Colección Americana de Cultivos Tipo



III.3.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Para el cultivo de las diferentes cepas y su utilización en el laboratorio se usaron varios medios de cultivo, que fueron el Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) (Cultimed), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Cultimed) y Agar Sangre (Cultimed) suplementados con un 1% de NaCl (Panreac), los cuales se prepararon según las instrucciones del fabricante. Para enriquecer el medio se empleó sangre desfibrinada de oveja (Oxoid) en una proporción del 5%.

Para capsular las cepas se utilizó BHIA suplementado con un 1% de NaCl (Panreac) y un 1% de glucosa (Panreac). Este medio nunca ha sido descrito para la formación de la cápsula de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, pero desde hace algunos años existen descripciones donde el enriquecimiento con glucosa del medio de cultivo facilita su desarrollo (BONET y cols., 1994).

Para la comprobar la formación de esta estructura en las cepas, éstas se sembraron en dos medios: Agar sangre con un 1% de NaCl y en BHIA con un 1% de NaCl y un 1% de glucosa. A las 48 horas, se sumergió el cultivo en glutaraldehído, y lo enviamos al Servicio de Microscopía Electrónica y Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, donde se realizó un estudio mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.



Los medios inoculados fueron incubados durante 48 horas a 25°C. Las cepas aisladas en cultivo puro, fueron resuspendidas en Caldo Triptona Soja (Cultimed) con un 15% de glicerol y fueron congeladas a -80°C para su conservación.

III.4.- MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS EN CADA EXPERIENCIA

Desarrollo del objetivo 1.- CONOCER EL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

III.4.1.- EXPERIENCIA I.- Actividad bactericida del óxido nítrico y los peroxinitritos sobre *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

Esta experiencia en una primera fase consistió en enfrentar a la bacteria capsulada y sin capsular a una serie de diluciones de donadores de óxido nítrico (ON) N-(β-D-Glucopyranosil)-N²-acetil-S-nitroso-D,L-penicilamina (SNAP), y de peroxinitritos (ONOO⁻) 3-Morfolinosydnonimina, HCl (SIN-1), con el fin de medir la supervivencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* frente a estos productos.

Con la finalidad de establecer si el efecto producido sobre la supervivencia es debido o no a las moléculas nitrógeno reactivas se

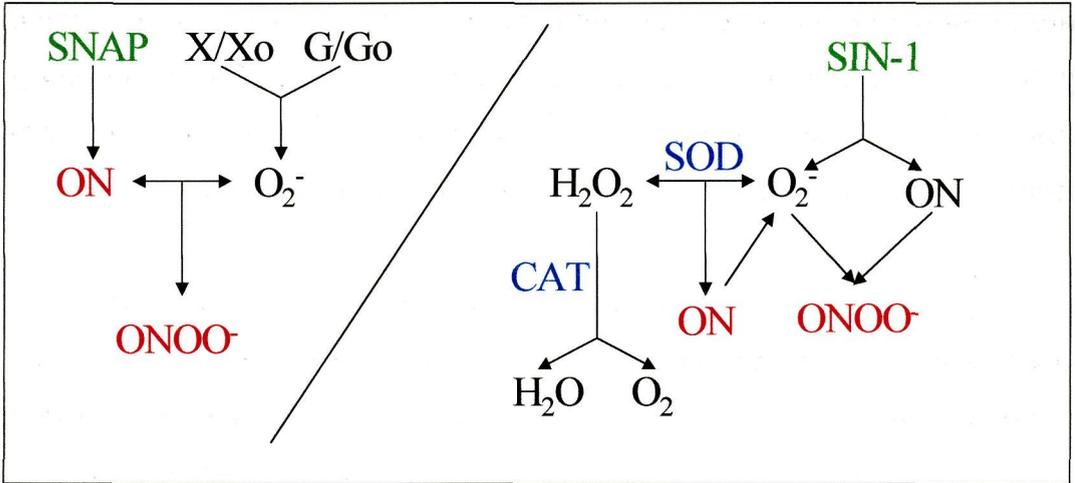


emplearon dos enzimas, que son la superóxido dismutasa (SOD) (Sigma-Aldrich S.A.), la cual elimina los radicales superóxido haciendo que no se formen peroxinitritos, y la catalasa (CAT) (Sigma-Aldrich S.A.), la cual reacciona con el peróxido de hidrógeno eliminándolo en forma de agua y oxígeno comprobando de esta forma que el daño sobre la bacteria no es producido por el H_2O_2 sino por los peroxinitritos, las cuales se adicionarán a los tubos en los que incorporamos SIN-1.

En una segunda fase tomamos la dosis mayor de SNAP utilizada en la fase anterior y la añadimos a la misma dosis de bacterias con y sin cápsula, y posteriormente incorporamos donadores de radicales superóxido para averiguar quién es más tóxico, el óxido nítrico o los peroxinitritos.

Las diferentes reacciones químicas que se producen por la acción de los donadores y de los inhibidores se resumen en el Esquema 1.





ESQUEMA 1.- Esquema de las reacciones químicas producidas *in vitro* por los donadores e inhibidores usados en el experimento.

Para evaluar el efecto del óxido nítrico y los peroxinitritos, medimos la supervivencia utilizando el método del 3-[4-5-Dimetiltiazol-2 y e]-2-5- bromuro de difeniltetrazolium (MTT) (SECOMBES, 1990).

El desarrollo de estas fases se resume en el Esquema 2.

Para el desarrollo de la primera fase se sometieron a varias cepas de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, con y sin cápsula, a la acción del óxido nítrico y peroxinitritos, haciendo reaccionar los cultivos en fase líquida de estas bacterias con diferentes diluciones (0, 10, 30, 100, 300, y 1000 μM) de donadores de estos productos, como son el SNAP (N-(β -D-Glucopyranosil)-N²-



acetil-S-nitroso-D,L-penicilamina) (Calbiochem) para óxido nítrico, y SIN-1 (3-Morfolinosydnonimina, HCl) (Calbiochem) para el NO y los O₂⁻. Estos reactivos al ser mezclados en el medio de cultivo liberan estos productos (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000a).

Las cepas de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* usadas en esta experiencia fueron la C2, 94/99, DI-21 y la ATCC 17911, cuyas fuentes y orígenes se muestran en la Tabla 4. Todas ellas fueron cultivadas en BHIA con un 1% de NaCl para las cepas sin cápsula y en BHIA con un 1% de NaCl y un 1% de glucosa para las cepas con cápsula. A partir de estos cultivos puros se tomaron bacterias con un hisopo estéril para resuspenderlas en BHI líquido con un 1% de NaCl, obteniendo una concentración de bacterias de 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro (u.f.c./ml). Esto se hizo ajustando una suspensión del cultivo a una densidad óptica de 0.68 medida a 590nm en un espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell), y comprobando posteriormente, mediante diluciones seriadas y cultivo de una alícuota de las mismas, el conteo directo de colonias en las placas.

Como control de la técnica se usó la N-acetil penicilamina (compuesto parental del SNAP), para establecer si esta presenta efecto tóxico por sí sola sobre la bacteria. La N-acetil penicilamina fue diluida a una concentración de 1mM. Entonces se tomaron 4 eppendorfs con 1 ml cada uno de BHIB conteniendo cada uno 10⁸ unidades formadoras de colonias.



Los donadores de ON, SNAP (N-(β -D-Glucopyranosil)-N²-acetil-S-nitroso-D,L-penicilamina) (Calbiochem) y de O₂⁻ y ON, SIN-1 (3-Morfolinisydnonimina, HCl) (Calbiochem) se diluyeron en BHIB haciendo diluciones seriadas de 0, 10, 30, 100, 300 y 1000 μ M (BRUNELLI y col., 1995; FIERRO y col., 1996).

Del cultivo líquido en fase logarítmica se pasó 1 ml a 24 eppendorfs, 6 para el SNAP y 18 para el SIN-1, quedando entonces cada uno con 10⁸ u.f.c./ml. Centrifugamos a 3000 rpm durante 10 minutos, para a continuación retirar el sobrenadante.

Al precipitado obtenido, se le añadió 500 μ l por separado de las 6 diferentes diluciones preparadas en ese momento, de SNAP (6 eppendorfs) y de SIN-1, este último fue hecho por triplicado (3 grupos de 6 eppendorfs).

Triplicar el SIN-1, fue para añadir a cada grupo de 6 eppendorfs:

- SIN-1 solo
- SIN-1 + Superóxido dismutasa (SOD, 500 U/ml)
- SIN-1 + Superóxido dismutasa (SOD, 500 U/ml) + Catalasa (500 μ g/ml).

Para minimizar el error de lectura de las pruebas de cada concentración obtenida se tomaron por cuadruplicado 100 μ l y se



pasaron a placas de ELISA de 96 pocillos. Estas placas se incubaron a 25°C y se tomaron muestras a las 24 horas de cada una de las diluciones probadas.

Después de la incubación se preparó el 3-[4-5-Dimetiltiazol-2 y e]-2-5- bromuro de difeniltetrazolium (MTT) a una concentración de 5 mg/10 ml en agua destilada y a continuación se añadió 100 µl a cada pocillo (SECOMBES, 1990).

Las placas fueron leídas 15 minutos después en un espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell) a 600 nm. El cálculo de bacterias supervivientes se realizó según la formula:

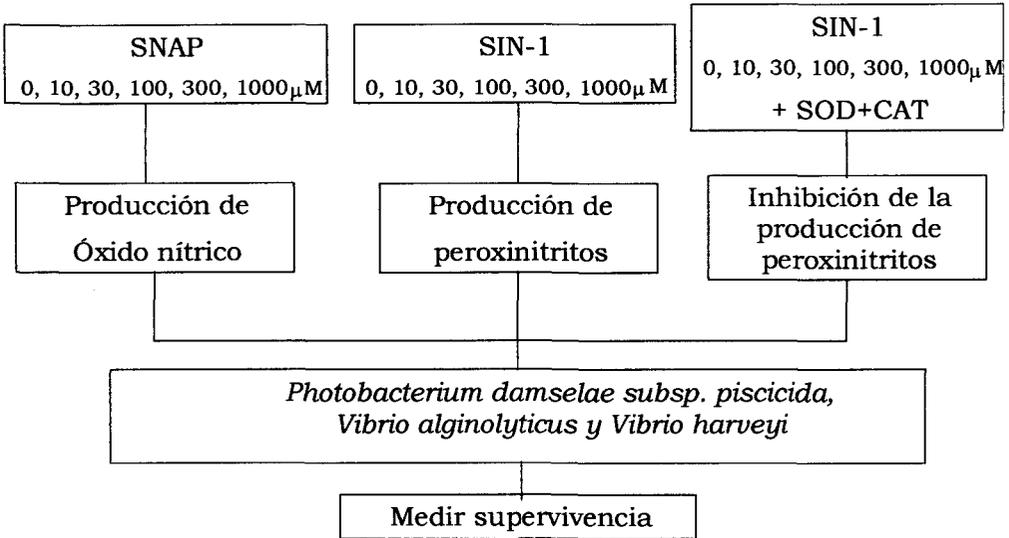
$$\frac{\text{Densidad óptica de pocillos tratados}}{\text{Densidad óptica de pocillos no tratados}} \times 100$$

En la segunda fase se ha intentado comprobar los resultados obtenidos en la primera fase por una vía diferente que corroborase o no los datos obtenidos. En concreto las cepas fueron sometidas a la acción de donadores de radicales superóxido (xantina (X), xantina oxidasa (Xo), glucosa (G) y glucosa oxidasa (Go) (todas obtenidas en Sigma-Aldrich S.A.) y utilizadas a una concentración de 100 µg/ml. La combinación de radicales superóxido, que estos productos liberan, con el óxido nítrico que libera el SNAP produjo la formación de peroxinitritos. Para ello tomamos la dosis mayor de SNAP probada en la fase anterior (1000 µM) y fue enfrentada a una



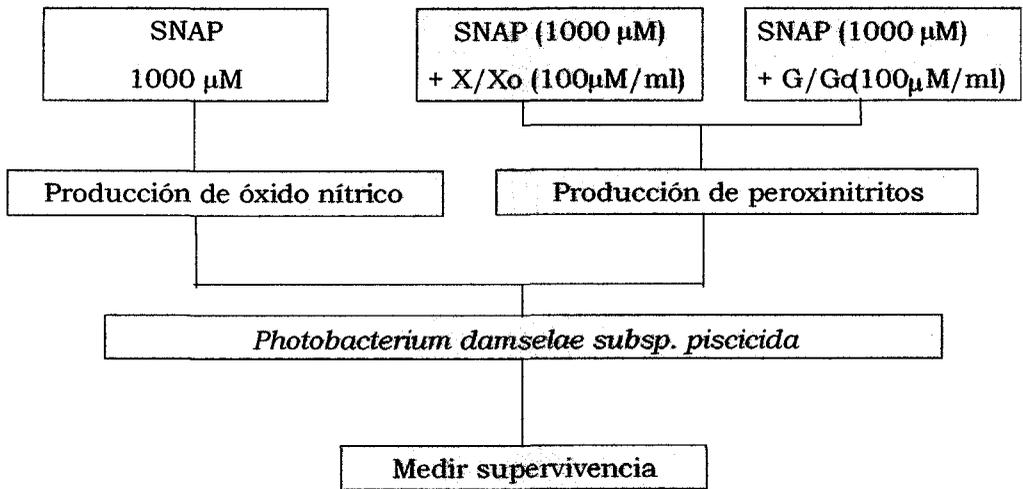
dosis única (100 $\mu\text{g/ml}$) de estos donadores. Posteriormente, se realizaron muestreos seriados durante 24 horas (0, 6, 9, 12, 18 y 24 horas). Después de añadir el MTT a la concentración descrita anteriormente se tomaron muestras de cada pocillo para medir mediante espectrofotómetro en las mismas condiciones que la fase anterior. Esta fase se resume en el Esquema 3.





ESQUEMA 2.- Acción del óxido nítrico y los peroxinitritos





ESQUEMA 3.-Estudio comparado del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos



Desarrollo del objetivo 2.- INVESTIGAR CÓMO INFLUYE LA INFECCIÓN POR *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EN LA DORADA CON RESPECTO A LA VARIACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO Y L-CITRULINA EN EL SUERO SANGUÍNEO Y EN LOS MACRÓFAGOS AISLADOS DE ESTOS PECES.

Desarrollo del objetivo 3.- CONSTATAR SI EXISTE ALGUNA CORRELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LOS PECES DE ESTUDIO Y EL PERIODO DE TIEMPO POSTINOCULACIÓN EN QUE LAS CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO Y L-CITRULINA SE DETECTAN EN EL SUERO SANGUÍNEO.

Desarrollo del objetivo 4.- COMPROBAR SI LA PRESENCIA DE CAPSULA EN LA ESPECIE BACTERIANA EN ESTUDIO -*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*- INFLUYE EN LOS VALORES SEÑALADOS EN EL PUNTO ANTERIOR.

Desarrollo del objetivo 6.- DETECTAR LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS), NECESARIA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO, EN LOS TEJIDOS DE DORADA, Y EVALUAR SU CINÉTICA DE PRODUCCIÓN EN PECES INFECTADOS Y EN LOS PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*



III.4.2.- EXPERIENCIA II.- Peces infectados experimentalmente con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

III.4.2.1.- Experiencia preliminar

Debido a la falta de referencias previas relacionada con la respuesta inmune inespecífica de la dorada frente a la infección con esta bacteria, y especialmente, la edad con que se produce esta respuesta, se decidió antes de diseñar una experiencia completa, hacer una preliminar en la cual se utilizaron doradas de tres tallas diferentes:

- 35-70 grs
- 150-300 grs
- 400-600 grs.

De cada talla de animales hicimos dos lotes:

- Un primer grupo, inoculado con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.
- Un grupo control, inoculado con PBS estéril

A estos peces inoculados se les sometió a unos muestreos seriados a las 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas postinoculación, tomando en todos los casos muestras de sangre para obtener suero y medir la presencia o ausencia de nitritos y L-citrulina. Además se tomaron por separado: agallas, hígado, bazo, riñón anterior, sistema nervioso, intestino y macrófagos, para intentar detectar la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por



medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000b).

Todas las técnicas utilizadas en esta experiencia preliminar son descritas en los distintos apartados que configuran la experiencia II. El desarrollo de esta fase se resume en el Esquema 4.

III.4.2.2.- Infección experimental

Los peces fueron obtenidos según describimos en el apartado III.1, y repartidos en 18 tanques de 500 l cada uno, conteniendo cada tanque 30 peces. Los tanques se dividieron en 6 grupos de 3 tanques cada uno, con el fin de obtener los resultados por triplicado. Las cepas 94/99 y DI-21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* fueron utilizadas para la inoculación, cuyos orígenes y fuentes se describen en la Tabla.4. Los diferentes grupos utilizados fueron:

- Dos grupos inoculados con las cepas sin capsular
- Dos con las cepas capsuladas
- Un grupo inoculado con la cepa 94/99 capsulada junto con L-NAME (N_{ω} -nitro-l-arginina metil ester) (Sigma-Aldrich S.A.), el cual es un inhibidor de la producción de óxido nítrico, utilizado como grupo testigo para establecer si la producción de óxido nítrico es debida a la infección o ajena a la misma.
- Un último grupo control de animales inoculados con tampón fosfato salino estéril (PBS).



Bacterias vivas en suspensión, las cuales fueron cultivadas previamente en un medio con y sin glucosa para comprobar si está diferencia repercutía en los resultados, han sido las utilizadas en este estudio. En el medio con glucosa está descrito que esta especie bacteriana elabora mejor la cápsula (BONET y cols., 1994), y por tanto debería ser más patógena para un pez inoculado.

Las bacterias se sembraron en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Cultimed) adicionado con un 1% de NaCl y un 1% de glucosa (para elaborar la cápsula) y sin el 1% de glucosa (para las cepas sin cápsula). Incubándose en agitación a 25°C durante 24-48 horas para obtener un cultivo fresco en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo se centrifugó el medio a 4000 r.p.m. durante 20 minutos, retirándose el sobrenadante, para después lavar el precipitado dos veces con tampón fosfato salino estéril (PBS). El precipitado obtenido fue resuspendido en la misma solución tampón a una concentración final aproximada de 3×10^4 u.f.c./ml, ajustando la suspensión mediante un espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell) a una densidad óptica de 0.1 en el caso de la bacteria capsulada, y de 0.2 cuando la bacteria no estaba capsulada, medida a una longitud de onda de 590 nm.

Con la finalidad de evaluar la concentración de óxido nítrico y L-citrulina en los peces infectados tanto con la cepa capsulada como acapsulada, así como su correspondiente control, se fueron sacrificando de forma paulatina a las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72



horas, y luego a los 6, 13, 20, 27 y 34 días postinoculación, extrayéndoles a cada uno, previa anestesia, 0.5 ml de sangre, la cual se extrajo realizando un punción en la vena caudal del pez con una jeringa de insulina. La sangre se mantuvo a 4°C durante 5 horas y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a 4°C. El suero obtenido se conservó a -20°C para su posterior análisis del contenido en nitritos y de L-citrulina.

A estos peces sacrificados se les tomó muestras de agallas, bazo, hígado, intestino y sistema nervioso, así como riñón anterior del cual se extrajeron los macrófagos, tal y como se describe en el apartado III.4.2.6. Para la detección y estudio de la cinética de producción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizaron cebadores diseñados para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000b).

El resumen del desarrollo de esta fase se describe en el Esquema 6.

III.4.2.3.- Inoculación de *Photobacterium damsela* subsp. piscicida

Para realizar las inoculaciones los peces fueron previamente anestesiados por inmersión en 2-fenoxietanol a una concentración de 300 µl/l, y se les inyectó 100 µl de una suspensión de 3×10^3



u.f.c./ml vía intraperitoneal, tanto con las cepas capsulada como con la cepas acapsuladas.

III.4.2.4.- Determinación de la concentración de nitritos en el suero sanguíneo

Para esta técnica, parte del suero obtenido de las doradas se utilizó para medir la concentración de nitritos presente en el mismo. En el suero se encuentran los nitritos pero estos se combinan fácilmente con el oxígeno y forman nitratos. Por ello, el suero fue tratado previamente para convertir todos los radicales en nitritos y facilitar su cuantificación.

El método utilizado para la medición de nitrato/nitrito es el de la nitrato reductasa según describió SCHMIDT y cols. (1989).

El suero obtenido se descongela en frío, haciendo una dilución 1:20 del mismo en PBS, y colocando en placas de 96 pocillos, 100 µl de este suero en cada uno. Para transformar los posibles nitratos en nitritos, a cada uno de estos pocillos se le añadió 3 µl de la siguiente solución:

- 1.5 µg de nitrato reductasa (Sigma-Aldrich S.A.)
- 3.3 mg NADPH (Sigma-Aldrich S.A.)
- 0.13 mg de dinucleótido flavina adenina (Sigma-Aldrich S.A.)
- 1 ml de agua destilada



Posteriormente fueron incubadas a 27°C durante una hora. Como la NADPH interfiere en la medición de nitritos, se debe inducir su oxidación, para lo cual fueron añadidos 1.5 µl de una solución de L-Lactic deshidrogenasa Tipo I (Sigma-Aldrich S.A.) (25 mg/ml) y 10 µl de una solución 100 mM de piruvato sódico (Sigma-Aldrich S.A.), e incubados a 37°C durante 1 hora.

Al final de estas reacciones, el nitrato es reducido totalmente a nitritos y es en este momento cuando realizamos la medición. Para ello se añadió 100 µl de reactivo de Griess por pocillo, el cual va a convertir a los nitritos en compuestos Azo que son medibles en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. El fundamento del método espectrofotométrico mostrando la reacción de nitritos con sulfanilamida en solución ácida de naftil-etilendiamina se describe en la Figura 2.

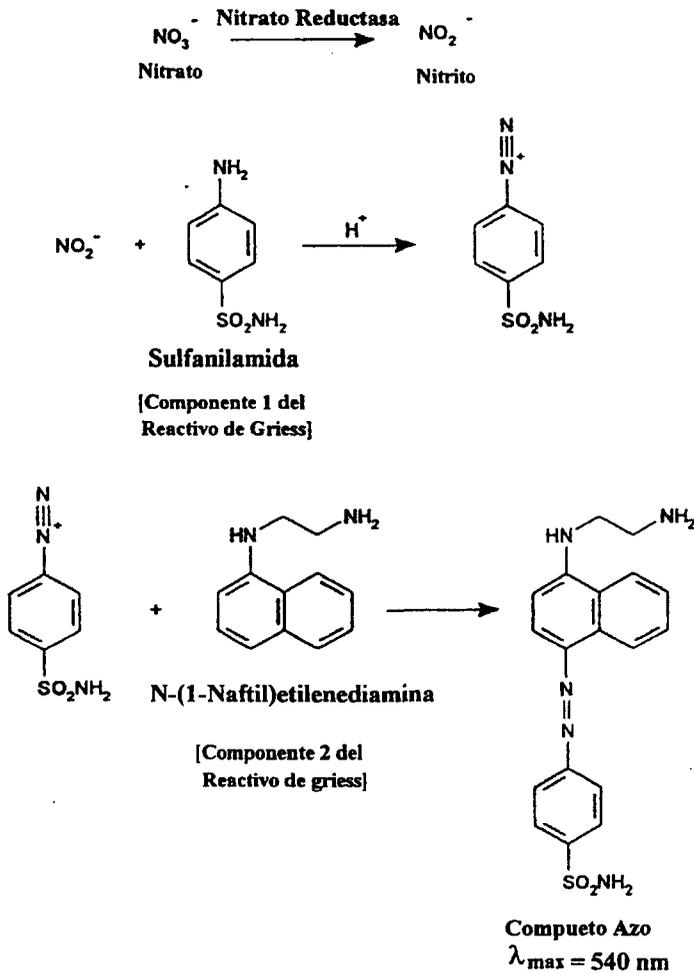
Reactivo de Griess:

- Componente 1
 - Sulfanilamida 1gr
 - 100 ml de una solución de H₃PO₄ al 5%
- Componente 2
 - Naftil-etilenediamina 0.1 gr
 - 100 ml de H₂O destilada

Mezclando volúmenes iguales de ambos componentes.



Figura 2-. Esquema general de la reacción espectrofotométrica mostrando la reacción de nitritos con sulfanilamida en solución ácida de naftil-etilendiamina



La absorbancia fue medida a 540 nm, en un lector de placas (Boheringer-Mangein, Spectra shell). La curva estándar fue elaborada a partir de diluciones seriadas de nitrato sódico. Para ello preparamos una solución madre (SM) a una concentración 1mM de nitrato sódico en medio mínimo esencial (DMEM, Gibco BRL) haciendo alícuotas de 500 μ l que se mantienen congeladas a -20°C . La elaboración de las diluciones seriadas se hizo según se muestra en la Tabla 5, y ello permitió establecer con exactitud la medida de los nitritos en el suero, extrapolando la absorbancia medida con respecto a la curva patrón.

Tabla 5.- Diluciones de la curva patrón de nitrato sódico

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN A PASAR	VOLUMEN DE MEDIO
100 μM	250 μl de SM	2250 μl
80 μM	1600 μl	400 μl
60 μM	1200 μl	400 μl
40 μM	800 μl	400 μl
20 μM	400 μl	400 μl
10 μM	400 μl	400 μl
5 μM	400 μl	400 μl
2.5 μM	400 μl	400 μl
BLANCO (Medio)		800 μl



III.4.2.5.- Determinación de L-citrulina

La L-citrulina es un coproducto de la biosíntesis del óxido nítrico, y para su determinación fue utilizado el método colorimétrico (BOYDE y RAHMATULLAH, 1980).

Se tomaron 400 µl de suero del pez, al que fue añadido ureasa tipo III (Sigma-Aldrich S.A.) a una concentración final de 45 UI/ml, incubándolo a 37 °C durante 30 minutos.

La mezcla fue desproteinizada añadiendo una solución fría al 5% de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich S.A.). Posteriormente, centrifugamos a 5000 rpm durante 15 min, y recogimos el sobrenadante (aprox. 400 µl).

Estos 400 µl fueron mezclados con 3 ml de solución cromogénica que tiene la siguiente composición:

Consta de 1 parte de Solución I y 2 partes de Solución II

Solución I: 0.5% diacetilmonoxime/0.01% tiosemicarbamide en agua destilada

Solución II: 0.025% FeCl₃ en una solución al 25% de ácido sulfúrico y 20% de ácido fosfórico en agua destilada



Esta mezcla se llevó a 96°C durante 5 minutos y luego fue enfriada a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell).

Para hacer la curva patrón utilizamos L-citrulina (Sigma-Aldrich S.A.) de la cual se hicieron diluciones conocidas (2.5-100 μM). Comenzamos preparando una solución madre al 1 mM de L-citrulina e hicimos alícuotas de 2000 μl que mantuvimos congeladas a -20°C. La elaboración de las diluciones seriadas se hizo según se muestra en la Tabla 6.

2

Tabla 6.- Diluciones de la curva patrón de L-citrulina

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN A	VOLUMEN DE
	PASAR	MEDIO
100 μM	100 μl de SM	9000 μl
80 μM	↓ 6400 μl	1600 μl
60 μM	↓ 4800 μl	1600 μl
40 μM	↓ 3200 μl	1600 μl
20 μM	↓ 2400 μl	1600 μl
10 μM	↓ 2400 μl	1600 μl
5 μM	↓ 2400 μl	1600 μl
2.5 μM	↓ 2400 μl	1600 μl
BLANCO (Medio)		2000 μl



III.4.2.6.- Aislamiento de macrófagos

Los macrófagos se aislaron de la porción anterior del riñón de las doradas del estudio, inmediatamente después de su sacrificio, según el protocolo descrito por SECOMBES (1990).

El riñón proximal fue extraído y macerado haciéndolo pasar por una membrana de nylon de 100 μ de poro (Eppendorf), resuspendiéndolo en medio Leibovitz L-15 (Sigma-Aldrich S.A.) suplementado con un 2% de suero fetal bovino (FBS) (Biochrom KG), 100 μ g de penicilina por ml, 100 μ g de estreptomicina por ml (P/S) (Biochrom KG) y 10 unidades de heparina por ml (Sigma-Aldrich S.A.). Esta suspensión fue colocada sobre un gradiente discontinuo de percoll (51/34%) (Sigma-Aldrich S.A.) y la centrifugamos a 1400 g durante 35 minutos. La banda de células que aparece en la interfase del percoll fue recogida según aparece en la Figura 3, y lavadas dos veces con medio L-15. Posteriormente, realizamos un contaje en un hemocitómetro, y la concentración fue ajustada a 1×10^7 células/ml con L-15 suplementado con un 0.1% de suero fetal bovino (FBS) y P/S, repartiendo 100 μ l de esta suspensión de células en cada pocillo de las placas de 96 pocillos (Corning). Se Incubó 3 horas a 18°C y entonces el medio fue retirado para eliminar las células no adheridas al pocillo. Las tres placas preparadas fueron lavadas dos veces con solución balanceada de Hank (Sigma-Aldrich S.A.) mediante inversión sobre papel de filtro, eliminando la solución de los pocillos y llenando de nuevo con la misma solución, para



posteriormente realizar la extracción del ARN de los macrófagos según se describe en el apartado III.4.2.7.

