



**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE S.C.**

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA LEVADURA MARINA *Debaryomyces  
hansenii* CBS 8339 EN LA DIETA SOBRE LA RESPUESTA  
INMUNE DE LA CABRILLA SARDINERA  
*Mycteroperca rosacea* Y LA DORADA *Sparus aurata***

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

**P R E S E N T A**

**Martha Candelaria Reyes Becerril**

La Paz, B.C.S. Junio de 2008

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz B.C.S. siendo las 11 horas del día 30 del mes de Mayo de 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis Avalada por la dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. a liberar la tesis de Grado titulada:

**“Efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*”**

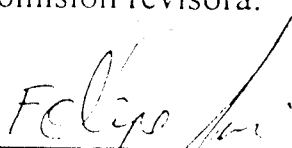
Presentada por la alumna:

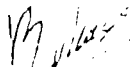
Martha Candelaria Reyes Becerril

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

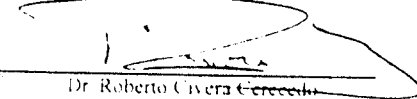
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

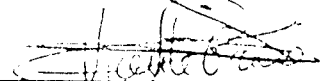
La comisión revisora:


  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
CO-DIRECTOR DE TESIS

  
Dra. Valerie Barbosa Solomiu  
CO-TUTOR

  
Dr. Daniel Tovar Ramirez  
CO-DIRECTOR DE TESIS

  
Dr. Roberto Civera Cereceda  
CO-TUTOR

  
Dr. Vicente Gracia Lopez  
CO-TUTOR

  
Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Comité Tutorial**

Dr. Dariel Tovar Ramírez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Felipe Ascencio Valle	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Valérie Barbosa Solomieu	Aqua Bounty Canada Inc.
Dr. Vicente Gracia López	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Roberto Civera Cerecedo	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

**Jurado de Examen**

Dr. Dariel Tovar Ramírez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dr. Felipe Ascencio Valle	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. Valérie Barbosa Solomieu	Aqua Bounty Canada Inc.
Dr. Roberto Civera Cerecedo	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Dra. María Ángeles Esteban	Universidad de Murcia, España.

**Suplente**

Dr. Vicente Gracia López	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
--------------------------	---

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización del doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, al personal docente y de apoyo por las facilidades prestadas durante mi estancia como estudiante de esta institución.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Dariel Tovar Ramírez y el Dr. Felipe Ascencio Valle, ambos directores de este trabajo, por la confianza que han depositado en mí a lo largo de estos años, por la ayuda y el apoyo que me han ofrecido y sobre todo por la gran oportunidad proporcionada al permitirme realizar este proyecto. Mis jefecitos...

Quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Valérie Barbosa, Dr. Roberto Civera y el Dr. Vicente Gracia por sus valiosos comentarios y apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

Y como olvidar a esas personas tan importantes que me enseñaron a cuidar de mis adorados pececitos, Jorge Sandoval, Jorge Angulo, Sandra de La Paz, Mario Osuna, Gilberto Colado, gracias.

También quisiera expresar mi valioso agradecimiento a todos y cada uno de los miembros del laboratorio de Patogénesis Microbiana, por sus comentarios, su ayuda técnica, los cafecitos mañaneros y al caer la tarde, las comidas, por seguir nuestros sueños...mi adorada Patobanda. Los extrañaré mucho!

A mis amigos eternos que cerca o lejos están conmigo echándome porras continuas: Oscarito mi coffe-mate, Cony, Kary, Yesy, Leito, Camilo, Laurence, Yumy, Miriam, a todos y cada uno de ustedes gracias por ser únicos.

Irenica brujita mía, sos mi alma gemela, gracias por tu sincera amistad, los días de muestreos y tus recetas de cocina, sos única. Rebeca sos la niña más tierna, Juana, Alberto, Glo y Glo, Meseguer y Marian, gracias por recibirme y darme la mejor de las acogidas en su madre patria, os hecho mogollón de menos!.

Madre eres la mejor, hermana te quiero muchísimo, gracias por darme unos sobrinos maravillosos que alegran mi vida constantemente. Mamá, hermana, gracias por las llamadas a diario...y estar siempre, siempre a mi lado.

Abuelo, aún nos quedan muchos libros por leer, tardes por discutir y domingos por explorar. Gracias por tu apoyo incondicional.

A ti my love, por estar a mi lado. Por escucharme de cerca y leerme de lejos...por Vizcaíno, por París!...gracias mi Charls.

**DEDICATORIA**

*A mi familia...*

## RESUMEN

El uso de probióticos en la acuicultura ha generado gran interés, principalmente para la protección contra las enfermedades infecciosas. Las levaduras representan una importante fuente de  $\beta$ -glucano, quitina, y nucleótidos que estimulan el sistema inmune en peces. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune en juveniles de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.

Juveniles de cabrilla sardinera y la dorada fueron alimentados durante cuatro semanas con dos dietas: una dieta con levadura marina *D. hansenii* CBS 8339 equivalente a  $10^6$  UFCg<sup>-1</sup> y una dieta control sin levadura. Al final del ensayo alimenticio únicamente los juveniles de cabrilla sardinera fueron retados frente a patógenos para medir la supervivencia y niveles inmunológicos. En un primer bioensayo las condiciones físico químicas del agua fueron manipuladas para inducir la proliferación del ectoparásito *Amyloodinium ocellatum* y en un segundo bioensayo, los organismos fueron expuestos con la bacteria *Aeromonas hydrophila*. La mortalidad fue registrada por 7 días. Los parámetros de la respuesta celular humoral y enzimas antioxidantes fueron medidos en suero, leucocitos de riñón cefálico, intestino e hígado, antes y después del reto. Los niveles de expresión de genes relacionados con el sistema inmune fueron también evaluados por PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real en juveniles de la cabrilla sardinera y la dorada.

Los resultados obtenidos muestran que la levadura marina *D. hansenii* se adhiere al moco de la pared intestinal de la cabrilla sardinera y la dorada. En el primer bioensayo, el estrés inducido favoreció la proliferación del parásito protozoario *A. ocellatum*. La mortalidad acumulada fue de 90.7 y 52.8% a los siete días post-infección en el grupo control y las dietas suplementadas con levadura, respectivamente. Los niveles de IgM en suero y actividad de la enzima antioxidante *SOD* fueron significativamente más altos en los peces alimentados con la levadura. En el segundo experimento, los peces expuestos a la infección con la bacteria *A. hydrophila* (LD<sub>50</sub>  $1 \times 10^8$  UFC), presentaron diferencias significativas en los niveles de IgM y de las enzimas antioxidantes *SOD* y *CAT* en peces alimentados con levadura en la dieta. La mortalidad no se registró en ambos grupos, sin embargo al final del reto la bacteria *A. hydrophila* fue recuperada de intestino e hígado de peces infectados. Los niveles de expresión de los genes *CAT* y *HSP-70* fueron incrementados en este mismo grupo a diferencia del control. La administración de *D. hansenii* en la dieta de la dorada, aumentó significativamente los niveles de actividad de peroxidasa, explosión respiratoria, fagocitosis y citotoxicidad en leucocitos de riñón cefálico. Un aumento en la actividad de *SOD* fue observada en peces alimentados con levadura. Finalmente, las dietas suplementadas con levadura sobre-expresaron los niveles de los genes *Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  analizados en el riñón cefálico. Los resultados obtenidos apoyan fuertemente la hipótesis de que *D. hansenii* cepa CBS 8339 estimula los parámetros del sistema inmune innato y específico en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.

Palabras claves: Levadura marina *Debaryomyces hansenii*; Probióticos; Sistema inmune; Peces teleósteos.

Vo. Bo.

---

Dr. Felipe Ascencio Valle  
CO-DIRECTOR DE TESIS

---

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
CO-DIRECTOR DE TESIS

## ABSTRACT

The use of probiotics in aquaculture has been shown great interest principally on protection of infection diseases. The beneficial role of yeasts is being of particular interest because they represent an important source of  $\beta$ -glucan, chitin, and nucleotides to stimulate the immune system in fish. The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary administration of the live yeast *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 strain on immune responses in leopard grouper *Mycteroperca rosacea* and gilthead seabream *Sparus aurata*.

Juveniles of leopard grouper and gilthead seabream were fed during four weeks with a diet supplemented with marine yeast *D. hansenii* CBS 8339 equivalent to  $10^6$  CFUg<sup>-1</sup> and a control diet deprived of yeast. At the end of feeding trial only juveniles of leopard grouper were challenged to measure the immunological parameters and survival. In a first experiment, the chemical-physical conditions of the water were manipulated to induce the proliferation of the ectoparasites *Amyloodinium ocellatum* and in a second experiment the fish were challenged with the bacteria *Aeromonas hydrophila*. The mortality was recorded for 7 days. Humoral and cellular innate immune parameters and antioxidant enzymes were measured from serum, head-kidney leucocytes, intestine and liver after the 4-week feeding trial and at the end of challenge test. Expression levels of immune-associated gene were also evaluated by PCR semi-quantitative and real-time PCR.

Our results showed that *D. hansenii* adheres to intestinal mucus of leopard grouper and gilthead seabream. In the first experiment, the induced stress favored proliferation of the protozoan parasite *A. ocellatum*. The cumulative mortality was 90.7% and 52.77% at seven days post-infection in control and yeast-supplemented diets, respectively. The titers of IgM in serum and the antioxidant enzymes superoxide dismutase were significantly higher in fish fed with the yeast. In a second experiment, fish exposed to *A. hydrophila* ( $LD_{50} 1 \times 10^8$ ) infection, presented significant differences in IgM and the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase activities in fish fed with yeast-diet.

The expression levels of *CAT* and *HSP-70* genes were higher in this group of fish compared with fish fed control diet. *D. hansenii* administration in gilthead seabream significantly enhanced peroxidase, respiratory burst, phagocytic and cytotoxic activity in head-kidney leucocytes. A significant increase in SOD was observed in fish feeding with the supplemented diet with yeast. Finally, the yeast supplemented diet up-regulated the expression of *Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  genes in head-kidney in gilthead seabream. These results strongly support the idea that live yeast *Debaryomyces hansenii* strain CBS 8339 can stimulate the innate immune parameters in gilthead seabream *S. aurata* and leopard grouper *M. rosacea*.

Keyword: Marine yeast *Debaryomyces hansenii*; probiotics; immune system; teleosts fish.



## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

**Del trabajo de investigación de esta tesis, se generaron:**

1. **Reyes-Becerril, Martha**, Tovar-Ramírez, Dariel, Ascencio-Valle, Felipe, Civera-Cerecedo, Roberto, Gracia-López, Vicente, Barbosa-Solomieu, Valérie, Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress, *Aquaculture* (2008), doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.056.
2. **Reyes-Becerril M**, Salinas I, Cuesta A, Meseguer J, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Ángeles Esteban M. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish and Shellfish Immunology* (2008), doi: 10.1016/j.fsi.2008.02.010

**Parte de la información generada se presentó en los siguientes congresos internacionales:**

1. **Reyes, B. M\***, Tovar, R. D., Ascencio, V. F. 2006. Efecto del uso de levaduras en la dieta sobre el sistema inmune de juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. VIII Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. Abstract p. 38. Noviembre 15-17, 2006. Mazatlán Sinaloa, México.
2. **Reyes, B. M\***, Tovar, R. D., and Ascencio, V. F. 2007. Effect of dietary supplementation with marine yeast *Debaryomyces hansenii* on immune system stimulation and disease resistance in leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. Congreso Caribeño y Latinoamericano de Acuicultura. Abstract p. 92. Noviembre 6-9 2007. San Juan, Puerto Rico.

## INDÍCE

	<b>Paginas</b>
<b>Introducción</b>	1
<b>Antecedentes</b>	
A.1. Cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	3
A.2. Distribución e importancia comercial de la cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	4
A.3. Dorada <i>Sparus aurata</i>	5
A.4. Distribución e importancia comercial de la dorada <i>Sparus aurata</i>	6
A.5. Sanidad acuícola	7
A.6. Sistema inmune de peces	10
A.6.1. Enzimas antioxidantes	13
A.6.2. Proteínas endógenas que participan en la defensa de los organismos	15
A.7. Acuicultura: inmuno-nutrición	16
A.8. Uso de probióticos en la acuicultura	17
A.9. Relación entre probióticos y el sistema inmune de peces	19
A.9.1 Levadura marina <i>Debaryomyces hansenii</i>	21
<b>Justificación</b>	24
<b>Objetivo general</b>	25
<b>Objetivos específicos</b>	25
<b>Hipótesis del trabajo</b>	25
I. Metodología	27
I.1. Bioensayo I	28
I.1.1 Reto: <i>Amyloodinium ocellatum</i>	28
I.2. Bioensayo II	28
I.2.1. Reto: <i>A. hydrophila</i>	29
I.3. Bioensayo III	30
I.4. Análisis estadístico	31
<b>BIOENSAYO I</b>	
<b>Efecto de la levadura marina <i>Debaryomyces hansenii</i> cepa CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune y antioxidante en juveniles de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> expuestas a <i>Amyloodinium ocellatum</i></b>	32
II. 1 Resultados	32
II.1.1 <i>Debaryomyces hansenii</i>	32
II.1.2. Adhesión de la levadura <i>D. hansenii</i> al intestino de la cabrilla sardinera	32
II.1.3. Parámetros hematológicos basales de juveniles de cabrilla sardinera en cultivo	33
II.1.4. Reto: <i>A. ocellatum</i>	34

	II.1.5 Parámetros hematológicos basales después del reto con <i>A. ocellatum</i>	36
	II.2. Discusión	39
	II.2.1. Capacidad de adhesión de <i>D. hansenii</i>	39
	II.2.2. Parámetros hematológicos basales de juveniles de cabrilla sardinera en cultivo	40
	II.2.3. Reto: <i>A. ocellatum</i>	41
	II.2.4. Parámetros hematológicos en juveniles tras su exposición al parásito	42
	II.3. Conclusión	44
<b>BIOENSAYO II</b>	<b>Efecto de la levadura marina <i>Debaryomyces hansenii</i> cepa CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune, antioxidante y la expresión de CAT y HSP-70 en juveniles de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> expuestas a <i>Aeromonas hydrophila</i></b>	<b>45</b>
	III. 1 Resultados	45
	III.1.1. Bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i>	45
	III.1.2. Determinación de la dosis letal media	45
	III.1.3. Parámetros hematológicos antes y después del reto bacteriano.	45
	III.1.4. Reto: <i>A. hydrophila</i>	47
	III.1.5. Análisis Molecular	48
	III.1.5.1. PCR semi-cuantitativa	49
	III.2. Discusión	53
	III.2.1. Reto con <i>A. hydrophila</i>	53
	III.2.2. Parámetros hematológicos	54
	III.2.3. Expresión génica: PCR semi-cuantitativa	56
	III.3. Conclusión	58
<b>BIOENSAYO III</b>	<b>Efecto de la levadura marina <i>Debaryomyces hansenii</i> cepa CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta inmune y antioxidante, así como la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en juveniles de la dorada <i>Sparus aurata</i>.</b>	<b>59</b>
	IV.1. Resultados	59
	IV.1.1. Material Biológico	59
	IV.1.2. Parámetros hematológicos	59
	IV.1.3. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune	64
	IV.2. Discusión	66
	IV.2.1. <i>D. hansenii</i> y su potencial como probiótico	66
	IV.2.2. Parámetros hematológicos	67
	IV.2.3. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune	69

	IV.3. Conclusión	71
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>		72
<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b>		77
<b>LITERATURA CITADA</b>		78
<b>ANEXOS</b>		94

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
Tabla I	Enfermedades transmisibles más importantes en la acuicultura de peces	7
Tabla II	Efecto modulador de varios inmunoestimulantes	17
Tabla III	Evaluación de probióticos con efecto inmunomodulador en organismos cultivados	21
Tabla IV	Valores hematológicos de juveniles de cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> antes del ensayo alimenticio	33
Tabla V	Actividad de las enzimas antioxidantes de la cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> en condiciones normales antes del ensayo alimenticio	34
Tabla VI	Parámetros hematológicos de la cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> alimentada con dietas suplementadas con levadura, peces estresados y recuperados después del reto con <i>A. ocellatum</i>	36
Tabla VII	Parámetros hematológicos en juveniles de cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> alimentadas con y sin levadura, antes y después del reto con <i>A. hydrophila</i>	46
Tabla VIII	Actividad enzimática en juveniles de cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> alimentados con y sin levadura en la dieta, antes y después del reto con <i>A. hydrophila</i>	47
Tabla IX	Numero de registro en el GenBank para <i>CAT</i> y <i>HSP-70</i> en cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i>	49
Tabla X	Actividad del complemento hemolítica, expresado como ACH <sub>50</sub> unidades ml <sup>-1</sup> suero, de la dorada alimentada con dietas suplementadas con y sin levadura	60
Tabla XI	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la dorada <i>S. aurata</i>	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
Figura 1	Evolución de la producción pesquera mundial 1950-2001 en millones de toneladas	1
Figura 2	Cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	3
Figura 3	Distribución de la cabrilla sardinera en México	4
Figura 4	Dorada <i>Sparus aurata</i>	5
Figura 5	Principales países productores de la dorada <i>Sparus aurata</i>	6
Figura 6	Representación esquemática de la respuesta inmune de los peces a la entrada de un patógeno	13
Figura 7	Diagrama de flujo general donde se esquematiza el proceso experimental de esta tesis	27
Figura 8	Inoculación intraperitoneal de la bacteria <i>A. hydrophila</i> Ah-315 a juveniles de cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> después de las 4 semanas de alimentación con la dieta experimental	29
Figura 9	Análisis microbiológico de la dieta experimental (Levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339)	32
Figura 10	<i>D. hansenii</i> (CBS 8339) marcada con fluorescencia (DTAF) adherida al intestino de juveniles de la cabrilla sardinera	33
Figura 11	Porcentaje de mortalidad acumulada de la cabrilla sardinera alimentada con y sin levadura (control) durante 7 días después de la exposición al parásito <i>A. ocellatum</i>	35
Figura 12	Porcentaje de mortalidad de la cabrilla sardinera alimentada con y sin levadura (control) durante 7 días después del estrés expuesto por el parásito <i>A. ocellatum</i>	35
Figura 13	Trofontes de <i>A. ocellatum</i> observados en las branquias de peces retados (a) y sanos (b)	36
Figura 14	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta humoral (IgM) en juveniles de cabrilla sardinera.	37
Figura 15	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la enzima antioxidante superóxido dismutasa	38
Figura 16	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la enzima antioxidante catalasa	38
Figura 17	Recuperación de la bacteria <i>A. hydrophila</i> en medio selectivo para <i>Aeromonas</i> (MSA) después del reto en muestras de hígado e intestino de cabrilla sardinera	48
Figura 18	Amplificación de los productos de PCR de los genes <i>CAT</i> , <i>HSP-70</i> visualizado en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio	48
Figura 19	Productos de RT-PCR de los genes <i>CAT</i> , <i>HSP-70</i> y <i>18S</i> RNA ribosomal visualizados en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
Figura 20	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen <i>CAT</i> relativo a la expresión del gen <i>18S</i> RNA ribosomal en hígado de juveniles de cabrilla sardinera	50
Figura 21	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen <i>CAT</i> relativo a la expresión del gen <i>18S</i> RNA ribosomal en intestino de juveniles de cabrilla sardinera	50
Figura 22	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen <i>HSP-70</i> relativo a la expresión del gen <i>18S</i> RNA ribosomal en hígado de juveniles de cabrilla sardinera	51
Figura 23	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen <i>HSP-70</i> relativo a la expresión del gen <i>18S</i> RNA ribosomal en intestino de juveniles de cabrilla sardinera	51
Figura 24	<i>D. hansenii</i> (CBS 8339) marcada con fluorescencia (DTAF) adherida al intestino de juveniles de la dorada <i>S. aurata</i>	59
Figura 25	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de peroxidasa en leucocitos	60
Figura 26	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de fagocítica en leucocitos de riñón cefálico de la dorada	61
Figura 27	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de explosión respiratoria en leucocitos de riñón cefálico de la dorada	62
Figura 28	Efecto de la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339 en la dieta sobre la actividad Citotóxica en leucocitos de riñón cefálico de la dorada	63
Figura 29	Expresión de genes del sistema inmune determinados por PCR de Tiempo Real en hígado, riñón cefálico e intestino de la dorada alimentada con la levadura <i>D. hansenii</i> CBS 8339	65

## LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título	Páginas
<b>Anexo I</b>	Artículo proveniente del bioensayo I. Reyes-Becerril, Martha, Tovar-Ramírez, Dariel, Ascencio-Valle, Felipe, Civera-Cerecedo, Roberto, Gracia-López, Vicente, Barbosa-Solomieu, Valérie, Effects of dietary live yeast <i>Debaryomyces hansenii</i> on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper <i>Mycteroperca rosacea</i> exposed to stress, <i>Aquaculture</i> (2008), doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.056	94
<b>Anexo II</b>	Procedimiento para la obtención de la levadura marina <i>Debaryomyces hansenii</i> cepa CBS 8339 y su adhesión al intestino de la cabrilla sardinera	101
<b>Anexo III</b>	Formulación y fabricación de las dietas experimentales	103
<b>Anexo IV</b>	Descripción del sistema experimental (Bioensayo I)	106
<b>Anexo V</b>	Análisis de producción de radicales de oxígeno por NBT y hematocrito	107
<b>Anexo VI</b>	Reactivación de la bacteria <i>Aeromonas hydrophila</i> y determinación de la dosis letal media (LD <sub>50</sub> ) en juveniles de cabrilla sardinera	108
<b>Anexo VII</b>	Determinación de expresión génica: PCR Semi-cuantitativa en juveniles de cabrilla sardinera. (Bioensayo II)	111
<b>Anexo VIII</b>	Artículo proveniente del bioensayo III. Reyes-Becerril M, Salinas I, Cuesta A, Meseguer J, Tovar-Ramírez D, Ascencio-Valle F, Ángeles Esteban M. Oral delivery of live yeast <i>Debaryomyces hansenii</i> modulates the main innate immune parameters and the expresión of immune-relevant genes in the gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> L.), <i>Fish and Shellfish Immunology</i> (2008), doi: 10.1016/j.fsi.2008.02.010.	115



**LISTA DE TABLAS DE ANEXOS**

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
<b>Tabla XII</b>	Composición en ingredientes de las dietas experimentales (g/100 g de alimento)	103
<b>Tabla XIII</b>	Composición química proximal (g/100g de materia seca) de la dieta experimental y control	104
<b>Tabla XIV</b>	Esquema de inoculación intraperitoneal en juveniles de cabrilla sardinera infectados con <i>A. hydrophila</i> para conocer la LD <sub>50</sub>	109
<b>Tabla XV</b>	Oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR	111
<b>Tabla XVI</b>	Concentraciones y cantidades estandarizadas para la amplificación por PCR para CAT y HSP-70	113

**LISTA DE FIGURAS DE ANEXOS**

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 30</b>	Sistema experimental con circulación de agua cerrada, en el bioterio del CIBNOR	101
<b>Figura 31</b>	Elaboración de dietas experimentales en la planta de fabricación de alimentos del laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR.	105
<b>Figura 32</b>	Sistema experimental con circulación de agua cerrada, en el bioterio del CIBNOR	106
<b>Figura 33</b>	a) <i>Aeromonas hydrophila</i> , b y c) Obtención y lavados de la bacteria; d) Ajuste de la concentración bacteriana a $1 \times 10^7$ ; e) Pruebas de catalasa y oxidasa	108
<b>Figura 34</b>	Optimización de temperatura y ciclos para CAT y HSP-70 en PCR	112

## ABREVIATURAS

**18S:** sub-unidad ribosomal RNA 18S

**Abs:** absorbancia

**C3:** complemento 3 (Complement 3)

**cm:** centímetro

**CSF-1R:** receptor-1 factor estimulador de colonias (Colony-Stimulating Factor Receptor-1)

**CTAB:** cetyl trimethylammonium bromide

**dir:** oligonucleótido (primer) 5'

**DTAF:** (5-([4,6-diclorotriazina-2-YL] amino)-fluoresceína

**DO:** densidad óptica

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid

**EE:** error estándar

**g:** gramo

**Hep:** hepcidina (hepcidin)

**IgM:** inmunoglobulina M

**IL-1 $\beta$ :** interleucina 1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ )

**IUCN:** (International Union of Conservation of Nature)

**LD50:** dosis letal media

**MHCII $\alpha$**  complejo mayor de histocompatibilidad II $\alpha$  (Major histocompatibility Complex Class II  $\alpha$ )

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**NCCRP-1:** proteína 1 receptor de células citotóxicas no-específicas (Non-specific cytotoxic cell receptor Protein 1)

**pH:** potencial de hidrógeno ( $-\log H^+$ )

**PCR:** polymerase chain reaction

**ARN:** ácido ribonucleico

**TCR  $\beta$ :** receptor de células T  $\beta$  (T-cell receptor  $\beta$ )

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ )

**YPD:** yeast-peptone-dextrose

## GLOSARIO

**ADN:** Acido desoxiribonucleico.

**Aglutinación:** Aglomeración de antígenos particulados por acción de anticuerpos.

**Antibiótico:** Compuesto químico, casi siempre obtenido de microorganismos, capaz de matar bacterias o impedir su crecimiento.

