

# Estudio de la actividad bactericida de las moléculas nitrógeno reactivas sobre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Acosta, F., Padilla, D., Gómez, V., Sierra, E.M., Rosario, I. y Real, F.

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria 35416 ARUCAS- ESPAÑA

Actualmente, la pasterelosis es un problema de primer orden en la acuicultura mundial [2], 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 y al efecto bactericida de los productos que derivan de esta actividad, es todavía un terreno poco explorado.

El óxido nítrico (NO) es un mediador celular generado durante la conversión de arginina en citrulina por tres NO-Sintasas (NOS) diferentes, que juega un papel fisiológico importante en los metazoos. Dos isoformas de NOS caracterizadas inicialmente en cerebro (NOS1) y endotelios vasculares (NOS3) son enzimas constitutivos y dependientes de Ca/Calmodulina que generan pequeñas cantidades fisiológicas de NO responsables de las acciones homeostáticas del gas que incluyen (aunque no se limita a) el mantenimiento del tono vascular y la neurotransmisión [8]. Una tercera isoforma (NOS2) caracterizada en macrófagos activados y otras células no inmunes es una enzima regulable a nivel transcripcional y transduccional que genera cantidades elevadas y sostenidas de NO implicado en la respuesta a agentes infecciosos y otras situaciones de estrés [4,6,1]. Aunque se acepta que el NO es un mediador celular evolutivamente conservado, y el papel de

la NOS2 en la defensa inmune está bien establecido en mamíferos [3,5], la importancia de este mecanismo en otras especies está menos delimitado.

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* tanto en su forma capsulada como no capsulada.

Para ello los cultivos de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* fueron sometidos a la acción del N-(b-D-Glucopyranosil)-N<sup>2</sup>-acetil-S-nitroso-D,L-penicilamina (SNAP) como donador de óxido nítrico y de 3-Morfolino-sydonimia, HCl (SIN-1) como donador de peroxinitritos adicionando al cultivo. Tras 24 horas de incubación se determinó el efecto bactericida mediante el método colorimétrico del 3-[4-5-Dimetiltiazol-2 y e]-2-5- bromuro de difeniltetrazolium (MTT) [7].

Nuestros resultados mostraron la sensibilidad de la bacteria a las moléculas nitrógeno reactivas (óxido nítrico y peroxinitritos). El donador de óxido nítrico (SNAP) fue tóxico para todas las cepas estudiadas. 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. Todas las cepas acapsuladas mostraron una mayor sensibilidad, teniendo una disminución de

la supervivencia del 38% frente al 14.25% de las capsuladas.

El SIN-1 (donador de peroxinitritos) 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%.

De esta manera podemos concluir que, al igual que ocurre con otras especies de bacterias patógenas, la acción bactericida de las moléculas nitrógeno reactivas es efectiva frente a *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. Además concluimos que la presencia de cápsula ejerce un efecto protector de la bacteria frente al estrés oxidativo provocado por las moléculas nitrógeno reactivas.

## Bibliografía

- 1.- Clark, I.A. y Rockett, K.A. (1996). Nitric oxide and parasitic disease. *Adv. Parasitol.* 37: 1.
- 2.- Daly, J.G. (1999). Other Bacterial Pathogens. *En: "Fish Disease and Disorders"*, Vol. 3. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. eds. *CAB International*, New York, pp. 577-598.
- 3.- Dinauer, M.C. (1993). The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 30: 329-369.
- 4.- 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.
- 5.- Neumann, N.E., 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.
- 6.- 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.
- 7.- 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.
- 8.- Schmidt, H.H.H.W., Smith, R.M., Nakane, M. y Murad, F. (1992).  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent NO synthase type 1: A biopteroflavoprotein with  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-independent diaphorase and reductase activities. *Biochem.* 31: 3243-3249.