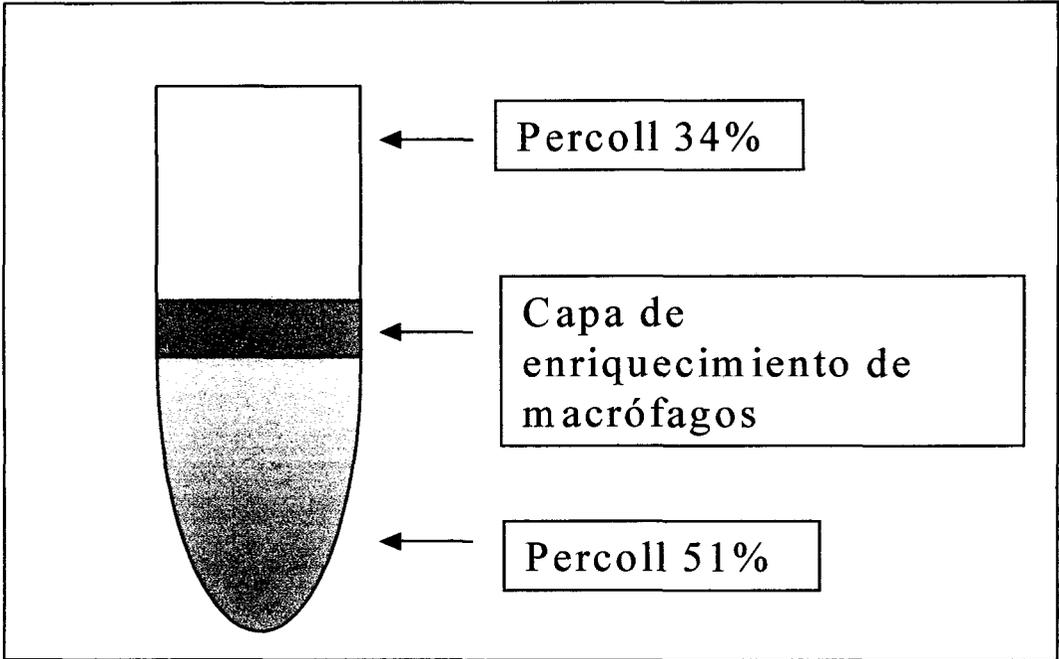


Figura 3.- Esquema del gradiente de percoll para la obtención enriquecida de macrófagos.

III.4.2.7.- Extracción del ARN

El ARN total fue extraído a partir del hígado, agallas, intestino, bazo, sistema nervioso, riñón y de los macrófagos aislados del riñón anterior de los peces sacrificados.

Para la extracción se tomó una muestra de cada tejido de unos 25 mg, la cual fue congelada en nitrógeno líquido. Posteriormente, la muestra fue macerada, y resuspendida en 0,5



ml de Trizol, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Biotech) y manteniéndola mientras tanto en hielo, añadiéndole 500 μ l de cloroformo (Panreac). La suspensión fue mezclada con agitación fuerte durante 15 segundos en vortex, y centrifugada a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. La fase acuosa se recogió en eppendorfs, añadiéndole el mismo volumen de Isopropanol (Sigma-Aldrich S.A.) frío, e incubándola toda la noche a -20 °C.

Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4°C, eliminando el sobrenadante. Al precipitado se le añadió 500 μ l de etanol (Panreac) 70% frío, y centrifugamos a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Este paso se repite dos veces. El sobrenadante es retirado, y dejamos secar el precipitado por completo para posteriormente añadir de 20 a 40 μ l de agua destilada tratada con dietil pirocarbamato (DEPC) (Sigma-Aldrich S.A.). Posteriormente, para diluirlo bien, el precipitado se calentó a 55°C en un baño durante unos 10 min.

Para evaluar la calidad del ARN extraído, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda. La relación entre ambas medidas (lectura 260/lectura 280) nos debe dar valores entre 1.6 y 2 si el ARN obtenido es de buena calidad.

Para cuantificar la cantidad de ARN de la extracción se tomó la lectura medida a 260 nm y la multiplicamos por 4, obteniendo de esta forma el número de μ g/ μ l.



III.4.2.8.- Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para elaborar ADNc a partir de ARN es necesaria la participación de una enzima transcriptasa inversa, la cual puede construir una cadena de ácidos nucleicos complementaria a la cadena molde. Para ello es necesario la presencia de una cadena iniciadora que hibrida en el extremo 3' de la cadena molde. La razón de recurrir a esta transformación es por la fragilidad del ARN en comparación con el ADNc, el cual se mantiene viable mucho más tiempo y se conserva de manera más fácil que el ARN.

Para la transcripción inversa del ARN a ADNc se tomó 1 μ g de ARN y se añadió 1 μ l de la cadena iniciadora (oligo (DT) 12-18) (Amersham-Pharmacia), 2 μ l de tampón, 4 μ l de Cl_2Mg , 1 μ l de la mezcla de dinucleótidos-fosfato (20 mM) (Amersham-Pharmacia), 0.6 μ l de inhibidor de la ribonucleasa (RNAsin) (Promega), 0.3 μ l de la enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV transcriptasa inversa) (Promega) y 2.1 μ l de agua DEPC. Posteriormente, se incubó durante 75 min a 42°C, para luego ponerlo 10 min a 94 °C y finalmente 5 min en un baño helado a 4°C. El ADNc se conservó a 4°C.

III.4.2.9.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la detección de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en dorada por RT-PCR fue utilizada la técnica de *Nested-PCR*. Para la primera fase de la técnica se utilizaron los cebadores NOS-M (5'-



GTTGGTACATGGGCACTGA-3') y NOS-N (5'-GTAATGTCCAGGAAG-TAGGTG-3'). Los cebadores NOS-P (5'-CTTCAACTCCAGGTTGCTCTG-3') y NOS-Q (5'-TCACTCGGAAGGTGTCAGAAC-3') fueron usados en la segunda fase de la reacción. Todos los cebadores se usaron a una concentración de 20 pg/ml y fueron elaborados por Genset S.A. (París, Francia). Los cebadores se han diseñado siguiendo las directrices de trabajos previos (CAMPOS-PÉREZ y col., 2000b) que detectaron la presencia de la enzima en trucha arcoiris.

La amplificación fue realizada en un volumen de 25 µl conteniendo 2.5 µl de tampón, 2 µl de la mezcla de dinucleótidos-fosfato, 1 µl de Cl₂Mg (Promega), 0.125 µl de Taq polimerasa (Promega), 1 µl de ADNc y el resto hasta 25 µl de agua ultrapura estéril, por cada reacción.

Como control de la técnica fue utilizado igualmente un juego de cebadores diseñado para la detección de la β-Actina (proteína constitutiva de los tejidos). Debido a que el gen que expresa esta proteína está muy conservado en casi todas las especies, su fórmula es idéntica a las previamente utilizadas (CAMPOS-PÉREZ, 2000b). Los cebadores son el BAC-1 (5'-ATCGTGGGCGCCCC-AGGCACC-3') y BAC-2 (5'-CTCCTTAATGT-CACGCACGATTTC-3'). El protocolo en cuanto al número de ciclos, tiempo de acción y temperatura utilizados en cada fase, se describe en la Tabla 7.



Como control negativo fue utilizado un eppendorf con agua destilada estéril en lugar de cDNA.

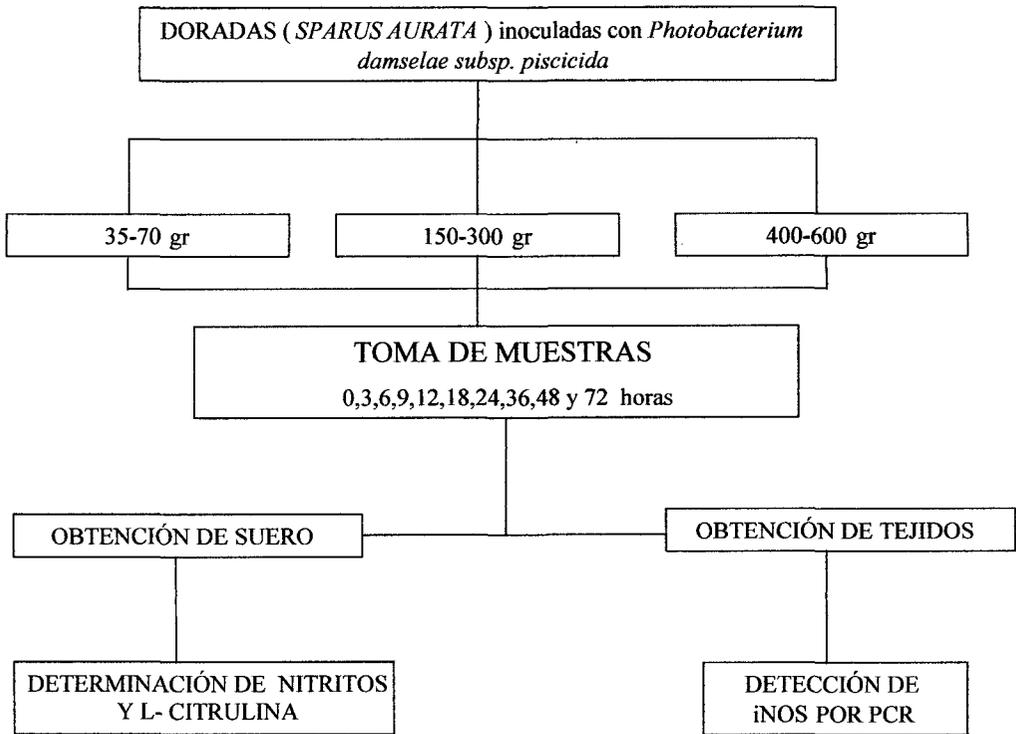
Los productos del PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos en una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos, y luego lavadas en agua destilada otros 30 minutos. Posteriormente, fueron estudiados con un sistema de análisis de imagen (UVP).

Tabla 7.- Protocolo de ciclos

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° de ciclos
94	5	1
94	1	} 35
60	1	
72	1	
72	10	1

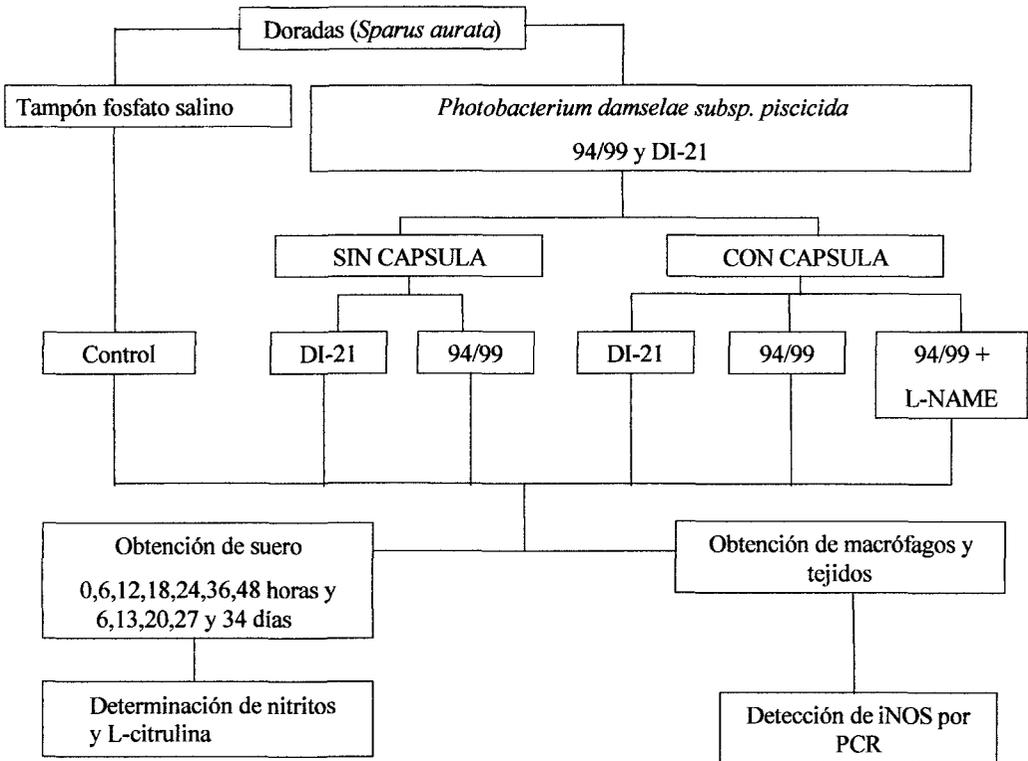
Como marcador de peso molecular, se utilizó uno de 50-2000 pares de bases (#170-8200, Laboratorios Bio-Rad S.A.).





ESQUEMA 4.- Experiencia preliminar





ESQUEMA 5.- Infección experimental con *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.



Desarrollo del objetivo 5.- COMPARAR LOS VALORES DE LAS VARIABLES SEÑALADAS EN EL OBJETIVO 2, OBTENIDOS EN EL CURSO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL, CON AQUELLOS OBTENIDOS EN DORADAS PREVIAMENTE INMUNIZADAS CON UNA BACTERINA, CON Y SIN ADYUVANTE DE FREUND INCOMPLETO.

Desarrollo del objetivo 6.- DETECTAR LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS), NECESARIA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO, EN LOS TEJIDOS DE DORADA, Y EVALUAR SU CINÉTICA DE PRODUCCIÓN EN PECES INFECTADOS Y EN LOS PREVIAMENTE INMUNIZADOS CON *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

III.4.3.-EXPERIENCIA III.- Inmunización frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e infección posterior

Para este apartado fueron utilizadas doradas obtenidas y mantenidas en idénticas condiciones a las descritas en los apartados anteriores. Nueve tanques con 30 peces cada uno y divididos en tres grupos fueron dispuestos con el fin de que cada estimación se hiciera por triplicado. La cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* utilizada en esta fase fue la 94/99 capsulada, la cual se inactivó y administró a los peces vía intraperitoneal. Los grupos se dividieron de la siguiente forma:

- Un grupo recibió la bacterina mezclada con Adyuvante de Freund Incompleto.



- Otro grupo recibió la bacterina sola.
- Un tercer grupo fue inoculado con tampón fosfato salino estéril (control de la infección).
- Un cuarto grupo sólo recibió tampón fosfato salino estéril y no fue posteriormente infectado (testigo).

Transcurrido un mes se procedió a infectar experimentalmente a estos peces con una dosis similar a la utilizada en la infección experimental, salvo al 4º grupo. Los animales fueron sometidos a los mismos muestreos y mediciones de variables que los descritos en los peces inoculados experimentalmente en la experiencia II, con el fin de comparar los posibles cambios. El desarrollo de este apartado se refleja en el Esquema 5.

III.4.3.1.- Elaboración de la vacuna

La cepa utilizada para elaborar la bacterina fue la 94/99, la cual se sembró en Infusión Cerebro Corazón (Cultimed) adicionado con un 1% de NaCl y un 1% de glucosa, incubándose en agitación a 25°C durante 24-48 horas para obtener un cultivo fresco en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo, el medio fue centrifugado en tubos de 25 ml de volumen (Corning), a 4000 r.p.m. durante 20 minutos. El sobrenadante fue retirado, y el precipitado se lavó dos veces con tampón fosfato salino estéril. El precipitado obtenido fue resuspendido en la misma solución tampón a una concentración final aproximada de 10^9 u.f.c./ml ajustada mediante un



espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell) a una densidad óptica de 0.68, medida a una longitud de onda de 590 nm.

Se añadió formol (Panreac) en una proporción final del 5‰ de una solución de formaldehído al 35%, depositándolo en un agitador de balanceo (Hybaid, shaker HB-SHK1) durante 24 horas a 25°C para inactivar las bacterias. A las 24 horas, se tomó una alícuota, sembrándola en Agar Sangre (Cultimed) con un 1% de NaCl para comprobar su inactivación e incubada a 25°C durante 48 horas, mientras se mantiene la bacterina a 4°C. A la vez, 10 doradas fueron inyectadas vía intraperitoneal con 300 µl de la bacterina para comprobar su inocuidad. Una vez asegurada su inactivación comprobando la ausencia de colonias en el medio usado, y su inocuidad verificando la ausencia de efectos indeseables en los peces inoculados, la bacterina quedó lista para su utilización.

III.4.3.2.- Protocolo de inmunización

Para la inoculación de la bacterina fue utilizada la vía intraperitoneal. Los peces fueron previamente anestesiados sumergiéndolos en agua con 2-fenoxietanol (300 µl/l) (Sigma-Aldrich S.A.). Una vez anestesiados se les inyectó a los diferentes grupos:

- 100 µl de la bacterina a uno de los grupos
- A otro se le inyectó la bacterina mezclada con Adyuvante de Freund Incompleto en proporciones iguales (100 µl de bacterina + 100 µl de adyuvante)



- El grupo control se inoculó con 100 µl de tampón fosfato salino estéril.
- Un último grupo (testigo) se inoculó con 100 µl de tampón fosfato salino estéril.

Los peces se mantuvieron durante cuatro semanas para permitir una inmunización activa, tras las cuales fueron inoculados (salvo el grupo testigo), y muestreados de idéntica forma que los peces de la experiencia II.

III.4.3.3.- Determinación de la concentración de nitratos y L-citrulina en cultivos de macrófagos *in vitro*

En este apartado se pretendió establecer la relación existente entre la producción de nitritos y L-citrulina entre macrófagos de peces sin inmunizar y peces inmunizados de diferentes formas, así como de macrófagos no tratados y tratados con factores de activación de los macrófagos (MAF).

Para el desarrollo de este apartado fueron utilizadas doradas procedentes del experimento de inmunización (Experiencia III). Para ello, una vez transcurrido el mes de inmunización se tomaron 5 peces de cada uno, es decir, 5 peces control, 5 peces inmunizados con la bacterina más Adyuvante de Freund Incompleto, 5 peces testigos y 5 peces sólo inmunizados con la bacterina.



A estos peces les fue extraído el riñón anterior, y de él extrajimos los macrófagos según el protocolo descrito en el apartado III.4.2.6.

Los macrófagos obtenidos a partir de los peces de la experiencia de inmunización se dividieron en dos grupos:

- uno tratado con los MAF (ver III.4.3.5)
- otro no tratado.

Para realizar dicho tratamiento, los macrófagos se pusieron en contacto con los MAF durante 48 horas siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto III.4.3.6. Posteriormente se lavó dos veces con L-15, y finalmente fue añadido a cada pocillo de los macrófagos tratados y no tratados, 100 µl de una suspensión de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (3×10^3 bacterias en 100 µl de L-15 con 5% de suero fetal bovino). Las placas fueron centrifugadas a 150 g durante 5 minutos a 4°C para provocar un mejor contacto de la monocapa de macrófagos con las bacterias. Posteriormente las placas fueron incubadas a 18°C durante 3 días.

La medición de nitritos y L-citrulina fue llevada a cabo según el protocolo descrito en los apartados III.4.2.4 y III.4.2.5, respectivamente.

El desarrollo de este punto se resume en el Esquema 6.



III.4.3.4.- Estudio de la “explosión respiratoria”

En este apartado se pretendió establecer la relación existente entre la producción de radicales superóxido entre macrófagos de peces sin inmunizar e inmunizados de diferentes formas .

Para el desarrollo de este apartado se utilizaron doradas del experimento de inmunización. Para ello, una vez transcurrido el mes de inmunización, se tomaron 5 peces de cada grupo, es decir, 5 peces control, 5 peces inmunizados con la bacterina más Adyuvante de Freund Incompleto y 5 peces sólo inmunizados con la bacterina.

A estos peces les fue extraído el riñón anterior y de él extrajimos los macrófagos según el protocolo descrito en el apartado III.4.2.6.

Los macrófagos de cada grupo, a su vez, se dividieron en dos lotes, uno tratados con factores activadores de los macrófagos (MAF) y otro sin tratar. Posteriormente, esos lotes de macrófagos fueron inoculados con las dosis de bacterias de 2×10^6 a 4×10^6 bacterias en 100 μ l, para estimular la “explosión respiratoria”, y calcular la producción de radicales superóxido en los diferentes grupos.

El desarrollo de este punto se resume en el Esquema 7.



III.4.3.5.- Producción de los factores activadores de los macrófagos (MAF)

Los MAF fueron producidos utilizando el método descrito por GRAHAM y SECOMBES (1988) con la modificación de no incluir antibióticos para evitar interferencias en los ensayos con bacterias posteriores (HARDIE y cols., 1996).

Los macrófagos fueron obtenidos según lo descrito en el apartado III.4.2.6 a partir de riñón anterior de 3 doradas procedentes de un grupo de animales que no se había utilizado hasta el momento para ninguna experiencia previa y en el cual se hicieron las comprobaciones previas pertinentes descritas en el apartado III.1. Los macrófagos fueron estimulados durante 3 horas con 100 µl de una solución compuesta por:

- 10 µg de concavalina A
- 5 µg de acetato de forbol myristato
- 1 ml de agua destilada

Transcurrido este tiempo las placas fueron lavadas con medio L-15, y finalmente, a las células se les añadió 100 µl de medio L-15 con un 10% de suero fetal bovino para incubarlas a 18°C durante 48 horas. Posteriormente, se recogió el sobrenadante donde se encuentran estos factores “MAF”.

III.4.3.6.- Determinación de la “explosión respiratoria”

Los macrófagos obtenidos a partir de los peces de la experiencia de inmunización se dividieron en dos grupos:



- Uno tratado con los MAF
- Otro no tratado.

Para realizar dicho tratamiento, los macrófagos se pusieron en contacto con 100 μ l de MAF durante 48 horas. Posteriormente se lavó dos veces con L-15 y, finalmente se añadió a cada pocillo de los macrófagos tratados y no tratados 100 μ l de diferentes diluciones de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (2×10^6 , 2.5×10^6 , 3×10^6 , 3.5×10^6 y 4×10^6 bacterias en 100 μ l de L-15 con 5% de suero fetal bovino). Las placas fueron centrifugadas a 4°C durante 5 minutos a 150 g para provocar un mejor contacto de la monocapa de macrófagos con las bacterias. Posteriormente, se incubaron las placas a 18°C durante 3 días.

Las placas fueron lavadas cuidadosamente dos veces con solución balanceada de Hank (HBSS) sin rojo fenol. Para estimular la “explosión respiratoria”, cada pocillo recibió 100 μ l de una solución de:

- 2 mg Ferricitocromo C (Sigma-Aldrich S.A.)
- 1 μ g de acetato forbol miristato (Sigma-Aldrich S.A.)
- 1 ml de HBSS sin rojo fenol

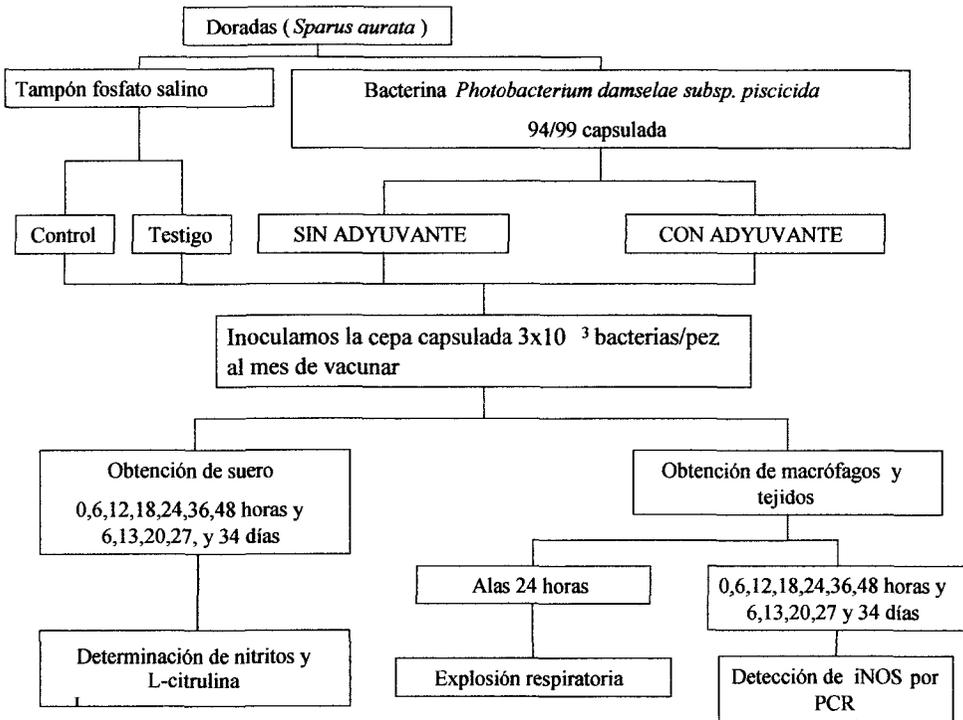
Como control de la técnica se tomaron 5 pocillos de cada grupo y se les añadió superóxido dismutasa (SOD) a una concentración de 300 UI/ml. Como blanco fueron utilizados pocillos con HBSS sin rojo fenol y SOD.



La densidad óptica de cada pocillo fue medida en un espectrofotómetro (Boheringer-Mangein, Spectra shell) a una longitud de onda de 550 nm.

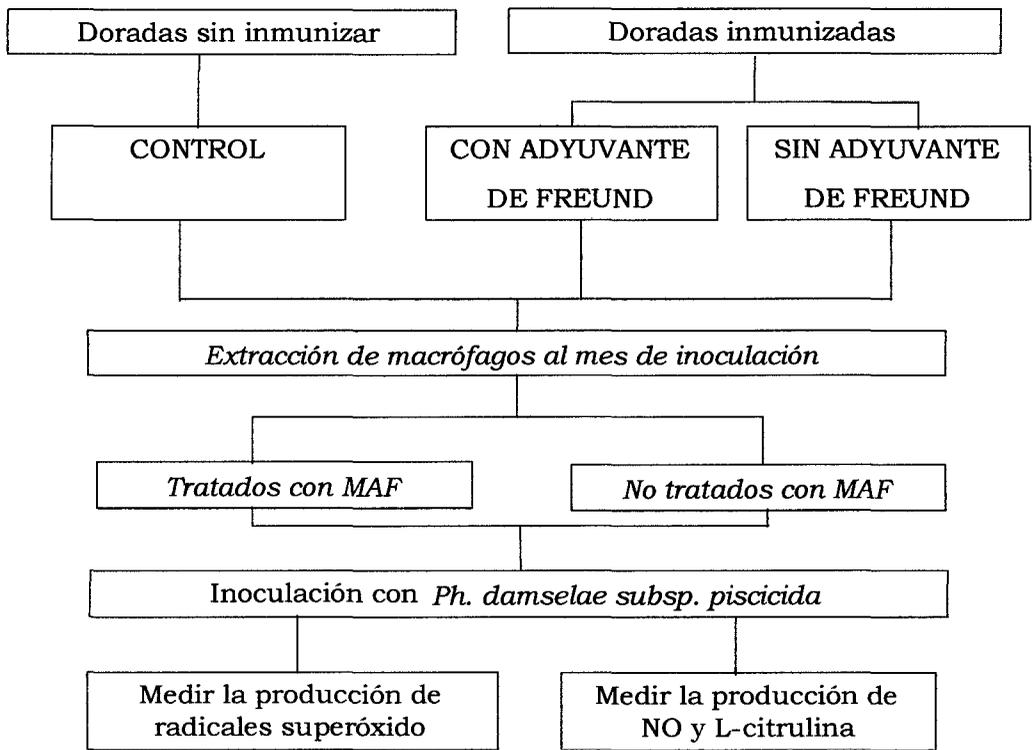
Las densidades ópticas obtenidas fueron convertidas en nmol. de O^{2-} según describió PICK (1986), multiplicando por el factor de corrección 15.87.





ESQUEMA 6.- Experiencia de inmunización e infección posterior





ESQUEMA 7.- Estudio de la “explosión respiratoria” y determinación de NO y L-citrulina.



III.5.- Tratamiento estadístico

Para el análisis de los resultados, se utilizó un modelo de análisis lineal de un solo factor, a fin de determinar, por separado, la variación atribuible a los efectos de la presencia o ausencia de cápsula, tipo de inmunización, utilizando la producción de óxido nítrico como variable:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es el valor individual del animal, μ es la media de la población, T_i es el efecto del factor i -ésimo bajo consideración presencia o ausencia de cápsula, tipo de inmunización ε_{ij} es el error asociado al registro ij -ésimo.