**Anticuerpo:** Glucoproteínas también llamadas inmunoglobulinas que se sintetizan tras la exposición a un antígeno y que puede combinarse específicamente con él.

**Anticuerpo monoclonal:** Anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

**Antígeno:** Cualquier sustancia exógena que induzca una inmunoreacción.

**Apoptosis:** Forma de muerte celular programada, con morfología característica y mediada por mecanismos fisiológicos.

**Bacterias:** Microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5  $\mu\text{m}$ ) y diversas formas incluyendo esferas, barras y espirales.

**Célula citotóxica:** Células que pueden matar o dañar a otras células.

**Clonación molecular:** Proceso de aislar una secuencia de ADN de interés, insertarlo en un plásmido y obtener múltiples copias de ella en un organismo (generalmente procariota) por acción de la DNA polimerasa.

**Complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC):** Región génica que contiene los genes que codifican la mayor parte de las moléculas de histocompatibilidad, así como algunos componentes del sistema del complemento y proteínas relacionadas.

**Ectoparásitos:** Parásitos que desarrollan su vida en la superficie del huésped.

**ELISA:** Prueba inmunosorbente ligado a enzimas. Prueba inmunológica que utiliza antiglobulinas ligadas a enzimas y un sustrato unido a una superficie inerte.

**Explosión respiratoria:** Incremento rápido de la actividad metabólica que ocurre en células fagocíticas mientras ingieren partículas.

**Factor de Necrosis Tumoral:** TNF, una de varias citocinas derivadas de macrófagos y linfocitos, que puede ejercer un efecto tóxico directo en las células neoplásicas.

**Fagocitos:** Células cuya principal función es ingerir partículas exógenas, en particular bacterias.

**Fagocitosis:** Capacidad de algunas células de ingerir materias exógenas.

**Flora normal:** Población microbiana, principalmente bacterias que coloniza las superficies del tracto digestivo. Tienen una función profiláctica primordial contra la invasión de microorganismos patógenos.

**Inflamación:** Reacción de los tejidos a la lesión. Esta respuesta refuerza las defensas titulares e inicia el proceso de reparación.

**Inmunidad:** Estado de resistencia a las infecciones.

**Inmunización:** Administración de un antígeno a un individuo con el fin de conferirle inmunidad.

**Inmunoestimulantes:** Compuestos, casi siempre de origen bacteriano, que estimulan el sistema inmunitario al favorecer la liberación de citocinas de los macrófagos.

**Inmunoglobulina:** Glucoproteínas con actividad de anticuerpos.

**Inmunología:** Estudio del sistema inmune, entendiendo como tal al conjunto de órganos, tejidos y células que en los vertebrados tienen como función biológica el reconocer elementos extraños o ajenos dando una respuesta (respuesta inmune).

**Inmunosupresión:** Inhibición del sistema inmune por efecto de fármacos u otros factores.

**Inoculación:** Administración de una vacuna.

**Interleucinas:** IL, Proteínas que actúan como factores de crecimiento y de diferenciación en las células del sistema inmunitario.

**Leucocitos:** Glóbulos blancos. Nombre genérico que se aplica a todas las células nucleadas.

**Levaduras:** Cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

**Macrófagos:** Células fagocíticas grandes que poseen un solo núcleo redondeado.

**Oligonucleótidos:** Secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta o menos pares de bases. Funcionan como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación y en bloqueos específicos de de ARN mensajero.

**Órgano hematopoyético:** Órgano en el cual se producen células sanguíneas.

**Patógeno:** Agente que causa enfermedad.

**Patógeno oportunista:** Organismo que, si bien es incapaz de ocasionar enfermedad en un individuo sano, puede invadir o enfermar a otros que presenta alteración de las defensas inmunitarias.

**PCR:** Técnica de biología molecular que se basa en la obtención de múltiples copias de ADN.

**PCR de tiempo real:** Se basa en la cuantificación de la expresión génica. Los datos procesados están basados en curvas estándares o en tasas de eficiencia amplificación.

**Plasma:** Líquido claro que constituye la fase líquida de la sangre.

**Primers:** Oligonucleótidos de ADN sintetizados químicamente; generalmente de 17 a 30 bases, usados en técnicas moleculares.

**Probióticos:** Microorganismos vivos que, ingeridos en cierta cantidad, pueden proporcionar efectos beneficiosos para el organismo hospedero.

**Sistema del complemento:** Grupo de proteínas sericas activadas por factores como la combinación de antígenos y anticuerpos, lo que tiene una gran variedad de consecuencias biológicas, por ejemplo la lisis de membranas celulares y la opsonización.

**Sistema inmune:** Conjunto de mecanismos que protegen a un organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos

**Virulencia:** Capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

En México una de las actividades del sector primario que ha adquirido mayor importancia en los últimos años es la acuicultura. Esta actividad ha arrojado beneficios sociales y económicos que se han traducido en una fuente de alimentación con un elevado valor nutricional. Estudios de la FAO (2002) indican que se ha alcanzado el techo de aprovechamiento de la pesca extractiva a nivel mundial. En el mismo estudio se proyecta que los incrementos en producción de productos pesqueros en los próximos 20 años solo podrán provenir de la acuicultura (Figura 1).

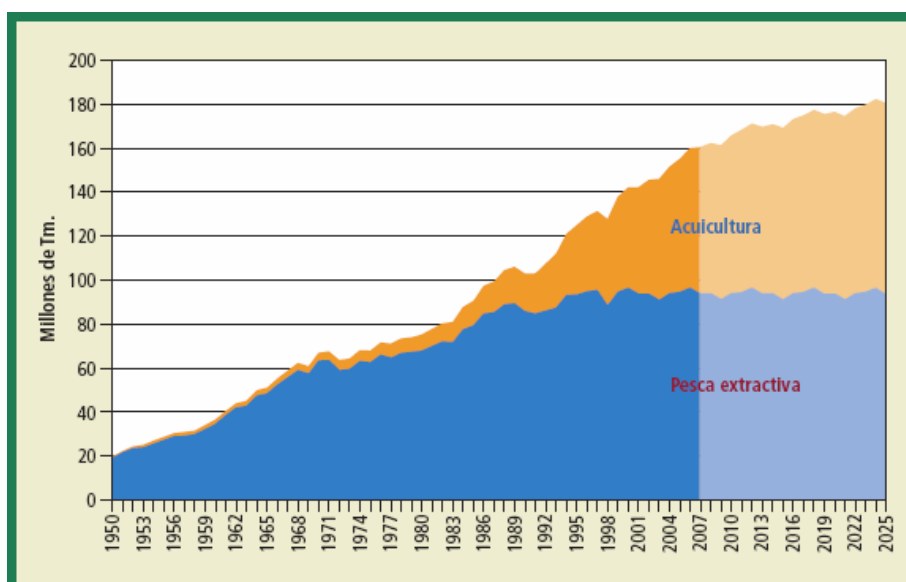


Figura 1. Evolución de la producción pesquera y de acuicultura mundial de 1950-2025 en millones de toneladas (FAO, 2002).

Sin embargo, una de las principales metas en la acuicultura es la disminución de las enfermedades infecciosas que son responsables de mortalidades masivas y pérdidas económicas (Thomson *et al.*, 1996). Esto representa uno de los mayores problemas para el desarrollo de la industria acuícola (Aguirre y Ascencio, 2000).

Se considera que el estatus nutricional tiene una influencia determinante en la salud y en la capacidad de los animales para resistir enfermedades. Por lo anterior, se busca optimizar la composición de las dietas con el uso de suplementos alimenticios para



disminuir enfermedades, evitar el uso de antibióticos y reducir los costos de producción (Gatesoupe, 1999). Hoy en día muchos estudios se han enfocado en la modulación del sistema inmune en peces para prevenir enfermedades infecciosas (Salinas *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha propuesto la utilización de suplementos alimenticios inmunoestimulantes para incrementar la capacidad de respuesta inmune en peces bajo condiciones adversas, mejorando su resistencia contra bacterias e infecciones virales aumentando los mecanismos de defensa no-específica (Anderson, 1992).

Dentro de los inmunoestimulantes se encuentran los probióticos (suplemento microbiano vivo), que son suplementados en la dieta, entrando al tracto gastrointestinal, permaneciendo vivos con el único objetivo de aportar salud al hospedero (Gatesoupe, 1999). Sus efectos benéficos incluyen la producción de moléculas con capacidad bactericida, la competencia con bacterias por sitios de adhesión y nutrientes en el tracto gastrointestinal y la estimulación del sistema inmune (McCracken y Gaskins, 1999).

El rol benéfico de las levaduras es particularmente interesante debido a que ellas proveen  $\beta$ -glucanos y nucleótidos que estimulan el sistema inmune de peces (Sahoo y Mukherjee, 2001; Li *et al.*, 2004). Particularmente la levadura marina *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) se ha investigado recientemente por sus características potenciales como probiótico. La levadura *D. hansenii* tiene la habilidad para producir poliaminas y adherirse al mucus intestinal siendo también una de las especies más halotolerantes (Andlid *et al.*, 1995; Tovar *et al.*, 2002; Vázquez-Juárez *et al.*, 1997; Bansal and Mondal, 2000).

En el presente trabajo se investigó el efecto de la inclusión de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta del sistema inmune en juveniles de la cabrilla sardinera *Myxeroperca rosacea*. Este pez está siendo estudiado por su potencial de explotación regional debido a su alta y creciente demanda y como modelo de estudio para desarrollar la tecnología de cultivo de peces marinos de importancia comercial en México. Por otra parte, se investigó también el efecto de la administración en la dieta de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 sobre el sistema inmune de la dorada *Sparus aurata*, especie de gran importancia en la acuicultura Europea Mediterránea.

## ANTECEDENTES

### A.1. Cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* es una especie de la cual se tiene poca información sobre su biología (Figura 2). Sus hábitos alimenticios son una de las características zootécnicas que más se conocen (Díaz-Uribe *et al.*, 2001).

#### Taxonomía y descripción morfológica de *M. rosacea*

Familia	Serranidae
Subfamilia	Epinephelinae
Orden	Perciformes
Clase	Actinopterygii
Genero	<i>Mycteroperca</i>
Especie	<i>rosacea</i>

Debido a sus hábitos alimenticios la cabrilla sardinera es una especie con baja tasa de crecimiento (Díaz-Uribe *et al.*, 2001). Se alimenta de peces, principalmente arenque y sardinas, así como de crustáceos, pero también de cualquier otro tipo de presa pequeña (Peláez-Mendoza, 1997).



Figura 2. Cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*

La cabrilla sardinera puede llegar a medir hasta 86 cm y el peso máximo publicado es de 9.64 kg (Fishbase, 2004). Uno de los principales factores que destacan en la importancia del estudio y conocimiento de esta especie, es el hecho de que está considerada como vulnerable en el libro rojo de la IUCN. La vulnerabilidad de una especie no lleva

consigo la extinción inmediata, pero sí la disminución de los bancos naturales que puede llevar a la especie a entrar en una situación poblacional delicada (IUCN, 2003).

Recientemente, Gracia (2004) destacó que la cabrilla sardinera es una especie de fácil adaptación al cautiverio, resistente a enfermedades y manipulación por lo cual su reproducción en cautiverio es de gran importancia.

### **A.2. Distribución e importancia comercial de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea***

*Mycteroperca rosacea* es una de las 5 especies de este género presente en aguas tropicales del Pacífico (Rosenblatt y Zahuaranec, 1967). Esta especie es encontrada en todas las aguas del sureste de bahía Magdalena en Baja California Sur y en todo el Golfo de California hasta Jalisco (Heemstra y Randall, 1993). Habita las áreas rocosas (< 50 m) donde la temperatura anual del agua y la salinidad oscilan entre 20 y 30 °C y de 34 a 35‰, respectivamente (Rodríguez, 2002) (Figura 3).



Figura 3. Distribución de la cabrilla sardinera en México.

En cuanto a su importancia comercial, esta especie es un buen candidato para el cultivo debido a que tiene características similares a otros grupos de meros (*Epinephelus* spp) de gran valor en el mercado por su excelente carne (Goodyear y Schrippa, 1991). La cabrilla sardinera es una fuente importante de pesquerías en el estado de Baja California

Sur, particularmente en la bahía de La Paz (Díaz-Uribe, 2001), y debido a su alto valor de mercado (12 USD/kg en filete) es actualmente considerada para su cultivo comercial (Gracia *et al.*, 2004).

### A.3. Dorada *Sparus aurata*

La dorada *Sparus aurata* L. (1758) pertenece a la familia *Sparidae* y el género *sparus* (Figura 4). Es una especie de gran importancia económica para la acuicultura extensiva en el Mar Mediterráneo (Anon, 1995). Es hermafrodita protándrica; primero madura como macho y a partir del segundo o tercer año se revierte a hembra. El desarrollo de la madurez sexual resulta en machos a los 2 años de edad (20-30 cm) y en hembras a los 2-3 años (33-40 cm). En cautiverio, el cambio de sexo está condicionado por factores sociales y hormonales. La dorada es una especie carnívora y se alimenta en su hábitat natural de moluscos y otros organismos bentónicos (Stickney, 2000).



Figura 4. Dorada *Sparus aurata*

La dorada es una de las principales especies utilizadas en estudios del sistema inmune debido a su fácil manejo y resistencia en cultivo a altas y bajas salinidades, principalmente (A. Cuesta, *com. pers.*).

#### A.4. Distribución e importancia comercial de la dorada *Sparus aurata*

La dorada se distribuye en el Mar Mediterráneo en las costas del Atlántico del Este desde Gran Bretaña hasta Senegal, y ocasionalmente en el Mar Negro (Figura 5).

Debido a sus hábitos eurihalinos y euri térmicos, la especie se encuentra tanto en ambientes marinos y salobres, tales como lagunas costeras y áreas estuarinas, en particular en etapas iniciales de su ciclo de vida (Stickney, 2000).

Tradicionalmente, las doradas eran cultivadas extensivamente en lagunas costeras y estanques de agua salada. Posteriormente, se desarrollaron sistemas intensivos de crianza durante los años 80s. La reproducción artificial fue lograda exitosamente en Italia en 1981-82 y la reproducción a gran escala de juveniles de dorada se desarrolló entre 1988-1989 en España, Italia y Grecia (Caggiano, 2000).

Esta especie tiene un alto valor comercial debido a su excelente carne, alcanzando una producción anual alrededor de 10, 000 ton (Consejería de Acuicultura y Pesca, 2001). El precio medio de la dorada proveniente de acuicultura se ha mantenido relativamente estable en los últimos 3 años y sigue siendo superior al de los años de la crisis de los años 1999-2002. Su precio medio en 2005 ha sido de 4,79 /Kg y ha generado un valor total en primera venta de 447 millones de € (Moretti *et al.*, 1999).



Figura 5. Principales países productores de la dorada *Sparus aurata* (Vela y Ojeda, 2007).

### A.5. Sanidad acuícola

La acuicultura constituye un sector económico de gran relevancia en el mundo. En años recientes esta actividad se ha expandido, intensificado y diversificado. En el mismo período, las enfermedades causadas por agentes patógenos también se han manifestado como el principal problema en la producción sostenible de la acuicultura, incidiendo negativamente en la cadena de producción (Galindo y Hosokawa, 2005).

Al igual que en otras especies animales de producción intensiva, los principales problemas sanitarios que afectan a los organismos acuáticos, se atribuyen a una amplia variedad de agentes patógenos que comprenden bacterias, virus, parásitos y hongos causando altas mortalidades y pérdidas en producciones (Brock y LeaMaster, 1992).

Las enfermedades que afectan a peces transmisibles más importantes cuya clasificación está basada fundamentalmente en un punto de vista socioeconómico y/o sanitario con graves repercusiones tanto en el comercio nacional como internacional se enlistan en la Tabla I.

Tabla I. Enfermedades transmisibles más importantes en la acuicultura de peces.

<b>Enfermedades</b>	<b>Agente etiológico</b>	<b>Especies sensibles</b>
Anemia infecciosa del salmón	<i>Ortomyxovirus</i>	Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )
Septicemia hemorrágica viral	<i>Rhabdovirus</i>	Salmónidos
Necrosis pancreática infecciosa	<i>Birnaviridae</i>	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) Salmónidos
Necrosis Hematopoyética Infecciosa	<i>Lisavirus</i>	Salmónidos
Furunculosis	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Salmónidos
Estreptococosis	<i>Lactococcus garviae</i> <i>Streptococcus iniae</i>	Salmónidos Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )
Síndrome del alevín	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )
Síndrome del alevín	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )
Aeromoniasis	<i>Aeromonas moviles</i>	Salmónidos
Piscirickettsiosis	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Salmónidos

La gravedad de estas enfermedades no sólo depende de la especie cultivada o de la capacidad de difusión del agente patógeno. En la mayoría de los casos se ve también amplificada por la presencia de otros factores de distinto tipo: estadio del organismo (principalmente larval por poseer un sistema inmune muy vulnerable), medioambiental (calidad de agua), nutricional, genético e higiénico-sanitario (manejo) que condicionan el desarrollo y estado de salud general (Ruiz *et al.*, 2002).

En los peces se han identificado multitud de especies de virus diferentes, algunos con gran importancia económica en la acuicultura, y algunas de las enfermedades que provocan son de declaración obligatoria por lo que son sometidas a controles tanto nacionales como internacionales (Ruiz *et al.*, 2002). Los virus pueden ser transmitidos por especies de peces no susceptibles y por otros animales acuáticos y aves siendo las principales vías de transmisión las abrasiones cutáneas, las branquias y el intestino (Birkbeck y Ringø, 2005). Las principales enfermedades de etiología vírica se presentan en la Tabla I.

Es frecuente que los microorganismos patógenos pueden entrar a los peces a través de las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal (Wang y Leung 2000; Birkbeck y Ringø, 2005). El tracto gastrointestinal es continuamente atacado por múltiples antígenos presentes en el medio acuático y en los alimentos. Existe una gran diversidad de agentes infecciosos y parasitarios que causan enfermedades en los peces marinos (Aguilera y Noriega, 1985). Las patologías causadas por parásitos o por bacterias han sido descritas en la literatura (Álvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla, 2002; Toranzo *et al.*, 2005; Palenzuela, 2006).

Entre los parásitos que causan enfermedades se encuentra el dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*, uno de los más peligrosos y destructivos ectoparásitos implicados en mortalidades masivas en peces marinos y de agua dulce en cultivo (Kabata, 1985; Noga and Levy, 1995; Colorni, 1998). Infecciones con este ectoparásito han sido reportadas en tilapia común *Oreochromis mossambicus* (Schaperclaus, 1954), en familias de peces de agua dulce como en carpas y salmónidos (Shaharom-Harrison *et al.*, 1990), Chanos *Chanos chanos* y el pargo de manglar *Lutjanus argentimaculatus* (Cruz-Lacierda *et al.*, 2004) causando mortalidades del 100%. *A. ocellatum* se alimenta de las células epiteliales del hospedero por medio de rizoides, los cuales penetran la piel. El daño a las células

infectadas permite una erosión focal del epitelio, acelerando la descamación que conllevan a fuertes alteraciones patológicas principalmente (Paperna, 1980). Éste parásito se aloja principalmente en las branquias del pez, lo que provoca sofocación por asfixia y muerte (Kuperman y Matey, 1999).

Dentro de las enfermedades en acuicultura, la proliferación de bacterias patógenas oportunistas provoca hasta un 80% de mortalidad en cultivos (Munro *et al.*, 1994). Conroy (1984) describe un esquema en el que se agrupan las principales bacterias marinas patógenas de peces, que comprenden:

1. Bacterias Gram negativas (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Pasteurella*) causantes de septicemias hemorrágicas.
2. Bacterias Gram positivas (*Streptococcus sp.* y *Renibacterium salmoninarum*) causantes de enfermedades sistémicas y altas mortalidades.
3. Bacterias ácido resistentes (*Micobacterium*, *Nocardia*) causantes de tuberculosis y nocardiosis.
4. Mixobacteria (*Flexibacter*) causante de la patología branquial, además de erosión de piel, aletas y cartílagos.

Las principales bacterias que pueden presentarse en sistemas acuáticos de cultivo son las pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Austin y Austin, 1987). Dentro del grupo de las *Aeromonas* se encuentra *Aeromonas hydrophila*, una bacteria con amplia distribución en los ambientes acuáticos y estuarinos, habitante normal del tracto intestinal de especies silvestres de agua dulce (Popovic *et al.*, 2000). La infección causada por *A. hydrophila* puede ser crónica y afectar a un pequeño grupo de peces, o aguda que se caracteriza por presentar una elevada mortalidad en los sistemas de cultivo (Camus *et al.*, 1998).