El software utilizado para el tratamiento estadístico de los datos fue el programa SPSS (Versión 8.0).

Las diferencias estadísticas se reflejarán como significativas cuando el intervalo de confianza sea $p < 0.05$ y muy significativas cuando sea $p < 0.01$.

En las tablas expresamos la existencia de diferencias significativas o muy significativas de un valor con respecto a su correspondiente control mediante la impresión de uno o dos asteriscos sobre el valor, respectivamente.



RESULTADOS



IV.1.- Comprobación de la presencia de cápsula en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Como podemos observar en la Figura 4, en el recuadro A podemos ver la bacteria cultivada en Agar Sangre con sal, evidenciando la ausencia de cápsula, mientras en el recuadro B la bacteria está cultivada en el BHIA enriquecido con glucosa, manifestando su forma capsulada.

IV.2.- EXPERIENCIA I

IV.2.1.- Actividad bactericida del óxido nítrico y los peroxinitritos sobre *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

IV.2.1.1.- Toxicidad del óxido nítrico

Los resultados de este experimento (medias \pm errores estándar) incluye datos promediados obtenidos de las 4 cepas usadas (C2, DI-21, 94/99 y ATCC 17911), ya que los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre los valores alcanzados para cada una de ellas.

El donador de óxido nítrico (SNAP) fue tóxico para todas las cepas estudiadas. Según se aprecia en la Figura 5 y Tabla 8, el valor de supervivencia de cada cepa fue disminuyendo



gradualmente conforme se incrementaba la concentración de SNAP, con independencia de que la cepa estuviera o no capsulada. Con las cepas no capsuladas, la supervivencia disminuyó más marcadamente entre las concentraciones de 10 y 300 μM de SNAP, mientras que las cepas capsuladas demostraron una disminución más uniforme con todas las concentraciones probadas. Todas las cepas acapsuladas mostraron una mayor sensibilidad, teniendo una disminución de la supervivencia del 38% de media en la concentración mayor de SNAP utilizada. Las cepas capsuladas fueron mucho más resistentes a la acción del óxido nítrico, teniendo una disminución de la supervivencia del 14.25% en la concentración mayor de SNAP utilizada con respecto a los controles no tratados (Figura 5 y Tabla 8). Las diferencias observadas entre cepas capsuladas y no capsuladas no fueron significativas para las concentraciones de 0 (control) y 10 μM . Para las concentraciones de 30 y 100 μM mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), mientras que las concentraciones de 300 y 1000 μM mostraron diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.01$).

Cuando se comparó las concentraciones obtenidas para las cepas capsuladas y acapsuladas con los controles, encontramos en el caso de las cepas capsuladas, que la concentración de 10 μM no mostró diferencias estadísticamente significativas, las concentraciones desde 30 hasta 300 μM mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), y la de 1000 μM muy significativas ($p < 0.01$).



Para las cepas acapsuladas, se observó que la concentración de 10 μM mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) y que las concentraciones desde 30 hasta 1000 μM mostraban diferencias muy significativas ($p < 0.01$) (Tabla 8).

En la Figura 6 y Tabla 9, se puede observar cómo disminuyen los valores medios de supervivencia de las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* tanto para las cepas capsuladas como acapsuladas, a medida que se incrementaba la concentración media de nitritos en el sobrenadante de los pocillos. Puede apreciarse que la disminución de la supervivencia es proporcional al aumento de nitritos en el medio. Además, el cruce de las curvas sucede primero con los valores de las cepas acapsuladas con una concentración de nitritos aproximada de 45 μmoles , mientras la cepa capsulada lo hace más tarde, a un valor aproximado de nitritos de 68 μmoles . También comprobamos que se produce el efecto esperado en las concentraciones de nitritos obtenidas en el medio, los cuales se incrementan proporcionalmente con el aumento de las concentraciones de SNAP en los pocillos.

Hemos comprobado que las cepas incubadas con 1 mM de N-acetil penicilamina, producto parental del SNAP, no actúa sobre la bacteria, y por tanto, no fueron inactivadas, mostrando valores similares al de los controles (Figura 7 y Tabla 10).



IV.2.1.2.- Toxicidad de los peroxinitritos

Los resultados de este experimento, al igual que la experiencia con el SNAP, se muestran mediante las medias y errores estándar de los valores obtenidos por separado con las 4 cepas usadas (C2, DI-21, 94/99 y ATCC 17911), y tras comprobar que al comparar mediante análisis estadístico, cada una con las demás no existían diferencias significativas entre los valores alcanzados por cada una de ellas.

Todas las cepas se comportaron de forma similar siguiendo la tendencia que se muestra en la Figura 8.

El SIN-1 fue tóxico, tanto para las cepas capsuladas, como acapsuladas, si bien el efecto fue más aparente en las cepas no capsuladas, los cuales redujeron sus valores de supervivencia en torno al 53.7%, mientras que las capsuladas sólo lo hicieron en un 34.8%. (Figura 8 y Tablas 11 y 12). Tal como observamos en dicha figura, los peroxinitritos acentúan la disminución del valor de supervivencia de las cepas, los cuales van decayendo paulatinamente hasta situarse en la medida correspondiente a la concentración más alta, por debajo del 47% para las no capsuladas, y aproximadamente el 65% para las cepas capsuladas. La disminución más acentuada se notó en ambos casos con la primera concentración de 10 μM de SIN-1 añadida.

Al añadir SOD, el efecto de los peroxinitritos fue revertido parcialmente, siendo la pérdida de viabilidad en la medición hecha en la concentración más alta de SIN-1 en las cepas no capsuladas



del 24.7%, y del 23.9% en las capsuladas (Figura 8 y Tablas 11 y 12).

Las muestras incubadas con SOD+CAT mostraron un comportamiento similar al anterior, con reducciones del 21.4% en las no capsuladas, y del 22.4% en las capsuladas. (Figura 8 y Tablas 11 y 12).

Las diferencias observadas entre cepas capsuladas y no capsuladas en todos los casos, fueron estadísticamente significativas a un nivel de confianza de $p < 0.05$ para las concentraciones de 30 y 100 μM de SIN-1, y muy significativas ($p < 0.01$) para las concentraciones de 300 y 1000 μM de SIN-1, no existiendo esas diferencias cuando comparamos los grupos de SIN-1+SOD y de SIN-1+SOD+CAT.

Al comparar las diferentes concentraciones con los controles encontramos en el caso de las cepas capsuladas, que las concentraciones de 10, 30 y 100 μM mostraban diferencias significativas ($p < 0.05$), y las de 300 y 1000 μM muy significativas ($p < 0.01$) para el SIN-1. Para el SIN-1+SOD, la concentración de 10 μM no mostró diferencia, y en el resto de concentraciones las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). En el caso de SIN-1+SOD+CAT las concentraciones de 10 y 30 μM , no fueron significativas y en el resto de concentraciones las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) (Tabla 11).



Al comparar las diferentes concentraciones con los controles en el caso de las cepas no capsuladas, la concentración de 10 μM mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Las de 30, 100, 300 y 1000 μM muy significativas ($p < 0.01$) para el SIN-1. Para el SIN-1+SOD las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) en todas las concentraciones, y en el caso de SIN-1+SOD+CAT no fue significativa la concentración de 10 μM , mientras que en el resto de concentraciones las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) (Tabla 12).

En la segunda parte de esta experiencia (Figura 9 y Tablas 13 y 14), se pretendió comparar estos resultados por otra vía, esto es, las mediciones de los pocillos que sólo tenían 1mM de SNAP en los pocillos, y los de SNAP adicionados con otros donadores de radicales superóxido como son xantina/xantina oxidasa y glucosa/glucosa oxidasa, observando que existe un efecto mayor en aquellos pocillos que tienen SNAP adicionado con xantina/xantina oxidasa y glucosa/glucosa oxidasa en los cuales se forman peroxinitritos con relación a los que tienen sólo SNAP donde sólo existe óxido nítrico. En los primeros, la disminución de la supervivencia a las 24 horas, fue del 35.4 al 37.6% para las cepas no capsuladas y del 53.2% al 55.9% para las capsuladas respectivamente, y cuando se utilizó el SNAP la disminución fue sólo del 40% para las no capsuladas y del 13.3% en las capsuladas. En cualquier caso, la pendiente de la disminución de



la supervivencia fue mucho más marcada con todos los donadores añadidos a los pocillos de las cepas no capsuladas.

Comparando el nivel de significación obtenido entre cepas capsuladas y no capsuladas, las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) a las 0 y 6 horas entre todos los casos, excepto para el tiempo de 6 horas de SNAP solo, y muy significativas ($p < 0.01$) para el resto de mediciones en los tres casos.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los controles, se observó que en el caso de las cepas capsuladas, hasta las 6 y 9 horas no hubo diferencias significativas, y sólo entre 12 y 24 estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) para el SNAP. Para el SNAP+X/Xo y el SNAP+G/Go las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) a las 6 y 9 horas, y muy significativas ($p < 0.01$) de 12 a 24 horas (Tabla 13).

Si comparamos los diferentes resultados obtenidos hasta las 6 horas con los controles en el caso de las cepas no capsuladas, no encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$). Desde las 9 a las 18 horas fueron significativas ($p < 0.05$), y a las 24 horas fueron muy significativas ($p < 0.01$) para el SNAP. Para el SNAP+X/Xo las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas y muy significativas ($p < 0.01$) hasta el final. Para el SNAP+G/Go las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) a las 6 y 9, y muy significativas ($p < 0.01$) de 12 a 24 (Tabla 14).



Al comparar las curvas de supervivencia obtenidas que refleja cada producto entre sí, y a ellos mismos con los controles, tanto para el óxido nítrico como para los peroxinitritos fueron similares a las que obtuvimos en la experiencia anterior en la que usamos SNAP y SIN-1 como donadores de ON y ONOO- respectivamente.

IV.3.- EXPERIENCIA II

IV.3.1.- Experiencia preliminar

Las doradas de 150-300 gr y las de 400-600 gr infectadas no mostraron variaciones significativas con relación a sus respectivos controles, no observándose en ninguno de los dos casos más de 0.5 μ moles de óxido nítrico (Figura 10 y Tabla 15) ni de L-citrulina (Figura 11 y Tabla 16). En el caso del grupo de peces de 35-70 gr se observó un aumento progresivo del óxido nítrico con un pico a las 24 horas, donde se midió una media de 16.69 μ moles para luego comenzar a descender (Figura 10 y Tabla 15). La L-citrulina mantuvo un comportamiento similar al de los nitritos con un valor máximo a las 24 horas de 16 μ moles (Figura 11 y Tabla 16). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) para ambos valores a las 6 horas postinoculación y muy significativas ($p < 0.01$) para el resto de las mediciones con respecto a sus controles (Tablas 15 y 16).



A partir de agallas, hígado, bazo, intestino, riñón, macrófagos, y sistema nervioso, extraídos a los peces de las diferentes tallas mencionadas, se hizo la técnica de PCR y en ninguno de los grupos de peces inoculados se detectó la banda de 791 pares de bases que nuestros cebadores debían amplificar. El control positivo de la técnica detectó la banda de β -actina (541 pares de bases) en todos los tejidos de los peces (Figura 12), a su vez, el control negativo también dio el resultado esperado.

IV.3.2.- Respuesta de la dorada frente a la infección experimental con *Photobacterium damselae subsp. piscicida*.

IV.3.2.1.- Determinación de nitritos en el suero sanguíneo

Los resultados obtenidos en esta experiencia se describen en las Figuras de la 13 a la 15, en las cuales no aparecen todos los valores de los tiempos muestreados, pues a partir de las 480 horas (20 días) los resultados obtenidos fueron similares a los del día 20 postinfección. Sin embargo, en las Tablas, sí se muestran todos los valores obtenidos hasta el final de la experiencia.

Los peces inoculados, tanto con las cepas acapsuladas como con las capsuladas, mostraron un incremento en la concentración de nitritos en el suero sanguíneo a partir de las 6 horas postinoculación alcanzándose valores de 3 y 4.97 μ moles, respectivamente, niveles que siguieron aumentando hasta las 24 horas donde se registraron picos de óxido nítrico en torno a los 26 μ moles para los peces inoculados con las cepas capsuladas, y



entre 15.88 y 17.16 μ moles para los inoculados con las cepas acapsuladas (Figura 13, Tablas 17 y 18).

A partir de las 24 horas comenzó un descenso en las concentraciones séricas de nitritos, los cuales alcanzaron sus valores mínimos alrededor de las 480 horas (20 días) postinfección, para mantenerse en niveles en torno a 1 μ mol para los inoculados con las cepas capsuladas y de 0.33 μ moles para los inoculados con las cepas acapsuladas hasta el final de la experiencia (Figura 13 y Tablas 17 y 18). Por otro lado, puede apreciarse en la Figura 13 que con las dos cepas utilizadas en esta experiencia se han obtenido unos valores y una cinética muy similar.

Los resultados obtenidos con los peces infectados con la bacteria capsulada y los inoculados con la cepa acapsulada mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 6 y 12 horas postinoculación, para pasar estas diferencias a ser muy significativas ($p < 0.01$) a las 24 y 48 horas, volviéndose significativas ($p < 0.05$) a las 72 y 144 horas. En el resto de los tiempos observados no se encontraron diferencias significativas.

Los peces controles inoculados con PBS estéril mostraron niveles basales de nitritos durante todas las mediciones realizadas que como promedio estuvieron en torno a los 0.15 μ moles (Figura 13, Tablas 17 y 18).



Al comparar las concentraciones de nitritos de los peces controles y los inoculados con las cepas capsuladas, encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 6 horas hasta las 144 horas (6 días), mientras a las 312 horas existían sólo diferencias significativas ($p < 0.05$). En el resto de observaciones las diferencias no fueron significativas (Tablas 17 y 18).

Cuando comparamos los valores de las concentraciones de nitritos de los animales inoculados con las cepas no capsuladas frente a las de los controles, también hemos encontrado diferencias muy significativas ($p < 0.01$), pero en este caso desde las 12 horas hasta las 72 horas, mientras a las 6 y 144 horas las diferencias fueron solamente significativas ($p < 0.05$). En el resto de las observaciones los resultados no mostraron significación estadística (Tablas 17 y 18).

Antes de la infección experimental, el grupo de peces tratados con el inhibidor de la producción de óxido nítrico -L-NAME-, mostró niveles de nitritos basales, los cuales se elevaron a las 6 horas de la inoculación en torno a $1 \mu\text{mol}$ para la infección con la cepa capsulada y de $0.7 \mu\text{moles}$ para la infección con la cepa acapsulada, para mantenerse posteriormente durante toda la experiencia en estos niveles (Figura 14, Tabla 19).

A pesar de que cada grupo mantuvo durante la experiencia distintos valores en las concentraciones de nitritos en el suero, en



ninguno de los casos, cuando comparamos los resultados de las cepas capsuladas con las acapsuladas, ni entre estas y sus controles, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Al comparar las concentraciones de nitritos en el suero sanguíneo de los peces tratados y no tratados con L-NAME, las diferencias obtenidas fueron las mismas en el caso de las cepas capsuladas y acapsuladas. Existiendo diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 6 horas hasta las 144 horas (6 días), mientras que a las 312 horas mostraron diferencias sólo significativas ($p < 0.05$), en el resto de las observaciones las diferencias no tuvieron significación estadística.

IV.3.2.2.- Determinación de L-citrulina en el suero sanguíneo

Este producto se detectó durante el desarrollo de esta experiencia en ambos grupos de peces infectados, tanto en los peces infectados con cepas acapsuladas, como en los infectados con cepas capsuladas, ofreciendo una cinética de producción similar a la estudiada con los nitritos en el punto anterior, aumentando paulatinamente hasta las 24 horas, donde se observaron valores cercanos a 26 μ moles de media para los peces infectados con cepas capsuladas, y de 16 μ moles de media para los peces infectados con cepas acapsuladas (Figura 15, Tablas 20 y 21). También en este caso los valores obtenidos con las dos cepas probadas fueron muy similares (Figura 15, Tablas 20 y 21).



Las diferencias obtenidas en las concentraciones de L-citrulina en el suero sanguíneo entre los peces infectados con bacteria capsulada y los inoculados con la cepa acapsulada fueron significativas ($p < 0.05$) a las 6 y 12 horas postinoculación, pasando posteriormente estas diferencias a ser muy significativas ($p < 0.01$) a las 24 y 48 horas, volviéndose significativas ($p < 0.05$) a las 72 y 144 horas. En el resto de las mediciones realizadas no se encontraron diferencias significativas.

Durante todas las mediciones realizadas, los peces controles presentaron niveles basales de este producto, en torno a 0.15 μ moles de media con las dos cepas utilizadas.

Al comparar las concentraciones de L-citrulina en el suero sanguíneo de los peces del grupo control y los inoculados con las cepas capsuladas, se encontraron diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 6 horas hasta las 144 horas (6 días), las cuales se volvieron sólo significativas ($p < 0.05$) a las 312 horas (13 días). En el resto de observaciones las diferencias no fueron significativas (Tablas 20 y 21).

Cuando se comparó las concentraciones de L-citrulina para los peces inoculados con las cepas no capsuladas frente a los del grupo control, encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 12 horas hasta las 72 horas (3 días), mientras que entre las 6 y 312 horas estas diferencias sólo fueron significativas



($p < 0.05$). En el resto de las observaciones medidas no encontramos significación estadística (Tablas 20 y 21).

El suero analizado de los peces tratados con L-NAME mostró también el mismo patrón de comportamiento que el obtenido en las mediciones de nitritos, siendo los valores obtenidos en torno a 1 μmol para la infección con la cepa capsulada y de 0.7 μmoles para los de la infección con la cepa acapsulada (Figura 16, Tabla 22).

Cuando comparamos los resultados de las cepas capsuladas con las acapsuladas, ni entre estas y sus correspondientes controles, no detectamos en ningún momento de la experiencia, diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sin embargo, al comparar las medidas de las concentraciones de L-citrulina en el suero sanguíneo de los peces tratados y no tratados con L-NAME, las diferencias obtenidas fueron las mismas para el caso de las cepas capsuladas y acapsuladas, encontrando diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 6 horas hasta las 144 horas (6 días), que se volvieron sólo significativas ($p < 0.05$) a las 312 horas. En el resto de las observaciones realizadas las diferencias no fueron significativas.



IV.3.2.3.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible

En ninguno de los tejidos analizados (agallas, riñón, hígado y sistema nervioso) se encontró la banda de 791 pares de bases que nuestros cebadores debían amplificar (Figura 17).

El control positivo de la técnica obtuvo el resultado esperado, observándose la banda de 541 pares de bases de la β -actina. El control negativo también mostró el resultado esperado (Figura 17).

IV.4.- EXPERIENCIA III

IV.4.1.- Respuesta inmune de la dorada tras la vacunación con bacterina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Comparación de los resultados con los peces infectados experimentalmente.

IV.4.1.1.- Determinación de nitritos en el suero sanguíneo

Los peces vacunados con la bacterina sin adyuvante mostraron un aumento en dicha concentración con un pico máximo a las 24 horas postinfección, mostrando un valor medio de 26.5 μ moles de nitritos para posteriormente ir descendiendo de una forma lenta hasta alcanzar un valor medio de 2.6 μ moles a las 816 horas (34 días), a partir del cual se mantuvo constante hasta el final de la experiencia (Figura 18, Tabla 23).



Los peces vacunados con la bacterina, junto con Adyuvante de Freund Incompleto, también mostraron un incremento de la concentración de nitritos con un pico máximo a las 24 horas y un valor medio de 34.5 μ moles, para posteriormente descender de una forma lenta hasta alcanzar un valor medio de 3.7 μ moles a las 816 horas (34 días) postinfección, a partir del cual se mantuvo constante (Figura 18, Tabla 23).

Los peces controles infectados mostraron un comportamiento similar a los de la inoculación experimental de la Experiencia II, incrementando la concentración de nitritos a partir de la inoculación, y mostrando igualmente, el valor máximo a las 24 horas con una concentración media de 23.5 μ moles, y un descenso posterior más acusado, llegando a valores de 1.02 μ moles a las 312 horas (13 días) los cuales se estabilizaron hasta el final de la experiencia (Figura 18, Tabla 23).

Los peces testigos se mantuvieron durante toda la experiencia en niveles basales de la concentración de nitritos, siendo similares a los obtenidos con los controles de la Experiencia II.

Las diferencias obtenidas entre los peces inmunizados con adyuvante y los inmunizados sin adyuvante, no mostraron diferencias significativas a las 6 horas postinoculación, para pasar a ser significativas ($p < 0.05$) a las 12 horas, volviéndose muy



significativas ($p < 0.01$) desde las 24 hasta las 144 horas (6 días). Las diferencias volvieron a ser significativas a las 312 y 480 horas (13 y 20 días), y no significativas a partir de las 648 horas hasta el final de la experiencia.

Al comparar los niveles de significación estadística las concentraciones de nitritos de los controles (sólo infectados) y los peces inmunizados sin adyuvante, no encontrando diferencias estadísticamente significativas hasta las 24 horas, para pasar a ser significativas ($p < 0.05$) a las 48 horas, y muy significativas ($p < 0.01$) desde las 72 horas hasta las 312 horas (13 días). A las 480 horas (20 días) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), y en el resto de observaciones las diferencias no fueron significativas (Tabla 23).

Cuando comparamos las concentraciones de nitritos de los peces inmunizados con adyuvante frente a las de los controles (sólo infectados), observamos la inexistencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas, para pasar a ser significativas a las 12 horas y muy significativas ($p < 0.01$) desde las 48 horas hasta las 480 horas, volviendo a ser significativas a las 648 horas (27 días), mientras que en el resto de observaciones las diferencias no fueron significativas (Tabla 23).

Las diferencias encontradas entre los peces testigo (no vacunados ni infectados) frente a los tres grupos experimentales



fueron muy significativas ($p < 0.01$) durante todas las mediciones realizadas en esta experiencia (Tabla 23).

IV.4.1.2.- Determinación de L-citrulina en el suero sanguíneo

Los peces vacunados con la bacterina sin adyuvante de Freund mostraron un aumento de la concentración de L-citrulina en el suero sanguíneo, con un pico máximo a las 24 horas y un valor medio de 27.2 μ moles, para posteriormente ir descendiendo de una forma lenta hasta alcanzar un valor medio de 2.27 μ moles a las 816 horas (día 34) a partir del cual se mantuvo constante (Figura 19, Tabla 24) hasta la última medición de esta experiencia.

Los peces vacunados con la bacterina junto con Adyuvante de Freund Incompleto, mostraron también un aumento de la concentración de L-citrulina, alcanzando el nivel máximo a las 24 horas, con un valor medio de 34.7 μ moles, el cual posteriormente, fue descendiendo de una forma lenta hasta alcanzar un valor medio de 3.57 μ moles a las 816 horas (día 34), a partir del cual se mantuvo constante (Figura 19, Tabla 24) hasta el final de la experiencia.

Los peces controles (infectados pero no vacunados) mostraron un comportamiento similar a los de la infección experimental (Experiencia II), incrementando la concentración de L-citrulina en el suero a partir de las primeras horas siguientes a la inoculación, y mostrando el pico máximo a las 24 horas, con un



valor medio de 20 μ moles, el cual posteriormente descendió más acusadamente alcanzando valores de 1.09 μ moles a las 480 horas (día 20) para luego quedar estable (Figura 18, Tabla 24) hasta el final de la experiencia.

Los peces testigos, con relación a la producción de L-citrulina, se comportaron durante toda la experiencia de manera similar a los controles de la Experiencia II, detectándose en todas las observaciones niveles basales de este producto.

Las diferencias estadísticas obtenidas en la producción de L-citrulina en el suero sanguíneo, entre los peces inmunizados con adyuvante y los inmunizados sin adyuvante, no fueron significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas postinoculación. Sin embargo, se tornaron significativas ($p < 0.05$) a las 12 horas, volviéndose muy significativas ($p < 0.01$) desde las 24 hasta las 144 horas (día 6). Las diferencias volvieron a ser significativas a las 312 y 480 horas, y no significativas desde las 648 horas hasta el final de la experiencia.

Cuando comparamos las concentraciones de L-citrulina de los peces inmunizados con adyuvante frente a las de los controles (sólo infectados), observamos la inexistencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas, para pasar a ser significativas a las 12 horas y muy significativas ($p < 0.01$) desde las 48 horas hasta las 480 horas, volviendo a ser significativas a las



648 horas (27 días), mientras que en el resto de observaciones las diferencias no fueron significativas (Tabla 24).

Cuando comparamos las concentraciones de L-citrulina de los peces inmunizados con adyuvante frente a las de los controles (infectados pero no previamente vacunados), encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.01$) desde las 24 horas hasta el final de la experiencia. En la medición realizada a las 12 horas sólo se alcanzaron diferencias significativas ($p < 0.05$), En el resto de las mediciones, las diferencias no fueron significativas.

Las diferencias encontradas entre los peces testigo (no vacunados ni infectados) frente a los tres grupos experimentales fueron muy significativas ($p < 0.01$) durante todas las observaciones realizadas en esta experiencia.

IV.4.1.3.- Detección de la óxido nítrico sintasa inducible

En ninguno de los tejidos analizados (agallas, bazo, intestino, riñón, hígado, sistema nervioso y macrófagos) encontramos la banda de 791 pares de bases que nuestros cebadores debían amplificar como sucedió en la Experiencia II (Figura 17).

El control positivo de la técnica obtuvo el resultado esperado, observándose la banda de 541 pares de bases de la β -actina (Figura 17). El control negativo también mostró el resultado esperado.



IV.4.2.- Producción de nitritos y L-citrulina por los macrófagos obtenidos de peces inmunizados.

IV.4.2.1.- Determinación de nitritos

La curva de producción de nitritos por parte de los macrófagos cultivados siguió una cinética similar a la mostrada en el suero sanguíneo de los peces infectados, y en su caso, previamente inmunizados, en las Experiencias II y III, pues se produjo un aumento de la concentración a partir del momento en que los pocillos se inocularon con la bacteria, obteniendo el pico de producción a las 24 horas y disminuyendo gradualmente, a partir de ese momento (Figura 20, Tabla 25).

En el caso de los macrófagos tratados con MAF observamos que los niveles de nitritos empezaron a elevarse a las pocas horas de inocular los pocillos, mostrando a las 6 horas niveles de 2.78 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 0.43 y 0.35 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles (sólo infectados), respectivamente. La curva mantuvo la pendiente ascendente alcanzando su valor máximo a las 24 horas, siendo los valores encontrados de 12.93 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 4.62 y 1.93 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 20, Tabla 25). A partir de ese momento comienza el decrecimiento de las concentraciones de nitritos encontradas, las cuales se situaron al



final de la experiencia (72 horas) en valores en torno a los 7.26 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 2.76 y 0.58 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles respectivamente (Figura 20, Tabla 25).

Para el grupo de macrófagos no tratados con MAF detectamos que los niveles de nitritos empezaron a incrementarse desde que inoculamos los pocillos, mostrando ya a las 6 horas niveles de 2.05 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 0.43 y 0.19 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 20, Tabla 26). La curva siguió elevándose para alcanzar el pico máximo a las 24 horas, siendo en ese momento los valores encontrados de 10.26 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 3.62 y 0.63 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente. A partir de ese momento, las concentraciones de nitritos empiezan a disminuir, situándose al final de la experiencia (72 horas) en valores cercanos a los 6.32 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 2.09 y 0.24 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 20, Tabla 26).

Los peces testigos para ambos grupos, tratados y no tratados con MAF, se mantuvieron durante toda la experiencia en niveles



basales de la concentración de nitritos, siendo estos similares a los obtenidos con los controles de la Experiencia II y III.

Las diferencias obtenidas en las concentraciones de nitritos entre los macrófagos aislados de peces inmunizados con adyuvante y de los inmunizados sin adyuvante, tratados con MAF, mostraron durante toda la experiencia diferencias muy significativas ($p < 0.01$). De igual forma sucedió cuando comparamos los datos de los macrófagos aislados de peces inmunizados con adyuvante frente a los controles. No obstante, cuando se comparó el grupo de macrófagos obtenido de peces inmunizados sin adyuvante con los controles, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta los valores obtenidos a las 9 horas. Las diferencias fueron significativas a las 12 horas, y muy significativas ($p < 0.01$) a partir de las 18 horas hasta el final de la experiencia.

Las diferencias encontradas entre los peces testigo (no vacunados ni infectados) frente a los tres grupos experimentales en el caso de los macrófagos tratados fueron muy significativas ($p < 0.01$) durante todas las mediciones realizadas para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante, para los de los peces inmunizados sin adyuvante las diferencias fueron muy significativas ($p < 0.01$) desde las 12 horas hasta el final de la experiencia, y significativas a las 9 horas, mientras que a las 6 horas no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 25).



En cuanto al grupo de macrófagos que no fueron tratados con MAF, las diferencias obtenidas en las concentraciones de nitritos entre los macrófagos aislados de peces inmunizados con adyuvante y de los inmunizados sin adyuvante, de la misma forma que en el caso anterior, mostraron diferencias muy significativas ($p < 0.01$) durante toda la experiencia. Lo mismo sucedió al comparar los datos de los macrófagos aislados de peces inmunizados con adyuvante frente a los controles. También de una manera casi similar cuando comparamos el grupo de macrófagos obtenido de peces inmunizados sin adyuvante con el control, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta las 9 horas, las diferencias fueron significativas a las 12 horas, y muy significativas ($p < 0.01$) a partir de las 18, 24 y 48 horas, para acabar siendo de nuevo significativas ($p < 0.05$) a las 72 horas.

Las diferencias encontradas entre los peces testigo (no vacunados ni infectados) frente a los tres grupos experimentales en el caso de los macrófagos no tratados, fueron para el grupo de los peces inmunizados sin adyuvante, no significativas ($p < 0.05$) a las 6 horas, para pasar a ser muy significativas ($p < 0.01$) desde las 9 horas hasta el final de la experiencia. Para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante las diferencias fueron muy significativas ($p < 0.01$) durante todas las mediciones realizadas (Tabla 26).



Al comparar las concentraciones de nitritos de los grupos tratados con MAF frente a los no tratados, no encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los macrófagos de los peces inmunizados sin adyuvante, ni entre los controles. Las únicas diferencias se produjeron, únicamente en los peces inmunizados con adyuvante, a las 24 y 48 horas, a un nivel significativo ($p < 0.05$).

IV.4.2.2.- Determinación de L-citrulina

Al igual que sucedió en los peces infectados experimentalmente en las Experiencias II y III, la producción de L-citrulina siguió una cinética similar a las concentraciones obtenidas en el suero sanguíneo de los peces de esas experiencias, aumentando la concentración de la misma a partir de la inoculación de los pocillos, obteniendo el pico de producción a las 24 horas y disminuyendo a partir de ese momento.

Hay que señalar que la curva fue prácticamente una copia de la que hemos descrito en el punto anterior para las concentraciones de nitritos producida por los macrófagos.

De esta manera, para el grupo de los macrófagos tratados con MAF, se observó que los niveles de L-citrulina comenzaron a elevarse a las pocas horas de inocular los pocillos, mostrando ya a las 6 horas niveles de 2.8 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 0.44 y 0.1 μ moles para los



macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente. La curva continuó ascendiendo también en este caso, hasta alcanzar su valor máximo a las 24 horas, siendo los valores encontrados de 12.53 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante y de 4.74 y 1.72 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 21, Tabla 27). Posteriormente, las concentraciones de L-citrulina disminuyeron para alcanzar al final de la experiencia (72 horas) valores cercanos a los 7.17 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante, y de 2.66 y 0.64 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 21, Tabla 27).

Para el grupo de macrófagos no tratados con MAF la producción de L-citrulina fue prácticamente idéntica a la obtenida en el punto anterior con los nitritos. A las 6 horas se detectaron niveles de 1.60 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante, y de 0.40 y 0.05 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 21, Tabla 28). La curva siguió mostrando una pendiente positiva hasta alcanzar el valor máximo a las 24 horas, midiendo entonces 11.06 μ moles para los macrófagos de los peces inmunizados con adyuvante y de 3.41 y 1.10 μ moles para los macrófagos de los peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente. Entonces dichas concentraciones comenzaron a disminuir hasta situarse al final de la experiencia



(72 horas) en valores de 7.33 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante, y de 2.26 y 0.32 μ moles para los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante y los controles, respectivamente (Figura 21, Tabla 28).

El nivel de significación estadística obtenido para la L-citrulina con los macrófagos tratados con MAF, y en lo referente a la comparación de los peces inmunizados con adyuvante, sin adyuvante, y los primeros con los testigos, fue exactamente el mismo que el que obtuvimos con la medición de los nitritos en el punto anterior. Al comparar el grupo de macrófagos obtenido de peces inmunizados sin adyuvante con el control, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta las 12 horas, a las 18, 48 y 72 horas las diferencias fueron significativas, y muy significativas ($p < 0.01$) a las 24 horas.

Para el grupo de macrófagos no tratados con MAF, las diferencias obtenidas en las concentraciones de L-citrulina entre los macrófagos aislados de peces inmunizados con adyuvante y de los inmunizados sin adyuvante, al igual que al comparar las determinaciones de los peces inmunizados con adyuvante frente a sus testigos, se detectaron diferencias muy significativas ($p < 0.01$) durante toda la experiencia, exactamente igual que sucedió con la determinación de nitritos en el punto anterior. Cuando comparamos el grupo de macrófagos obtenido de peces inmunizados sin adyuvante con el control, encontramos que no



había diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta las 12 horas, e igualmente en el resto de las determinaciones.

Al comparar los grupos tratados con MAF frente a los no tratados con relación a las concentraciones obtenidas de L-citrulina, los resultados fueron exactamente los mismos que en la valoración de los nitritos, salvo al comparar los datos de los peces inmunizados con adyuvante, donde observamos la ausencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en todas las mediciones de la experiencia salvo a las 24 horas, donde las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) (Tablas 27 y 28).

IV.4.3.- Estudio de la “explosión respiratoria”

Como se aprecia en la Figura 22, Tablas 29, 30 y 31, los macrófagos procedentes de los peces inmunizados con adyuvante mostraron con todas las concentraciones de bacterias utilizadas en la experiencia, una producción de radicales superóxido superiores en todo momento (desde 7.07 hasta 3.30 nmoles) que los procedentes de peces que fueron inmunizados sin adyuvante (desde 3.23 hasta 0.97 nmoles) y que los controles (desde 1.55 hasta 0.13 nmoles) para los grupos de macrófagos que fueron tratados con MAF. Sin embargo, como puede apreciarse en la Figura 22, los macrófagos no tratados previamente con MAF reaccionaron de una forma similar, dibujando una curva muy próxima al grupo tratado con MAF.



Se observó un fuerte aumento en la concentración de radicales superóxido obtenidos en los peces inmunizados, siendo los valores obtenidos en el caso de los peces inmunizados con adyuvante siempre superiores, desde 4 a 12 veces, con relación a los controles y, de 2 a 7 veces con respecto a los peces inmunizados sin adyuvante (Figura 22, Tablas 29, 30 y 31).

Tanto en los peces inmunizados con y sin Adyuvante Incompleto de Freund, no existieron diferencias significativas estadísticamente entre los grupos tratados con MAF y los no tratados, aunque sí una leve tendencia a tener una mayor respuesta en el caso de los tratados con MAF (Figura 22, Tablas 29, 30 y 31).

El estudio de la “explosión respiratoria” de los macrófagos de dorada expuestos a la acción de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reveló la existencia de diferencias muy significativas ($p < 0.01$) entre los controles y los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante en todas las concentraciones de bacterias probadas, y diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando comparamos los controles con los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante, así como al comparar los resultados de los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante con los de los macrófagos de peces inmunizados sin adyuvante.



TABLAS Y FIGURAS



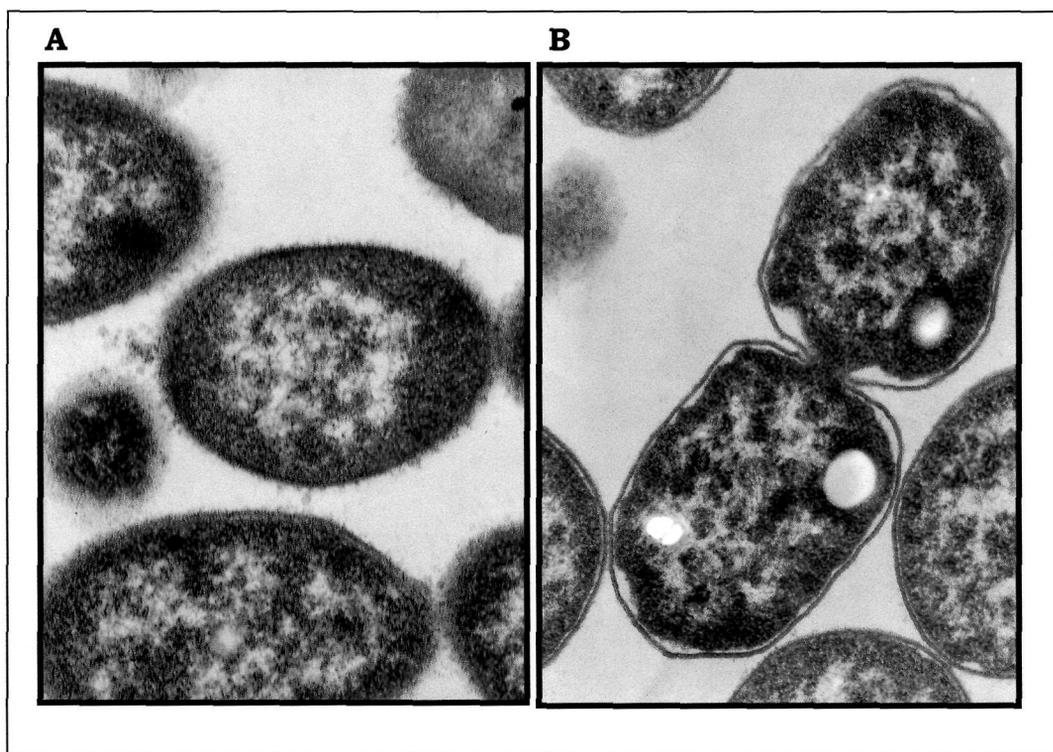


Figura 4.- Recuadro **A**; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: nótese la ausencia de cápsula (cultivada en Agar Sangre con un 1% de NaCl). Recuadro **B**; *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: se aprecia el desarrollo de la cápsula rodeando a la bacteria (cultivada en BHIA con un 1% de NaCl y un 1% de glucosa). (X46000).



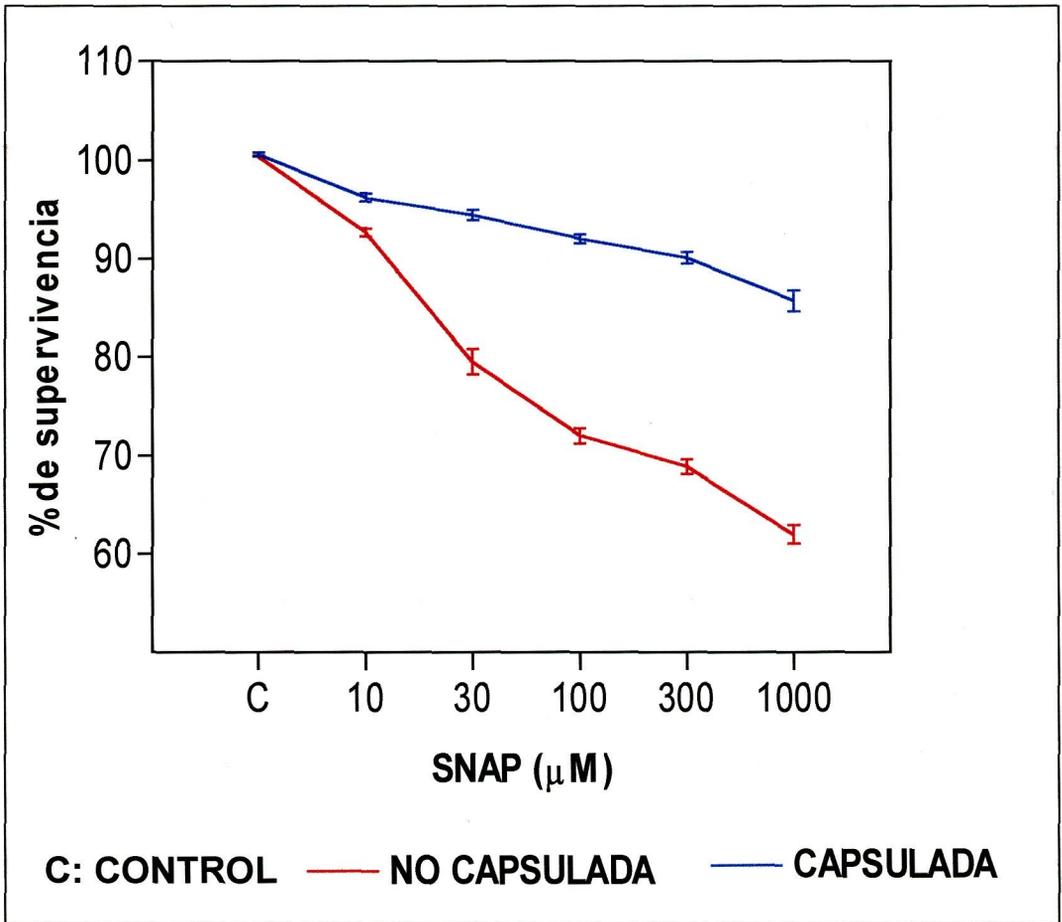


Figura 5.- Efecto del óxido nítrico en la supervivencia de *Photobacterium damsela subespecie piscicida*

Tabla 8.- Efecto del óxido nítrico en la supervivencia de *Photobacterium damsela subespecie piscicida*.

Cepa/ SNAP (μmoles)	% DE SUPERVIVENCIA					
	10	30	100	300	1000	Control
Capsulada	96,23	94,46 [*]	92,06 [*]	90,1 [*]	85,74 ^{**}	100
No capsulada	92,70 [*]	79,55 ^{**}	72,06 ^{**}	68,91 ^{**}	62,00 ^{**}	100



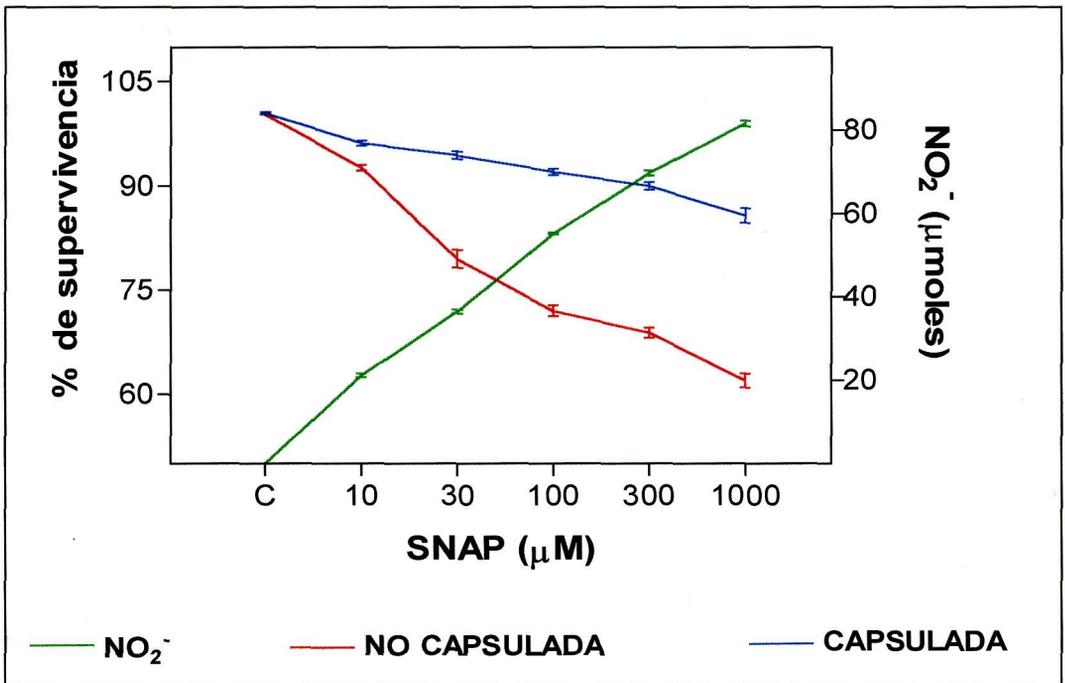


Figura 6.- Concentraciones de nitritos obtenidas en función de la concentración de SNAP añadida, y valores medios de supervivencia.

Tabla 9.- Concentraciones de nitritos obtenidas en función de la concentración de SNAP añadida, y valores medios de supervivencia.

Cepa / SNAP (μmoles)	% DE SUPERVIVENCIA					
	10	30	100	300	1000	Control
Capsulada	96,23	94,46	92,06	90,1	85,74	100
No capsulada	92,70	79,55	72,06	68,91	62,00	100
NO_2^- (μmoles)	21,16	36,57	55,31	69,81	81,67	0,04



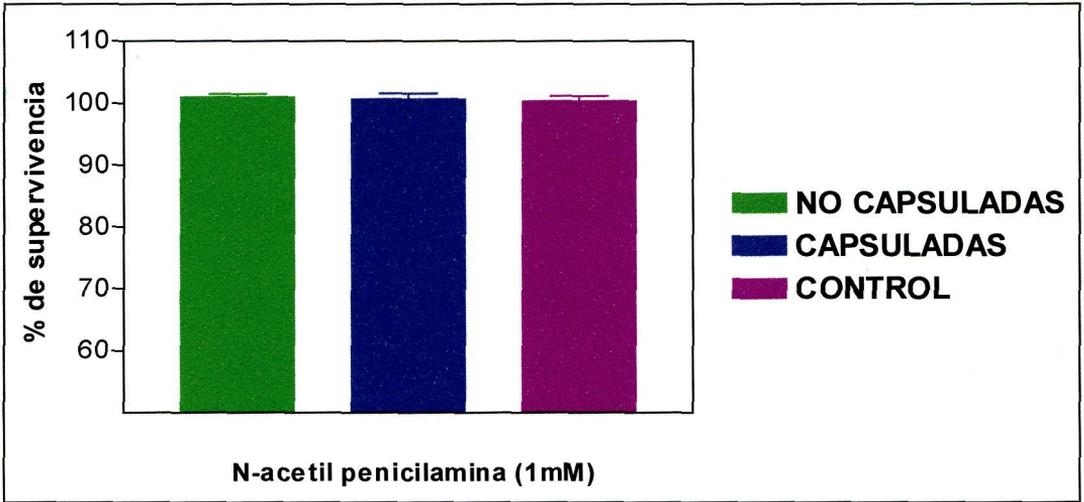


Figura 7.- Efecto de la N-acetil penicilamina sobre la supervivencia de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.

Tabla 10.- Efecto de la N-acetil penicilamina sobre la supervivencia de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.

Cepa / N-acetil penicilamina	% DE SUPERVIVENCIA	
	1000	Control
Capsulada	99,01,	100
No capsulada	99	100



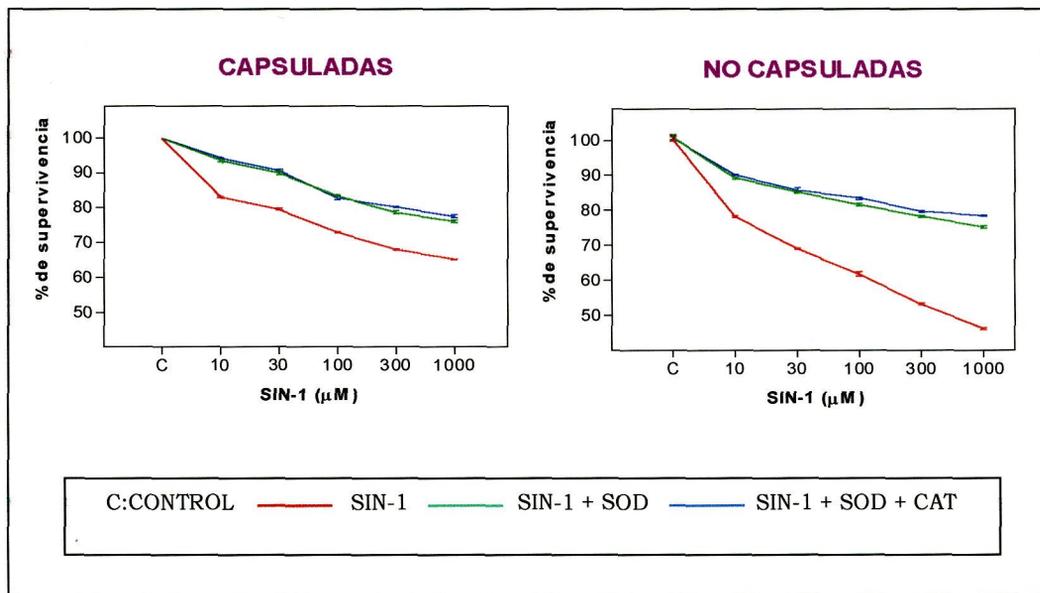


Figura 8.- Efecto del SIN-1 en la supervivencia de *Photobacterium damsela subespecie piscicida*



Tabla 11.- Efecto del SIN-1 en la supervivencia de *Photobacterium damsela* subespecie piscicida capsulada.

Cepa Capsulada /SIN-1 (μ moles)	% DE SUPERVIVENCIA					
	10	30	100	300	1000	Control
SIN-1	83,10*	79,60*	73,00*	68,10**	65,20**	100
SIN-1+SOD	93,50	89,89*	83,40*	78,70*	76,10*	100
SIN-1+SOD+CAT	94,30	90,60	82,79*	80,20*	77,60*	100

Tabla 12.- Efecto del SIN-1 en la supervivencia de *Photobacterium damsela* subespecie piscicida no capsulada.

Cepa no Capsulada/ SIN-1 (μ moles)	% DE SUPERVIVENCIA					
	10	30	100	300	1000	Control
SIN-1	78,30*	69,10**	61,89**	53,30**	46,30**	100
SIN-1+SOD	89,30*	85,30*	81,70*	78,30*	75,30*	100
SIN-1+SOD+CAT	90,20	85,89*	83,60*	79,80*	78,60*	100



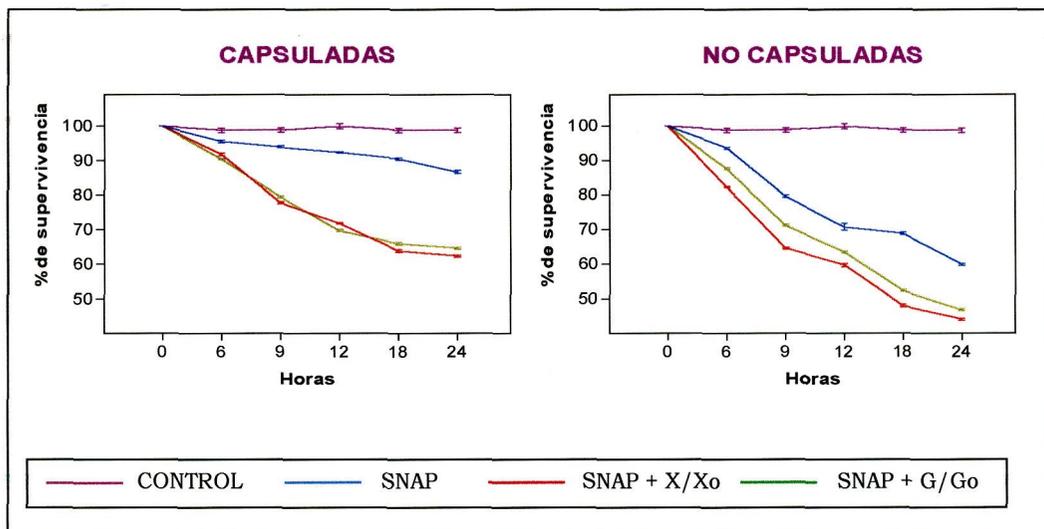


Figura 9.- Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, utilizando diferentes donadores de radicales superóxido.



Tabla 13.- Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* capsulada.

Cepa Capsulada / Horas	% DE SUPERVIVENCIA					
	0	6	9	12	18	24
SNAP	100	95,47	93,90	92,30*	90,50*	86,70*
SNAP+X/Xo	100	91,80*	77,70*	71,90**	63,90**	62,40**
SNAP+G/Go	100	90,30*	79,40*	69,70**	66,00**	64,60**
CONTROL	100	98,90	99,02	99,72	99,02	99,02

Tabla 14.- Comparación del efecto del óxido nítrico frente a los peroxinitritos en la supervivencia de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* no capsulada.

Cepa No capsulada /Horas	% DE SUPERVIVENCIA					
	0	6	9	12	18	24
SNAP	100	93,60	79,60*	70,78*	68,90*	60,00**
SNAP+X/Xo	100	82,40*	64,60**	59,80**	48,10**	44,10**
SNAP+G/Go	100	87,60*	71,20*	63,50**	52,40**	46,80**
CONTROL	100	98,74	98,77	100,00	98,74	98,77



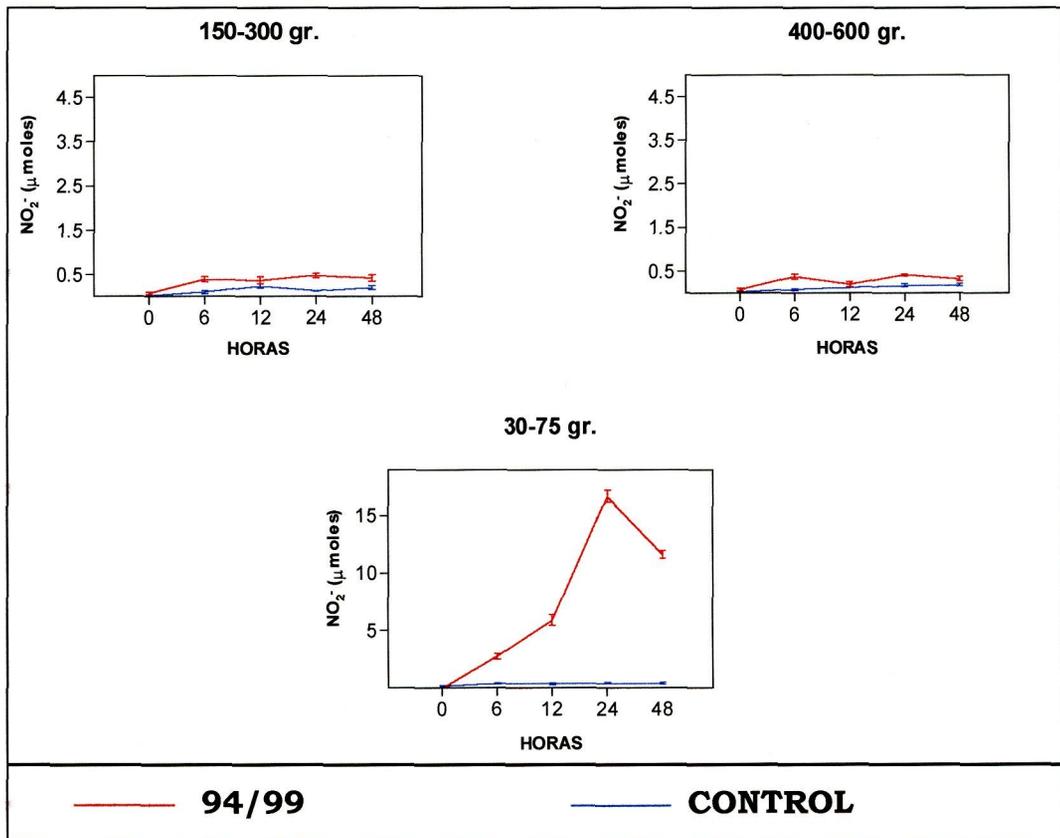


Figura 10.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de doradas de distinto peso, infectadas experimentalmente.



Tabla 15.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de doradas de distinto peso, procedentes de la experiencia de infección preliminar.