El uso de desinfectantes o antibióticos ha tenido un éxito limitado en la prevención de las enfermedades acuáticas (Subasinghe, 1997). Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos para el control de las enfermedades ha creado resistencia en las bacterias y la destrucción en la microflora intestinal, causando un efecto supresor del sistema inmune (Verschuere *et al.*, 2000). Por otra parte, uno de los principales problemas es la acumulación de residuos de antibióticos en los productos para consumo humano (Uma *et*



*al.*, 1999). Actualmente, en muchos países, incluido México, se ha regulado y normado el uso de antibióticos en la acuicultura (Directiva 96/23/CE, 1996, FFDC A; 21 U.S.C., Guidance No. 78, 2003; NOM-EM-006-PESC-2004). De esta manera se prohíbe el uso de antibióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades, así como su utilización para promover el crecimiento (Swamm, 1969).

Varias alternativas han sido propuestas para evitar el uso de antibióticos en el control de las enfermedades y han sido aplicadas exitosamente en la acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000) entre ellas el uso de los inmunoestimulantes solos o en combinación con vacunas, siendo una propuesta muy prometedora para el control y prevención de enfermedades, dado su efecto modulador del sistema inmune (Raa, 1996).

#### **A.6. Sistema inmune de peces**

La carencia de medula ósea y ganglios linfáticos en los peces teleósteos es una de las principales diferencias con los mamíferos (Zapata, 1985). Los órganos y tejidos más importantes afectados por los inmunoestimulantes incluyen el riñón (anterior y posterior), timo, bazo, hígado y mucosas externas (Galindo y Hosokawa, 2005). El riñón es el órgano hematopoyético más importante en la inmunidad de los peces, al igual que la medula ósea en mamíferos. El riñón anterior o cefálico es el sitio donde se lleva a cabo la formación de las células y las funciones inmunes, mientras que el posterior está principalmente relacionado en la filtración de la sangre (Secombes *et al.*, 1982).

Dentro de los peces, los teleósteos son los organismos evolutivamente más avanzados. Presentan una respuesta inespecífica (innata) y otra específica (adquirida), ambas capaces de actuar frente a los distintos patógenos (Magnadottir, 2006). El nivel de desarrollo y complejidad de estos sistemas es semejante al de los vertebrados superiores (mamíferos). Sin embargo, la importancia relativa de la inmunidad innata y la adquirida en el conjunto de su sistema difiere respecto a los vertebrados homeotermos (Magnadottir, 2006). En todos los poiquilotermos, la inmunidad adquirida se desarrolla más lentamente (Alexander, 1985). Esto explica el hecho de que los peces conserven un gran número de mecanismos de defensa humorales no específicos (Alexander, 1985).

El sistema inmune no-específico, definidos también como naturales o innatos, son mecanismos de defensa del hospedero los cuales no requieren de un reconocimiento específico del antígeno como ocurre en la respuesta de defensa específica (Fernández *et al.*, 2003). Este tipo de respuesta comprende una serie de elementos, en los que están implicados factores humorales y celulares, que para muchos constituyen la primera y más importante línea de defensa frente a una gran variedad de agentes patógenos (Lair y Needman, 1988).

El sistema inmune innato presenta una barrera natural como primera línea de defensa externa (piel y moco) y una celular mediada principalmente por células fagocíticas (leucocitos) y factores humorales (complemento y lisozimas) (Lo *et al.*, 1999). Varios tipos de leucocitos están relacionados en la defensa celular innata de peces, entre ellos células principalmente con actividad fagocítica (monocitos y macrófagos, así como leucocitos granulares tales como los neutrófilos). Los monocitos y macrófagos son probablemente las células más importantes en la respuesta inmune de los peces. No son solamente importantes en la producción de citocinas (Clem *et al.*, 1985), sino que también llevan a cabo la fagocitosis y destrucción de patógenos (Shoemaker *et al.*, 1997).

La fagocitosis – proceso por el cual las células interiorizan, matan y digieren diferentes partículas (células dañadas o infectadas), desempeña una función importante en la respuesta inmune innata (Neumann *et al.*, 2001). La fagocitosis puede dividirse en tres fases principales:

1. Ataque de la partícula a la superficie de la célula
2. Ingestión y formación de un fagosoma
3. Destrucción de la partícula dentro del fagosoma

Los fagocitos son capaces de matar patógenos usando una variedad de mecanismos de destrucción que pueden ser oxígeno-dependientes (especies reactivas de oxígeno, ROS) y nitrógeno-dependientes (especies de nitrógeno reactivas, RNS; Secombes *et al.*, 1996). Cuando la fagocitosis es iniciada en un caso de invasión bacteriana, hay un aumento en el consumo de oxígeno molecular por las células fagocíticas, llamado este fenómeno

“explosión respiratoria”. Este oxígeno es convertido vía NADPH oxidasa a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, los cuales son llamados también radicales libres con una potente acción microbicida, capaces de destruir bacterias y virus.

La respuesta humoral comprende moléculas de defensa como complemento, lisozima, proteína-C reactiva, lactoferrinas e interferon, que actúan sin involucrar directamente a las células, aunque muchos factores humorales son sintetizados y almacenados en las células (Vargas-Albores *et al.*, 1998).

El sistema de complemento es una parte esencial del sistema inmune. Se ha demostrado la actividad del complemento en toda clase de vertebrados (Zapata, 1985) así como en varias especies de peces (Ingram, 1990). La principal función del complemento es destrucción de los microorganismos por la generación de mediadores de inflamación biológicamente activos que desembocan en la destrucción de la membrana celular de los microorganismos, provocando también citolisis (Alexander, 1985; Yano, 1992). Es por ello que la actividad bactericida y hemolítica observada en el suero de los peces se ha considerado muchas veces dependiente de la presencia del complemento (Ingram, 1980).

Dentro del sistema inmune, la respuesta específica o adaptativa engloba los mecanismos más complejos y desarrollados, y se caracteriza por su especificidad y capacidad de memoria. El hecho de que se pueda inmunizar o vacunar a los peces frente a varios procesos, pone de manifiesto la presencia de un fenómeno de memoria inmunológica (Zapata, 1985). (Figura 6).

Casi todos los trabajos que estudian el sistema inmune de los peces se han centrado en la respuesta humoral, por lo que la celular permanece desconocida en muchos aspectos (Bernstein *et al.*, 1998). Las inmunoglobulinas son el mejor componente del sistema inmune humoral de los invertebrados (Cuesta *et al.*, 2004). Aunque la IgD ha sido recientemente descrita, la IgM es la principal inmunoglobulina presente en los teleósteos (Ellis, 1998; Watts *et al.*, 2001).

En las infecciones virales, las inmunoglobulinas son capaces de unirse a la superficie del virus e impedir así la infección de las células. En las infecciones bacterianas, pueden mediar la protección por dos vías: mediante su unión a la membrana de la bacteria,

que induce la fijación del complemento, lo que finalmente resulta en la lisis bacteriana, o mediante el recubrimiento de la partícula de forma que actúan como opsoninas y facilitan el reconocimiento por las células fagocíticas (Bradshaw, 1971).

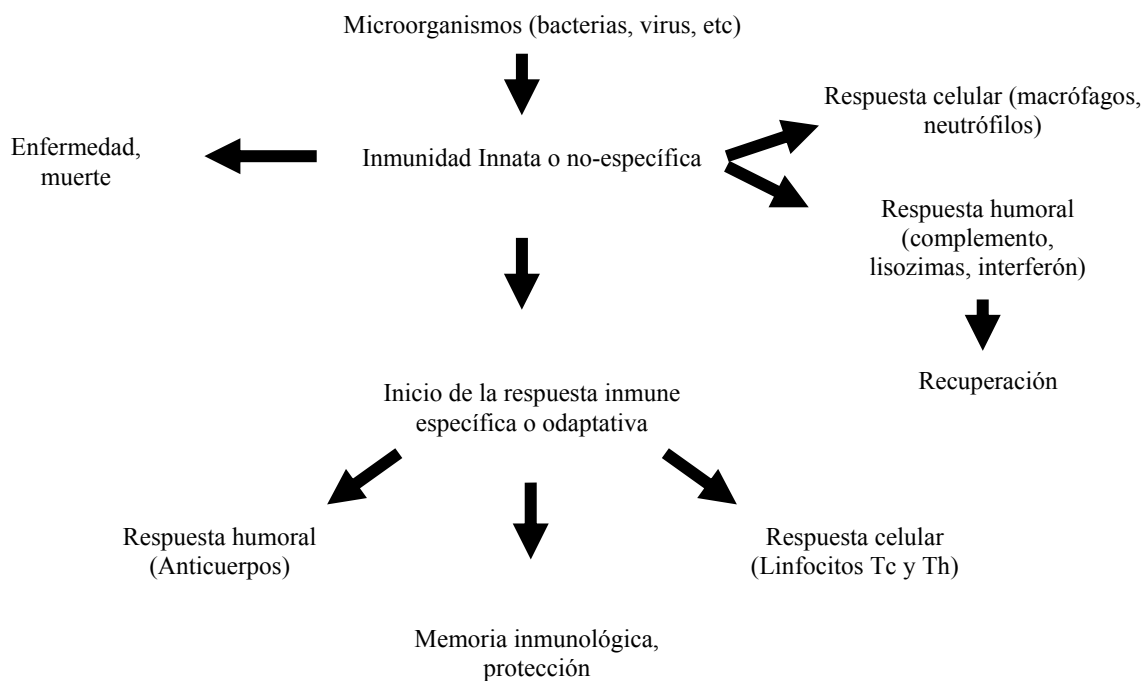


Figura 6. Representación esquemática de la respuesta inmune de los peces a la entrada de un patógeno (Adaptado de Shoemaker *et al*, 2001). Cuando un agente infeccioso penetra al organismo, los mecanismos de defensa no-específicos son estimulados, su sola activación puede ser suficiente para detener la infección. Si esto no sucede, la enfermedad se desarrollará, permitiendo la inducción de los mecanismos de defensa específicos.

#### **A.6.1. Enzimas antioxidantes.**

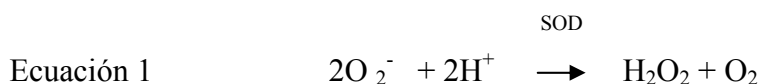
En vertebrados, el metabolismo celular del oxígeno produce especies reactivas tóxicas (especies de oxígeno reactivas; ROS). Esta toxicidad es mediada por productos resultantes de la reducción univalente del oxígeno molecular que incluye al radical superóxido ( $O_2^-$ ) peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (OH), resultando algunas de ellas presentes por la actividad de combustión respiratoria por las células fagocíticas (Fridovich, 1995). Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se generan

dentro de la célula, pero algunas de estas moléculas son capaces de cruzar al ambiente extracelular y extra-vacuolar causando daño potencial a las células del huésped (Warner, 1994).

Las enzimas antioxidantes juegan un papel importante protegiendo a las células del huésped de la acción de las ROS. La superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa neutralizan a las especies reactivas de oxígeno a través de componentes enzimáticos (Warner, 1994).

### *Superóxido dismutasa*

Las SOD's son uno de los principales mecanismos de defensa en respuesta al estrés oxidativo causado por agentes contaminantes en el medio ambiente, por infecciones de microorganismos o por cambios de temperatura (Fridovich, 1995; Neves *et al.*, 2000). Las SOD's catalizan la conversión de dos moléculas de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno – que también causa daño celular difundiéndose libremente a través de la membrana celular hacia el ambiente extracelular – es eliminado principalmente por la catalasa y la glutatión peroxidasa. Datos cualitativos relacionados a la evolución de los antioxidantes enzimáticos en peces tales como SOD's y catalasas muestran que los peces son estructuralmente muy similares a los mamíferos (Wilhelm, 1996). Sin embargo, la actividad específica de las enzimas de los peces es cuantitativamente más baja que la de los mamíferos (Wilhelm y Boveris, 1993).



### *Catalasa*

La catalasa es una enzima presente en todos los órganos animales, plantas y organismos aerobios (Wang 1985).

La catalasa (EC 1.11.1.6), protege a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, que cataliza la descomposición a oxígeno molecular y agua sin la producción de radicales libres.



### ***A.6.2 Proteínas endógenas que participan en la defensa de los organismos***

Los peces, al igual que otros vertebrados están expuestos a estresores medioambientales, físicos, químicos o biológicos, lo cual es caracterizado por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que ayudan a mantener al animal en un estado normal de homeostasis (Iwama *et al.*, 1999; Barton, 2002). Esta respuesta generalizada ha sido considerada como adaptativa y representa la capacidad natural de los peces para responder a un estrés (Iwama *et al.*, 1999).

La respuesta al estrés celular esta caracterizado por la inducción de una familia de proteínas conocidas como heat shock proteins (HSPs), también llamadas *proteínas de estrés* que están presentes en todas las células de los organismos (Feder y Hofman, 1999) incluyendo peces (Iwama *et al.*, 1999). Las HSP actúan como chaperonas moleculares y median la reparación y degradación de proteínas desnaturalizadas o alteradas (Derham y Harding, 1999).

Se conocen tres tipos de HSP por su peso molecular: HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa) y de bajo peso molecular (16-24 kDa). Estas moléculas son rápidamente sintetizadas dentro de células estresadas habiendo una producción constitutiva de esas proteínas que son requeridas en varios aspectos del metabolismo de proteínas para mantener la homeostasis celular (Iwama *et al.*, 2004). El tipo HSP-70 es una de las más extensamente caracterizadas. La síntesis de HSP aumenta en respuesta al shock por calor, y a una variedad de estresores como la hiper-osmolaridad, la isquemia, y también a la exposición de radicales superóxido que son formados durante la hipoxia y reoxigenación en peces (Polla *et al.*, 1998).

### **A.7. Acuicultura: inmuno-nutrición**

La acuicultura está alcanzando mundialmente un desarrollo impresionante, constituyendo el sector alimentario de más rápido crecimiento (FAO, 2007). Sin embargo, la presencia de enfermedades ha limitado el desarrollo de la acuicultura afectando al sector económico y social de muchos países (Irianto y Austin, 2002). Por lo cual se han buscado alternativas de control para eliminar las enfermedades bacterianas en los sistemas de cultivo, destacándose la prevención (Quesada *et al.*, 2004). Las dietas preparadas no solo proveen los nutrientes esenciales que son requeridos para las funciones fisiológicas normales, sino que también sirven como medio para brindar otros componentes que puedan incrementar la salud, así como resistencia a las enfermedades y al estrés (Gatlin, 2002).

Actualmente se evalúan estos componentes promotores de la salud y las estrategias de suplementación en la dieta (Gatlin *et al.*, 2006). Los inmunoestimulantes son sustancias naturales o sintéticas capaces de activar la respuesta inmune innata o específica (Anderson, 1992), activando las señales del sistema neuro-inmuno-endocrino del animal o por varias rutas de señalamiento celular (Gatlin *et al.*, 2006).

Los inmunoestimulantes son sustancias eficientes para inducir en el aumento de la resistencia a las enfermedades bacterianas mediante el incremento de la actividad innata inmune de los peces (Cáceres *et al.*, 2004) (Tabla II). Entre estas sustancias, han sido reportados como inmunoestimulantes efectivos en peces, el levamisol (Cáceres *et al.*, 2004; Siwicki, 1989), componentes bacterianos como el  $\beta$ -glucano (Jeney and Anderson, 1993; Jeney *et al.*, 1997), vitaminas (Hardie *et al.*, 1991; Duncan and Lovell, 1994), citocinas (Raa *et al.*, 1992) y microorganismos benéficos llamados “probióticos” (Irianto y Austin, 2002; Ortuño *et al.*, 2002).

Tomando en consideración estos antecedentes, los inmunoestimulantes se perfilan como candidatos ideales para contribuir a la prevención de enfermedades de tipo bacteriano en peces (Sakai, 1999; Sealey y Gatlin, 2001). En este sentido, las bacterias probióticas promueven los mecanismos endógenos de respuesta del huésped, teniendo como resultado mejoras en la respuesta inmune, incrementando la resistencia de los peces contra los microorganismos patógenos y su eliminación (Isolauri *et al.*, 2001; Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Tabla II. Efecto modulador de varios inmunoestimulantes (Heys *et al.*, 2004).

---

<b>Arginina</b>
Aumenta la respuesta de células T y retrasa las respuestas de hipersensibilidad
Aumento en células Natural Killer (NK)
Aumenta los niveles de citocinas en circulación
Aumenta la producción de óxido nítrico
Aumenta la síntesis de colágeno
Estimula la liberación de prolactina, insulina y glucagón
<b>Glutamina</b>
Aumenta la respuesta de células T
Aumenta la diferenciación de linfocitos B y producción de anticuerpos
Incrementa la fagocitosis por macrófagos y la función de los neutrófilos
Incrementa la producción de citocinas
Mantenimiento de las barreras de la mucosa intestinal
<b>Ácidos grasos</b>
Disminución de la respuesta quimiotáctica de los monocitos y neutrófilos y producción de superóxidos
Alteración en la función de la membrana celular y señalización intracelular
<b>Probióticos</b>
Aumento en la actividad fagocítica
Aumento en la citotoxicidad de células tumorales
Mayor concentración de inmunoglobulinas
Aumento en la producción de enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa)

---

### **A.8. Uso de probióticos en la acuicultura**

La utilización de probióticos nace a inicios del siglo pasado con los trabajos del científico ruso Elie Metchnikoff, quien sostenía que mediante la ingestión de microorganismos benéficos era posible controlar a los microorganismos patógenos (Bibel, 1988). Parker (1974) introduce la palabra probiótico como microorganismos o sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal.

En un amplio sentido, los probióticos son un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al hospedero animal con una mejoría del balance microbiano intestinal con la única finalidad de aportar salud al hospedero (Fuller, 1997; Gatesoupe, 1999).



Hoy en día los probióticos son usados como control biológico en la prevención de ataques bacterianos representando una opción para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos contra patógenos potenciales en la acuicultura (Gatesoupe, 1999; Irianto y Austin, 2002). La mayoría de los probióticos que se han propuesto para uso en la acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y a los géneros *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, principalmente por su acción como promotores del crecimiento (Austin et al., 1995; Ringo y Gatesoupe, 1998; Verschuerer *et al.*, 2000; Sullivan, 2001).

Para seleccionar microorganismos posiblemente probióticos es necesario conocer su potencial de colonización, habilidad de competencia con patógenos, producción de sustancias antimicrobianas y capacidad para incrementar la resistencia a las enfermedades (Balcazar, 2002).

Hoy en día los estudios sobre el uso de probióticos en la acuicultura se han enfocado principalmente a su capacidad antagónica hacia patógenos potenciales en cultivos de peces (Gatesoupe, 1999); entre ellos, microalgas (*Tetraselmis*), levaduras (*Debaryomyces*, *Phaffia* y *Saccharomyces*), bacterias gram-positivas (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*) y bacterias gram-negativas como *Pseudomonas* (Irianto and Austin, 2002; Reyes et al., 2008a).

Los efectos benéficos de los probióticos en el campo de la acuicultura pueden resumirse en seis puntos importantes:

1. Mejora de la calidad del agua. Sobre todo se ha aplicado en sistemas de cultivo de crustáceos a través de la adición de bacterias gram positivas como las del género *Bacillus* (Vaseeharan y Ramasamy, 2003).
2. Modificación de la microflora intestinal (Balcázar *et al.*, 2007) y competición con bacterias causantes de enfermedad por sitios de adhesión, fuentes de energía y nutrientes (Irianto y Austin, 2002).
3. Inhibición de microorganismos patógenos *in vitro* (Chabrillón *et al.*, 2005, Balcázar, 2006b).
4. Estimulación de la respuesta inmune sistémica y local, celular y humoral. Se ha propuesto que los probióticos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune de los organismos acuáticos (Gatesoupe, 1999). La influencia que la administración

de probióticos ejerce sobre el sistema inmunitario de peces ha sido evaluada con mayor profundidad en los últimos años (Gatesoupe, 1994; Gildberg *et al.*, 1997; Raida *et al.*, 2003).

5. Aumento de la resistencia a infecciones. Hasta la fecha se ha demostrado una mayor resistencia de distintas especies de peces teleósteos frente a la *lactococosis* y *streptococosis* (Brunt y Austin, 2005), vibriosis (Spaangaard *et al.*, 2001), furunculosis (Irianto y Austin, 2002; 2003), yersiniosis (Raida *et al.*, 2003) y edwardsiellosis (Chang y Liu, 2002; Pirarat *et al.*, 2006).

6. Otra característica importante que cumplen los probióticos, es el aporte de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero. Tovar *et al.* (2002) evaluaron la capacidad de varias levaduras marinas para secretar poliaminas, moléculas de alto peso molecular esenciales para el mantenimiento del crecimiento celular y biosíntesis macromolecular.

#### **A.9. Relación entre probióticos y el sistema inmune de peces**

El efecto de los probióticos sobre el sistema inmune ha sido muy estudiado en humanos y animales domésticos (Isolauri *et al.*, 2001; Salminen *et al.*, 1998). En humanos, el uso de bacterias probióticas específicas mostró inducir *in vitro* la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, factor de necrosis tumoral e Interleucina-6 (Miettinen *et al.*, 1996) promoviendo la resistencia no específica del hospedero a microbios patógenos (Salminen *et al.*, 1998).

El estudio de la inmunidad de peces y la resistencia a enfermedades es relativamente reciente en comparación al estudio de la inmunidad en los mamíferos, sin embargo, investigaciones recientes se han enfocado a comprender como el sistema inmune de los peces responden a agentes extraños aumentando su capacidad de resistencia (Galindo y Hosokawa, 2004). Se ha propuesto que los probióticos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune de los organismos acuáticos al igual que los efectos ya observados en mamíferos (Gatesoupe, 1999) (Tabla III).

Actualmente el uso de probióticos sobre la estimulación del sistema inmune y resistencia a las enfermedades en organismos cultivados está siendo ampliamente estudiado mostrando efectos positivos (Anderson, 1992; Gatesoupe, 1994, 1997; Austin *et al.*, 1995;

Ringo y Vadstein, 1998; Salinas *et al.*, 2005). Entre ellos, los glucanos de las levaduras han sido ampliamente usados como inmunoestimulantes en peces (Sakai, 1999).

En cuanto a la relación entre probióticos y el sistema inmune de organismos cultivados podemos resaltar lo siguiente:

- i. Respuesta celular sistémica:* varios estudios han demostrado recientemente que las actividades innatas de los leucocitos de riñón cefálico de distintas especies de peces son estimuladas tras la administración de probióticos. Estas incluyen la explosión respiratoria, la actividad fagocítica, la citotoxicidad tumoral o la producción de peroxidasa (Irianto y Austin, 2002; Nikoskelainen; 2003; Pirarat; 2006; Panigrahi, 2007).
- ii. Respuesta humoral sistémica:* tanto el sistema del complemento como la actividad lisozima del suero (Kim y Austin, 2006; Panigrahi; 2007) aumenta en peces alimentados con probióticos.
- iii. Expresión de citocinas:* sólo en el último año se ha estudiado este aspecto en trucha arco iris tras administrársele dos cepas de *Carnobacterium* spp. Sin embargo, las conclusiones del trabajo no son claras, aunque los autores revelan un aumento de la expresión de IL-1 y TNF $\alpha$  en el intestino de ejemplares que recibieron la dieta probiótica (Kim y Austin, 2006; Panigrahi *et al.*, 2007). Selvaraj *et al.* (2006) observaron la expresión de IL-1 $\beta$  en leucocitos y macrófagos de trucha y carpa después de la administración *in vivo* e *in vitro* de bacterias gram-negativas.

Tabla III. Evaluación de probióticos con efecto inmunomodulador en organismos cultivados

Probiótico	Hospedero	Efecto	Referencia
<i>Lactobacillus</i> o <i>Carnobacterium</i>	Larvas de rodaballo <i>S. maximus</i>	Aumento de la resistencia contra el patógeno <i>Vibrio</i> sp.	Gastesoupe, 1994
<i>Carnobacterium divergens</i>	Bacalao Atlántico <i>G. morhua</i>	Disminución de la mortalidad en peces retados con <i>V. anguillarum</i>	Gildberg <i>et al.</i> , 1997
<i>Carnobacterium</i>	Salmón Atlántico <i>S. salar</i>	Reducción de la tasa de mortalidad causada por <i>A. salmonicida</i> , <i>V. ordalii</i> y <i>Y. ruckeri</i>	Robertson <i>et al.</i> , 2000
<i>Lactococcus lactis</i>	Rodaballo <i>S. maximus</i>	Aumento de macrófagos y la concentración de óxido nítrico en suero	Villamil <i>et al.</i> , 2002.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dorada <i>S. aurata</i>	Aumento de la respuesta inmune celular innata	Ortuño <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (ATCC 53103)	Trucha arcoiris <i>O. mykiss</i>	Aumento de la actividad de explosión respiratoria <i>in vitro</i> y el nivel de IgM en suero. Destrucción en suero de <i>E. coli</i> .	Nikoskelainen <i>et al.</i> , 2003
<i>Mucor circinelloides</i>	Dorada <i>S. aurata</i>	Aumento de la actividad de lisozima en suero y la respuesta inmune innata (fagocitosis y citotoxicidad)	Rodríguez <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Dorada <i>S. aurata</i>	Aumento de la actividad fagocítica y citotóxica en leucocitos de riñón cefálico	Salinas <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	Carpa India, <i>L. rohita</i>	Aumento de la supervivencia en peces retados con <i>A. hydrophila</i> , hemoglobina y conteo celular de leucocitos	Kumar <i>et al.</i> , 2006

### A.9.1 Levadura marina *Debaryomyces hansenii*

Las levaduras por definición son hongos unicelulares, usualmente de forma ovalada, con estados vegetativos que se reproducen predominantemente por gemación o fisión, dando por resultado un crecimiento unicelular (Ochoa y Vázquez, 2004).

*Debaryomyces hansenii* es una levadura marina que puede tolerar salinidades por arriba de 24‰, a diferencia de otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es inhibida cuando la salinidad supera los 10‰. Esto hace a *D. hansenii* una levadura con características de interés para su aplicación biotecnológica (Baronian, 2004). *D. hansenii* presenta otras propiedades favorables para su producción masiva, como el requerir bajas

concentraciones de fuentes de carbono para su crecimiento y desarrollo (Ochoa *et al.*, 1995).

Por otro lado, es posible considerar el aprovechamiento de las levaduras marinas en la producción de proteína unicelular para la formulación de dietas para acuicultura e incluso complementos alimenticios para animales de granja y humanos (Ochoa y Vázquez, 2004).

En los ecosistemas acuáticos la levadura *D. hansenii* ha sido aislada de diferentes especies de peces, desde el salmón del Atlántico hasta la trucha arcoiris (Andlid, 1995) y ha sido evaluada por su habilidad para producir poliaminas, adherirse y crecer en el mucus intestinal de peces (Buts *et al.*, 1994; Vázquez-Juárez *et al.*, 1997; Andlid *et al.*, 1998; Tovar *et al.*, 2002). Las poliaminas son moléculas que participan en numerosos procesos biológicos (Tabor y Tabor, 1984), entre ellos, la replicación y diferenciación celular, así como la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Bardócz *et al.*, 1993). Evaluando los efectos de la inclusión de la levadura *D. hansenii* cepa CBS 8339 en dietas microparticuladas, se observó un aumento de la maduración del tracto digestivo en larvas de la lubina Europea debido posiblemente a la alta secreción de espermina y espermidina por la levadura, así como un incremento en la supervivencia de larvas (Tovar *et al.*, 2002).

#### *Poliaminas y sistema inmune*

Las poliaminas son aminas alifáticas de bajo peso molecular que se encuentran en todos los seres vivos, ayudando a regular un número de importantes actividades biológicas (Evans *et al.*, 1989). Son esenciales para la proliferación y diferenciación celular y la biosíntesis macromolecular por interactuar con ácidos nucleicos, proteínas y membranas (Marton y Morris, 1987). Su efecto sobre el crecimiento se debe a que estimulan la replicación del DNA y, por tanto, favorecen la síntesis de proteínas (Méndez y Hicks, 1987). La carga positiva que mantienen los grupos aminos en condiciones fisiológicas permite a las poliaminas interactuar con los grupos aniónicos de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, proporcionándoles así estabilidad en su estructura (Méndez y Hicks, 1987). Entre las poliaminas más estudiadas se encuentran la putrescina, la espermidina y la espermina.

Se ha encontrado que las poliaminas tienen propiedades antioxidantes en peces (Decker y Xu 1998). Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina inhiben la oxidación de lípidos por inactivación de los radicales libres (Decker y Xu 1998). La actividad antioxidante de las poliaminas aumenta con la presencia de estas tres aminas (Lovaas, 1991).

Se ha visto que la espermina puede aumentar la síntesis de IL-10 en macrófagos de ratones estimulados con lipopolisacáridos (Hasko *et al.*, 2000). Así mismo, la espermina es producida en altos niveles en tejidos regenerados y es liberada hacia el medio extracelular durante la lisis celular (Clarke y Tyms, 1991). Estas observaciones sugieren que la espermina puede jugar un rol en el desarrollo del sistema inmune.

## JUSTIFICACIÓN

La acuicultura -y el cultivo de peces- se han convertido en una actividad muy importante y necesaria para la alimentación humana. Uno de los mayores problemas que presenta el desarrollo de esta industria es la pérdida económica causada por mortalidades masivas de peces. El estrés debido al manejo diario y la aparición de enfermedades son los dos motivos principales de mortalidad. De esta manera, el estudio del sistema inmunitario como mecanismo de defensa frente a enfermedades es muy importante. Se ha observado que el sistema inmune puede ser estimulado por el uso de inmunomoduladores tales como antioxidantes, vitaminas o probióticos. La adición de probióticos en las dietas es actualmente una práctica común en muchas granjas acuícolas en México. Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas le confieren beneficios de salud al hospedero. El efecto de la levadura marina *D. hansenii* cepa CBS 8339 ha sido evaluada en la maduración del sistema digestivo y supervivencia en larvas de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, por su habilidad para producir poliaminas; moléculas involucradas en la proliferación y diferenciación celular. De esta manera despierta el interés por determinar el efecto de esta levadura sobre la respuesta inmune en peces. Por lo expuesto anteriormente, se considera de relevante importancia evaluar el efecto de la levadura marina *D. hansenii* como suplemento alimenticio en juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 incorporada en la dieta sobre el sistema inmune y antioxidante de juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 incorporada en la dieta sobre la respuesta inmune y antioxidante en juveniles de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* expuestas a *Amyloodinium ocellatum*.
2. Evaluar el efecto de dietas suplementadas con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 sobre la respuesta inmune y antioxidante, así como la expresión de genes relacionados con el sistema inmune por RT-PCR en juveniles de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* retados con *Aeromonas hydrophila*.
3. Evaluar el efecto de dietas suplementadas con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 sobre la respuesta inmune y antioxidante, así como la expresión de genes relacionados con el sistema inmune por RT-PCR en juveniles de la dorada *Sparus aurata*.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

1. Las dietas enriquecidas con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 aumentaran la respuesta inmune, antioxidante y la supervivencia de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* al ser retadas con el parásito *Amyloodinium ocellatum* y la bacteria *Aeromonas hydrophila*.
2. Las dietas enriquecidas con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 aumentaran los niveles de expresión de genes relacionados en el sistema inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.
3. Las dietas enriquecidas con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 aumentaran la respuesta inmune y antioxidante de la dorada *Sparus aurata*.

## I. METODOLOGÍA

La metodología de los análisis realizados para cumplir con los objetivos del presente estudio, se describen detalladamente en los anexos I y X.

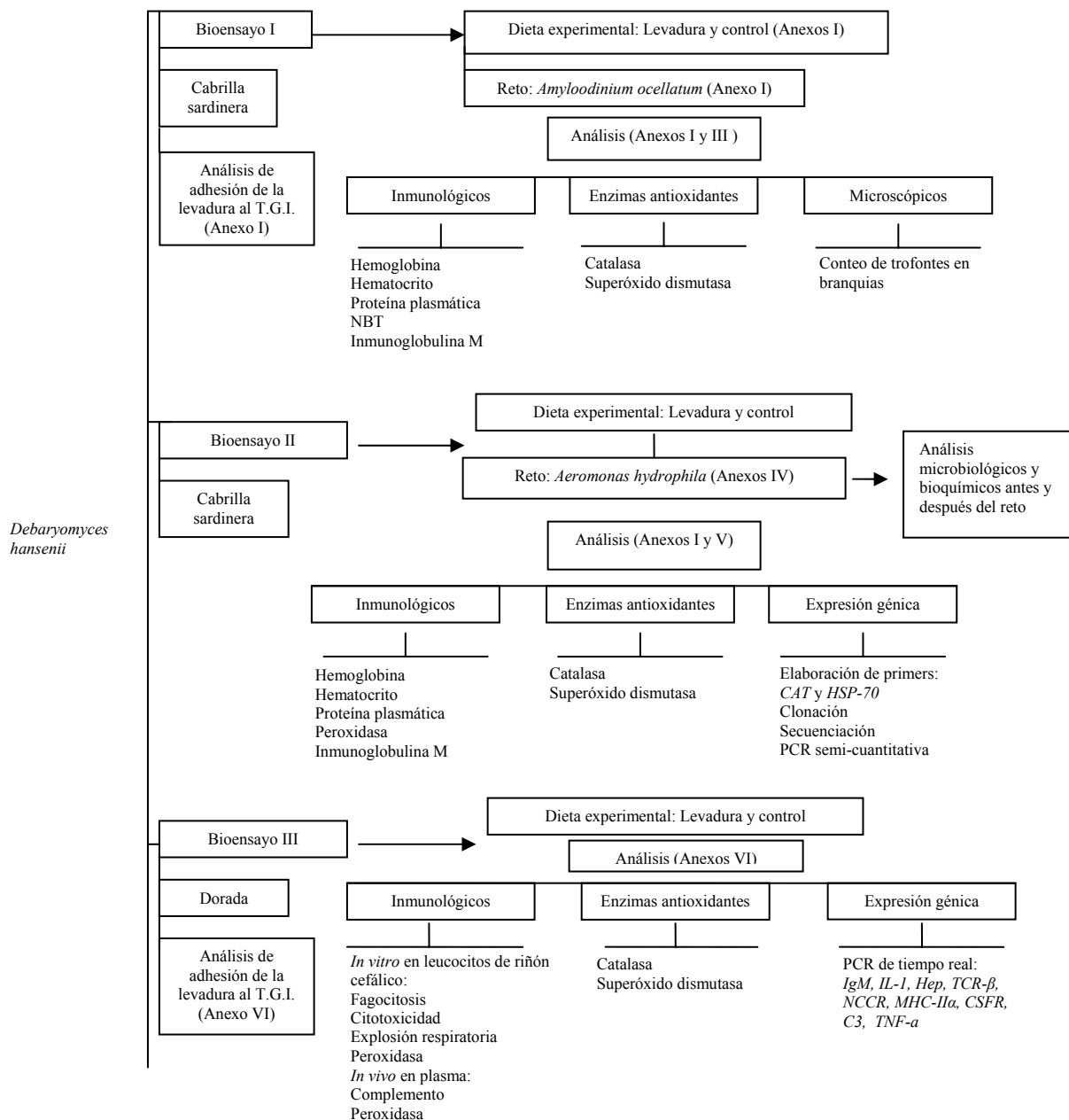


Figura 7. Diagrama de flujo general donde se esquematiza el diseño experimental de esta tesis.

## **I.1. Bioensayo I**

Antes de iniciar el ensayo con las dietas experimentales, 30 peces con un peso promedio de  $26 \pm 5$  g fueron colectados y sacrificados para medir los índices hematológicos basales en condiciones normales de producción (Anexo I). Al alcanzar un peso de  $30 \pm 5$  g, los peces restantes fueron transferidos a los tanques experimentales. Los juveniles fueron colocados a una densidad de 20 peces en cada tanque. La temperatura del agua fue mantenida a  $26$  °C con una salinidad de 35 ‰. Las dietas experimentales fueron asignadas aleatoriamente a 4 tanques (réplicas) para cada tratamiento. El alimento fue distribuido manualmente en dos raciones (50% a las 9:00 am y 50% a las 5:00 pm) durante cuatro semanas de experimentación.

### **I.1.1 Reto de cabrilla sardinera con *Amyloodinium ocellatum***

Después de las cuatro semanas de alimentación los peces fueron expuestos a un estrés por manipulación sobre las condiciones físico-químicas el agua para inducir la proliferación del ectoparásito *Amyloodinium ocellatum*. La temperatura del agua fue aumentada a  $29$  °C y la salinidad disminuida a 25 ‰. Los peces continuaron con las dietas experimentales y la mortalidad fue monitoreada por 7 días.

Al final de los 7 días, cinco peces representativos de cada tanque fueron tomados y sacrificados para evaluar la respuesta inmune (20 peces por cada tratamiento). El estrés ocasionado en los peces, fue propicio para la aparición del ectoparásito *Amyloodinium ocellatum*, un parasito oportunista, por lo que las branquias de los peces infectados fueron disectadas para confirmar la infección y determinar el número de trofontes de *A. ocellatum* microscópicamente.

Los peces restantes (sobrevivientes) fueron colocados en un tanque libre de dinoflagelados para su recuperación siguiendo la alimentación con las dietas experimentales (levadura y control) por tres semanas adicionales.

## **I.2. Bioensayo II**

Para este segundo experimento se utilizaron 60 peces en etapa de juvenil de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* con un peso promedio de  $12 \pm 5$  g. Los juveniles fueron

distribuidos en los 6 tanques de experimentación (10 peces/tanque). Las dietas experimentales fueron asignadas aleatoriamente teniendo 3 réplicas por tratamiento. El alimento fue distribuido manualmente en dos raciones (50% a las 9:00 am y 50% a las 5:00 pm) durante cuatro semanas de experimentación. Se llevaron a cabo dos muestreos antes y después del reto, utilizando 20 peces en cada muestreo.

#### I.2.1. Reto: *A. hydrophila*

Se utilizó la bacteria *A. hydrophila* Ah-315 aislada de salmón. La bacteria fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Patogénesis Microbiana del CIBNOR y proveniente del stock del Department of Medical Microbiology, University of Lund, Suecia. Después de las 4 semanas de alimentación con la dieta experimental, se dejaron en los tanques 20 peces en total manteniendo la misma distribución que en un inicio en cada uno de los 6 tanques para el reto. Los peces fueron anestesiados (MS-222) y la inoculación se realizó por vía intraperitoneal utilizando jeringas de insulina (Figura 8).

Cada pez fue inoculado con 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana con una concentración de la cepa Ah-315 de *A. hydrophila* de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. La mortalidad fue registrada por una semana. Al finalizar el reto se llevó a cabo la recuperación de la bacteria en medio selectivo para *Aeromonas* (MSA) en muestras de hígado e intestino de todos los peces.

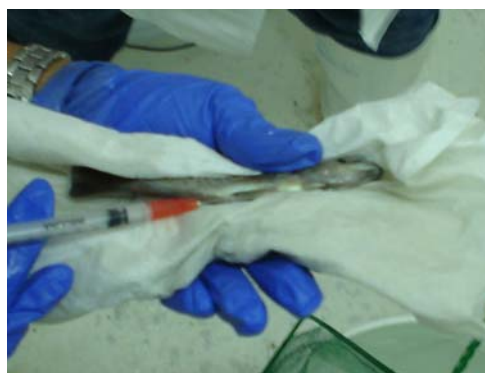


Figura 8. Inoculación intraperitoneal de la bacteria *A. hydrophila* Ah-315 a juveniles de cabrilla sardinera *M. rosacea* después de las 4 semanas de alimentación con la dieta experimental.

### **I.3. Bioensayo III**

Se utilizaron 80 doradas en etapa de juvenil con un peso promedio de  $80 \pm 5$  g. Los juveniles fueron distribuidos en 4 tanques (20 peces por tanque). Las dietas experimentales fueron asignadas aleatoriamente teniendo 2 replicas por tratamiento. El alimento fue distribuido manualmente en dos raciones (50% a las 9 am y 50% a las 5 pm) durante cuatro semanas de experimentación. Se llevaron dos muestreos: uno a la primera semana de alimentación con la dieta experimental y otro a la cuarta semana. A diferencia de los anteriores bioensayos con la cabrilla sardinera, la dorada no fue expuesta a ningún reto bacteriano.

#### **I.4. Análisis estadístico**

Para los tres bioensayos se llevó a cabo una prueba de homogeneidad y normalidad de datos y los resultados fueron analizados por ANOVA de 1 vía, a excepción del bioensayo 2, donde se utilizó una ANOVA de 2 vías. Una  $P \leq 0.05$  fue tomada como indicativa de significancia estadística. La comparación múltiple de medias se realizó por medio de la prueba de Tukey.

## BIOENSAYO I

### II. RESULTADOS:

#### II.1. *Debaryomyces hansenii*

Los análisis microbiológicos llevados a cabo en la dieta con levadura dieron un conteo total de la levadura marina de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  de alimento (Figura 9). El conteo total en la dieta control fue negativa para la levadura *D. hansenii*.



Figura 9. Análisis microbiológico de la dieta experimental (Levadura *D. hansenii* CBS 8339). Medio de cultivo YPD-agar más antibiótico.

#### II.1.2. Adhesión de la levadura *D. hansenii* al intestino de la cabrilla sardinera.

La levadura marina *D. hansenii* marcada con fluorescencia (DTAF) mostró una afinidad por el mucus intestinal de juveniles de cabrilla sardinera en los tres segmentos intestinales después del lavado con buffer PBS, evidenciando esto por la adhesión de la levadura al mucus. Esto fue confirmado por la recuperación de  $2.5 \times 10^2$  UFC de la levadura al final del experimento en los peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii* (Figura 10). La levadura no fue detectada en peces alimentados con la dieta control.

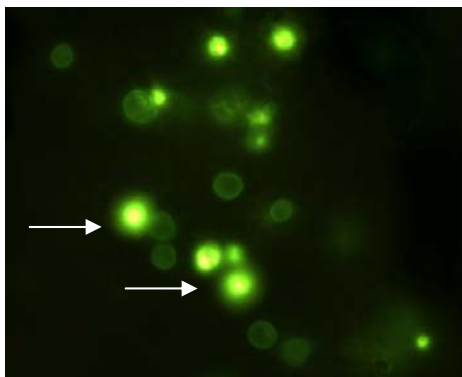


Fig. 10. *D. hansenii* (CBS 8339) marcada con fluorescencia (DTAF) adherida al intestino de juveniles de la cabrilla sardinera

### II.1.3. Parámetros hematológicos basales de juveniles de la cabrilla sardinera en cultivo.

Los valores hematológicos de juveniles de cabrilla sardinera mantenidos en un sistema de cultivo abierto en condiciones normales se muestran en la Tabla IV. Los niveles de enzimas antioxidantes se indican en la Tabla V.

Tabla IV. Valores hematológicos de juveniles de cabrilla sardinera *M. rosacea* ( $n = 30$ ) antes del ensayo alimenticio.

Índices hematológicos basales	Media $\pm$ EE
Hb (g/dL)	7.2 $\pm$ 1.0
Ht (%)	38.0 $\pm$ 5.0
NBT (DO 450 nm)	0.4 $\pm$ 0.0
Proteína plasmática (mg/mL)	27.0 $\pm$ 6.1
IgM (DO 490 nm)	1.6 $\pm$ 0.3

Los valores son expresados como medias  $\pm$  EE para 30 organismos. Hb, Hemoglobina; Ht, Hematocrito; IgM, Inmunoglobulina M.



Tabla V. Actividad de las enzimas antioxidantes de la cabrilla sardinera *M. rosacea* ( $n = 30$ ) en condiciones normales, antes del ensayo alimenticio.

Actividad de enzimas antioxidantes	Media $\pm$ EE
SOD (U/mg proteína)	8.2 $\pm$ 2.0
CAT (U/mg proteína)	319.0 $\pm$ 48.7

Los valores son expresados como medias  $\pm$  EE para 30 organismos. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa.

#### II.1.4. Reto: *A. ocellatum*

Al finalizar las cuatro semanas de experimentación y tras la inducción de estrés por manipulación en el agua, todos los organismos presentaron una amyloodiniosis aguda durante los 7 días del reto, causada por la aparición del ectoparásito *A. ocellatum*. Diferencias significativas fueron observadas en las tasas de mortalidad ( $P=0.013$ ) que afectaron durante la primera semana de infección a los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura y la dieta control (Figura 11). El porcentaje de mortalidad acumulada a los 7 días, fue de 89.5% en el grupo control y 40% en el grupo alimentado con *D. hansenii*. Es importante señalar que la tasa más alta de mortalidad en el grupo control ocurrió a las 48 horas después de la exposición con el dinoflagelado (Figura 12).