Peso del pez (gr)	Grupo /Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)				
		0	6	12	24	48
35-70	Control	0,11	0,39	0,35	0,48	0,41
	Infestado	0,03	2,75 [*]	5,88 ^{**}	16,69 ^{**}	11,61 ^{**}
150-300	Control	0,02	0,07	0,23	0,14	0,20
	Infestado	0,06	0,39	0,35	0,48	0,41
400-600	Control	0,01	0,06	0,14	0,17	0,18
	Infestado	0,06	0,37	0,18	0,42	0,32



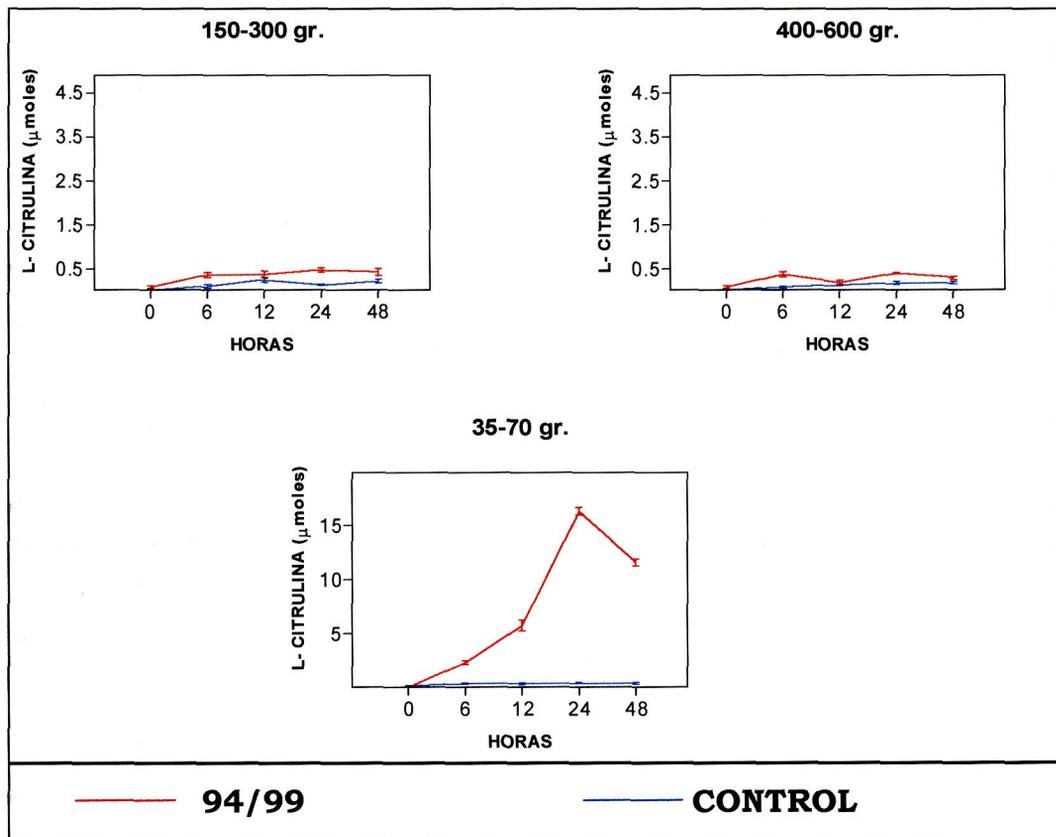


Figura 11.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de doradas de distinto peso, infectadas experimentalmente.



Tabla 16.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de doradas de distinto peso, procedentes de la experiencia de infección preliminar.

Peso del pez (gr)	Grupo /Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μ MOLES)				
		0	6	12	24	48
35-70	Control	0,01	0,39	0,35	0,48	0,41
	Infectado	0,06	2,34*	5,71**	16,34**	11,61**
150-300	Control	0,02	0,07	0,23	0,14	0,20
	Infectado	0,06	0,36	0,36	0,47	0,41
400-600	Control	0,01	0,06	0,14	0,17	0,18
	Infectado	0,06	0,37	0,17	0,42	0,30



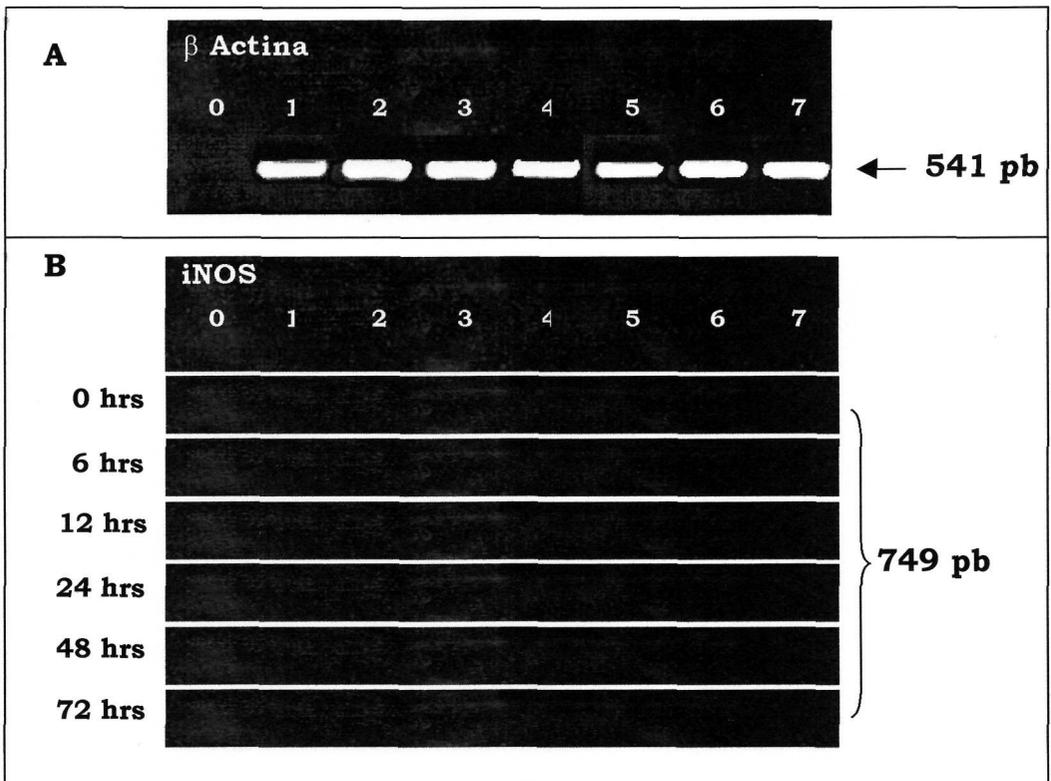


Figura 12.- Recuadro **A**: banda de 541 pb de la β actina en todos los tejidos muestreados (1: agallas, 2: hígado, 3: bazo, 4: intestino, 5: riñón, 6: macrófagos y 7: sistema nervioso). Ausencia de la banda en el control negativo de la técnica (línea 0).

Recuadro **B**; ausencia de la banda de 749 pb correspondiente a la expresión de la iNOS, (no apareció en ningún tejido, ni en ninguno de los momentos muestreados durante la experiencia).



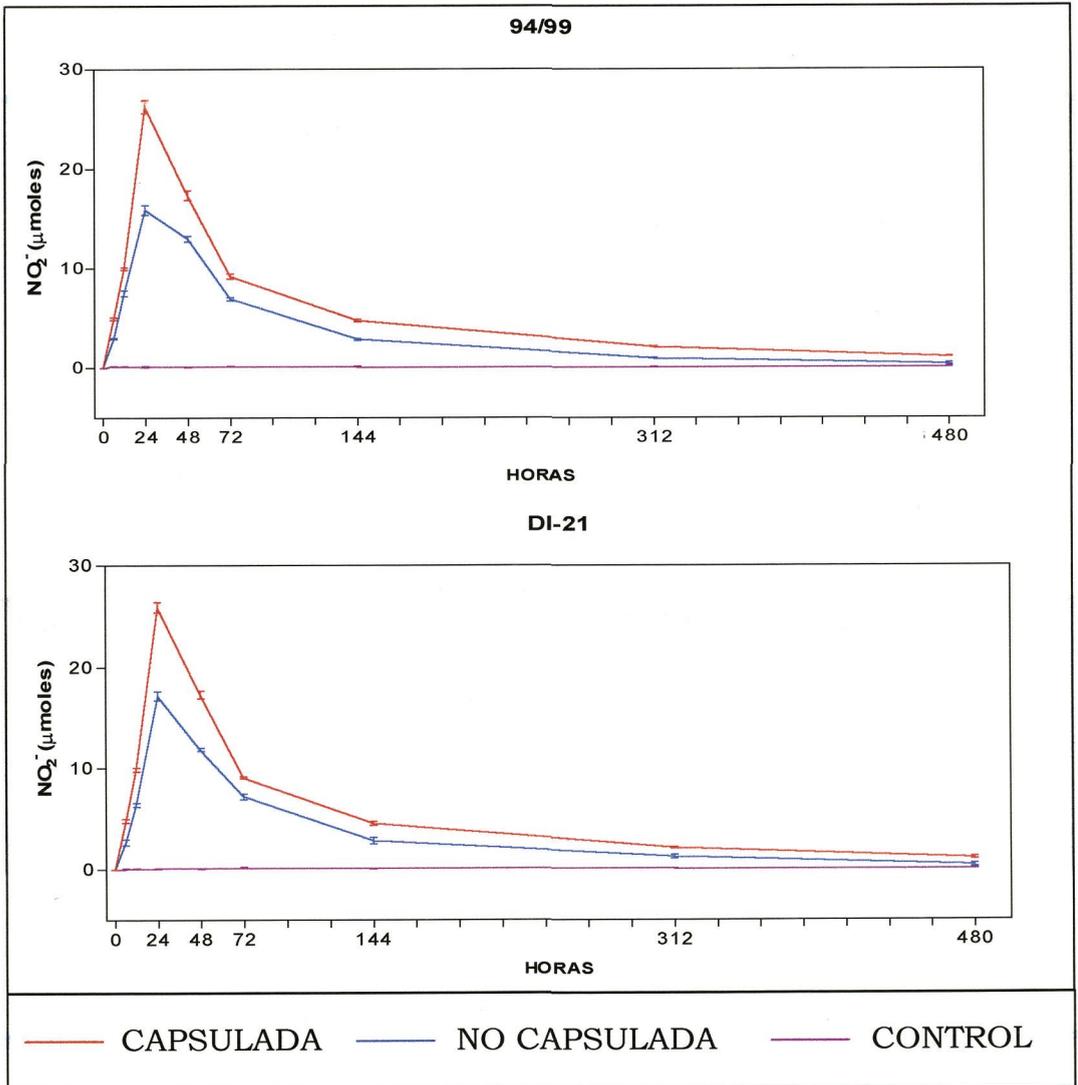


Figura 13.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Tabla 17.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99 / Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0,01	4,97**	10,0**	26,25**	17,3**	9,22**	4,80**	2,17*	1,12	1,07	1,09
NC	0	3,00*	7,49**	15,88**	13,0**	6,94**	2,89*	1,00	0,39	0,33	0,25
CO	0	0,19	0,16	0,10	0,13	0,16	0,16	0,11	0,10	0,14	0,13

CA: CAPSULADA, NC: NO CAPSULADA, CO: CONTROL

Tabla 18.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa DI-21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa DI-21 / Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0,01	4,81**	9,87**	25,91**	17,3**	9,10**	4,57**	2,15*	1,13	1,14	1,14
NC	0	2,69*	6,39**	17,16**	11,9**	7,21**	2,82*	1,29	0,37	0,60	0,60
CO	0	0,08	0,08	0,13	0,13	0,22	0,12	0,14	0,07	0,14	0,13

CA: CAPSULADA, NC: NO CAPSULADA, CO: CONTROL



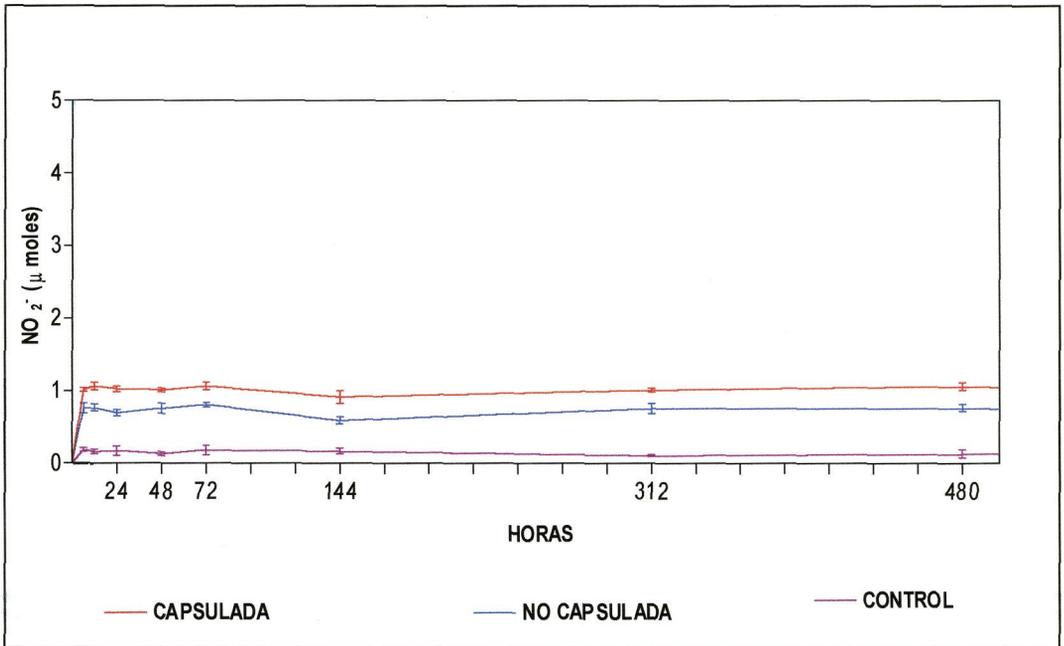


Figura 14.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, y tratadas con L-NAME.



Tabla 19.- Concentración de nitritos en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de *Photobacterium damselae subsp. piscicida* y tratadas con L-NAME.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	1,02	1,06	1,03	1,02	1,06	0,90	1,02	1,06	0,98	1,02
NC	0	0,75	0,77	0,70	0,75	0,81	0,79	0,75	0,77	0,57	0,75
CO	0	0,17	0,14	0,11	0,10	0,15	0,16	0,11	0,12	0,17	0,14

CA: CAPSULADA, **NC:** NO CAPSULADA, **CO:** CONTROL



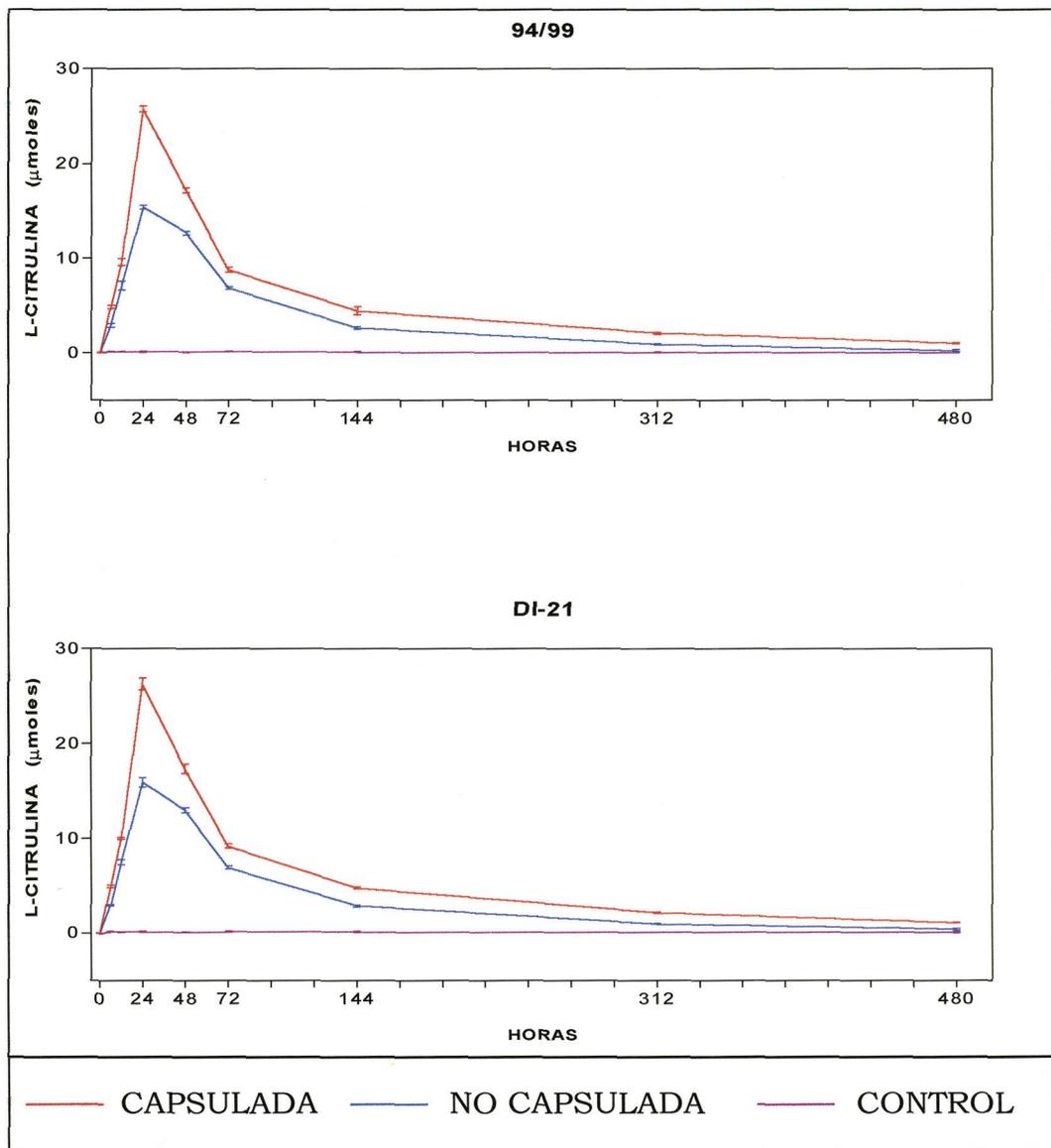


Figura 15.- Concentración de L-citrulina en el suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.



Tabla 20.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	4,94 ^{**}	9,63 ^{**}	25,77 ^{**}	17,2 ^{**}	8,79 ^{**}	4,45 ^{**}	2,12 [†]	1,09	1,07	1,09
NC	0	2,95 [†]	7,09 ^{**}	15,43 ^{**}	12,7 ^{**}	6,86 ^{**}	2,68 [†]	0,95	0,28	0,19	0,28
CO	0	0,19	0,16	0,10	0,13	0,16	0,16	0,11	0,10	0,17	0,13

CA: CAPSULADA, **NC:** NO CAPSULADA, **CO:** CONTROL

Tabla 21.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa DI-21 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa DI-21 / Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	5,83 ^{**}	10,3 ^{**}	26,64 ^{**}	17,3 ^{**}	8,72 ^{**}	4,45 ^{**}	1,97 [†]	1,14	1,02	1,06
NC	0	2,75 [†]	5,88 ^{**}	16,69 ^{**}	11,6 ^{**}	6,87 ^{**}	2,39 [†]	1,14	0,42	0,75	0,77
CO	0	0,18	0,15	0,12	0,13	0,14	0,15	0,10	0,10	0,16	0,12

CA: CAPSULADA, **NC:** NO CAPSULADA, **CO:** CONTROL



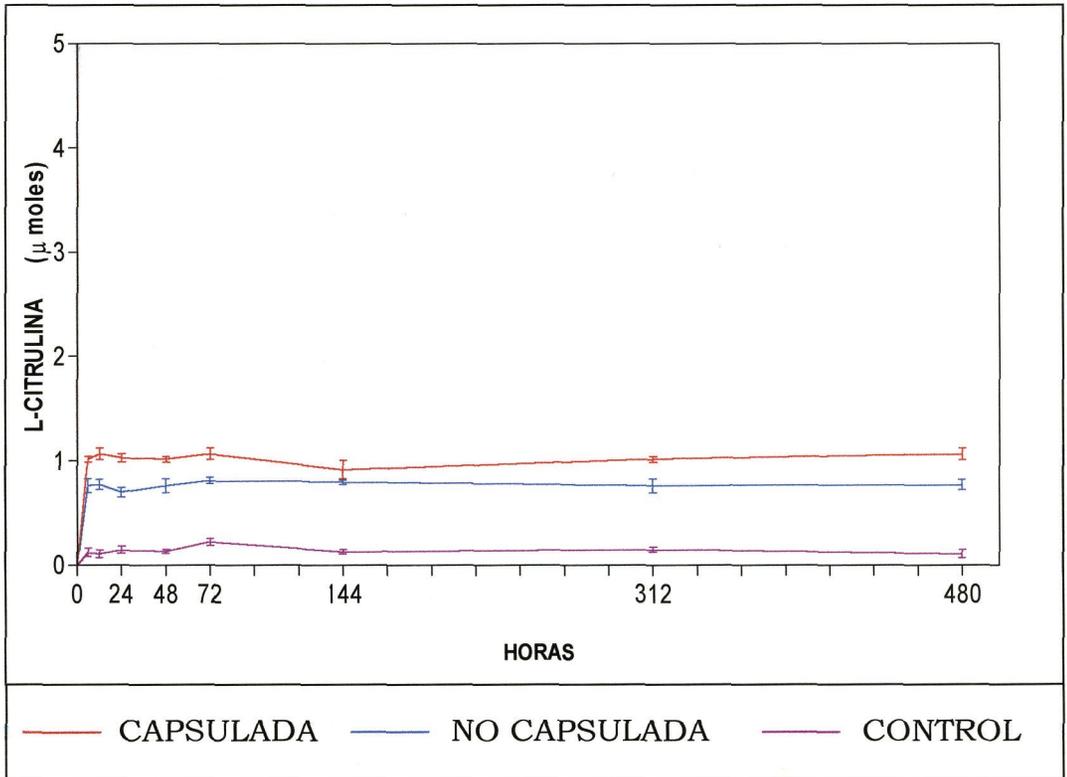


Figura 16.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, y tratadas con L-NAME.



Tabla 22.- Concentración de L-citrulina en suero sanguíneo de las doradas infectadas experimentalmente con la cepa 94/99 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y tratadas con L-NAME.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μMOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	1,02	1,06	1,03	1,02	1,06	0,90	1,02	1,06	0,98	1,02
NC	0	0,75	0,77	0,70	0,75	0,81	0,80	0,75	0,77	0,57	0,75
CO	0	0,15	0,12	0,13	0,10	0,14	0,17	0,12	0,13	0,16	0,15

CA: CAPSULADA, **NC:** NO CAPSULADA, **CO:** CONTROL



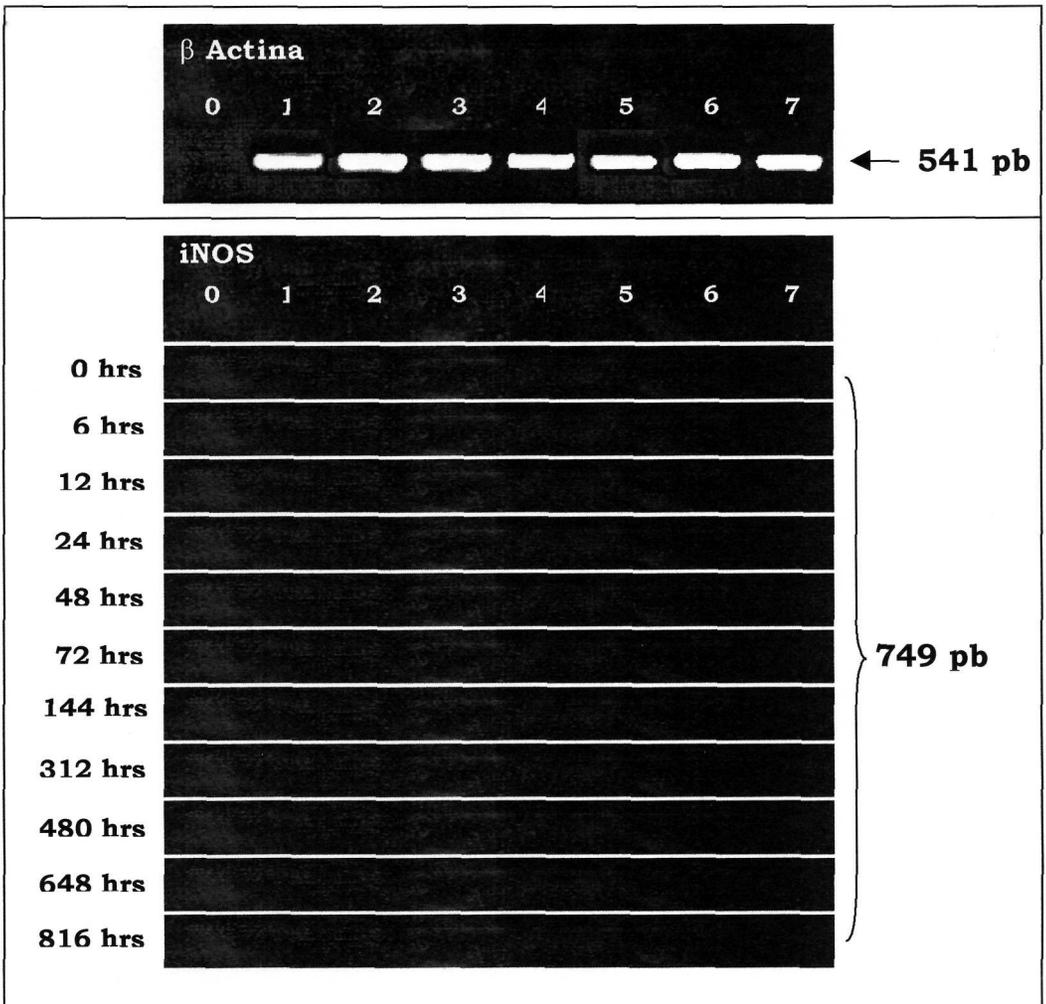


Figura 17.- Recuadro **A**: banda de 541 pb de la β actina en todos los tejidos muestreados (1: agallas, 2: hígado, 3: bazo, 4: intestino, 5: riñón, 6: macrófagos y 7: sistema nervioso). Ausencia de la banda en el control negativo de la técnica (línea 0).

Recuadro **B**; ausencia de la banda de 749 pb correspondiente a la expresión de la iNOS, (no apareció en ningún tejido ni en ninguno de los momentos muestreados durante la experiencia).



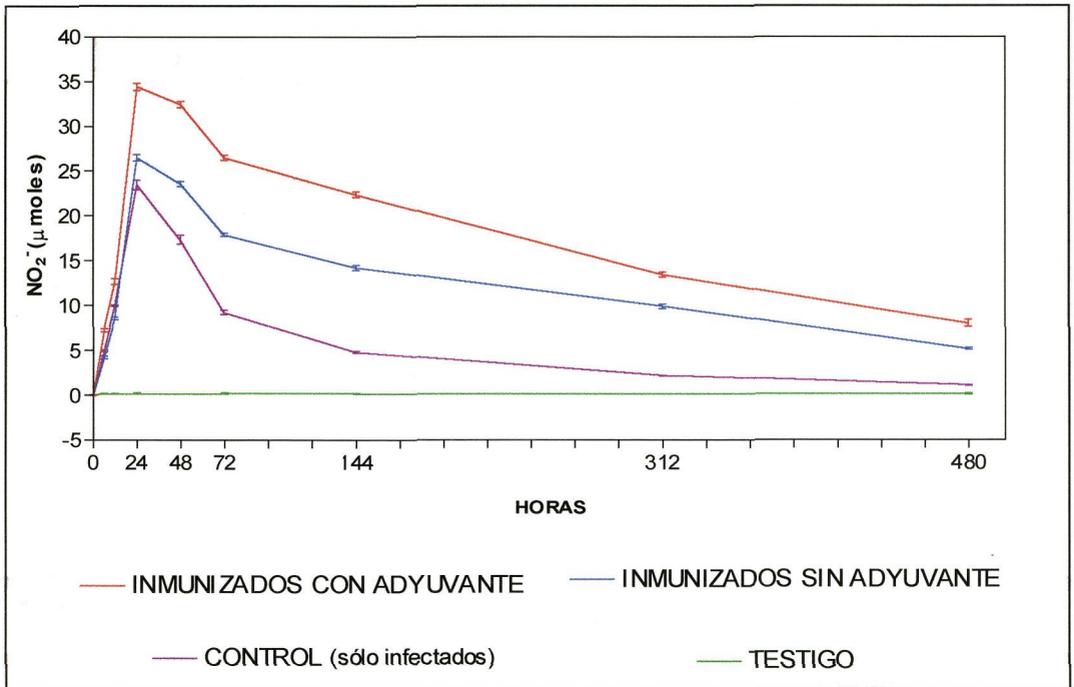


Figura 18.- Niveles de nitritos detectados en el suero sanguíneo de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados, y con los no infectados.