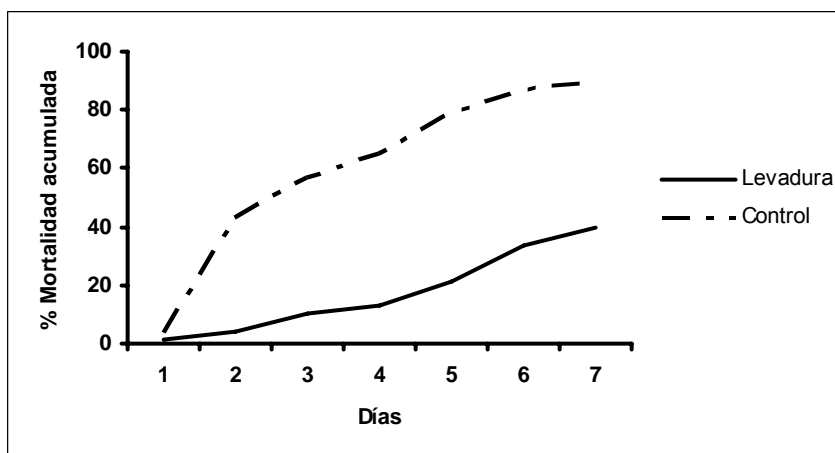


Figura 11. Porcentaje de mortalidad acumulada de la cabrilla sardinera alimentada con y sin levadura en su dieta, durante 7 días después de la exposición al parásito *A. ocellatum*.

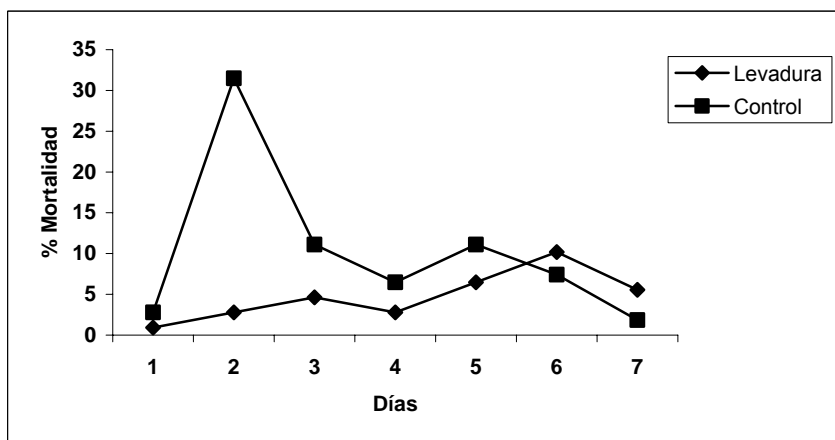


Figura 12. Porcentaje de mortalidad de la cabrilla sardinera alimentada con y sin levadura en su dieta, durante 7 días después del reto con el parásito *A. ocellatum*

Durante el reto con el dinoflagelado *A. ocellatum*, el principal sitio de infección fueron las branquias, lo cual, al interferir con la respiración y aunado a la pérdida de apetito, provocó en la mayoría de los casos sofocación y muerte. La infección con el parásito en el grupo control fue confirmada por observación microscópica de las branquias de los peces, y estimada a una media de 18 trofontes/filamento branquial (Figura 13).

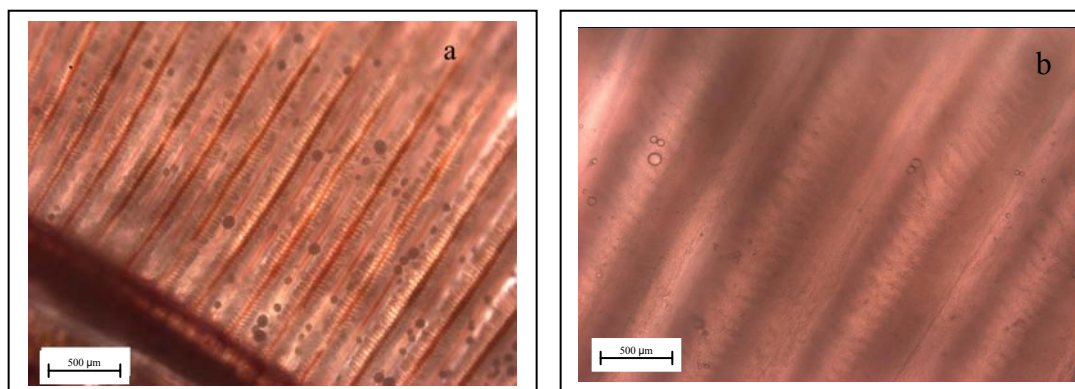


Figura 13. Trofontes de *A. ocellatum* observados en las branquias (a un aumento de 40X bajo el microscopio) de peces retados (a) y sanos (b).

### II.1.5. Parámetros hematológicos después del reto con *A. ocellatum*

Después del reto, todos los peces sobrevivientes pertenecían al grupo alimentado con la levadura *D. hansenii* en la dieta. Los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura exhibieron los niveles más altos de hemoglobina y proteína plasmática, sin embargo no hubo diferencias significativas comparados con la dieta control (Tabla VI). El nivel de inmunoglobulina M de la cabrilla sardinera aumentó significativamente ( $P < 0.004$ ) en los organismos alimentados con la dieta con levadura. El nivel más alto de respuesta de IgM se obtuvo en los peces recuperados después del reto con el dinoflagelado *A. ocellatum* (Figura 14).

Tabla VI. Parámetros hematológicos de la cabrilla sardinera *M. rosacea* durante y después del reto con *A. ocellatum*.

Dieta	Hemoglobina (g/dl <sup>-1</sup> )	Proteína Plasmática (mg/ml <sup>-1</sup> )
Peces retados		
Levadura (n=20)	8.04 <sup>a</sup> ± 0.24	34.9 <sup>a</sup> ± 3.7
Control (n=20)	7.27 <sup>a</sup> ± 0.19	24.0 <sup>a</sup> ± 4.1
Peces recuperados		
Levadura (n=20)	7.63 <sup>a</sup> ± 0.28	35.27 <sup>a</sup> ± 4.1
Pr>F	0.126	0.168

Los valores son expresados como medias ± EE para 30 organismos. Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con letras.

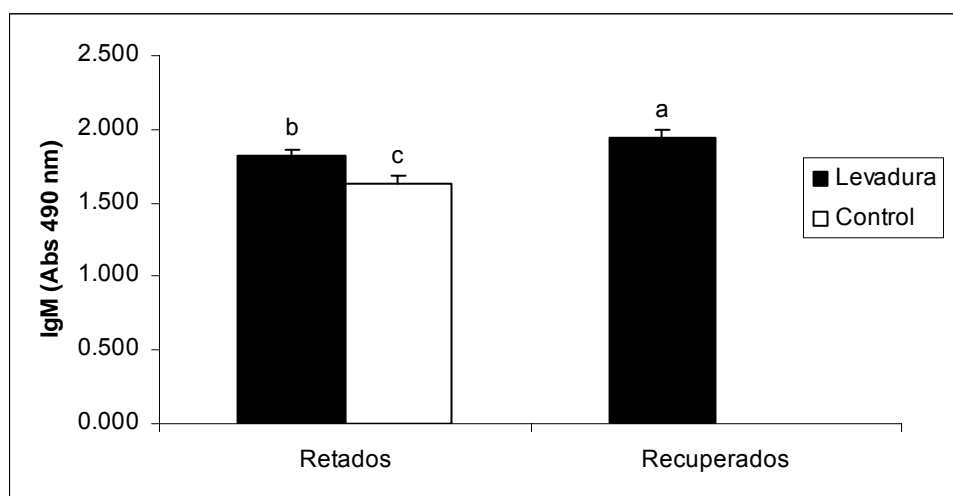


Figura 14. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la respuesta humoral (IgM) en juveniles de cabrilla sardinera. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=30$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con letras sobre las barras.

Durante el experimento la administración de la levadura en la dieta no causó variaciones significativas en la actividad de catalasa antes y después del reto. Sin embargo, la actividad de la enzima superóxido dismutasa aumentó significativamente ( $P < 0.000$ ) en los peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii* (Figuras 15 y 16). En general los parámetros inmunológicos en los peces recuperados fueron más altos que en los peces estresados comparados con el grupo control.

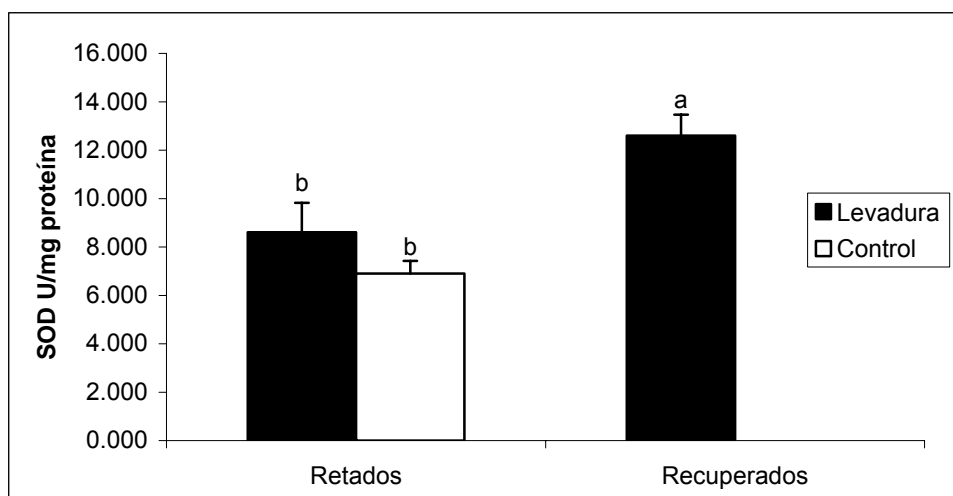


Figura 15. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la enzima antioxidante superóxido dismutasa. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=30$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con letras sobre las barras.

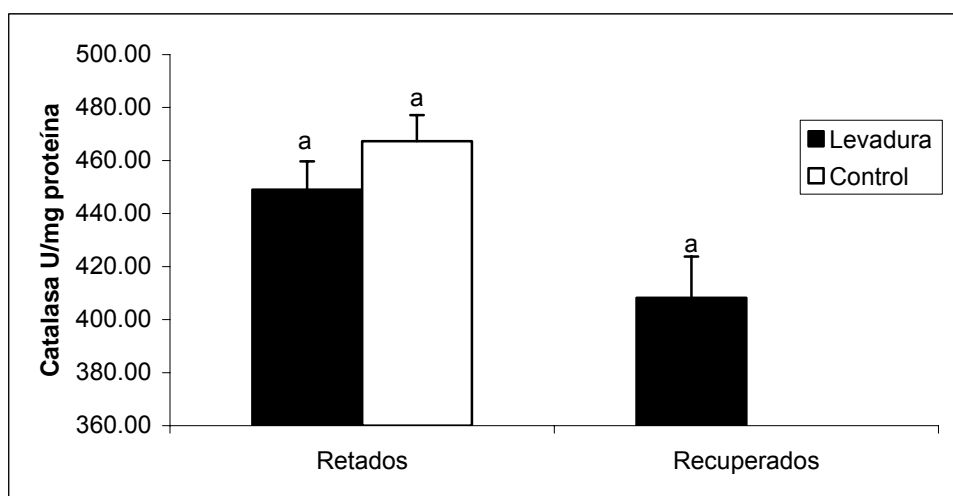


Figura 16. Efecto de la inclusión de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la enzima antioxidante catalasa. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=30$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con letras sobre las barras.

## II.2 DISCUSIÓN

### II.2.1. Capacidad de adhesión de *D. hansenii*

El tracto gastrointestinal de los animales esta en permanente contacto con los nutrientes y los microorganismos presentes en su superficie. Ambos componentes son vitales para un adecuado funcionamiento y bienestar del hospedero, teniendo importantes efectos de regulación sobre la respuesta inmune local y sistémica (Cunningham-Rundles y Lin., 1998). Entre los diferentes modos de acción que ejercen las bacterias, hay una evidencia clara sobre la estimulación de la respuesta inmune innata y específica del hospedero (Isolauri *et al.*, 2002; Herman y Ménard, 2002). En este estudio se evaluó la adhesión de la levadura marina *D. hansenii* cepa CBS 8339 al intestino de juveniles de la cabrilla sardinera. La adhesión al mucus intestinal es un primer paso esencial en el proceso para permitir una colonización persistente de probióticos potenciales (Douglas, 1989). En nuestro estudio, *D. hansenii* se adhirió al mucus intestinal de la cabrilla sardinera *M. rosacea*. Resultados similares fueron reportados en larvas de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y juveniles de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004). Los resultados del análisis de adherencia de la levadura *D. hansenii* al intestino de la cabrilla sardinera concuerda con los datos obtenidos por Vázquez-Juárez *et al.* (1997) quienes demostraron la habilidad de adhesión de la levadura *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 al mucus crudo de la trucha arcoiris *Salmo gairdneri*. La levadura marina utilizada en este estudio fue aislada de la trucha arcoiris, por lo se observa gran afinidad al tracto intestinal de otras especies de peces (Vázquez-Juárez *et al.*, 1997). Esta estrategia permite a la levadura *D. hansenii* (CBS 8339) colonizar la membrana del mucus intestinal y estimular el metabolismo intestinal de la cabrilla sardinera, similar a lo observado en la lubina cuando la levadura *D. hansenii* fue introducida al 1.1%, correspondiente a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> en la dieta (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004). La eficacia de las dietas suplementadas con probióticos, no solamente depende del número de células viables introducidas durante el proceso de elaboración, si no de su permanencia en el intestino durante su alimentación (Panigrahi *et al.*, 2005). En este estudio, la levadura marina *D. hansenii* permaneció viable no solo después de su adición en la dieta, sino que mantuvo su presencia en el intestino durante el experimento.

### **II.2.2. Parámetros hematológicos basales de juveniles de cabrilla sardinera en cultivo**

Los parámetros hematológicos son una herramienta importante para conocer el estado de salud de las especies, y son típicamente usados para detectar los cambios fisiológicos (Atamanalp y Yanik, 2003). Se evaluaron los índices hematológicos de juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* manejada en condiciones de cultivo controlados y alimentadas con una dieta comercial. Los parámetros inmunológicos medidos en el presente ensayo son importantes componentes del sistema de defensa de los peces (Landolt, 1989). Los resultados obtenidos en juveniles de la cabrilla sardinera se encuentran dentro de los intervalos reportados en otros peces de agua marina y dulce. El análisis de hemoglobina, hematocrito y proteína concuerda con lo obtenido en tilapia, salmón del Atlántico y bagre de canal (Silveira, 2005; Hardie *et al.*, 1990; Buentello *et al.*, 2007).

El producto de reducción de NBT obtenido después de la reacción con superóxidos es un buen indicador del estado de salud ante una inmunización efectiva en peces (Anderson y Jeney, 1992). La producción de radicales de oxígeno por células fagocíticas, medidas por el análisis de NBT concuerda con lo obtenido en el salmón del Atlántico, *Salmo salar L.* (Hardie *et al.*, 1990). La respuesta inmune humoral fue conocida mediante la estandarización del método de ELISA para la cuantificación de IgM en suero de la cabrilla sardinera. Los resultados de SOD concuerdan con lo reportado en otras especies de peces como la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Ozmen *et al.*, 2004). Estos datos son los primeros obtenidos sobre biología hemática de *M. rosacea* en cultivo y podrán ser empleados como referencia para estudios posteriores sobre el estado de salud de esta especie.

### **II.2.3. Reto: *Amyloodinium ocellatum***

Los resultados esperados al utilizar probióticos en la acuicultura son principalmente la reducción de la mortalidad (Chang y Liu, 2002; Irianto y Austin, 2002). Muchos estudios han utilizado probióticos para mejorar la resistencia del hospedero hacia enfermedades y han mostrado una reducción de la mortalidad hacia patógenos como *Aeromonas* (Kumar y

Sahoo, 2006; Irianto y Austin, 2002) y *Vibrio anguillarum* (Taoka *et al.*, 2006; Villamil *et al.*, 2002). De Simone (1989) observó que las bacterias vivas inducen una respuesta del sistema inmune debido a que ellas son más potentes inductoras de citocinas que las bacterias muertas o inactivadas.

Nuestro estudio muestra una estimulación del sistema inmune por la inclusión en la dieta de la levadura viva *D. hansenii* debido a un aumento en la resistencia contra el ectoparásito *Amyloodinium ocellatum*, comparado con el grupo control (dieta sin levadura). Algunas investigaciones han reconocido que la producción de anticuerpos es uno de los más importantes mecanismos de defensa contra este parásito (Woo, 1996; Cobb *et al.*, 1998). La mortalidad acumulada causada por *A. ocellatum* después de los 7 días fue de 90% en peces alimentados con la dieta control, con una alta virulencia a las 48 horas. Resultados similares se observaron con juveniles de la corvina *Sciaenops ocellatum* observándose una alta mortalidad a los dos días de infección (Li *et al.*, 2005). La amyloodiniosis es una de las enfermedades epidémicas más virulentas reportadas en la acuicultura (Tu *et al.*, 2002). La intensidad de la infestación por *A. ocellatum*, se representa y evalúa por el número de trofontes por pez que afectan principalmente los filamentos de las branquias (Kuperman y Matey, 1999). Se ha demostrado que las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal son los portales de entrada de muchos patógenos microbianos. Li *et al.* (2005) investigaron la influencia de dos promotores de la salud en la dieta, levadura de cerveza y nucleótidos, sobre la respuesta al estrés y su resistencia a la infección no controlada del dinoflagelado *A. ocellatum* en la corvina roja *Sciaenops ocellatus*, pero sus resultados no mostraron un efecto de la levadura sobre la respuesta inmune, a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo.

#### **II.2.4. Parámetros hematológicos en juveniles tras su exposición al parásito**

En el presente estudio, se ve un claro efecto de la levadura viva en la dieta sobre un aumento de los niveles de IgM en los peces después de ser expuestos al parásito *A. ocellatum*. Los teleósteos son capaces de producir el anticuerpo IgM al igual que otros vertebrados. Las inmunoglobulinas se encuentran en el plasma, el mucus y la bilis, aunque no se conocen bien los mecanismos por los cuales aparecen en el mucus y la bilis (Lobb y



Clem, 1981). Las inmunoglobulinas del suero son el mejor componente del sistema inmune humoral y la IgM es la principal inmunoglobulina presente en los peces (Watts *et al.*, 2001). Una producción de anticuerpos en el suero más elevada fue encontrada en los peces recuperados después de la infección. Estos resultados fortalecen las observaciones de que la producción de anticuerpos contra *A. ocellatum* es un importante mecanismo de defensa inmune (Cobb *et al.*, 1998). En un estudio con bagre de canal *I. punctatus* retado con el parásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* se observó la adquisición de inmunidad humoral ya que una alta cantidad de anticuerpos específicos fueron producidos al subsiguiente reto llevando a cabo la inmovilización de los trofontes (Wang y Dickerson, 2002). En otros estudios se ha observado que los probióticos pueden estimular la producción de anticuerpos en peces (Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*, 2004). Yambot y Song (2006) observaron que la inmunización con vacunas en *Epinephelus coioides* contra el parásito marino *Cryptocaryon irritans* limita la adhesión, penetración y desarrollo de los trofontes de *C. irritans*. Una posible explicación es que el enlace del anticuerpo a la superficie del parásito presiona al parásito para que abandone a su hospedero (Clark y Dickerson, 1997).

La explosión respiratoria es uno de los más importantes mecanismos bactericidas en peces (Ellis, 1999; Ellis, 2001), siendo también un buen indicador del estado de salud (Anderson, 1992). Este proceso genera especies reactivas de oxígeno (ERO), que son tóxicas para muchos microorganismos (Hardie *et al.*, 1996). A pesar de que todos los seres vivos poseen mecanismos de defensa tanto enzimáticos como químicos, contra éstas (Asada, 1978).

Las defensas antioxidantes incluyen a varias enzimas, entre ellas la superóxido dismutasa y la catalasa. Ambas enzimas protegen contra ciertos patógenos (Barnes *et al.*, 1999). La enzima superóxido dismutasa cataliza la transformación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, subsecuentemente la catalasa descompone este peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua, siendo una parte crucial del mecanismo de defensa antioxidante. En este estudio, la actividad de superóxido dismutasa y catalasa fue analizada en hígado. El hígado es el órgano con el nivel más alto de actividad de superóxido dismutasa y el mejor sitio que soporta el estrés oxidativo en peces retados (Lin y Lin, 1997). La actividad de superóxido dismutasa fue significativamente más elevada en

peces retados y recuperados, alimentados con el alimento enriquecido con levadura, a diferencia de los que fueron alimentados con el alimento control. Las actividades de las enzimas antioxidantes y el nivel de los radicales libres han sido relacionados con varias condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo el estrés (Czene *et al.*, 1997; Wojtaszek, 1997). Choi *et al.* (2006) encontraron que *Lactobacillus acidophilus* cepa 606 estimula la actividad antioxidante y reprime el crecimiento de una variedad de líneas de celulares cancerígenas. La levadura *D. hansenii* en la dieta no tuvo un efecto sobre la enzima antioxidante catalasa, obteniendo para la dieta control valores más elevados de catalasa a diferencia de la enzima superóxido dismutasa. Al parecer la catalasa tiene una carencia de protección limitada contra la virulencia del parásito *A. ocellatum*. Si bien la liberación del peróxido de hidrógeno es menos dañina que otros radicales libres como el anión superóxido, la liberación del primero sigue teniendo un efecto sobre el estrés oxidativo. La información sobre el papel de la actividad de ambas enzimas antioxidantes contra patógenos en peces, contribuye al entendimiento de la acción de los probióticos y su efecto benéfico sobre el sistema inmune. Asimismo, el presente estudio representa el primer reporte del efecto inmuno-modulador causado por la administración en la dieta de la levadura marina *D. hansenii* en juveniles de la cabrilla sardinera.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer experimento se puede aceptar la hipótesis planteada, ya que se observó un efecto de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 sobre el sistema inmune y antioxidante de juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Este efecto se vio reflejado en el reforzamiento del sistema inmune de los peces que al ser retados con el dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* tuvieron una mayor supervivencia.

### II.3. CONCLUSIÓN

1. Se obtuvieron los primeros datos sobre parámetros hematológicos en juveniles sanos de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en cultivo.
2. La levadura marina *D. hansenii* mostró una alta adhesión de tracto intestinal de la cabrilla sardinera *in vitro* e *in vivo*.
3. La levadura viva *D. hansenii* cepa CBS 8339 disminuyó la mortalidad hasta un 60% en juveniles de cabrilla sardinera retados con el protozooario *A. ocellatum*.
4. La respuesta inmune humoral (IgM) y antioxidante representada por la enzima superóxido dismutasa, son los parámetros que aumentaron significativamente después del reto con el dinoflagelado *A. ocellatum*, en los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura, reforzando así la respuesta del pez ante una infección.

## BIOENSAYO II

### III.1 RESULTADOS

#### III.1.1. Bacteria *Aeromonas hydrophila*

Se llevó a cabo la reactivación de la bacteria en medios nutritivos de agar LB. Las pruebas bioquímicas, catalasa y citocromo oxidasa realizadas para confirmar la pureza de la bacteria antes de la preparación del inóculo dieron positivas para el género *Aeromonas*.

#### III.1.2 Determinación de la dosis letal media

Al final del reto bacteriano se obtuvo un 100% de supervivencia en el grupo control, el grupo con solución salina estéril y el inoculado al  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Por otro lado en el grupo de  $1 \times 10^5$  UFC/ml sólo se presentó una mortalidad del 25% comparada con los grupos de  $10^7$  y  $10^8$  UFC donde la mortalidad fue del 50%. Respecto al comportamiento y los signos durante el reto experimental, estos mismos grupos ( $10^7$  y  $10^8$  UFC) presentaron un nado lento y de lado, permaneciendo en el fondo de los tanques, mostrando inapetencia. Asimismo, presentaron características físicas típicas de septicemia, como inflamación en el sitio de la inoculación y a un lado de la boca, además de presentar características internas como inflamación en el hígado, bazo e intestino. Para el reto experimental se trabajó con la concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

#### III.1.3. Parámetros hematológicos antes y después del reto bacteriano

Se evaluó el efecto de la levadura viva *D. hansenii* sobre el sistema inmune en la cabrilla sardinera por cuatro semanas. En este estudio, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los análisis de hemoglobina, proteína plasmática, mieloperoxidasa e IgM. Los parámetros hematológicos se pueden observar en la Tabla VII.

Tabla VII. Parámetros hematológicos en juveniles de cabrilla sardinera *M. rosacea* alimentadas con y sin levadura, antes y después del reto con *A. hydrophila*

Dieta	Hemoglobina (g/dl <sup>-1</sup> )	Proteína Plasmática (mg/ml <sup>-1</sup> )	MPX	IgM (OD 490 nm)
1er muestreo (antes del reto) (n = 20)				
Levadura	6.23 <sup>a</sup> ± 1.23	17.24 <sup>a</sup> ± 7.04	1.14 <sup>a</sup> ± 0.12	1.26 <sup>a</sup> ± 0.15
Control	5.95 <sup>a</sup> ± 1.33	16.28 <sup>a</sup> ± 4.45	0.89 <sup>a</sup> ± 0.08	1.17 <sup>a</sup> ± 0.13
2do muestreo (después del reto) (n = 20)				
Levadura	7.99 <sup>a</sup> ± 1.81	17.81 <sup>a</sup> ± 9.95	1.00 <sup>a</sup> ± 0.22	1.65 <sup>a</sup> ± 0.17
Control	7.46 <sup>a</sup> ± 1.47	14.50 <sup>a</sup> ± 4.38	0.87 <sup>a</sup> ± 0.15	1.39 <sup>b</sup> ± 0.19
Pr>F	0.825	0.628	0.310	0.045

Los valores son expresados como medias ± EE para 20 organismos. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) son expresadas como Pr>F.

La actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa fue evaluada como parte del análisis del sistema inmune antioxidante en los juveniles de cabrilla sardinera. El consumo de la dieta no tuvo un efecto significativo en la actividad de ambas enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa. La actividad de la enzima superóxido dismutasa aumento de 9.32 U/mg proteínas en la dieta control a 10.47 U/mg proteínas en la dieta con levadura, mientras que catalasa aumentó de 664.4 a 789.8 U/mg proteínas, en la dieta con levadura. (Tabla VIII).

Tabla VIII. Actividad enzimática en juveniles de cabrilla sardinera *M. rosacea* alimentados con y sin levadura en la dieta, antes y después del reto con *A. hydrophila*.

Dieta	Superóxido dismutasa (U/mg proteína <sup>-1</sup> )	Catalasa (U/mg proteína <sup>-1</sup> )
1er muestreo (antes del reto) (n = 20)		
Levadura	10.47 <sup>a</sup> ± 3.77	789.88 <sup>a</sup> ± 139.89
Control	9.32a ± 3.55	664.41 <sup>a</sup> ± 175.59
2do muestreo (después del reto) (n = 20)		
Levadura	14.12 <sup>a</sup> ± 4.54	1020.61 <sup>a</sup> ± 135.07
Control	8.300 <sup>b</sup> ± 1.50	702.18 <sup>b</sup> ± 130.88
Pr>F	0.045	0.035

Los valores son expresados como medias ± EE para 20 organismos. Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) son expresadas como Pr>F.

Las enzimas superóxido dismutasa y catalasa son parte del sistema inmune antioxidante que defienden al organismo de las especies de oxígeno (ROS). En relación al sistema inmune antioxidante, evaluado por medio de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en *M. rosacea*, se observaron valores estadísticamente mayores de ambas enzimas en los organismos alimentados con la dieta con *D. hansenii* comparados con la dieta control (sin levadura).

### III.1.4 Reto: *A. hydrophila*

La inoculación intraperitoneal de la bacteria *A. hydrophila* a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC se evaluó por medio de un reto en juveniles de cabrilla sardinera por una semana. Durante esta semana no se registraron mortalidades durante los 7 días del reto en los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura y la dieta control. Los organismos no mostraron lesiones típicas de septicemia hemorrágica. No obstante después de sacrificar a los organismos retados, *A. hydrophila* fue recuperada en un 45% de los peces infectados. Las cepas recuperadas como cultivos puros al final del reto experimental en muestras de tejidos de hígado e intestino dieron positivas para los análisis químicos de catalasa y oxidasa. En total se obtuvieron 9 cepas con estas características a partir de los

órganos de los 20 peces inoculados con la concentración de  $1 \times 10^7$  UFC. Una mayor concentración de *A. hydrophila* en los medios agar LB fue encontrada en los cultivos inoculados con muestras de intestino (Figura 17). En el grupo control (peces sin inocular) no se aislaron colonias bacterianas presuntivas del género *Aeromonas*.

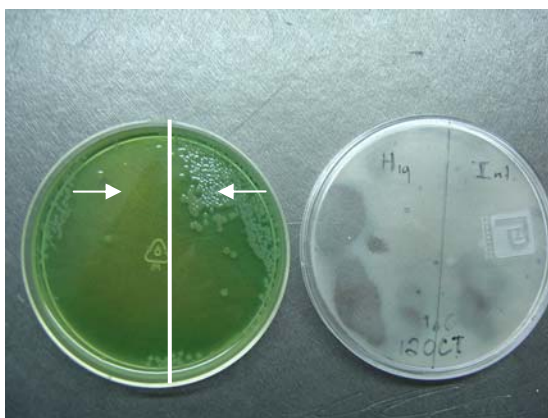


Figura 17. Recuperación de la bacteria *A. hydrophila* en medio selectivo para *Aeromonas* (MSA) después del reto en muestras de hígado e intestino de cabrilla sardinera. Izq. Hígado; Der. Intestino.

### III.1.5 Análisis Molecular

Se obtuvieron las secuencias parciales para los genes *CAT* y *HSP-70* de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*, las secuencias fueron registradas en el banco de genes (GenBank) (Tabla IX).

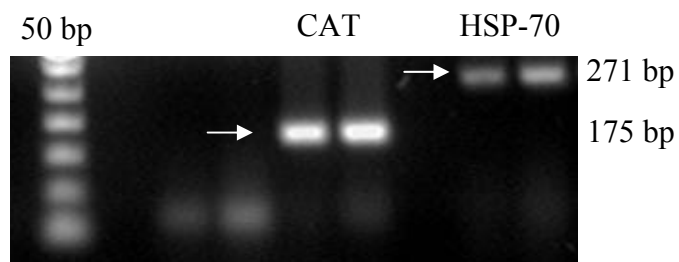


Figura 18. Amplificación de los productos de PCR de los genes *CAT*, *HSP-70* visualizado en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio.

Tabla IX. Número de registro en el GenBank para *CAT* y *HSP-70* en cabrilla sardinera *M. rosacea*.

Gen	Abreviación del gen	Acceso al GenBank
Catalasa	<i>CAT</i>	1085343
Heat shock protein-70	<i>HSP-70</i>	1085347

### III.1.5.1 PCR semi-cuantitativa

En este estudio, el aumento en la expresión del gen *CAT* fue significativamente más elevada en los peces alimentados con dietas suplementadas con levadura en muestras de hígado e intestino. En las muestras de hígado, la expresión del gen *CAT* fue mayor en los peces no infectados, mientras que en las muestras de intestino niveles más elevados de expresión fueron detectados en los peces infectados con la bacteria (Figuras 20 y 21).

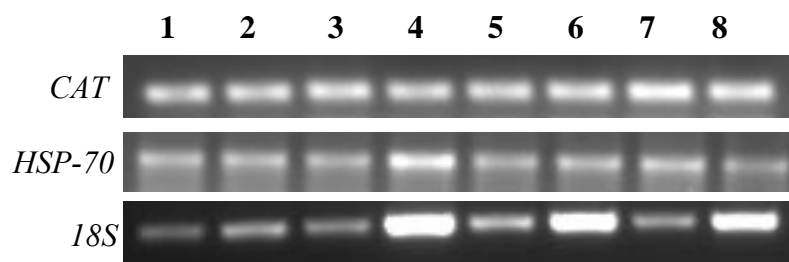


Figura 19. Productos de RT-PCR de los genes *CAT*, *HSP-70* y *18S* RNA ribosomal visualizados en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio. La línea del 1-8 muestra los diferentes tratamientos (1-No infectados-hígado-levadura; 2-No infectados-hígado-control; 3-Infectados-hígado-levadura; 4-Infectados-hígado-Control; 5-No infectados-Intestino-levadura; 6-No infectados-Intestino-Control; 7-Infectados-Intestino-levadura; 8-Infectados-Intestino-Control).



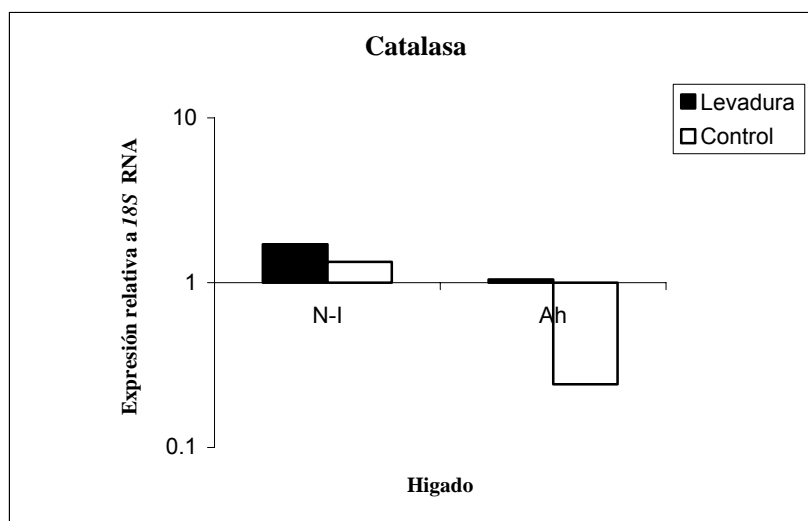


Figura 20. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen *CAT* relativo a la expresión del gen *18S* RNA ribosomal en hígado de juveniles de cabrilla sardinera. No infectados (N-I) e infectados con *Aeromonas hydrophila* (Ah).

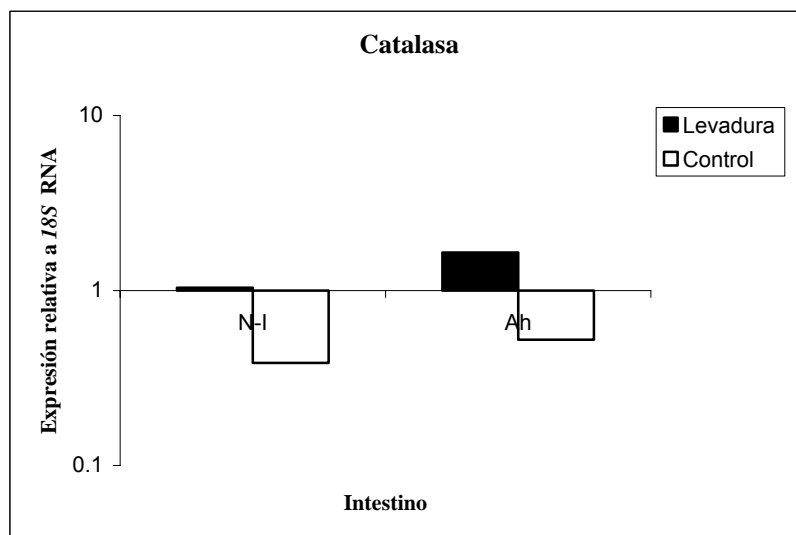


Figura 21. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen *CAT* relativo a la expresión del gen *18S* RNA ribosomal en intestino de juveniles de cabrilla sardinera. No infectados (N-I) e infectados con *Aeromonas hydrophila* (Ah).

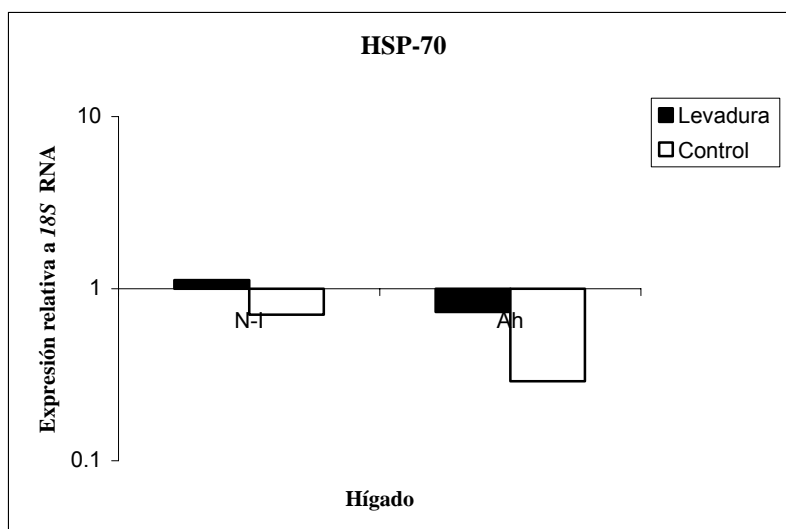


Figura 22. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen *HSP-70* relativo a la expresión del gen *18S* RNA ribosomal en hígado de juveniles de cabrilla sardinera. No infectados (N-I) e infectados con *Aeromonas hydrophila* (Ah).

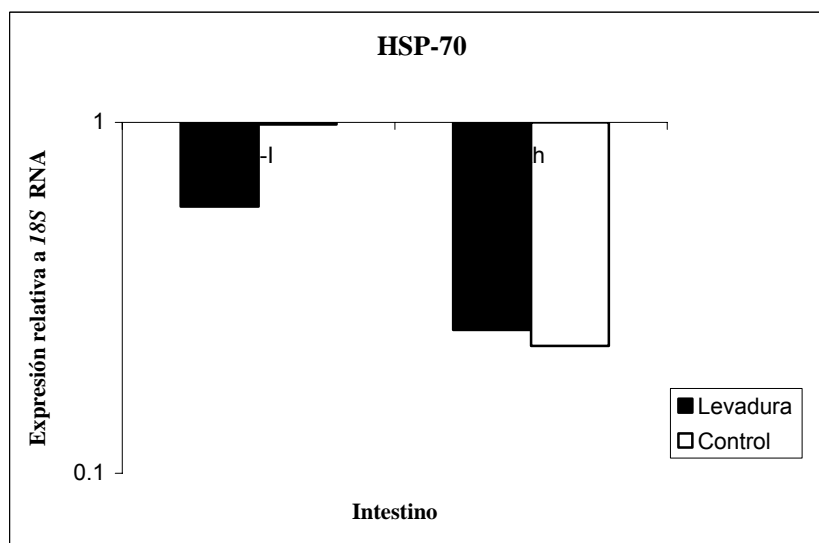


Figura 23. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la expresión del gen *HSP-70* relativo a la expresión del gen *18S* RNA ribosomal en intestino de juveniles de cabrilla sardinera. No infectados (N-I) e infectados con *Aeromonas hydrophila* (Ah).

Sin embargo, el gen *HSP-70* solo se vio expresado en hígado en los peces alimentados con la levadura sin infectar (Figura 22). En los demás tratamientos no se obtuvieron diferencias con respecto al control endógeno (*18S* RNA ribosomal) (Fig. 23).

## III.2. DISCUSIÓN

### III.2.1. Reto con *A. hydrophila*

*Aeromonas hydrophila* es una bacteria Gram-negativa que infecta a un amplio rango de hospederos, incluyendo peces, reptiles, aves y mamíferos (Popoff, 1984). *Aeromonas hydrophila* es el agente causal de la septicemia hemorrágica en peces cultivados, y es conocida también como septicemia de las *Aeromonas* móviles. Esta enfermedad es reconocida como un importante problema económico para la industria de la acuicultura por la mortalidad causada en peces de importancia comercial (Austin y Austin, 1987).

En este segundo experimento se evaluó la respuesta del sistema inmune de la cabrilla sardinera al ser retada con la bacteria móvil *A. hydrophila*. Los resultados de las pruebas bioquímicas practicadas a la cepa siempre correspondieron a lo reportado por la literatura para *A. hydrophila*, confirmando así el género en nuestras bacterias recuperadas (Popoff y Véron, 1976; Popovic *et al.*, 2000). Una de las principales características del género *Aeromonas*, es que son bacterias Gram-negativas con forma de bacilos, no esporuladas, aeróbicas y anaeróbicas facultativas que producen oxidasa y catalasa (Janda y Abbott, 1998). Al final del reto experimental, se llevó a cabo la recuperación de la bacteria en medio agar LB utilizando los tejidos de hígado e intestino, con el fin de confirmar la presencia de la cepa en los organismos inoculados. La bacteria se encontró en una mayor concentración en las muestras de intestino de los peces sacrificados, a diferencia de las muestras de hígado, donde su presencia fue escasa. A pesar de que las *Aeromonas* móviles son reconocidas como patógenos de peces, es importante notar que estas bacterias también forman parte de la microflora intestinal normal de los peces sanos (Trust *et al.* 1974), por lo que la presencia habitual de esta bacteria no es indicativo de enfermedad. Sin embargo, un desequilibrio fisiológico como el estrés, puede ser un factor en el brote de la enfermedad causada por *Aeromonas*, siendo *A. hydrophila* un patógeno oportunista (Cipriano, 2001).

Al término de las cuatro semanas de alimentación con las dietas experimentales, los peces fueron sometidos a un reto con *A. hydrophila* a una concentración de  $10^7$  UFC. Después del reto con *A. hydrophila*, la mortalidad fue monitoreada por 7 días. En este estudio, no se registraron mortalidades en ninguno de los grupos experimentales, y tampoco se observaron los síntomas típicos de la septicemia hemorrágica, por lo cual no se puede

concluir un efecto de la levadura en los peces, ya que este resultado se vio en ambos tratamientos. Mizra *et al.* (2007) evaluó el efecto de la vitamina C como inmunoestimulante después de retar a juveniles de carpa *Labeo rohita* con *A. hydrophila* intraperitoneal un volumen de 100 µl con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC, observando una mayor mortalidad en los peces control. Sin embargo, en este objetivo es importante el evaluar los parámetros inmunológicos para confirmar si hubo o no un reforzamiento del sistema inmune después del reto como efecto de la levadura viva *D. hansenii*. De igual manera, se llevó a cabo la recuperación de la bacteria al final del reto en todos los peces para confirmar su presencia.

### III.2.2. Parámetros hematológicos

Para contrarrestar los problemas de las enfermedades en la acuicultura, y ante el uso indiscriminado de los antibióticos, los probióticos representan un tratamiento alternativo para la prevención de las enfermedades (Taoka *et al.*, 2006). En este estudio se investigó el efecto de la administración de levaduras vivas *D. hansenii* a través de la dieta, para confirmar la posibilidad de la aplicación de este probiótico en el cultivo de la cabrilla. Se muestra que las dietas suplementadas con *D. hansenii* estimulan el sistema inmune innato y el específico. Al final del reto se obtuvieron muestras de sangre e hígado de todos los peces para conocer los parámetros inmunes como efecto de la levadura *D. hansenii* en la dieta. La cabrilla sardinera, como todos los teleósteos, producen un singular tipo de inmunoglobulina, anticuerpos similares a la IgM que se producen tanto en sangre como en secreciones del mucus (Itami *et al.*, 1988). Respecto al sistema inmune específico humoral, se observó en este estudio un aumento significativo en la producción de anticuerpos (IgM) al final del reto bacteriano en los peces alimentados con la levadura viva respecto a la dieta control como una respuesta frente a la exposición con el antígeno bacterial. La IgM es una de las principales moléculas que activan la ruta clásica del complemento, logrando indirectamente neutralizar a los patógenos (Carroll y Prodeus, 1998). Cabe señalar que desde el inicio del experimento los niveles de IgM circulante se vieron más elevados en los organismos alimentados con levadura. Se ha visto que los inmunoestimulantes en la dieta

tiene un efecto marcado sobre la producción de los niveles de IgM en peces (Cuesta *et al.*, 2004; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Amar *et al.*, 2000). Cuesta *et al.* (2003) observaron un aumento simultáneo en los niveles de IgM y la respuesta inmune innata al adicionar vitamina A en la dieta. Sin embargo, al suplementar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de la dorada *Sparus aurata* (después de dos semanas) se observó primero un aumento en los niveles séricos de IgM y posteriormente en los parámetros del sistema inmune innato (Ortuño *et al.*, 2002). Los altos niveles de IgM encontrados en este estudio después del reto pueden sugerirnos que actúan como primera línea de defensa contra microorganismos. Resultados similares se encontraron al retar a los peces con el dinoflagelado *A. ocellatum*, donde la IgM fue de las primeras respuestas activadas del sistema inmune.

En todos los vertebrados, la fagocitosis esta asociada con la producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO) y tiene como principal función la eliminación de los patógenos, siendo potentes microbicidas (Muñoz *et al.*, 2000). Sin embargo, muchas especies reactivas de oxígeno pueden cruzar las vacuolas fagocíticas hacia el ambiente extravacuolar y extracelular causando daño a las células del propio organismo (Warner, 1994) para esto las enzimas antioxidantes protegen a las células de los efectos de éstas. Así tenemos a la SOD, que tiene la función de proteger a las células de los daños causados por estos compuestos a través de la reducción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno; el peróxido de hidrógeno luego de cruzar la membrana es removido por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (Anderson, 1996). En este estudio se evaluaron las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa en hígado de juveniles de cabrilla sardinera alimentados con *D. hansenii* después de ser retadas con la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Un aumento significativo se observó en la actividad de ambas enzimas al final del reto. Las infecciones sistémicas de la enfermedad causada por *Aeromonas* están bien caracterizadas (Ventura y Grizzle, 1988). Internamente, el hígado y los riñones son los órganos blancos de una septicemia aguda cuando son atacados por toxinas bacteriales, y donde ocurre una intensa actividad fagocítica por los macrófagos (Huizinga *et al.*, 1979) por lo que la actividad de las enzimas antioxidantes se ve activada. La activación de las

enzimas antioxidantes aumenta la protección contra patógenos virulentos y enfermedades infecciosas, lo cual fue observado en este estudio.