Tabla 23.- Niveles de nitritos detectados en el suero sanguíneo de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con los no infectados.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	7,24	12,6	34,44 ^{**}	32,5 ^{**}	26,5 ^{**}	22,4 ^{**}	13,4 ^{**}	8,00 ^{**}	5,58	3,67
SA	0,01	4,19	8,58	26,54	23,6	18,0 ^{**}	14,0 ^{**}	9,89 ^{**}	5,18	3,75	2,58
CO	0	4,97	10,00	23,49	17,33	9,22	4,80	2,17	1,12	1,07	1,09
T	0,02	0,17	0,14	0,11	0,10	0,15	0,16	0,11	0,12	0,17	0,14

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, SA: INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE,
CO: CONTROL, T: TESTIGO



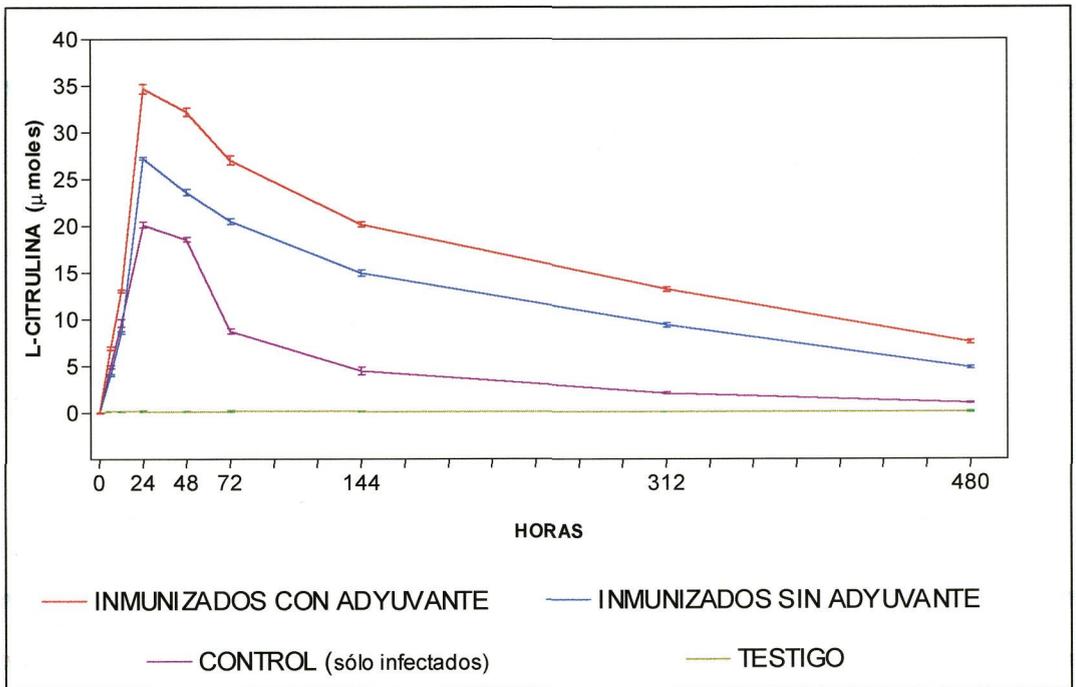


Figura 19.- Niveles de L-citrulina detectados en el suero sanguíneo de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados, y con los no infectados.



Tabla 24.- Niveles de L-citrulina detectados en el suero sanguíneo de las doradas inmunizadas en comparación con los peces que fueron sólo infectados y con los no infectados.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μ MOLES)										
	0	6	12	24	48	72	144	312	480	648	816
CA	0	6,94	13,1 [*]	34,7 [*]	32,2 ^{**}	27,1 ^{**}	20,2 ^{**}	13,2 ^{**}	7,57 ^{**}	4,63 [*]	3,57
SA	0	4,06	8,61	27,25	23,6 [*]	20,5 ^{**}	15,0 ^{**}	9,40 ^{**}	4,84 [*]	3,75	2,27
CO	0	4,94	9,63	20,17	18,59	8,79	4,45	2,12	1,09	1,07	1,09
T	0	0,15	0,12	0,13	0,10	0,14	0,17	0,12	0,13	0,16	0,15

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, **SA:** INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE,
CO: CONTROL, **T:** TESTIGO



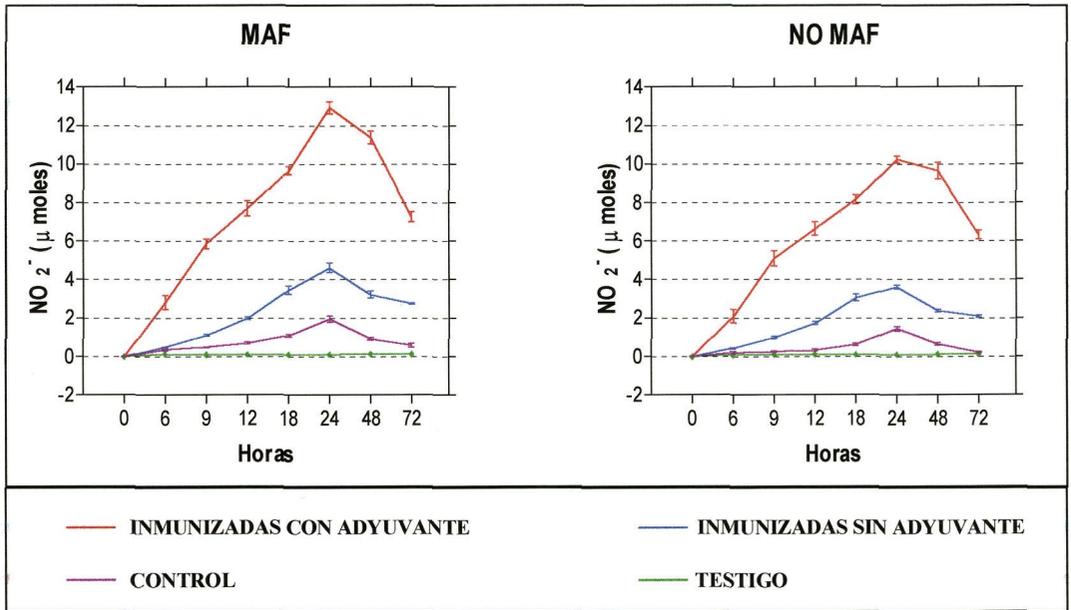


Figura 20.- Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Tabla 25.- Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, tratados con MAF, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)							
	0	6	9	12	18	24	48	72
CA	0	2,78 ^{**}	5,86 ^{**}	7,68 ^{**}	9,67 ^{**}	12,93 ^{**}	11,39 ^{**}	7,26 ^{**}
SA	0	0,48	1,12	2,00	3,45 ^{**}	4,62 ^{**}	3,22 ^{**}	2,76 ^{**}
CO	0	0,35	0,49	0,71	1,09	1,93	0,93	0,58
T	0	0,13	0,10	0,11	0,12	0,11	0,15	0,13

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, **SA:** INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE, **CO:** CONTROL, **T:** TESTIGO

Tabla 26.- Concentración de nitritos producidos por los macrófagos de doradas inmunizadas, no tratados con MAF, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE NITRITOS (μ MOLES)							
	0	6	9	12	18	24	48	72
CA	0	2,05 ^{**}	5,09 ^{**}	6,64 ^{**}	8,17 ^{**}	10,26 ^{**}	9,66 ^{**}	6,32 ^{**}
SA	0	0,43	1,00	1,73	3,06 ^{**}	3,62 ^{**}	2,40 ^{**}	2,09 ^{**}
CO	0	0,19	0,26	0,34	0,63	1,45	0,67	0,24
T	0	0,10	0,11	0,13	0,11	0,12	0,14	0,13

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, **SA:** INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE, **CO:** CONTROL, **T:** TESTIGO



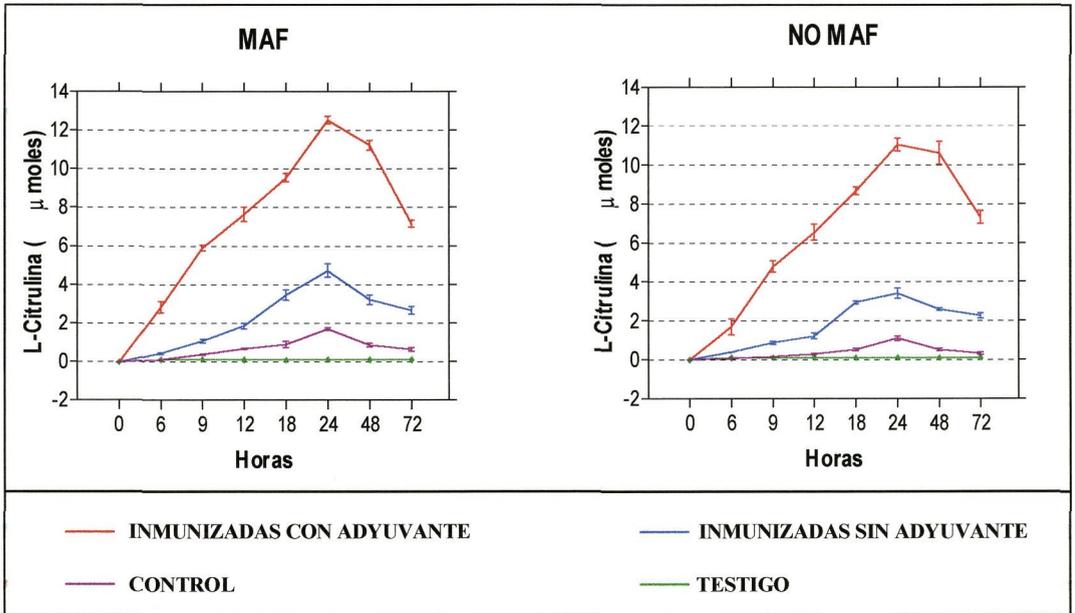


Figura 21.- Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Tabla 27.- Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, tratados con MAF, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μMOLES)							
	0	6	9	12	18	24	48	72
CA	0	2,80**	5,90**	7,65**	9,56**	12,53**	11,23**	7,17**
SA	0	0,44	1,08	1,86 [†]	3,47**	4,74**	3,23**	2,66**
CO	0	0,10	0,39	0,67	0,91	1,72	0,87	0,64
T	0	0,12	0,13	0,11	0,10	0,13	0,12	0,11

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, SA: INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE,
CO: CONTROL, T: TESTIGO

Tabla 28.- Concentración de L-citrulina producida por los macrófagos de doradas inmunizadas, no tratados con MAF, después de la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Cepa 94/99/ Horas	CONCENTRACIÓN DE L-CITRULINA (μMOLES)							
	0	6	9	12	18	24	48	72
CA	0	1,60**	4,80**	6,54**	8,70**	11,06**	10,60**	7,33**
SA	0	0,40	0,87	1,22 [†]	2,95**	3,41**	2,60**	2,26**
CO	0	0,05	0,16	0,28	0,51	1,10	0,53	0,32
T	0	0,10	0,11	0,14	0,12	0,11	0,113	0,12

CA: INMUNIZADOS CON ADYUVANTE, SA: INMUNIZADOS SIN ADYUVANTE,
CO: CONTROL



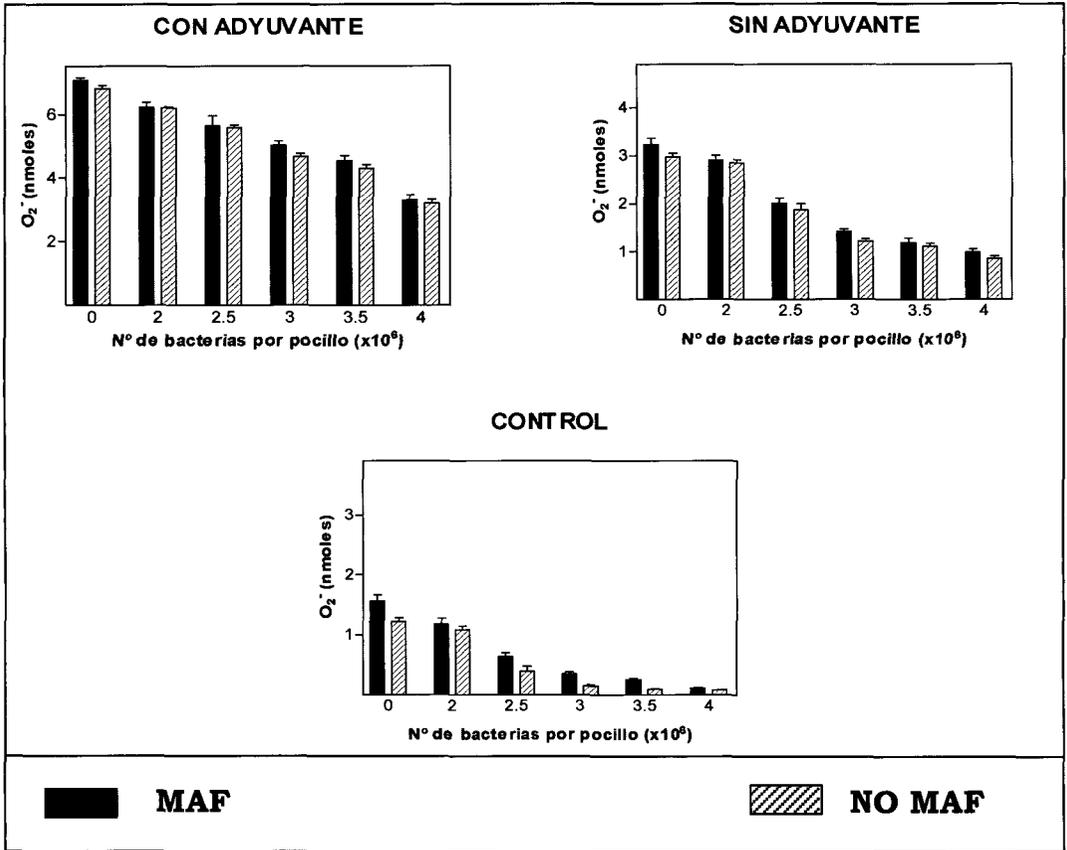


Figura 22.- Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida por los macrófagos de doradas previamente inmunizadas, y estimulados con diferentes concentraciones de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.



Tabla 29.- Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida *in vitro* por los macrófagos de doradas no inmunizadas.

Tto./u.f.c./ pocillo ($\times 10^6$)	RADICALES SUPERÓXIDO (nmoles)					
	0	2	2.5	3	3.5	4
MAF	1,55	1,17	0,64	0,36	0,25	0,13
NO MAF	1,22	1,08	0,37	0,16	0,10	0,09

Tabla 30.- Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida *in vitro* por los macrófagos de doradas inmunizadas sin Adyuvante.

Tto./u.f.c./ pocillo ($\times 10^6$)	RADICALES SUPERÓXIDO (nmoles)					
	0	2	2.5	3	3.5	4
MAF	3,23'	2,90'	2,01'	1,42'	1,18'	0,97'
NO MAF	2,96'	2,84'	1,85'	1,22'	1,11'	0,86'

Tabla 31.- Concentración de radicales superóxido (O_2^-) producida *in vitro* por los macrófagos de doradas inmunizadas con Adyuvante.

Tto./u.f.c./ pocillo ($\times 10^6$)	RADICALES SUPERÓXIDO (nmoles)					
	0	2	2.5	3	3.5	4
MAF	7,07''	6,21''	5,61''	5,02''	4,54''	3,30''
NO MAF	6,80''	6,18''	5,57''	4,65''	4,28''	3,20''



DISCUSIÓN



V.1.- EXPERIENCIA I.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LOS PEROXINITRITOS SOBRE *Photobacterium damsela* subespecie piscicida.

Recientemente se ha demostrado que los macrófagos de peces poseen una forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa, la cual les permite, cuando son estimulados, responder con la producción de óxido nítrico (WANG y cols., 1995; LAING y cols., 1999; CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000).

El estudio del efecto tóxico de estas moléculas nitrógeno reactivas frente a diferentes patógenos de mamíferos ha sido estudiado durante mucho tiempo. Así, algunos autores destacan los peroxinitritos como los radicales más potentes para *Escherichia coli* (BRUNELLI y cols., 1995), utilizando como donadores el SIN-1 y óxido nítrico gaseoso, o para *Cándida albicans* (VAZQUEZ-TORRES y cols., 1995 y 1996), usando como donador para los peroxinitritos el SIN-1, y nitroprusida sódica como generador de óxido nítrico. Sin embargo, en los estudios realizados con *Leishmania mayor* (ASSREUI y cols., 1994) y *Cándida albicans* (FIERRO y cols., 1996), se atribuye el papel de radical más tóxico al óxido nítrico, usando en ambos casos SIN-1 y SNAP como donadores.

Nuestros resultados se muestran conformes a los autores que dan un papel preponderante a los peroxinitritos frente al óxido nítrico, pues fueron los primeros los que ejercieron un efecto tóxico



superior sobre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Figuras 8 y 9). Nuestros resultados para la disminución de supervivencia en cepas acapsuladas frente al ON (Figura 5) son semejantes a los obtenidos por CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000a) para las cepas de la bacteria que no presentaban el factor de autoagregación. De igual forma, ocurrió en la disminución de la supervivencia de las cepas capsuladas que dieron valores semejantes a los de las cepas de *Renibacterium salmoninarum* con factor de autoagregación (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000a).

El efecto tóxico de los radicales superóxido sobre esta bacteria se conocía con anterioridad (SKARMETA y cols., 1995; BARNES y cols., 1999), por lo que la combinación de dichos radicales con el óxido nítrico generando peroxinitritos puede dar lugar a un efecto tóxico mayor que el del óxido nítrico por si solo.

Otros patógenos de peces como *Renibacterium salmoninarum* y *Aeromonas salmonicida* han sido sometidos a ensayos de toxicidad frente a estas moléculas nitrógeno reactivas (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000a), y a diferencia de nuestros resultados, se han mostrado más sensibles a la acción del óxido nítrico que a la de los peroxinitritos. El hecho de que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* presente una enzima superóxido dismutasa (SOD) que se expresa en situaciones de bajas concentraciones de oxígeno (BARNES y cols., 1999), podría suponer un factor favorable para la mayor actividad de los peroxinitritos, con relación a otros agentes



patógenos como *Shigella flexneri* (FRANZON y cols., 1990), y *Aeromonas salmonicida* (BARNES y cols., 1996), cuyas SODs han demostrado ser efectivas en la protección de las mismas frente a radicales superóxido, y por consiguiente frente a los peroxinitritos.

En bacterias patógenas de mamíferos se han descrito formas de defensa frente a moléculas nitrógeno reactivas. Así, *Salmonella thyphimurium* cuando presenta una deleción en las bases que son responsables de la síntesis de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se muestra sensible a la acción de las moléculas nitrógeno y oxígeno reactivas (LUNDBERG y cols., 1999). También ha sido descrito el papel protector de algunas flavoproteínas (CRAWFORD y GOLBERG, 1998 a y b).

Para la mayor parte de las bacterias patógenas de los peces casi no existe información en cuanto a la acción protectora de proteínas ni de enzimas, habiendo sido asociada la resistencia a estas moléculas a la presencia de factores de patogenicidad. En el caso de *Renibacterium salmoninarum*, dicha resistencia se asocia a la presencia de la proteína p-57, la cual se ha relacionado a fenómenos de autoagregación, aumento de la virulencia (BRUNO y cols., 1990), inmunosupresión (WOOD y KAATTARI, 1996) y como inhibidor de la “explosión respiratoria” (DENSMORE y cols., 1998). En *Aeromonas salmonicida*, la presencia del lipopolisacárido capsular-A ha sido asociado a la virulencia de las cepas que lo tienen, y a un efecto protector frente al mecanismo de defensa



conocido como “explosión respiratoria” (KARCZEWSKI y cols., 1991).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* posee en su estructura un lipopolisacárido capsular el cual se ha relacionado con un aumento de la virulencia (MAGARIÑOS y cols., 1995), y resistencia al suero normal, siendo opsonizadas sólo las cepas acapsuladas (ARIJO y cols., 1998). Todo ello demuestra que la presencia de cápsula ejerce un efecto protector de la bacteria frente al ataque de células del sistema inmune. Nuestros resultados muestran, en concordancia con los autores anteriores, que la presencia de la cápsula tiene un claro efecto protector de la bacteria frente a estas moléculas nitrógeno reactivas. Y de acuerdo con los resultados obtenidos por CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000a), las cepas de *Renibacterium salmoninarum* que presentaban un factor de autoagregación fueron menos sensibles que las que no lo tenían. En nuestro caso, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en su forma capsulada, se comportó de forma similar.

V.2.- EXPERIENCIA II.- RESPUESTA INMUNE DE LAS DORADAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUBSP. PISCICIDA*

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* ha sido descrita en varias de las especies marinas cultivadas, como lubina común,



lubina estriada y doradas, afectando en todos los casos a peces que nunca superaron los 100 gr. de peso.

Existe un absoluto vacío de datos con relación al comportamiento de la dorada en la producción de óxido nítrico como respuesta del sistema inmune inespecífico ante infecciones bacterianas, y la sola existencia de datos en infecciones de especies de aguas continentales, como en el pez gato infectado con *Edwardsiella ictaluri* (SCHOOR Y PLUMB, 1994) o la trucha arcoiris infectada con *Renibacterium salmoninarum* (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000b), en los cuales se observó una clara respuesta de los peces infectados, elevando los niveles de ON (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000b) en la trucha y de L-citrulina en el pez gato (SCHOOR Y PLUMB, 1994). Esto nos obligaba a probar como experiencia previa con doradas (*Sparus aurata*) de diferente tamaño para conocer su comportamiento en estos casos.

Nuestros resultados revelaron diferencias significativas en relación a la talla de los peces utilizados en los trabajos anteriores, ya que en los peces de agua continental, la experiencia se había realizado con animales de gran tamaño, 400- 600 gr para la trucha arcoiris (CAMPOS-PÉREZ y cols., 2000b) y de 420 a 560 gr para el pez gato (SCHOOR Y PLUMB, 1994). En el caso de la dorada, estos tamaños no mostraron alteración ninguna respecto de los datos analizados en los peces entre 150 y 300 gr ni en los de 400-600 gr (Figura 10). En cambio, los peces de 30-75 gr, sí que respondieron



a la infección (Figura 10) aumentando los nitritos séricos. Estos resultados parecen estar de acuerdo con los hallazgos de los diferentes aislamientos de esta bacteria en peces marinos, donde sólo los animales hasta unas ciertas tallas (100 gr) son más susceptibles a la enfermedad, por lo que podemos suponer que la respuesta de estos peces es acorde con la susceptibilidad que tienen ante este agente patógeno, y lo que es más importante, parece existir una diferencia clara en los mecanismos de respuesta inmune de la dorada frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en función del tamaño/edad del pez. Por otro lado, el incremento de la concentración de ON sérico es absolutamente paralela y similar al aumento de L-citrulina (Figura 11), siendo estos resultados acordes con lo obtenido por los autores anteriores en sus experiencias.

A diferencia de autores como LAING y cols. (1999) o CAMPOS-PEREZ y cols. (2000b), los cuales detectaron la actividad iNOS mediante la técnica de PCR en trucha arcoiris infectadas con los patógenos de peces *Aeromonas salmonicida* y *Renibacterium salmoninarum* respectivamente, en el presente trabajo no obtuvimos resultados satisfactorios (Figura 12), a pesar de comprobar que la enzima se había activado con la producción de óxido nítrico y L-citrulina, pues en ninguno de los peces muestreados logramos obtener la banda de 749 pares de bases que buscábamos, circunstancia que pensamos se ha debido a la existencia de diferencias en la secuencia génica que codifica para



la enzima de la dorada con respecto a la de la trucha. Además, los controles positivos y negativos de la técnica dieron en todo momento los resultados esperados. Este resultado fue siempre el mismo en todas las experiencias realizadas en el presente trabajo, tanto en doradas sólo infectadas, como en aquellas previamente inmunizadas. Este punto sin aclarar nos deja el camino abierto a la perspectiva de realizar un estudio más profundo con el fin de probar diferentes juegos de cebadores para identificar una secuencia de iNOS en dorada.

La ausencia de banda en la PCR nos llevó a pensar otra opción para evaluar la actividad iNOS. Para ello decidimos hacer el estudio de la L-citrulina, que es un coproducto del óxido nítrico cuando la activación de la NOS hace que a partir de la arginina se formen estos dos productos (LHENINGER y cols., 1993; WEINBERG, 1998). En un principio, la L-citrulina sólo se describió ante la acción de las NOS calmodulina dependientes, por lo cual no era utilizada para evaluar la actividad de la iNOS, pero trabajos recientes (SCHOOR y PLUMB, 1994) demuestran la actividad de la iNOS en pez gato inoculado experimentalmente con *Edwardsiella ictaluri*, midiendo la cantidad de L-citrulina producida por los macrófagos renales del pez. GROSS y cols., (1998) confirmaron que el óxido nítrico y la L-citrulina pueden ser medidos en el sobrenadante de cultivos de macrófagos de ratón infectados con *Brucella suis*, indicando esto la activación de la iNOS, dato que corroboraron inhibiendo la producción de óxido nítrico y L-



citrulina con L-NAME. También, HEGER y cols. (2002) demuestran en ratones que la actividad iNOS puede ser medida por la formación de L-citrulina y óxido nítrico.

La L-citrulina mostró un incremento sólo en los peces de 30-75 gr, siguiendo un comportamiento similar al de los nitritos. Este hecho está en concordancia con los datos obtenidos por GROSS y cols. (1998) y HEGER y cols. (2002).

V.2.1.- Respuesta de la dorada frente a la infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

La producción de ON a partir de la activación de la iNOS, juega un papel importante en el estudio del sistema inmune inespecífico. La actividad de este producto ha sido involucrada en la lucha frente a bacterias, virus, parásitos y células tumorales (MONCADA y cols., 1991).

La activación de la iNOS hace que la L-arginina sea usada como sustrato y mediante la acción de la NADPH se produzcan ON y L-citrulina. El ON en presencia de oxígeno, y en una suspensión acuosa es convertido rápidamente a nitritos y nitratos, los cuales son los que se pueden determinar (MARLETA y cols., 1988). La producción de ON en infecciones bacterianas por especies gram negativas y gram positivas fue descrito por THIEMERMANN (1997).



La observación *in vivo* de la producción de ON en respuesta a infecciones con patógenos, ha sido llevada a cabo por diversos investigadores. Así, SASAKI y cols., (1998) infectaron ratones con *Staphylococcus aureus* observando que los ratones infectados incrementaban en el tiempo las concentraciones de ON y la supervivencia a la infección. BOOCKVAR y cols. (1994) infectaron ratones con *Listeria monocitogenes* y encontraron incrementos en las concentraciones de ON con respecto a los controles, y a los grupos inoculados con L-NAME. Resultados similares han sido descritos por VESPA y cols. (1994) en infecciones en ratones por *Trypanosoma cruzi*.

En los peces, la observación de la cinética del ON *in vivo* ha sido realizada recientemente por CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b), en cuyo trabajo demostraron que las truchas arcoiris infectadas con *Renibacterium salmoninarum* mostraban un aumento en las concentraciones de nitritos séricos postinfección, y que estos niveles eran mayores en las cepas que presentaban factores de virulencia, como en este caso podría ser la capacidad de autoagregación.

Nuestros resultados fueron coincidentes con los de los autores anteriores, pues las doradas infectadas con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* mostraban incrementos en las concentraciones de nitritos plasmáticas en contraste con los niveles basales encontrados en los controles (Figura 13). Cuando



medimos los nitritos a los peces infectados con la cepa capsulada se observó que los valores obtenidos eran superiores a los de los peces infectados con cepas sin cápsula (Figura 13), estos datos nos hicieron relacionar la presencia del factor de patogenicidad “cápsula” como responsable de esta mayor actividad, al igual que describieron CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b) para el factor de autoagregación de *Renibacterium salmoninarum*.

No obstante, existe una importante diferencia con los resultados obtenidos por CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b), donde ellos observaron un aumento en las concentraciones de nitritos hasta los 21 días, mientras que nosotros observamos el pico de producción a las 24 horas postinfección. Esta diferencia podría basarse en la propia idiosincrasia de cada patógeno, pues *Renibacterium salmoninarum* se caracteriza por afectar de forma crónica a sus huéspedes, pudiendo esa característica condicionar una respuesta más sostenida en el tiempo que en el caso de *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, la cual suele cursar en las especies marinas de forma aguda o sobreaguda, esto podría hacer que la dorada responda de una manera mucho más rápida y corta que la trucha arcoiris.

Los resultados obtenidos en nuestras mediciones de L-citrulina muestran que los peces infectados reaccionan produciendo L-citrulina con una producción equimolar a la de ON (Figura 15), datos que son conformes a lo expresado por otros



autores como SCHOOR y PLUMB (1994) en pez gato, GROSS y cols., (1998) en macrófagos de ratón infectados con *Brucella suis*. En ratones, HEGER y cols. (2002) comprobaron que la actividad iNOS puede ser medida por la formación de L-citrulina junto con óxido nítrico. Además, también observamos el efecto potenciador que la cápsula bacteriana ejerce en el grado de respuesta de los peces, de la misma forma que ocurrió con el ON.