### III.2.3. Expresión génica: PCR semi-cuantitativa

En este estudio se analizó la expresión de los genes *CAT* y *HSP-70* en peces no infectados e infectados con la bacteria *A. hydrophila* después de cuatro semanas de alimentación con la levadura *D. hansenii*. Se encontraron aumentos significativos de los niveles de expresión del gen *CAT* en tejidos de hígado e intestino en peces que habían sido alimentados con dietas suplementadas con levadura con respecto a la dieta control. La catalasa se produce en todas las células, sin embargo, es una de las enzimas peroxisomales con mayor actividad en hígado como se ha visto en la trucha café *Salmo trutta* (Rocha *et al.*, 2003).

Las HSP's son una familia de proteínas celulares muy conservadas y que han sido observadas en todos los organismos, incluyendo peces (Iwama *et al.*, 1998). Recientemente, varias familias de HSP's han sido propuestas como indicadores de una respuesta al estrés generalizado a nivel celular. En este estudio, una ligera expresión de la *HSP-70* en cabrilla sardinera fue detectada en hígado de peces alimentados con levadura y no sometidos a reto bacteriano. Por una parte, la respuesta al estrés celular puede variar en función del tejido, y el tipo de estresor, aunado a que existen niveles basales de expresión constitutiva de las heat-shock protein, que son requeridas en varios aspectos del metabolismo de proteínas para mantener la homeostasis (Iwama *et al.*, 2003). Para posteriores trabajos, se recomienda analizar la expresión de estas proteínas de estrés en diferentes tejidos (cerebro, sangre, músculo), ya que si bien relacionamos proteínas específicas con tejidos específicos, esto no significa que estas proteínas no se expresen en otros tejidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el segundo bioensayo se puede concluir también que la hipótesis planteada es aceptada, ya que se observó un efecto positivo de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 sobre el sistema inmune y antioxidante de juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Este efecto se vio

reflejado en el reforzamiento del sistema inmune de los peces al ser retados con *Aeromonas hydrophila*, una de las principales bacterias que causan altas mortalidades en la acuicultura.



### III.3. CONCLUSIÓN

1. La inclusión de la levadura *D. hansenii* en la dieta fortalece el sistema inmune específico humoral promoviendo un aumento en la producción de IgM en cabrilla sardinera después de ser sometidos a estrés por exposición a *Aeromonas hydrophila*.
2. La inclusión de la levadura *D. hansenii* en la dieta aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa en juveniles de cabrilla sardinera retadas con *Aeromonas hydrophila*.
3. La levadura marina *D. hansenii* CBS 8339 regula fuertemente la expresión de *CAT* y *HSP-70* especialmente en hígado.

## BIOENSAYO III

### IV.1. Resultados

#### IV.1.1. Adhesión de la levadura marina *D. hansenii* al intestino de la dorada.

Las células fluorescentes de *D. hansenii* (CDB 8339) mostraron una afinidad al mucus intestinal de juveniles de dorada, tal y como se observa en las fotografías por microscopía confocal (Figura 24.).

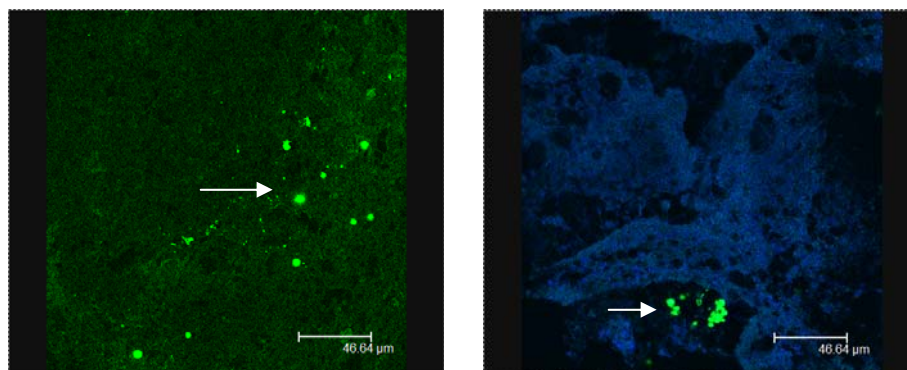


Figura 24. *D. hansenii* (CBS 8339) marcada con fluorescencia (DTAF) adherida al intestino de juveniles de la dorada *S. aurata*. (a un aumento de 40X bajo el microscopio)

#### IV.1.2. Parámetros hematológicos

La liberación de la enzima peroxidasa por los gránulos azufrados de los neutrófilos durante la actividad de explosión respiratoria, como medición del contenido de peroxidasa en suero, no difiere ( $P > 0.05$ ) entre los peces control durante el experimento, y los organismos alimentados con la dieta suplementada con levadura. Sin embargo, se observa una ligera estimulación, no significativa, de este parámetro después de las semanas 2 y 4 de alimentación con la levadura. En contraste, la actividad de peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico fue significativamente ( $P < 0.05$ ) más alta en el grupo alimentado con la levadura *D. hansenii* en la semana 4, comparado con la dieta control (Figura 25).

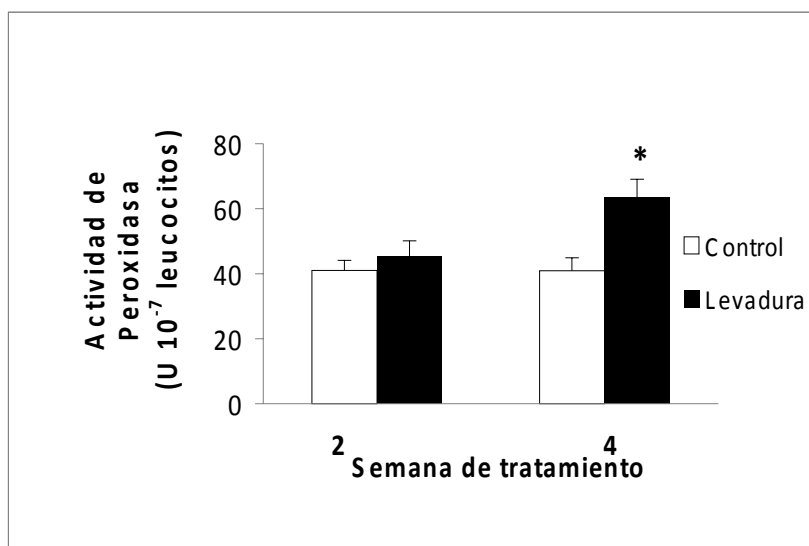


Figura 25. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de peroxidasa en leucocitos. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=10$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con asterisco para cada uno de los tiempos de muestreo (\*).

El consumo de la dieta experimental no tuvo efecto sobre la actividad del complemento hemolítica natural ( $ACH_{50}$ ) de la dorada en cualquier tiempo durante el experimento, comparada con los grupos control (Tabla X).

Tabla X. Actividad del complemento hemolítica, expresado como  $ACH_{50}$  unidades  $ml^{-1}$  suero, de la dorada alimentada con dietas con y sin levadura.

Dietas experimentales	Semanas de tratamiento	
	2	4
Control	71.58 $\pm$ 6.24	42.36 $\pm$ 7.48
Levadura	102.92 $\pm$ 16.05	61.90 $\pm$ 12.18

Datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=10$ ).

Los leucocitos en la dorada *S. aurata* consisten de monocitos-macrófagos y granulocitos, siendo los monocitos-macrófagos los que tiene una función fagocítica más alta. Después de dos semanas de alimentación con la dietas experimentales, el porcentaje de las células fagocíticas (habilidad fagocítica) en leucocitos de riñón cefálico fue

significativamente ( $P < 0.05$ ) aumentada en peces alimentados con la levadura *D. hansenii* comparadas con el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al final del experimento (semana 4) (Figura 26).

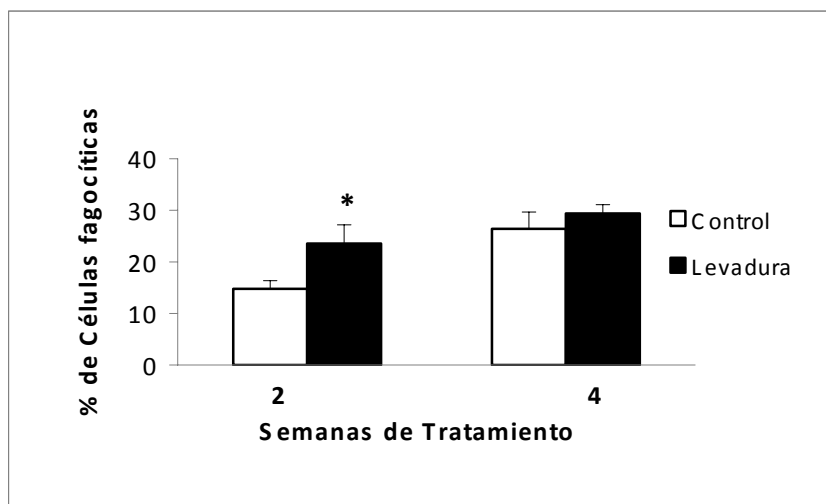


Figura 26. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de fagocítica en leucocitos de riñón cefálico de la dorada. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=10$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con asterisco para cada uno de los tiempos de muestreo (\*).

La actividad de explosión respiratoria de leucocitos de riñón cefálico, medida por quimioluminiscencia por medio de PMA (activadores de la explosión respiratoria) fue significativamente más alta ( $P < 0.05$ ) en los grupos experimentales alimentados con la levadura en su dieta en la semana 4 comparados con el grupo control, pero no significativamente diferentes en la semana 2 (Figura 27).

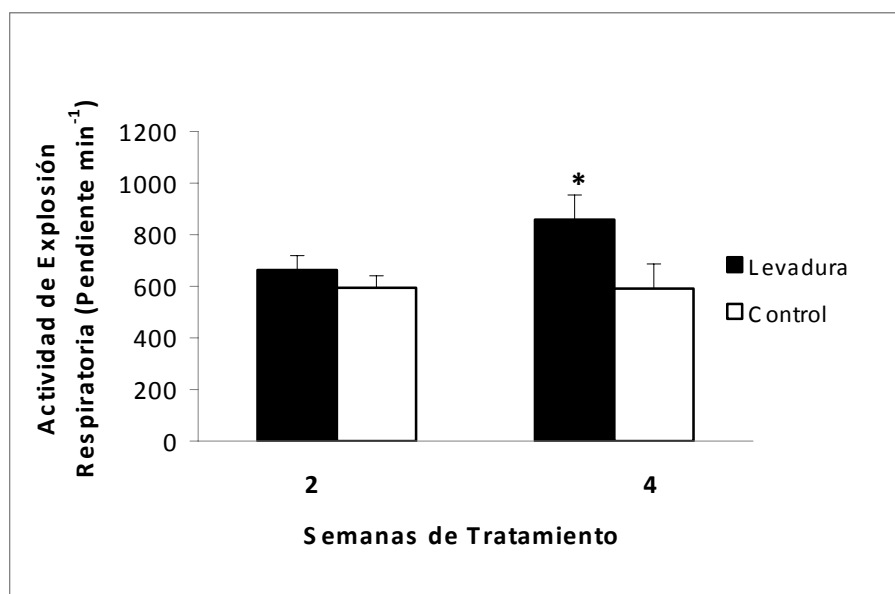


Figura 27. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de explosión respiratoria en leucocitos de riñón cefálico de la dorada. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=10$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con asterisco para cada uno de los tiempo de muestreo (\*).

La actividad de respuesta citotóxica llevada a cabo en peces por las células citotóxicas naturales (NCC) fue medida en juveniles de la dorada. La actividad citotóxica fue significativamente ( $P < 0.05$ ) aumentada en la semana 2 de tratamiento en los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura respecto a la dieta control, sin embargo esta actividad tuvo una disminución al final del tratamiento, por lo que no se detectaron diferencias entre ambos grupos (Figura 28).

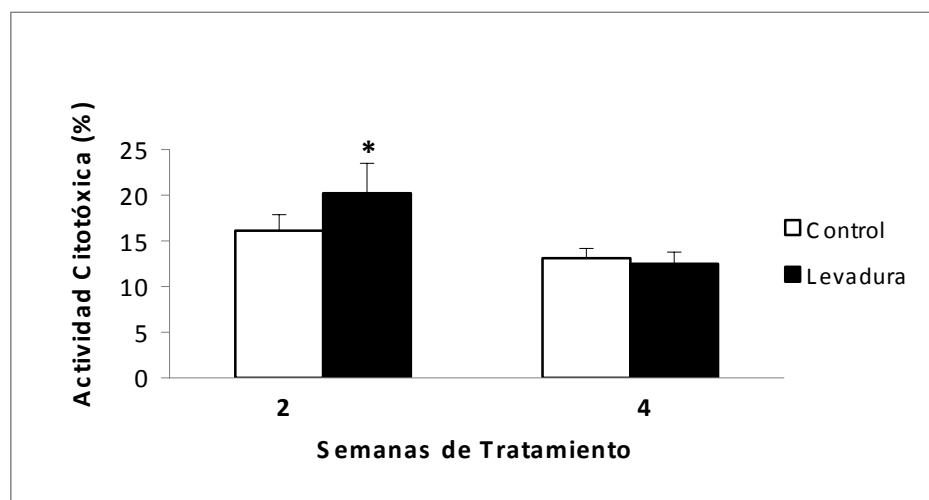


Figura 28. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la actividad Citotóxica en leucocitos de riñón cefálico de la dorada. Los datos representan la media  $\pm$  EE ( $n=10$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con asterisco para cada uno de los tiempo de muestreo (\*).

La eliminación de las especies reactivas de oxígeno producidas durante el proceso de explosión respiratoria por los fagocitos fue medida por la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa en hígado de la dorada. En este estudio, se observó un aumento ( $P < 0.05$ ) significativo en la actividad de superóxido dismutasa en la semana 2 en los peces alimentados con la dieta rica en levadura, comparada con el grupo control (Tabla XI), no obstante se vio disminuida al final del experimento (semana 4). Respecto a la actividad de catalasa, ésta no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambas dietas (control y levadura) en ningún tiempo del experimento.

Tabla XI. Efecto de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la dorada *S. aurata*.

Enzima/dieta	Semanas de tratamiento	
	2	4
SOD		
Control	6.75±0.62	6.15±1.29
Levadura	9.77±0.92*	5.83±0.65
CAT		
Control	66.10±7.98	57.57±11.0
Levadura	60.30±7.98	67.46±6.75

Los datos representan la media ± EE ( $n=10$ ). Diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos control y levadura son indicados con asterisco para cada uno de los tiempo de muestreo (\*).

#### IV.1.3. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune

En este estudio, el número de transcritos de los 9 genes del sistema inmune seleccionados fue generalmente más alto en muestras de riñón cefálico en los peces alimentados con *D. hansenii*. En las muestras de RNA de hígado de peces alimentados con la dieta con levadura, se incrementó solamente el nivel de expresión del gen *C3*. Las muestras de RNA de intestino de la dorada mostraron un aumento en la expresión de *TCRβ*, *C3*, *TNFα* cuando la levadura fue administrada. En este mismo grupo la expresión de *C3* fue aumentada 365 veces comparada con el grupo control (Figura 29).

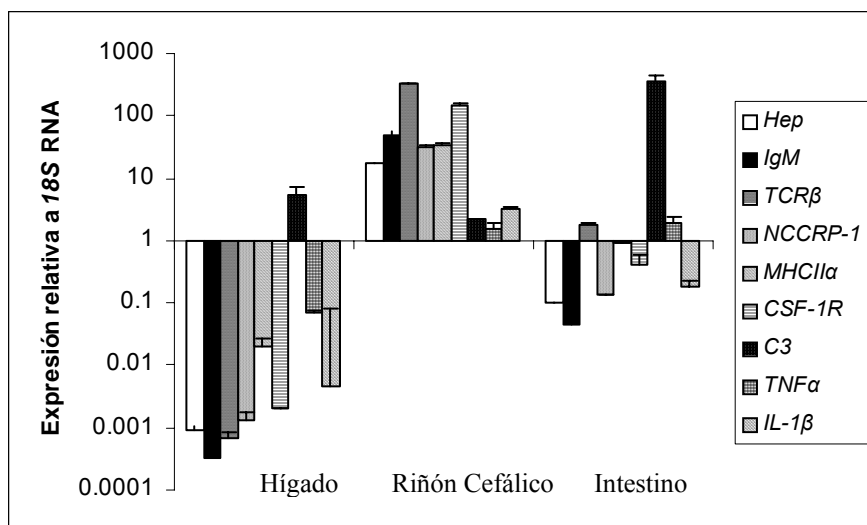


Figura 29. Expresión de genes del sistema inmune determinados por PCR de Tiempo Real en hígado, riñón cefálico e intestino de la dorada alimentada con la levadura *D. hansenii* CBS 8339.



## IV.2. DISCUSIÓN

### IV.2.1. *D. hansenii* y su potencial como probiótico

El uso de las levaduras como fuente de inmunoestimulantes ( $\beta$ -glucano) ha aumentado en las últimas décadas. La levadura usada en el presente trabajo fue elegida en base a estudios previos que la identificaron con potencial probiótico (Tovar *et al.*, 2002, 2004). La principal característica de un probiótico debe ser su habilidad para colonizar y permanecer en el hospedero. En nuestro estudio, la levadura viva *D. hansenii* CBS 8339 se adhirió al mucus intestinal de juveniles de dorada *Sparus aurata*, tal y como lo muestran las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, donde un gran número de células marcadas con fluorescencias fue encontrado. Este resultado concuerda con lo obtenido la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, donde se reportó una alta adhesión de *D. hansenii* al mucus intestinal (Tovar *et al.*, 2002, 2004). Es posible que esta levadura como muchas otras, formen parte de la micro fauna de muchos peces debido a que tiene gran capacidad de adhesión (Vázquez-Juárez *et al.*, 1997). Este tercer experimento confirma el potencial probiótico de la levadura marina *D. hansenii* mostrando su habilidad de adhesión. La habilidad del probiótico seleccionado para lograr una alta población celular en el tracto gastrointestinal es uno de los criterios más importantes (Panigrahi *et al.*, 2005). En este estudio la persistencia de *D. hansenii* en el intestino de doradas fue consistente hasta el final del experimento.

Los probióticos deben poseer dos características: 1. Producir sustancias que son antagonistas a los patógenos, pero no dañinas a los peces, incrementando la resistencia a las enfermedades. *D. hansenii* CBS 8339 es una levadura productora de poliaminas (Tovar *et al.*, 2002), las cuales tienen una función importante en la proliferación y regeneración de células. 2. Los probióticos deben ser una fuente barata para poder ser empleados como inmunoestimulantes con potencial biotecnológico. *D. hansenii* es una levadura metabólicamente versátil, no patogénica y osmotolerante, representando una alternativa para investigaciones biotecnológicas (Breuer y Harms, 2006).

#### IV.2.2. Parámetros hematológicos

Los inmunoestimulantes naturales son biocompatibles, biodegradables y seguros para el medio ambiente y la salud humana (Ortuño *et al.*, 2002). El efecto de los probióticos ha sido estudiado en especies acuáticas cultivadas, particularmente como una estrategia para el control de los patógenos (Panigrahi *et al.*, 2004) o debido a su capacidad para aumentar el sistema inmune innato en peces (Kumar y Sahoo, 2006). En el presente trabajo la dorada *Sparus aurata* fue alimentada con la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta por 4 semanas. Los principales parámetros del sistema inmune innato (celular y humoral) fueron evaluados después de las semanas 2 y 4 de la administración de levaduras. La respuesta inmune humoral representada por la actividad del complemento no se vio significativamente afectada por la administración de la levadura. De acuerdo a nuestros resultados, Kumar y Sahoo (2006) no encontraron una modulación de esta actividad en bagre Asiático, *Clarias batrachus* (L.) alimentados con dietas conteniendo  $\beta$ -1,3 glucano de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudios adicionales son necesarios para comprender el papel de los probióticos en la estimulación de este importante parámetro humoral del sistema innato.

Los parámetros del sistema inmune innato celular fueron positivamente aumentados por la levadura *D. hansenii* suplementada en la dieta. El aumento en la formación de los radicales libres y los niveles más altos de actividad de peróxido en leucocitos durante la explosión respiratoria fue evidente hasta la cuarta semana, lo cual sugiere que un aumento en la capacidad microbicida por parte de los leucocitos es un factor clave en la resistencia a las enfermedades.

Se ha reportado que los inmunoestimulantes, como los glucanos, son capaces de aumentar la actividad citotóxica de los macrófagos contra células tumorales de mamíferos (Bogwald *et al.*, 1982). En este estudio, se encontró que la actividad citotóxica de los leucocitos de riñón cefálico fue significativamente aumentada en la semana 2; sin embargo esta actividad fue disminuida al final del experimento. Similarmente, la actividad fagocítica de los leucocitos se vio aumentada significativamente durante las primeras dos semanas en peces que recibieron la dieta con levadura, disminuyendo en la semana cuatro. Los resultados de este trabajo concuerdan con los encontrados en la trucha arco iris (Siwicki *et*

*al.*, 1994) y la dorada (Ortuño *et al.*, 2002), donde la actividad fagocítica fue aumentada por la suplementación en la dieta de *S. cerevisiae* en las primeras semanas. Nuestra investigación muestra que la levadura *D. hansenii* CBS 8339 posee un potencial para estimular los parámetros del sistema inmune innato-celular de la dorada, en leucocitos de riñón cefálico, siguiendo una corta incubación *in vitro*.

En vertebrados, la fagocitosis esta asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ); todos estos radicales con alta capacidad microbicida (Barnes *et al.*, 1999). Las principales enzimas antioxidantes que detoxifican las especies reactivas de oxígeno en todos los organismos son: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Teixeria *et al.*, 1998). En los peces estas enzimas han sido ampliamente estudiadas (Livingstone *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1994; Ozmen *et al.*, 2004; Abele y Puntarulo, 2004). En el presente trabajo se observó un incremento significativo a las 2 semanas en la actividad de la enzima superóxido dismutasa en los peces alimentados con la levadura. Este incremento se correlaciona con la actividad fagocítica por los leucocitos al mismo tiempo. La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del radical anión superóxido a oxígeno y a especies menos reactivas como el  $H_2O_2$  (Teixeria *et al.*, 1998). La superóxido dismutasa es una de las principales enzimas antioxidantes que responde a los estímulos de estrés oxidativo (Fridovich, 1995). Otros compuestos biológicos considerados por tener propiedades antioxidantes en peces son las poliaminas putrescina, espermina y espermidina (Decker y Xu 1998). *D. hansenii* CBS 8339 es una levadura productora de poliaminas (Tovar *et al.*, 2002). Sin embargo, se requiere de más estudios para demostrar el efecto de las poliaminas producidas por la administración de levaduras sobre el sistema inmune y antioxidante. Por otra parte, en este estudio no se vio un efecto de la levadura *D. hansenii* sobre la actividad de catalasa. Efectos similares se obtuvieron en el primer bioensayo realizado en el presente trabajo con la cabrilla sardinera. El nivel de las enzimas antioxidantes en los tejidos o células puede variar en respuesta a múltiples factores, tales como condición física del pez y la calidad de las dietas proporcionadas (Orbea *et al.*, 2000).