En nuestro estudio hay que destacar el absoluto paralelismo tanto en el nivel de respuesta, como en su duración respecto a las mediciones de nitritos y L-citrulina. Además, los resultados mostraron diferencias muy significativas ($p < 0.01$) para los dos productos analizados a las 24 y 48 horas, y sólo significativas ($p < 0.05$) para el resto de los tiempos de medición, al comparar los valores de los peces infectados con la cepa capsulada o acapsulada. Con respecto a los controles para los dos productos analizados, las diferencias fueron muy significativas ($p < 0.01$) en un periodo de tiempo más largo (de 6 a 144 horas) cuando las cepas se usaron en su forma capsulada, pasando a ser sólo significativa en el resto de los tiempos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente por los autores ya citados.

Finalmente, el L-NAME inhibió la producción de L-citrulina y óxido nítrico en todos los peces tratados, existiendo diferencias de nivel muy significativo ($p < 0.01$) entre peces tratados y no tratados, con independencia de que posteriormente fueran infectados con



cepas capsuladas o acapsuladas, durante un largo periodo de tiempo (6 a 144 horas). Mientras que a las 312 horas las diferencias sólo fueron a un nivel significativo ($p < 0.05$). Este hecho coincide con los resultados obtenidos por otros autores GROSS y cols. (1998).

V.2.2.- Respuesta inmune de la dorada tras la vacunación con bacterina de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y posterior infección.

Los peces inmunizados con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* capsulada mostraron niveles más altos en las concentraciones plasmáticas de nitritos en contraste con los niveles encontrados en los peces no inmunizados. La utilización de vacunas con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ha demostrado la eficacia de las mismas cuando incorporamos lipopolisacáridos, frente a aquellas preparadas exclusivamente con la cepa formolizada o con productos extracelulares (MAGARIÑOS y cols., 1994, 1999). Las vacunas con LPS han demostrado ser más eficaces incrementando la actividad fagocítica (SALATI y cols., 1987; SAKAI, 1999) y la capacidad migratoria de los macrófagos (Mac ARTHUR y cols., 1985 cit. SAKAI, 1999), y aumentando la resistencia a las infecciones postvacunales tanto naturales como experimentales (KAWAKAMI y cols., 1997 y 1998). Estos efectos producidos por los LPS producen han sido similares a los que nosotros obtuvimos utilizando la bacterina enriquecida con polisacáridos capsulares, la cual indujo una respuesta mayor en el



sistema inmune, y en especial en los macrófagos encargados de la producción y liberación del ON.

Los valores de los nitritos en el suero sanguíneo medidos a los peces inmunizados, y posteriormente infectados con la cepa capsulada, se incrementaron en el tiempo, mostrando una cinética similar a la de los peces infectados sin inmunizar pero con una magnitud mucho mayor (Figura 18), demostrando el efecto positivo que la inmunización tuvo en la respuesta a la infección en este grupo de peces. Estos datos nos hacen relacionar la presencia del factor de patogenicidad “cápsula” como un potente agente inmunógeno, al igual que describieron CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b) en el trabajo realizado con el factor de autoagregación de *Renibacterium salmoninarum*, en el cual inmunizaron truchas con *Renibacterium salmoninarum* con dicho factor, siendo sus resultados también similares a los nuestros en el sentido descrito. Los resultados obtenidos con la L-citrulina se comportaron como los de los nitritos (Figura 19).

Al observar los resultados en función de que los peces fuesen vacunados o no con Adyuvante de Freund Incompleto, encontramos niveles más altos en las concentraciones plasmáticas de nitritos en peces inmunizados con Adyuvante de Freund, que en los peces inmunizados sin Adyuvante. Estos resultados son similares a los obtenidos por CAMPOS-PÉREZ y cols. (2000b). Desde hace años se ha descrito la mayor eficacia de la vacunación



con inmunoestimulantes como el Adyuvante de Freund (PATERSON y FRYER, 1974 cit. SAKAI, 1999). La utilización de vacunas frente a *Aeromonas salmonicida* con Adyuvante de Freund también se ha referido como más efectiva en salmón (OLIVIER y cols., 1985). KAWAKAMI y cols. (1998) citan la mayor eficacia de la vacunación cuando utilizaron una vacuna con LPS y Adyuvante de Freund frente a *Photobacterium damsela subsp. piscicida* en seriola. Comparando nuestros resultados con los descritos por estos autores, la utilización de Adyuvante de Freund en la vacunación de peces incrementa de forma cuantitativa y cualitativa la respuesta del sistema inmune inespecífico ante una infección posterior.

Por tanto, estos resultados nos indican que la vacunación con LPS más Adyuvante de Freund incrementa la respuesta inmune de los peces de forma inespecífica.

V.2.3.- Respuesta inmune de los macrófagos obtenidos de peces inmunizados e infectados.

Los resultados obtenidos indican que la dorada responde ante la presencia de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* con una activación del sistema inmune inespecífico, y más concretamente con la activación de la iNOS, lo cual provoca la aparición de elevados niveles de ON y L-citrulina en el sobrenadante de los pocillos (Figuras 20 y 21). Esta observación ha sido previamente hecha por SCHOOOR y PLUMB (1994), los cuales



demonstraron la actividad iNOS en el pez gato inoculado experimentalmente con *Edwardsiella ictaluri*, midiendo la cantidad de L-citrulina producida por los macrófagos renales del pez. GROSS y cols. (1998) corroboraron el aumento del óxido nítrico medido en el sobrenadante de cultivos de macrófagos de ratones infectados con *Brucella suis* y el incremento de L-citrulina en dicho sobrenadante. Además, inhibieron la producción de óxido nítrico y L-citrulina con L-NAME. Igualmente, HEGER y cols. (2002) demostraron en ratones, que la actividad iNOS puede ser medida por la formación de L-citrulina junto con óxido nítrico.

En nuestro caso, y al igual que ocurrió en la experiencia *in vivo*, los macrófagos de los peces inmunizados con Adyuvante tuvieron un incremento mayor en las concentraciones de ON y L-citrulina.

Hay que resaltar que tanto para el óxido nítrico como para la L-citrulina, y con independencia de que los macrófagos hubiesen sido o no tratados previamente con MAF, aquéllos procedentes de peces inmunizados con adyuvante, mostraron en todas las mediciones realizadas diferencias muy significativas ($p < 0.01$) con respecto a los controles, mientras los inmunizados sin adyuvante con respecto a los controles mostraron ese nivel de significación estadística sólo entre las 24 y 48 horas postinfección. Además, entre los dos grupos probados (inmunizados con adyuvante y sin



adyuvante) existieron diferencias muy significativas ($p < 0.01$) en todas las mediciones realizadas.

Sin embargo, no parece que los MAF jueguen un papel decisivo en este modelo de respuesta inmune de la dorada, pues no existió marcada diferencia en la respuesta que dieron los macrófagos tratados y no tratados (Figuras 20 y 21), sin importar que el grupo fuera inmunizado con o sin Adyuvante Incompleto de Freund.

Sólo existió significación estadística al nivel más bajo ($p < 0.05$) en el grupo de los peces inmunizado con adyuvante para las mediciones realizadas a las 24 y 48 horas para el caso del ON, y sólo a las 48 horas para la L-citrulina.

Por otro lado, la actividad que los MAF desarrollan en células fagocíticas de peces va encaminada fundamentalmente a la estimulación de la “explosión respiratoria” produciendo moléculas oxígeno reactivas (GRAHAM y cols., 1988; MARSDEN y cols., 1994). Varios autores (SHOBER y cols., 1993; HARDIE y cols., 1994; SCHOOR y PLUMB, 1994) han demostrado la presencia de la iNOS en los teleósteos, y el posible papel que esta enzima y los productos de su metabolismo (ON y L-citrulina) tienen en la eliminación de las enfermedades en los peces. Los datos ofrecidos por estos autores indican que con la estimulación adecuada se registran diferencias de respuesta entre los peces tratados con



MAF y los no tratados. En nuestro caso la inexistencia de esas diferencias podrían explicarse basándonos en trabajos de otros autores como TAFALLA y cols. (2000) donde describen que cuando hacen diluciones de los MAF, obtenidos de cultivos de macrófagos estimulados con LPS, algunas de las diluciones menos concentradas ya no provocan respuesta. En nuestro caso pudo suceder que los MAF obtenidos, no tuvieron la concentración adecuada para estimular a los macrófagos. Según HARDIE y cols. (1996) la estimulación de los macrófagos con las citoquinas adecuadas, provoca una mayor actividad en los tratados que en los no tratados. Otra posibilidad es que los MAF que nosotros hemos utilizado adolezcan de alguna de las citoquinas que estimulan la respuesta del macrófago. Una última posibilidad de no encontrar respuesta con la estimulación de los MAF podría estar en el propio pez, en el cual ya hemos visto que no responde igual en la activación de la iNOS en función de su talla/edad, por lo que podría ocurrir que la dorada presente en otras tallas una respuesta más positiva a los MAF que la que nosotros describimos con la talla muestreada.

Con respecto al mecanismo de la “explosión respiratoria” por parte de los macrófagos que fueron o no estimulados con MAF, los resultados obtenidos revelaron una actividad de los macrófagos de los peces inmunizados superior a la de los no inmunizados, y dentro de éstos, superior en los inmunizados con adyuvante que en los inmunizados sin adyuvante (Figura 22). Sin embargo, no



observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con MAF y los no tratados, a pesar de que se ha descrito que la actividad de los MAF en células fagocíticas de peces va encaminada fundamentalmente a la estimulación de la “explosión respiratoria” produciendo moléculas oxígeno reactivas (GRAHAM y cols., 1988; MARSDEN y cols., 1994).

Así, los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante respondieron con diferencias muy significativas ($p < 0.01$) respecto a los controles durante todas las mediciones de la experiencia, mientras que sólo encontramos diferencias a nivel significativo ($p < 0.05$) al comparar los valores de los radicales superóxido procedentes de los macrófagos de los peces inmunizados sin adyuvante con los controles, y al comparar los dos grupos de peces inmunizados con y sin adyuvante.

En nuestro caso no se observaron diferencias entre los macrófagos que fueron tratados con MAF y aquellos que no lo fueron. Aunque exactamente no conocemos la causa de estos resultados, sí hemos encontrado que en determinadas diluciones de los MAF no encuentran respuestas (TAFALLA y cols., 2000), lo cual nos podría haber ocurrido a nosotros al producir los MAF, los cuales no tuviesen la concentración suficiente de citoquinas para estimular a nuestros macrófagos. Sin embargo, los protocolos seguidos en la obtención de los MAF utilizados para estimular la



“explosión respiratoria” de los macrófagos, se hizo siguiendo el método aceptado y descrito por HARDIE y cols. (1996).

Por eso, dicha respuesta podría ser un efecto de la edad/tamaño de los peces donantes, en nuestro caso 35-70 gr. Al igual que otras respuestas que hemos encontrado en el desarrollo de este trabajo, es posible que los macrófagos se estimulen en mayor o menos medida por los MAF, en función de un carácter edad-dependiente, lo cual obliga a realizar investigaciones posteriores.



CONCLUSIONES



PRIMERA.- Las moléculas nitrógeno reactivas (óxido nítrico y peroxinitritos) ejercen un efecto tóxico sobre la supervivencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, siendo los peroxinitritos los que presentan mayor efecto bactericida, de un 20.5% para las cepas capsuladas y un 15.7% para las no capsuladas.

SEGUNDA.- La respuesta inmune inespecífica de la dorada basada en la producción de óxido nítrico está condicionada por un factor edad/tamaño dependiente, ejerciendo un claro papel en peces de 30-75 gr pero no en tamaños superiores.

TERCERA.- La presencia del polisacárido capsular ejerce un efecto claramente protector para la supervivencia de la bacteria, y estimula con mayor potencia la respuesta inmune inespecífica mediante la producción de óxido nítrico.

CUARTA.- La infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* produce en la dorada un nivel de respuesta paralelo en intensidad y duración respecto de las concentraciones de nitritos y L-citrulina en el suero sanguíneo. Las diferencias de las doradas infectadas con la cepa capsulada, respecto de las infectadas con la no



capsulada, son estadísticamente muy significativas ($p < 0.01$) para ambos productos a las 24 y 48 horas, y sólo significativas ($p < 0.05$) para el resto de los tiempos analizados.

QUINTA.- El N_{ω} -nitro-l-arginina metil éster (L-NAME) inhibe la producción de L-citrulina y nitritos en todos los peces tratados respecto de los no tratados, existiendo diferencias muy significativas ($p < 0.01$) hasta las 312 horas postinfección, con independencia de que sean infectados con la cepa capsuladas o no capsulada.

SEXTA.- Sobre la base de los incrementos de nitritos y L-citrulina obtenidos en el suero de las doradas infectadas experimentalmente, y la anulación de esta respuesta inducida por la aplicación del N_{ω} -nitro-l-arginina metil éster (L-NAME), la activación de la óxido nítrico sintasa inducible en estos animales resulta evidente.

SÉPTIMA.- En la dorada, la detección de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los tejidos y cultivos de macrófagos mediante la técnica de PCR, no es posible utilizando los cebadores descritos previamente en otras especies de peces.



OCTAVA.- La inmunización de las doradas con la bacterina asociada al Adyuvante Incompleto de Freund, en comparación con los peces a los que no se les suministra adyuvante, eleva los niveles de respuesta inmune inespecífica, basada en la determinación de nitritos y L-citrulina en el suero sanguíneo mostrando diferencias muy significativas ($p < 0.01$) entre las 24 y 144 horas de la experiencia.

NOVENA.- Con respecto a los peces solamente infectados, la inmunización de las doradas con la bacterina, incrementa los niveles de respuesta inmune inespecífica basada en la determinación de nitritos y L-citrulina en el suero sanguíneo, y muestra diferencias muy significativas ($p < 0.01$) entre las 24 y 312 horas en los peces que recibieron adyuvante y entre las 72 y 312 horas en los que no lo recibieron.

DÉCIMA.- Los niveles de nitritos y L-citrulina medidos en el cultivo de macrófagos, al igual que ocurriera con las determinaciones *in vivo*, alcanzaron su valor máximo a las 24 horas, y muestran diferencias muy significativas ($p < 0.01$) en todas las mediciones realizadas entre los macrófagos procedentes de peces inmunizados con y sin adyuvante de Freund.



DÉCIMO PRIMERA.- Los factores activadores de los macrófagos (MAF) no juegan un papel decisivo en la respuesta inmune inespecífica de las doradas de esta talla/edad, facilitando la activación de la óxido nítrico sintasa inducible, con independencia de que los peces se hayan inmunizado con o sin Adyuvante Incompleto de Freund, pues no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos a lo largo de la experiencia.

DÉCIMO SEGUNDA.- El mecanismo de la “explosión respiratoria” por parte de los macrófagos desarrolla una respuesta mayor en los peces inmunizados frente a los no inmunizados, y dentro de los primeros, superior en aquellos que recibieron Adyuvante Incompleto de Freund frente a los que no lo recibieron.



RESUMEN



Actualmente, la pastereelosis es un problema de primer orden en la acuicultura mundial, representando en el Archipiélago Canario una de las enfermedades más prevalentes.

La respuesta inmune inespecífica de los peces frente a determinados patógenos, con relación a la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y al efecto bactericida de los productos que derivan de esta actividad, es todavía un terreno poco explorado.

En este trabajo se estudió el efecto bactericida que poseen el óxido nítrico y los peroxinitritos sobre el cultivo *in vitro* de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. Además tratamos de determinar los niveles séricos de nitritos y L-citrulina en peces infectados respecto de peces inmunizados, estos últimos con y sin Adyuvante Incompleto de Freund, e incluso intentamos detectar la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mediante PCR. Finalmente, hemos pretendido medir los niveles de L-citrulina y nitritos en cultivos de macrófagos procedentes de las doradas (*Sparus aurata*) inmunizadas, tratados y no tratados con factores activadores de los macrófagos (MAF), así como cuantificar la "explosión respiratoria". Hemos medido el nivel de significación estadística de las diferencias obtenidas entre grupos ($p < 0.01$ ó $p < 0.05$) mediante un modelo de análisis lineal de un solo factor con el programa SPSS (v8).



Nuestros resultados mostraron la sensibilidad de la bacteria a las moléculas nitrógeno reactivas (óxido nítrico y peroxinitritos) con un mayor efecto tóxico en el caso de los peroxinitritos. La cápsula mostró un efecto protector de la bacteria frente al ataque de estos productos.

Respecto a la infección experimental encontramos sólo respuesta en los peces entre 30- 75 gr. Tanto en la infección con la cepa capsulada como acapsulada encontramos que, en ambos casos, los peces responden incrementando los niveles séricos de nitritos y L-citrulina, con cinéticas similares pero con intensidades diferentes, siendo la respuesta en todos los casos superior en el caso de la infección con la cepa capsulada. La expresión de la enzima iNOS no pudo ser detectada mediante PCR con los cebadores utilizados en trabajos previos.

En la experiencia de inmunización encontramos que la cinética de producción de nitritos y L-citrulina era similar a la de la experiencia anterior, y que la utilización de adyuvante en la vacunación provocó un incremento en el nivel de respuesta. Los macrófagos procedentes de estos peces se estimularon al tener contacto con la bacteria mostrando un incremento en las concentraciones de óxido nítrico y L-citrulina, y con una cinética similar. Los macrófagos de peces inmunizados con adyuvante dieron una respuesta mayor que los de peces inmunizados sin adyuvante. El tratamiento con MAF no incrementó los niveles de



respuesta medidos en los cultivos de macrófagos. La "explosión respiratoria" fue mucho mayor en los macrófagos obtenidos de los peces inmunizados con adyuvante que en los peces inmunizados sin adyuvante, y a su vez, superior a la que desarrollan los peces infectados.



SUMMARY



Fish pasteurellosis is one of the major problem in the world aquaculture, and it is also in the Canary Islands one of the more prevalent diseases.

Nonespecific immune response of fish against specific pathogens, with relation to the nitric oxide synthase (iNOS) activity and the bactericidal effect of the products coming from this activity, is still an inexplorated field.

In this study, we have tried to evaluate the bactericidal effect of nitric oxide and peroxinitrites on the *in vitro* culture of *Photobacterium damsela* subspecie *piscicida*. Furthermore, we have tried to determine the nitrites and L-citrulline serum levels of infected fish with regard to immunised fish, the last made with and without Freund's uncomplete adjuvant, and we have even tried to detect the nitric oxide synthase enzyme expression through PCR. Finally, we have pretended to evaluate the L-citrulline and nitrites levels in macrophages from immunised gilthead seabream (*Sparus aurata*), treated and untreated with macrophages activating factors, and measuring the "respiratory burst". We have also



measured the level of statistics meaning of the differences obtained between groups ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) through a GLM procedure with the program SPSS (v8).

Our results showed the bacterial sensitivity to the reactive nitrogen molecules (nitric oxide and peroxinitrites) with a higher toxic effect for the peroxinitrites. The capsule showed a protective effect of the bacteria against the attack of these products.

With regard to the experimental infection, we have only found some response in 30-75 gr weight fish. Infection with capsulated as much as non-capsulated bacteria, in both cases, increased of the nitrites and L-citrulline serum levels, showing similar kinetics but different intensities. In all cases, the response showed by infected fish with the capsulated strain was higher. The iNOS expression could not be detected by PCR with the primers used in previous studies.

Immunisation trial we showed a similar kinetics nitrites and L-citrulline to the former trial, and the adjuvant used in the



vaccination, increased the level of response. Macrophages from adjuvant immunised fish were stimulated after introducing the bacteria in the culture medium, showing a higher serum levels of nitrites and L-citrulline but with a similar kinetics. This group of macrophages also showed a higher response than those from immunised fish without adjuvant. The treatment with MAF did not increase the levels response measured in the macrophage cultures. The “respiratory burst” was stronger in the macrophages from adjuvant immunised fish than fish immunised without adjuvant, and also higher than that developed for only infected fishes.



BIBLIOGRÁFIA



- Ainsworth, A.J. (1992).** Fish granulocytes: Morphology, distribution and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2**: 123-148.
- Al-Adhami, M.A. y Kunz, Y.W. (1976).** Hemopoietic centers in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Curier and Valenciennes). *Wilheim Roux's Arch.* **179**: 393-401.
- Adler, H., Adler, B., Peveri, P., Wemer, E.R., Wachter, H., Peterhans, E. y Jungi, T.W. (1996).** Differential regulation of inducible nitric oxide synthase production in bovine and caprine macrophages. *J. Infect. Dis.* **173**: 971-978.
- Aoki, T. y Kitao, T. (1985).** Detection of transferable R plasmids in strains of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.* **8**: 345-350.
- Appelberg, R. Y Orme, I.M. (1993).** Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infection in murine macrophages. *Immunol.* **80**: 352-359.
- Arijo, S., Borrego, J.J., Zorrilla, I., Balebona, M.C. y Morínigo, M.A. (1998).** Comparison of the immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to capsulated and uncapsulated strains of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.* **8**: 63-72.
- Assreuy, J., Cunha, F.Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y. y Moncada, S. (1994).** Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* **24**: 672-676.



- Austin, B. y Austin, D.A. (1999).** Bacterial Fish Pathogen. *En*: “Disease of Farmed and Wild Fish”. Laird, L. and Stead, S., eds. *Springer-Praxis*, United Kingdom. pp. 176-276.
- Bakopoulos, V., Adams, A. y Richards, R.H. (1995).** Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *J. Fish. Dis.* **18**: 1-7.
- Bakopoulos, V., Peric, Z., Rodger, H., Adams, A. y Richards, R.H. (1997a).** First report of fish pasteurellosis from Malta. *J. Aquat. Anim. Health* **9**: 26-33.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Papapanagiotou, E., Richards, R.H., Galleoti, y M. Adams, A. (1997b).** Development of an ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in culture and in “spiked” fish tissues. *Aquac.* **156**: 359-366.
- Balebona, M.C., Moriñigo M.A., Sedano, J., Martínez-Manzanares, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J. y Toranzo A.E. (1992).** Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in southwestern Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **12**(1): 168-170.
- Baptista, T., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (1996).** First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **16**: 92-95.
- Barnes, A.C., Balebona, M.C., Horne, M.T. y Ellis A.E. (1999).** Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium*



- damselae* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiol.* **145**(2): 483-494.
- Baudin Laurencin, F., Pepin, J.F. y Raymond, J.C. (1991).** First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. *En: Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists.* p. 17.
- Berdt, D.S. y Synder, S.H. (1992).** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* **8**: 3-11.
- Bonet, R., Magariños, B., Romalde, J.L., Simon-Pujol, M.D., Toranzo, A.E. y Congregado, F. (1994).** Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 285-289.
- Boockvar, K.S., Granger, D.L., Poston, R.M., Maybodi, M., Washington, M.K., Hibbs J.B. Jr y Kurlyer R.L. (1994).** Nitric oxide produced during murine listeriosis is Protective. *Infect. Immun.* **62**: 1089-1100.
- Boyde, T.R. y Rahmatullah, M. (1980).** Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* **15**: 424-431.
- Brunelli, L., Crow, J.P. y Beckman, J.S. (1995).** The comparative toxicity of nitric oxide and peroxyxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 327-334.
- Bruno, D.W. (1990).** Presence of the saline extractable protein associated with virulent strains of the fish pathogen



Renibacterium salmoninarum. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **10**: 8-10.

Buentello, J.A. y Gatlin, D.M. III (1999). Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquac.* **179**:513-521.

Campbell, I.L., Samimi, A. y Chiang C.S. (1994). Expression of the inducible nitric oxide synthase correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J. Immunol.* **153**: 3622-3629.

Campos-Pérez, J.J., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (2000a). Toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to bacterial pathogen of fish. *Dis. Aquat. Orgs.* **43**: 109-115.

Campos-Pérez, J.J., Ward, M., Grabowsky, P.S., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (2000b). The gills are important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunol.* **99**: 153-161.

Candan, A., Kucuker, M.A. y Karatas, S. (1996). Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* **16**: 150-153.

Ceschia, G., Quaglio, F., Giorgetti, G., Bertoja, G. y Bovo, G. (1991). Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. *En: Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists.* p. 26.



- Chilmonczyk, S. (1992).** The thymus in fish: Development and possible function in the immune response. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2**: 181-200.
- Clark, I.A. y Rockett, K.A. (1996).** Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* **37**: 1.
- Crawford, M.J. y Goldberg, D.E. (1998a).** Role for the *Salmonella* flavohemoglobin in protection from nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**: 12543-12547.
- Crawford, M.J. y Goldberg, D.E. (1998b).** Regulation of the *Salmonella typhimurium* flavohemoglobin gene. A new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **273**: 34028-34032.
- Daly, J.G. (1999).** Other Bacterial Pathogen. *En: "Fish Disease and Disorders"*, Vol. 3. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. eds. *CAB International*, New York. pp. 577-598.
- Deixiang, C. y Ainsworth, A.J. (1991).** Assessment of metabolic activation of channel catfish peripheral blood neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 201-208.
- Dinauer, M.C. (1993).** The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **30**: 329-369.
- Dogget, T.A. y Harris J.E. (1991).** Morphology of the gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish Shellfish Immunol.* **1**: 213-228.



- Doi, T. Yo, M. Akaike, T. Suga, M., Sato, K. y Maeda, H. (1993).** Resistance of nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immunol.* **61**: 1980-1989.
- Drapier, J.C. y Hibbs, J.B. (1988).** Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J. Immunol.* **140**: 2829-2838.
- Egusa, S. (1992).** Bacterial pseudotuberculosis in *Seriola quiqueradiata*. En: "Infectious diseases of fish". Kothekar, V.S. ed. *A.A Balkema publishers*, Brookfield (USA). pp. 219-230.
- Ellis, A.E. (1977).** The Leucocytes of fish. A. Review. *J. Fish Biol.* **11**: 453-491.
- Ellis, A.E. (1981).** Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. En: "Stress and Fish". Pickering, A.D. ed. pp. 147-169.
- Ellis, A.E. (1989).** The Immunology of Teleost. En: "Fish Pathology". Roberts R.J. ed. pp 135-152.
- Ellis, A.E. (1999).** Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunol.* **9**: 291-308.
- Ellis, A.E. y de Sousa, M. (1974).** Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. *Europ. J. Immunol.* **4**: 338-343.



- Ellis, A.E., Roberts, R.J. y Tyler, P. (1989).** The Anatomy and Physiology of Teleost. *En: "Fish Pathology"*. Roberts R.J. ed. pp 13-52.
- Evans, D.L., Carlson, R.L. Graves, S.S. y Hogan, K.T. (1984).** Non-specific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). IV. Target cell binding recycling capacity. *Dev. Comp. Immunol.* **8**: 823-833.
- Evans, D.L. y Jaso-Friedmann, L. (1992).** Role of protein phosphatases in the regulation of non specific cell activity. *Fish Shellfish Immunol.* **18**: 136-146.
- Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, y Cohen J. (1996).** Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9553-8.
- Fierro, I.M., Barja-Fidalgo, C., Cunha, F.Q. y Ferreira, S.H. (1996).** The involvement of nitric oxide in the anti-*Candida albicans* activity of the rat neutrophils. *Immunol.* **89**: 295-300.
- Finlay, B.B. y Falkow, S. (1988).** A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species. *En: "Bacteria-Host Cell Interaction"*. Alan R. Liss ed. M. A. Horowitz. New York. pp. 227-243.
- Franzon, V.L., Arondel, J. y Sansonetti, P.J. (1990).** Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infect. Immu.* **58**(2): 529-535.
- Fukuda, Y. y Kusuda, R. (1985).** Vaccination on yellowtail against pseudotuberculosis. *Fish Pathol.* **15**: 263-269.



- Galan, J.E. (1994).** Interactions of bacteria with non-phagocytic cells. *Curr. Opin. Immun.* **6**: 590-595.
- Garthwaite, J. (1991).** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS.* **14**: 60-67.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breitmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M. y Christen, R. (1995).** Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniezko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 139-144.
- Good, R. A., Finstad, J., Pollara, B., y Gabrielsen, A. E. (1966).** Morphological studies on the evolution of the lymphoid tissues among the lower vertebrates. *En "Phylogeny of Immunity"* Smith, R. T., Miescher, P. A. and Good, R. A. eds.),. University of Florida Press, Gainesville. pp. 149-167.
- Graham, S., Jeffries, A.H. y Secombes, C.J. (1988).** A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing activity of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.* **11**: 389-396.
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B. Rikarsen, K.S., Greger, E. y Vignuelle, M. (1998).** Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *J. Appl. Ichthyol.* **14**: 159-162.
- Gross, A., Spiesser, S., Terraza, A., Rouot, B., Caron, E. y Dorny J. (1998).** Expression and bactericidal activity of nitric oxide



- synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect. Immu.* **66**: 1309–1316.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Y Secombes, C.J. (1994).** Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 57-66.
- Hardie, L.J., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (1996).** In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates killing of *Renibacterium salmoninarum* concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Dis. Aquat. Org.* **25**: 175-183.
- Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider, T.G. y Guarino, A.M. (1987).** Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquac.* **65**: 193-204.
- Heger, J., Gödecke, A., Flögel, U. Merx, M.W., Molojavyi, A., Kühn-Velten, W.N. y Schrader, J. (2002).** Cardiac-Specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ. Res.* **90**: 93-99.
- Hibbs, J.B. Jr. (1992).** Overview of cytotoxic mechanisms and defense of the intracelullar environment against microbes. *En: "The Biological the Nitric Oxide. 2. Enzymology, Biochemistry and Immunology"*. Moncada, S., Marlatta, M.A., Hibbs, J.B. Jr. and Higgs, E.A. eds. *Portland Press*. London. pp. 201-206.
- Hine, P.M. (1992).** The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2**: 79-98.



- Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M. y Vincent S.R. (1991).** Neuronal NADPH-diaphorase in a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 49-73.
- Hyman, M.R. y Arp, D.J. (1991).** Kinetic analysis of the interaction of nitric oxide with the membrane-associated, nickel and iron-sulfur-containing hydrogenase from *Azotobacter vine-landii*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1076**:165-172.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. y Beckman, J.S. (1992).** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 446-451.
- Janssen, W. A. y Surgalla, M. J. (1968).** Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *J. Bacteriol.* **96**: 1606-1610.
- Jones, M.W. y Cox, D.I. (1999).** Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family Pasteurellaceae, a case report. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **19**(2): 75-78.
- Kaplan, S.S., Lancaster, J.R., Basford, R.E. y Simmons, R.L. (1996).** Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect. Immunol.* **64**: 69-76.
- Karczewski, J.M., Sharp, G.J.E. y Secombes, C.J. (1991).** Susceptibility of strains of *Aeromonas salmonicida* to killing by cell-free generated superoxide anion. *J. Fish Dis.* **14**:367-373.
- Kawahara, E., Nelson, J.S. y Kusuda, R. (1986).** Fluorescent antibody technique compared to standard media culture for



- detection of pathogenic bacteria for yellowtail and amberjack. *Fish Pathol.* **21**: 39-45.
- Kawakami, H., Shinohara, N., Fukuda, Y., Yamashita, H., Kihara, H. y Sakai, M. (1997).** The efficacy of lipopolisaccharide mixed chlorophorm-killed cell (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquac.* **154**: 95-105.
- Kawakami, H., Shinohara, N. y Sakai, M. (1998).** The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, Chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in Yellowtail. *Fish Pathol.* **33**(4): 287-292.
- Kawakami, H., Suzukawa, K., Yamashita, H., Kohno, Y., Kono, T. y Sakai, M. (1999).** Mass mortality of wild largescale blackfish *girella punctata* caused by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Pathol.* **4**(2): 87-88.
- Kent, M.L. (1982).** Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API 20E (Analytab Products) multitube test strips. *Can. J. Aquat. Sci.* **39**: 1725-1729.
- Kahl, R., Wulff, U. y Netter, K.J. (1978).** Effect of nitrite on microsomal cytochrome P450. *Xenobiot.* **8**: 359-364.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1993a).** Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan. *Microbiol. Immunol.* **37**(2): 103-109.



- Kim, E.H. y Aoki, T. (1993b).** The structure of the Chloramphenicol resistance gene on a transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* **37**(9): 705-712.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1993c).** Detection of R plasmid encoded with resistance to Florfenicol in *Pasteurella piscicida*. *Gyob. Kenkyu.* **28**(4): 165-170.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1994).** The trasposon-like structure of IS26-Tetraciclina, and Kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* **38**(1): 31-38.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1996a).** Sulfonamide resistance gene in a transferable R plasmid of *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* **40**(5): 397-399.
- Kim, E.H. y Aoki, T. (1996b).** Sequence analysis of the Florfenicol resistance gene encoded in the transferable R plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* **40**(9): 665-669.
- Kimura, M., y Kitao. T. (1971).** On the etiological agent of "bacterial tuberculosis" of *Seriola*. *Fish Pathol.* **6**: 8-14.
- Kitao, T. y Kimura, M. (1974).** Rapid diagnosis of pseudotuberculosis in yellowtail by means of the fluorescent antibody technique. *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.* **40**: 889-893.
- Knowles, R.G. y Moncada, S. (1994).** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258.



- Koike, Y., Kuwahara, A. y Fujiwara, H. (1975).** Characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. *Japan J. Microbiol.* **19**: 241-247.
- Koprowski, H., Zheng, Y.M., Heber-Katz, E., Fraser, N., Rorke, L. Fu, Z. Hanlan, C. y Dietz-Shold, B. (1993).** In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3024-3027.
- Krönke, K.D., Fehsel, K. y Kolb-Bachofen, V. (1995).** Inducible nitric oxide synthase and its products nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem.* **376**: 327-343.
- Kubota, S., Kimura, M., y Egusa, S. (1970a).** Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-I. Symptomatology and histopathology. *Gyob. Kenk.* **4**: 103-110.
- Kubota, S., Kimura, M., y Egusa, S. (1970b).** Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-II. Mechanism of nodule formation. *Gyob. Kenk.* **5**: 31-34.
- Kubota, S., Kimura, M. y Egusa, S. (1972).** Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-III. Findings on nodules and bacterial colonies in tissues. *Gyob. Kenk.* **6**: 69-72.
- Kusuda, R. y Hamaguchi, M. (1988).** The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in culture Yellowtail. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **8**: 50.



- Kusuda, R. y Miura, W. (1972).** Characteristics of a *Pasteurella* sp. Pathogenic for pond culture ayu. *Fish Pathol.* **7**: 51-57.
- Kusuda, R. y Yamaoka, M. (1972).** Etiological studies on pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. I. On the morphological and biochemical properties. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries*, **38**: 1325-1332.
- Kusuda, R., Ninomiya, M., Hamaguchi, M. y Muraoka, A. (1988).** The efficacy of ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in culture Yellowtail. *Fish Pathol.* **23**: 191-196.
- Laing, K.J., Belosevic, M. y Secombes, C. (1996).** A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunol. Cell. Biol.* **74**: 374-379.
- Laing, K.J., Hardie, L.J., Aartsen, W., Grabowski, P.S. y Secombes, C.J. (1999).** Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Develop. Comp. Immunol.* **12** : 60-74.
- Lamas, J. y Ellis, A.E. (1994).** Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 201-219.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L. y Fontecave, M. (1991).** Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 442-448.



- Leung, K.Y., Lim, T.M., Lam, T.J. y Sin, Y.M. (1996).** Morphological changes in carp epithelial cells infected with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* **19**: 167-174.
- Lewis, D.H., Grumbles, L.C., McConnell, S. y Flowers, A.I. (1970).** *Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. *J. Fish Dis.* **6**: 160-162.
- Lheninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1993).** Integración y regulación hormonal del metabolismo de los mamíferos. En: "Principios de Bioquímica". *Ediciones Omega S.A.* Barcelona. pp. 736-769.
- Lopez-Doriga, M.V., Barnes, A.C., Dos Santos, N.M. y Ellis, A.E. (2000).** Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiol.* **146**(1): 21-30.
- Lundberg, B.E., Wolf, R.E., Dinauer, M.C., Xu, Y. y Fang, F.C. (1999).** Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* **67**: 436-438.
- MacArthur, J.L., Thomson, A.W. y Fletcher, T.C., (1985).** Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.* **27**: 667-676.
- Magariños, B., Romalde, J., Byin, I., Fouz, B. y Toranzo, A.E. (1992a).** Phenotypic, antigenic, and molecular



characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3316-3322.

Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1992b). Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2491-2498.

Magariños, B., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (1994a). Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **15**(3): 88-90.

Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1994b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2990-2998.

Magariños, B., Noya, M., Romalde, J.L., Pérez, G. y Toranzo, A.E. (1994c). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **14**: 120-122.

Magariños, B., Bonet, R., Romalde J.L., Martínez M.J., Congregado, F. y Toranzo, A.E. (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogen.* **21**: 289-297.

Magariños, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 29.34.



- Magariños, B. y Romalde, J.L. (1997a).** Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. *En: "Fish Vaccinology"*. R. Gudding, A. Lillehaug, P. J. Midtlying & F. Brown, eds. *Basel: Karger*. pp. 167-177.
- Magariños, B., Osorio, C., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (1997b).** Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 634-639.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Núñez, S. y Toranzo, A.E. (1999).** Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **19**(4): 159-161.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (2000).** Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela subsp. piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol. Infect.* **125**(1): 213-219.
- Manning, M. J. (1994).** Fishes. *En "Immunology. A comparative approach"* Turner, R. J. ed. John Wiley & Sons, Chichester. pp. 69-100.
- Marleta, M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D. Y Wishnok J.S. (1988).** Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* **27**: 8706.
- Marsden, M.J., Cox, D. Y Secombes. C.J. (1994).** Antigen induced release of macrophage activating factor from rainbow



- trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **42**: 199-208.
- Mayer, B. y Hemmens, B. (1997).** Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 477-481.
- Moncada, S., Palmer, R.M. y Higgs, E.A. (1991).** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**(2): 109-42.
- Moody, C.E., Serreze, D.V. y Reno, P.W. (1985).** Non-specific cytotoxic activity of teleost leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 51-64.
- Murray, H.W. y Teitelbaum, R.F.L. (1992).** L-arginine dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.* **165**: 513-517.
- Nakai, T., Fujiie, N., Muroga, K. Arimoto, M., Mizuta, Y. y Matsuoka, S. (1992).** *Pasteurella piscicida* infection in hatchery-reared juvenile striped jack. *Gyob. kenk.* **27**(2): 103-108.
- Nathan, C. y Xie, Q. W. (1994).** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 13725-13728.
- Nathan, C. y Shiloh, M.U. (2000).** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS.* **97**: 8814-8848.
- Nelson, J. S., Kawahara, E., Kawai, K. y Kusuda, R. (1981).** Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail,



Seriola quinqueradiata. *Bull. Mar. Sci. Fish Kochi Univ.* **1**: 17-22.

Neumann, N.F., Fagan, D. Y Belosevic, M. (1995). Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **19**: 473-482.

Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J. y Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* **25**: 807-825.

Nicholson, S., da Gloria Bonencini-Almeida, M., Lapa e Silva, J.R., Nathan, C., Xie, Q.W., Mumford, R., Weidner, J.R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W. y Ho, J.L. (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* **183**: 2293-2302.

Noya, M., Magariños, B. y Lamas, J. (1993). Histología asociada a *Pasteurella piscicida* y sus productos extracelulares en dorada, *Sparus aurata*. *Actas IV Congreso Nac. Acuicult.* Illa de Arousa. pp. 599-604.

Noya, M., Magariños, B. y Lamas, J. (1995a). Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquac.* **131**: 11-21.



- Noya, M., Magariños, B., Toranzo, A.E. y Lamas, J. (1995b).** Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*). A light- and electron-microscopic study. *Dis. Aquat. Org.* **21**: 177-186.
- Olivier, G. Evelyn, T.P.T. y Lallier, R. (1985).** Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: non-specific nature and the probable role of macrophage in the phenomenon. *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 419-432.
- Onishi, K., Watanabe, K. y Jo, Y. (1982).** Pasteurella infection in young black seabream. *Fish Pathol.* **16**: 207-210.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (1999).** 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2942-2946.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. y Barja, J.L. (2000).** Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis. Aquat. Organ.* **40**: 177-183.
- Ostholm, T., Holmqvist, B.I., Alm, P. y Ekstrom, P. (1994).** Nitric oxide synthase in the CNS of Atlantic salmon. *Neurosci. Lett.* **168**: 233-237.
- Øyan, A.M., Nilsen, F., Goksøyr, A. y Holmqvist, B. (2000).** Partial cloning of constitutive and inducible nitric oxide synthases and detailed neuronal expression of NOS mRNA in



the cerebellum and optic tectum of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Mol. Brain Res.* **78**: 38–49.

Pick, E. (1986). Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Meth. Enzymol.* **132**: 407-421.

Press, C.M.L., Dannevig, B.H. y Lysverk, T. (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish immunol.* **4**: 79-93.

Quesada, J., Villena, M.L. y Argulleiro, B. (1990). Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A light and electron microscopic study. *J. Morph.* **206**: 273-281.

Real, F., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P. y Deniz, S. (1997). Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **17**(5): 153-157.

Reali, D., Pretti, C., Tavanti, L. y Cognetti-Varriale, A.M. (1997). *Pasteurella piscicida* (Janssen & Surgalla, 1964): a simple method of isolation and identification from rearing-water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **17**(2): 51-52.

Rhodaes, E.R. y Orme, I.M. (1997). Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immunol.* **65**: 1189-1195.



- Roberts, R.J. (1978),**. Fish pasteurellosis. *En: Fish Pathology, Bailliere-Tindall, Londres.* Pp. 298-300
- Romalde, J.L., Magariños, B., Fouz, B., Byín, I., Núñez, S. y Toranzo, A.E. (1995a).** Evaluation of BIONOR mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Org.* **21:** 25-34.
- Romalde, J.L., Breton, A., Magariños, B. y Toranzo, A.E. (1995b).** Use of Bionor Aquarapid-Pp kit for the diagnosis of *Pasteurella piscicida* infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **15(2):** 64-66.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Turnbull, K.D., Baya, A.N., Barja, J.M. y Toranzo, A.E. (1995c).** Fatty acid profiles of *Pasteurella piscicida*: comparison with other fish pathogenic gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* **163:** 211-216.
- Romalde, J.L. y Magariños, B. (1997).** Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Dev. Biol. Stand.* **90:** 167-177.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R. y Toranzo, A.E. (1999).** Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *J. Microbiol. Meth.* **38:** 147-154.
- Rombout, J.W., Taverna-Thiele, A.J. y Villena, M. (1993).** The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Ciprinus carpio* L.): An immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **17:** 55-66.



- Rowley, A.F., Hunt, T.C., Page, M. y Mainwaring, G. (1988).** Fish. *En*: "Vertebrate Blood Cells". Rowley, A.F. and Ratcliffe, N.A. eds. *Cambridge University Press*. Cambridge. pp. 19-127.
- Santos, Y, Romalde J.L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja J.L. y Toranzo, A.E. (1993).** Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogen. *Aquaculture*. **116**: 111-120.
- Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., Kawakami, H. Y Yoshida, T. (1993).** The cell surface hydrophobicity and hemagglutinating properties of the bacterial fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.* **13**: 168-170.
- Sakai, M. (1999).** Current research of fish immunostimulants. *Aquac.* **172**: 63-92.
- Salati, F., Hamaguchi, M., Kusuda, R., (1987).** Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.* **22**: 93-98.
- Sasaki, S., Miura, T., Nishikawa, S., Yamada, K., Hirasue, M. y Nakane, A. (1998).** Protective role of nitric oxide in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect.. Immun.* **66**: 1017-1022.
- Schmidt, H.H.H.W., Seifert, R. y Bohme, E.J.N. (1989).** Formation and release of nitric-oxide from human-neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene-B4. *FEBS Lett.* **244**: 357.



- Schmidt, H.H.H.W. y Walter, U. (1994).** NO at work, *Cell.* **78:** 919-925.
- Schmidt, H.H.H.W., Smith, R.M., Nakane, M. y Murad, F. (1992).** Ca²⁺/Calmodulin-dependent NO synthase type 1: A biopteroflavoprotein with Ca²⁺/Calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochem.* **31:** 3243-3249.
- Schneemann, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guenero, L. y Schaffner, A. (1993).** Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.* **167:** 1358-1363.
- Schober, A., Malz, C.R. y Meyer, D.L. (1993).** Enzymohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mickiis*). *Neurosci. Lett.* **151:** 67-70.
- Schober, A., Malz, C.R. y Schober, W. (1994).** NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampetra planeri*). *Neurol.* **345:** 94-104.
- Schoedon, G., Schneemann, M., Walter, R., Blau, N., Hofer, S. Y Schaffner, A. (1995).** Nitric oxide and infection: another view. *Clin. Infect. Dis.* **2:** 152-157.
- Schoor, W.P. y Plumb, J.A. (1994).** Indication of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Org.* **19:** 153-155.
- Secombes, C.J. (1990).** Isolation of fish macrophages and analysis of their killing activity. *En: "Techniques in fish immunology"*. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S.



and van Muiswinkel, W.B. eds. *SOS publication*, Fair Haven, New Jersey. pp. 137-154.

Secombes, C.J. (1996). The nonspecific immune system: Cellular defenses. *En: "The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment"*. Iwama, G. and Nakanishi, T. eds. *Academic Press. London.* pp. 63-103.

Secombes, C.J. y Fletcher, T.C. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2**: 53-71.

Segal, A.W. y Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS.* **18**: 43-47.

Sharp, G. J. E., y Secombes. C. J. (1993). The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **3**: 119-129.

Shin, D.H., Lim, H.S., Cho, S.K., Lee, H. Y., Lee, H.W., Lee, K.H., Chung, Y.H., Cho, S.S., Cha, C.I. y Hwang, D.H. (2000). Immunocytochemical localization of neuronal and inducible nitric oxide synthase in the retina of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Neurosci. Lett.* **292**: 220-222.

Simidu, U. y Egusa, S. (1972). A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38**: 803-812.

Sinderman, C.J. (1990). Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish. Vol I. *En: "Disease of Marine Fish"*. 2nd ed. *Academic Press*, New York. pp. 106-125.



- Skarmeta, A.M., Byin, I., Santos, Y. y Toranzo, A.E. (1995).** *In vitro* killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Dis. Aquat. Org.* **23**: 51-57.
- Smibert, R.M. y Krieg, N.R. (1984).** General characterization. *En*: “Manual of Methods for General Microbiology”. *American Society for Microbiology*. Washington, DC. pp. 409-443.
- Smith, A.M., Potter, M. y Merchant, E.B. (1967).** Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Lepomis macrochirus*. *J. Immunol.* **99**: 876-882.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E. y Boone, J.G. (1964).** *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.* **88**: 1814-1815.
- Soderstrom, V., Hylland, P. y Nilsson, G.E. (1995).** Nitric oxide synthase inhibitor blocks acetylcholine induced increase in brain blood flow in rainbow trout. *Neurosci. Lett.* **197**: 191-194.
- Speilberg, L.A., Myhr, E. y Valheim, M. (1991).** A *Pasteurella piscicida*-like organisms as the causative agent of periorbital cellulitis and dermal ulceration in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*. pp. 99.
- Stuehr, D.J. y Nathan, C.F. (1989).** Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**: 1543-1555.



- Tafalla, C., Figueras, A. y Novoa, B. (1999).** Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**: 249-256.
- Tafalla, C. y Novoa, B. (2000).** Requeriments for nitric oxide production by turbor (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* **24**: 623-631.
- Takashima, N., Aoki, T. y Kitao, T (1985).** Epidemiological surveillance of drug-resistant strains of *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol.* **20**: 209-217.
- Tan, E., Low, K.W., Wong, W.S.F. y Leung, K.Y. (1998).** Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. *Microbiology* **144**: 299-307.
- Tatner, M. F. (1985).** The migration of labeled thymocytes to the peripherallymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol.* **9**: 85-91.
- Temkim, R.J. y McMillan, D.B. (1986).** Gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Morph.* **190**: 9-26.
- Thiemermann, C. (1997).** Nitric oxide and septic shock. *Gen. Pharmac.* **29**: 159-166.
- Thyssen, A., Grisez, L., Van Houdt, R. y Ollevier, F. (1998).** Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1145-1151



- Thyssen, A., Van Eygen, S., Hauben, L., Goris, J. Swings J. y Ollevier F. (2000).** Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1013–1019
- Toranzo, A.E., Barja, J. y Hetrick, F.M. (1982).** Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **3**: 43-45.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. y Barja, J. (1991).** Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) : First report in Spain. *Aquac.* **99**, 1-15.
- Tung, M.C., Tsai, S.S., Ho, L.F., Huang, S.T. y Chen S.C. (1985).** An acute septicemic infection of *Pasteurella* organisms in pond-cultured Formosa Snakehead fish (*Chana maculata* Lacepede) in Taiwan. *Fish Pathol.* **20**: 143-148.
- Ueki, N., Kayano, Y. y Muroga, K. (1990).** *Pasteurella piscicida* in juvenile red grouper. *Fish Pathol.* **25**: 43-44.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. y Balish, E. (1995).** Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect. Immun.* **63**: 1142-1144.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. y Balish, E. (1996).** Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide- producing macrophages. *Infect. Immun.* **64**: 3127-3133.
- Vespa, G.N., Cunha F.Q. y. Silva, J.S. (1994).** Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia



- and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* **62**: 5177-5182.
- Wang, R., Neumann, N.F., Shen, Q. y Belosevic, M. (1995).** Establishment and characterisation of a macrophage cell line from goldfish. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 329-346.
- Wang, X.H., Oon, H.L., Ho, G.W.P., Wong, W.S.F., Lim, T.M. y Leung, K.Y. (1998).** Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* **144**: 2987-3002.
- Wang, T., Warad, M., Grabowsky, P. y Secombes, C. (2001).** Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Biochem. J.* **358**: 747-755.
- Weinberg, J.B. (1998).** Nitric oxide production and nitric oxide synthase tipe 2 expresion by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol. Med.* **4**: 557-591.
- West, P.A. y Colwell, R.R. (1984).** Identification and classification of Vibrionaceae: an overview. *En*: "Vibrios in the Environment". R.R. Colwell ed. *Wiley*. New York. pp. 263-285.
- Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C. y Nims, R.W. (1993).** Inhibition of cytochromes-P450 by nitric oxide and a nitric oxidereleasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 115-123.
- Wong, H.Y., Fung, L.Y., Kwok, F. y Lo, S.C.L. (1998).** Constitutive nitric oxide synthase (NOS) activities in big-head carp (*Aristichthys nobilis*). *Fish Physiol. Biochem.* **19**: 171-179.



- Wood, P.A. y Kaattari, S.L. (1996).** Enhanced immunogenicity of *Renibacterium salmoninarum* in chinook salmon after removal of the bacterial cell surface-associated 57 kDa protein. *Dis. Aquat. Org.* **25**: 71-79.
- Xia, Y. y Zweier, J.L. (1997).** Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 6954-6958.
- Xie, Q. W. y Nathan, C. (1994).** The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukocyte Biol.* **56**: 576-582.
- Yasunaga, N., Hatai, K. y Tsukahara, J. (1983).** *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured sea bream. *Fish Pathol.* **18**: 107-110.
- Yasunaga, N. y Yasumoto, S. (1988).** Therapeutic effect of florfenicol on experimentally induced pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathol.* **23**: 1-5.
- Yasunaga, N., Yasumoto, S., Hirakawa, E. y Tsukahara, J. (1984).** On a masive mortality of oval file fish (*Navodan modestus*) caused by *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol.* **19**: 51-55.
- Yoshida, T., Inglis, V., Misawa, N., Kruger, R. y Sakai, M. (1997).** *In vitro* adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. *J. Fish Dis.* **20**: 77-80.
- Zapata, A.G. (1979).** Ultrastructural study of the teleost kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **3**: 55-65.



- Zapata, A.G. (1981).** Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultrastructure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 685-690.
- Zapata, A.G. (1983).** Phylogeny of the fish immune system. *Bull. Inst. Pasteur.* **81**: 165-186.
- Zapata, A.G. y Cooper, E.L. (1990).** The Immune System: Comparative Histophysiology. John Willey and Sons. Chichester.
- Zapata, A.G. (1996a).** Periodic cycles and immunity. *En*: "The Physiology of Immunity". Marsh J.A. and Kendall, M.D., eds. *CRC Press*, Boca Raton (USA). pp. 377-393.
- Zapata, A.G., Chiba, A. y Varas, A. (1996b).** Cells and Tissues of the Immune System of Fish. *En*: "The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment". Iwama, G. and Nakanishi, T. eds. *Cambridge University Press*, Cambridge. pp. 1-53.
- Zhao, J. y Aoki, T. (1989).** A specific DNA hybridization probe for detection of *Pasteurella piscicida*. *Dis Aquat. Org.* **7**: 203-210.
- Zhao, J. y Aoki, T. (1992).** Plasmid profile analysis of *Pasteurella piscicida* and use of a DNA probe to identify the species. *J. Aquat. Anim. Health.* **4**: 198-202.
- Zielinski, B.S., Osahan, J.K., Hara, T.J., Hosseini, M. y Wong, E. (1996).** Nitric oxide synthase in the olfactory mucosa of the larval Sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *J. Comp. Neurol.* **365**: 18-26.



Ziegler, M.K. y Galan, J.E. (1995). Paradigms in bacterial entry into host cells. *En: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens"*. 2nd ed. J. A. Roth, C. A. Bolin, K. A. Brogden, F. C. Minion & M. J. Wannemuehler eds. *American Society for Microbiology*. Washington, DC. pp. 21-31.



ANEXOS



ANEXO I.- Direcciones de Laboratorios y casas comerciales utilizadas en este trabajo.

- **Amersham-Phamacia:** Parc Tecnologic del Valles, Cerdanyola, Barcelona, España.
- **Biochrom KG:** Berlín, Alemania.
- **Biomerieux:** Madrid, España.
- **Bio-Rad Laboratorios S.A.:** López de Hoyos, Madrid, España.
- **Biotech:** Houston, Texas, Estados Unidos de América.
- **Calbiochem:** Boulevard Industrial Park, Nothingham, Reino Unido.
- **Corning:** Badhoevedorp, Holanda.
- **Cultimed:** Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona, España.
- **Eppendorf:** Netheler-Hinz, Hamburgo , Alemania.
- **Genset S.A.:** París, Francia.
- **Gibco:** Life Technologies S.A., Parque Mas Blau, Prat de Llobregat, Barcelona, España.
- **Hybaid:** Bruselas, Bélgica.
- **Oxoid:** Unipath España S.A., Vía de Los Poblados, Madrid, España.
- **Panreac Química S.A.:** Montcada i Reixac, Barcelona, España.
- **ProAqua:** California, Estados Unidos de América.
- **Promega:** Innogenetic Diagnóstica y Terapéutica S.A., Barcelona, España.
- **Sigma-Aldrich Química S.A.:** Alcobendas, Madrid, España.



AGRADECIMIENTOS



Al Dr. D.. Fernando Real Valcárcel, por su dirección y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. D. Manuel Ruiz de Galarreta, por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo y por su inagotable inspiración científica, aún me duelen las neuronas de la cantidad de ideas por segundo que su privilegiada mente genera y que yo sigo intentando asimilar.

Al Dr. D. José Bismarck Poveda, Guerrero por ser como es, una persona afable donde las haya, y que puso a mi disposición todos los medios informáticos y humanos que necesite para desarrollar mi trabajo. De verdad, gracias José.

A Dani por ser quien es, mi compañero, el que aguanta mis lamentos en los días de cabreo, cuando las técnicas no salían, o los peces me daban problemas, y sobre todas las cosas por ser un fiel amigo.

A Tacho por ser amigo siempre, maestro en muchas ocasiones, pero sobre todo por ser la buena persona que es, lo que me hace pensar en él, más que como amigo como un hermano.

A Raduan por estar ahí al pie del cañón cuando lo necesite, sin importarle el momento ni el lugar.



A Inma (D^a. Aurelia) por poner esos puntos dulces con sus risas a los días tristes. Venga amiga dale caña al Criptococo.

A Soraya, Vilma, Begoña, Ana, Christian y Rafael Gines por estar ahí siempre que les necesite.

A Raquel, Vladi, Carlos, y el resto de personal del Laboratorio de Bioquímica por soportarme, preguntando donde estaban todas las cosas.

A Luigi y M^a José, las primas tremendas, por los buenos ratos pasados juntos y los que nos quedan.

A Patricia, la persona más importante en mi vida y una de las que más ha sufrido la realización de este trabajo. Gracias cariño por aguantar mis cambios de humor en los días malos, y saber estar ahí siempre para animarme, sólo espero poder ser la mitad de bueno y comprensivo el día que tú lo necesites.

A la Empresa GRAMACAN S.A. por facilitarnos los animales que han permitido el desarrollo de esta tesis, y a Alevines y Doradas S.A. por las facilidades que nos dieron en cuantas gestiones requerimos.



A la Consejería de Educación del Gobierno de Canarias y al Plan nacional I+D por haber financiado prácticamente la totalidad de los gastos derivados de este trabajo.

Y a todos aquellos que de una u otra forma han colaborado a llevar a buen término este trabajo.