#### IV.2.3 Expresión de genes relacionados con el sistema inmune

El análisis PCR de tiempo real fue diseñado para cuantificar la expresión de los genes *Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  en riñón cefálico, hígado e intestino de juveniles de dorada. El presente trabajo demuestra que la dieta suplementada con levadura sobre-regula la expresión de esos 9 genes principalmente en el riñón cefálico, uno de los más importantes órganos hematopoyéticos en peces. En contraste, solamente la expresión del gen *C3* fue expresado en el hígado, mientras que los genes *TCR $\beta$* , *TNF $\alpha$*  y *C3* se sobre-expresaron en el intestino, siendo la expresión de *C3* la más pronunciada. Los componentes del sistema del complemento están relacionados con la iniciación de la respuesta específica de anticuerpos, antígenos interceptados en los centros germinales linfoides, desarrollo y mantenimiento de células de memoria (Thorbecke *et al.*, 1994). El efecto de opsonización, es una función importante del sistema del complemento para eliminar patógenos del hospedero en el sistema inmune innato (Kinoshita, 1991). El aumento de expresión del gen *C3* pudo realizarse como consecuencia a un aumento de la actividad de fagocitosis durante el experimento.

Los péptidos antimicrobianos son importantes moléculas en el sistema inmune innato (Hirono *et al.*, 2005), los cuales actúan contra bacterias y levaduras (Shike *et al.*, 2002). En este estudio, el gen que codifica el péptido antimicrobiano, *hepcidina*, fue sobre-expresado en el riñón cefálico de los organismos alimentados con *D. hansenii*. La *hepcidina* ha sido también detectada en otros tejidos como bazo, piel y branquias en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) después de ser sometidos a un reto bacteriano (Chen *et al.*, 2007) por lo que sería de gran interés analizar la expresión de este gen en diferentes tejidos.

Por otra parte, la expresión de los genes *IgM* y *TCR $\beta$*  se sobre-expresó en el riñón cefálico en peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii*. Cuesta *et al.* (2004) observaron un incremento de la producción de IgM en suero de la dorada al alimentarse con *S. cerevisiae*. Varios estudios han evaluado el efecto de los probióticos sobre los niveles de IgM observando niveles altos en producción de este anticuerpo en peces (Krieg *et al.*, 1995; Panigrahi *et al.*, 2004). Por otra parte, los genes relacionados con las células-T, como el *TCR $\beta$*  han sido identificados en varias especies de peces (Criscitello

*et al.*, 2004). Algunos estudios han demostrado que los perfiles de expresión del gen *TCRβ* están correlacionados con actividades citotóxicas (Fischer *et al.*, 2003). En este estudio se determinó la actividad citotóxica *in vitro* en leucocitos de riñón cefálico, observando una mayor actividad en leucocitos de peces alimentados con levadura en su dieta en la semana dos. Sin embargo, en la semana cuatro de muestreo, la actividad citotóxica disminuyó en este grupo de peces por lo que no se pudo correlacionar a nivel de expresión del gen *TCRβ* por PCR en tiempo real.

Otros genes como *NCCRP-1*, *MHCIIα*, *CSF-1R* codifican receptores de leucocitos y en algunas circunstancias pueden servir como marcadores celulares. En numerosos estudios han concluido que estos genes son excelentes candidatos para este fin (Chen *et al.*, 2004; Somamoto *et al.*, 2006; Cuesta *et al.*, 2005; Jaso-Friedmann *et al.*, 1997). En este estudio, estos genes son sub-expresados en el hígado e intestino, a diferencia del riñón cefálico donde se sobre-expresaron. Sin embargo, se recomiendan más investigaciones en este campo para conocer las rutas por las cuales los probióticos son capaces de estimular el sistema inmune en peces.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el tercer experimento, se puede concluir que la hipótesis planteada es también aceptada, ya que se observó un efecto positivo de la levadura marina *D. hansenii* cepa CBS 8339 sobre el sistema inmune, antioxidante y en la expresión de genes de juveniles de la dorada *S. aurata*. Cabe señalar que este tercer experimento revalida el potencial probiótico de esta levadura marina sobre otras especies de teleósteos de gran importancia en la acuicultura.

### IV.3. CONCLUSIÓN

1. La levadura marina *D. hansenii* mostró afinidad por el tracto gastrointestinal de la dorada *Sparus aurata*.
2. La administración oral de la levadura *D. hansenii* a través del alimento, tuvo un efecto estimulante *in vitro* sobre la respuesta inmune innata celular y humoral en juveniles de la dorada.
3. La actividad del sistema antioxidante (representado por la enzima superóxido dismutasa) se vio estimulada *in vivo* en la dorada por la suplementación en la dieta de la levadura.
4. La levadura *D. hansenii* induce fuertemente la expresión de mRNA de *Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  en el riñón cefálico.
5. Los resultados obtenidos proporcionan nuevas evidencias, de que la levadura viva *D. hansenii* cepa CBS 8339 puede ser considerada un probiótico de interés para la acuicultura de la dorada *Sparus aurata*.

## DISCUSIÓN GENERAL

La levadura marina viva usada en el presente trabajo fue seleccionada debido a que estudios microbiológicos previos la señalaban como un buen candidato para ser empleado como probiótico en acuicultura. Su adhesión al tracto gastrointestinal de los peces, su inocuidad y su habilidad para producir poliaminas constituyen algunas de sus características probióticas (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004). La relación entre probióticos-sistema inmune puede ser utilizada como una alternativa para el manejo de poblaciones bacterianas indeseables en los sistemas de cultivo. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la levadura marina *D. hansenii* sobre el sistema inmune de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y de la dorada *Sparus aurata* expuestas a diferentes agentes patógenos presentes en los sistemas de cultivos.

La cabrilla sardinera *M. rosacea* es una especie sujeta a nuevos estudios y propuesta como candidata para la acuicultura en la región Noroeste de México. Los índices hematológicos evaluados en esta especie en condiciones de cultivo intensivo nos proporcionan una herramienta útil para el monitoreo de salud y como referencia en estudios posteriores, siendo estos datos los primeros obtenidos para esta especie.

En un primer experimento, se evaluó la adhesión de la levadura marina al intestino de la cabrilla sardinera y la dorada. Los resultados observados en ambas especies nos muestran una fuerte adhesión de *D. hansenii* en el intestino, siendo considerada esta característica un importante criterio para la selección de probióticos (Salminen *et al.*, 1998). La capacidad de adhesión de la levadura marina *D. hansenii* al moco intestinal de otras especies puede ser relacionada con su presencia en la microflora natural de algunos teleósteos. En otros trabajos con levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* ha sido demostrado su adhesión y colonización en el moco de peces y humanos (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Kirjavainen *et al.*, 1998). La adhesión de la levadura y su colonización en el tracto gastrointestinal no es solo uno de los requisitos importantes en un probiótico, sino su permanencia en el mismo. En este estudio, al finalizar el ensayo experimental se tomaron muestras de intestino de cabrilla y dorada alimentadas con dietas suplementadas con levadura para corroborar la permanencia de ésta en el intestino de los peces en medio YPD-

agar. El resultado promedio de  $9.6 \times 10^3$  UFC demuestra el grado de colonización y permanencia de *D. hansenii*.

La levadura marina fue administrada con la dieta y evaluada en dos tratamientos, un tratamiento control y una dieta suplementada con levadura al 1.1% (correspondientes a  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) por 4 semanas; posteriormente los organismos fueron retados con el ectoparásito *Amyloodinium ocellatum*, como se describe en el bioensayo I. Durante el tiempo de exposición al parásito se observaron diferencias significativas en la mortalidad acumulada durante 7 días en los peces alimentados con la dieta suplementada con levadura respecto a la dieta control 40 y 90% respectivamente. El análisis microscópico realizado para el conteo de trofontes (etapa parasitaria) en las branquias de los peces infectados nos revela un caso agudo de amyloodiniosis; una de las enfermedades que más afectan a la acuicultura de peces marinos. La alta patogenicidad de este parásito puede ser atribuida al daño causado por el ataque de los trofontes a la piel de los peces y a severas alteraciones patológicas en las branquias (Kuperman and Matey, 1999).

Durante la infección con *A. ocellatum*, uno de los principales mecanismos de defensa del hospedero es la producción de anticuerpos (Woo, 1996; Cobb *et al.*, 1998). Ha sido ampliamente demostrado que los probióticos (bacterias y levaduras) pueden estimular la producción de anticuerpos en humanos (Malin *et al.*, 1996) y peces (Nikoskelainen *et al.*, 2003). Un efecto similar fue observado en el presente estudio en el grupo alimentado con levadura en su dieta, en donde la producción de IgM se vio significativamente aumentada. En los mamíferos, aves y peces, las inmunoglobulinas pueden unirse a antígenos para su eliminación por la activación de la ruta clásica del complemento, pudiendo indirectamente neutralizar a los patógenos (Overath *et al.*, 1999) incluso si se trata de una respuesta primaria (Sinyakov *et al.*, 2002) como lo fue en este experimento. De igual manera, los niveles de IgM en los peces retados con *Aeromonas hydrophila* (bioensayo II) aumentaron significativamente en los peces alimentados con *D. hansenii* con respecto a la dieta control.

Otro de los parámetros del sistema inmune que se vio significativamente estimulado en los tres experimentos fue la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa y catalasa. La SOD acelera la reacción de  $O_2^-$  a peróxido de hidrógeno y agua y puede ser considerada la primera línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno (Barnes *et*



*al.*, 1999). En el sistema inmune de los vertebrados, las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden generarse a partir de varios sucesos: uno de ellos es través de las células fagocíticas que producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno (Gamaley y Kluybin, 1999) o en casos de hipoxia, por la auto-oxidación de la hemoglobina, resultando en la generación de anión superóxido (Stocker y Frei, 1991). La exposición de los organismos a la producción de estos radicales libres puede aumentar las defensas antioxidantes representadas por la superóxido dismutasa, tal y como se observó en el bioensayo I. De acuerdo a trabajos previos, los niveles de esta enzima en las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida polymorpha* son menores a los de la levadura marina *D. hansenii* cepa C11, la cual constituye una fuente alterna para la obtención de la enzima superóxido dismutasa (Ochoa *et al.*, 1995). En el bioensayo II, se detectó un aumento significativo en la actividad de ambas enzimas antioxidantes a diferencia de los bioensayos I y III en donde solo fue detectado un aumento de la SOD. Ante la infección con *Aeromonas hydrophila* en los peces, el hígado y los riñones son los principales órganos blancos de una septicemia aguda (Cipriano, 2001). Estos órganos son atacados aparentemente por toxinas bacterianas presentando de esta manera una intensa actividad fagocítica por los macrófagos (Huizinga *et al.*, 1979) generando una producción elevada de radicales libres, producida por la combustión respiratoria durante la fagocitosis. La exposición de los organismos a los ataques pro-oxidativos puede incrementar las defensas antioxidantes, aumentando la síntesis de enzimas antioxidantes.

A nivel molecular y a diferencia del gen *HSP-70*, la expresión del gen *CAT* fue detectada en tejidos de hígado e intestino en los organismos alimentados con levadura en su dieta cuando fueron expuestos a la bacteria *A. hydrophila*. De esta manera, hay una correlación directa de la expresión del gen *CAT* en tejidos de hígado y los altos niveles basales de ésta enzima que fueron detectados en peces alimentados con levadura con respecto al control. El hígado es uno de los órganos donde el estrés oxidativo se presenta en mayores cantidades (Lin y Lin, 1997). La actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de radicales libres han sido correlacionados con varias condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo el estrés (Wojtaszek, 1997) como ocurrió en este estudio. El gen *HSP-70* solo se expresó en muestras de hígado en peces alimentados con levadura en sus

dietas y no infectados con la bacteria. En células no estresadas, hay una producción constitutiva de estas proteínas de estrés que son requeridas en varios aspectos en el metabolismo de las proteínas para mantener la homeostasis celular (Fink y Goto, 1998). Se recomienda para investigaciones futuras analizar los niveles de *HSP-70* por análisis inmunológicos como la técnica de ELISA utilizando diferentes tejidos para contrastar los niveles de expresión molecular con los índices basales.

En el tercer bioensayo se evaluaron varios parámetros del sistema inmune en leucocitos de juveniles de la dorada después de ser alimentados con levadura en su dieta. La actividad de fagocitosis, explosión respiratoria, citotoxicidad y peroxidasa se midieron *in vitro* en leucocitos de riñón cefálico. En los análisis antes mencionados, se observó un aumento significativo en peces alimentados con dietas suplementadas con *Debaryomyces hansenii*. Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos estructurales de la pared celular de muchas bacterias, levaduras y hongos (Rosenberger, 1976). Estos compuestos pueden estimular los mecanismos de defensa no-específicos a través de la activación de los macrófagos en peces (Kumari y Sahoo, 2006), como se observó en el presente estudio con juveniles de dorada *Sparus aurata*.

Los análisis de expresión molecular en este estudio fueron llevados a cabo para evaluar el efecto de la inclusión de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta sobre la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en hígado, riñón cefálico e intestino. De acuerdo a los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, se observa significativamente la expresión de los nueve genes evaluados (*Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$* ), en cDNA de riñón cefálico de peces alimentados con levadura en su dieta con respecto al grupo control. Selvarat *et al.* (2005) reportaron que la expresión de *IL-1 $\beta$*  en carpa fue inducida en macrófagos de riñón cefálico después de una aplicación con  $\beta$ -glucanos de levaduras. En peces el riñón cefálico es el principal órgano hematopoyético donde se lleva a cabo la producción y maduración de las células del sistema inmune. El presente trabajo demuestra que la levadura *D. hansenii* cepa CBS 8339 estimuló la expresión de genes relacionados con el sistema inmune a las cuatro semanas de alimentación, principalmente en el riñón cefálico. No obstante, se recomienda llevar a cabo muestreos a diferentes tiempos (semanas) y en diferentes tejidos, para determinar de

manera mas precisa y detallada los patrones de expresión de cada gen y detectar eventuales picos de expresión.

## CONCLUSIÓN GENERAL

1. La hipótesis planteada en el presente trabajo es aceptada, ya que en los tres bioensayos realizados se observa un efecto sobre el reforzamiento del sistema inmune y antioxidante, al adicionar la levadura marina *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta de la cabrilla sardinera *M. rosacea* y la dorada *S. aurata*.
2. La inclusión en la dieta de la levadura *D. hansenii* refuerza el sistema inmune de juveniles de la cabrilla sardinera cuando es expuesta al parásito *Amyloodinium ocellatum*, reflejado en una mayor supervivencia respecto a la dieta control.
3. La principal causa de mortalidad en los juveniles de cabrilla sardinera fue producido por la etapa parasitaria del ectoparásito *A. ocellatum* llamada “trofonte”, el cual se aloja principalmente en las branquias provocando sofocación, pérdida del apetito, asfixia y muerte.
4. La incorporación en la dieta de la levadura *D. hansenii* aumenta la respuesta inmune humoral (IgM) y antioxidante (SOD) de la cabrilla sardinera después de ser retadas con la bacteria *Aeromonas hydrophila*.
5. La incorporación en la dieta de la levadura *D. hansenii* aumenta los niveles de expresión de *CAT* y *HSP-70* en hígado.
6. Los estudios del sistema inmune innato en leucocitos de riñón cefálico de la dorada son aumentados por la inclusión de la levadura en la dieta a diferencia de los estudios realizados en suero de complemento y peroxidasa.
7. La incorporación de la levadura en la dieta aumenta la respuesta antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en la dorada.
8. Los efectos de la incorporación de levadura en la dieta se ven reflejados en un aumento en los niveles de expresión de *Hep*, *IgM*, *TCR $\beta$* , *NCCRP-1*, *MHCII $\alpha$* , *CSF-1R*, *C3*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  en riñón cefálico de la dorada.

## LITERATURA CITADA

- Abele, D., Puntarulo, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp Bioch Phys, Part A* 138, 405-415.
- Aguilera, H. P., Noriega, C. P. 1985. La tilapia y su cultivo. Secretaria de Pesca, Fondepesca, México. p. 98.
- Aguirre, G., Ascencio, F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Rec Res Deve Microb*, 4, 333-348.
- Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L., Caldwell, M. D. 1989. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J. Immunol.* 143, 3641-3660.
- Alexander, J. B. 1985. Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. En: *Fish Immunology*. M. J. Manning and M. F. Tatner. Academic Press. Londres. 133-140.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A. 2002. *Cryptosporidium molnarin* sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol* 32, 1007-1021.
- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T. 2000. Effects of dietary B-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Scien* 66, 1068-1075.
- Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2, 281-307.
- Anderson, D. P., Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defence mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol* 34, 379-389.
- Anderson, D. P., Siwicki, A. K. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In: *Fish Health Section* (ed. By M. Shari, J. R. Arthur & R. P. Subasinghe), pp. 185-202. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Anderson, R.S. 1996. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrates hemocytes: Immunological significance. En: *New directions in Invertebrate Immunology*. Söderhäll, K., Iwanaga, S. y Vasta, G., Editor., SOS. Publications.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb Ecol* 30, 321-4.
- Andlid, T., Vazquez-Juarez, R., Gustafsson, L. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal Mucus. *Molec Mar Biol Biotech* 7, 115-126.
- Anon, A. 1995. More tsipoura on our table. *Foods and Drinks*, 179, 71-72.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn., ed. P. Cunniff. AOAC International, Arlington, Virginia, USA.
- Asada, K. 1978. Active oxygen suppression of formation and scavenging. *Protein, Nucleic acid and enzyme*. Tokio. 23, 200-13.

- Atamanalp, M., Yanik, T. 2003. Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Mancozeb. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27, 1213-7.
- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., Griffith, D. R. H. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal fish dis 18, 93-96.
- Autin, B., Austin, D. A. 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Chichester, England. p. 334.
- Balcázar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Calvo, C., Márquez, I., Girones O., Muzquiz, J. L. 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British Journal nutrit 97, 522-527.
- Balcázar, J. L. 2002. Use of probiotics in aquaculture: general aspects. In: de Blas, I. (Ed.), Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, Zaragoza, Spain, p. 877-881.
- Balcázar, J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Evora, M. D., Muzquiz, J. L. 2006b. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. Microb ecol health dis 18, 61-63.
- Bansal, P. K., Mondal, A. K. 2000. Yeast sequencing report. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the hog1D strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16, 81-88.
- Bardocz, S., White, A., Grant, G., Brown, D. S., Duguid, T. G., Pusztai, A. 1996. Uptake and bioavailability of dietary polyamines. Biochem. Soc. Trans. 24, p.2265.
- Barnes, A.C., Balebona, M. C., Horne, M. T., Ellis, A. E., 1999. Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. Piscida and their roles in resistance to reactive oxygen species. Microbiol 145, 483-94.
- Baronian, K. H. R. 2004. The use of yeasts and moulds as sensing elements in biosensors. Biosens Bioelec 19, 953-962.
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integ Comp Biol 42, 517-525.
- Bayne, C. J., Levy, S. 1991. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. Journal Leuk Biol 50,554-60.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44, 276-86.
- Bergljót, M. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immun 20, 137-151.
- Bernstein, R. M., Schluter, S. F., Marchalonis, J. J. 1998. Immunity. En: The physiology of fishes. D.H. Evans. 2<sup>a</sup> ed. CRC Press LLC. USA. 215-242.
- Bibel, D. J. 1988. Elie Metchnikoff's bacillus of long life. ASM News 54, 661-665.
- Birkbeck, T. H., Ringø, E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel W, Naughton P (eds) Microbial ecology in growing animals. Elsevier, Edinburgh, p. 208-234.
- Bogwald, J., Johnson, E., Seljelid, R. 1982. The Cytotoxic Effect of Mouse Macrophages stimulated in Vitro by a beta-1,3,-D-Glucan from yeast cell walls J. Immunol 15, 297-304.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Bioch* 72, 248-254.
- Bradshaw, C. M., Richard, A. S. Sigel, M. M. 1971. IgM antibodies in fish mucus. *Proc. Soc Exp Biol Med* 136, 1122-1124.
- Breuer, U. Harms, H. 2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential, *Yeast* 23, 415-437.
- Brock, J. A., Leamaster, B. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. In: wyban j. (ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. World aquaculture society. Usa. p. 212-226.
- Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control *lactococcosis* and *streptococcosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 28, 693-701.
- Buentello, G. A., Reyes, B. M. Romero, G. M. and Ascencio, V. F. 2007. Effects of Dietary Arginine on Hematological Parameters and Innate Immune Function of Channel Catfish. *J Aquatic Anim Health* 19, 195-203.
- Buts, J. P., Keyser, N., Raedemaeker, L. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, *Pediatric Res* 4, 522-527.
- Byrne, A., Reen, D. J. 2002. Lipopolysaccharide induces rapid production on IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168, 1968-1977.
- Caceres, B. M., Masumoto, T., Galindo, V. J., Hosokawa, H. 2004. Efecto del levamisol mediante administración oral en la actividad de la respuesta inmune innata en juveniles de lenguado Japones (*Paralichthys olivaceus*). En: Comunicación científica civa 2004. (<http://www.civa2004.org>), p. 625-634.
- Caggiano, M. 2000. Quality in harvesting and post-harvesting procedures - influence on quality. Fish freshness and quality assessment for seabass and seabream. Global quality assessment in Mediterranean aquaculture Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2000. 149 pp. (Cahiers Options Méditerranéennes No. 51). (available on <http://www.ciheam.org>).
- Camus, A. C., Durborow, R. M., Hemstreet, W. G., Thune, R. L., Hawke, J. P. 1998. *Aeromonas* bacterial infections-motile aeromonad septicemia. Souther Regional Aquaculture Center Publication No. 478.
- Carroll, M. C., Prodeus, A. P. 1998. Linkages of innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 36-40.
- Chabrillon, M., Bordas, M. A., Moríñigo, M. A., Balebona, M. C. 2004. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components. *Aquac Res* 35, 403-409.
- Chabrillon, M., Rico, R. M., Balebona, M. C., Moríñigo, M. 2005. Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. *J Fish Dis* 28, 229-37.
- Chang, C. I., Liu, W. Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis* 5, 311-315.

- Chen, S. L., Li, W., Meng, L., Sha, Z. X., Wang, Z. J., Ren, G. C. 2007. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish shellfish immunol 22, 172-181.
- Chen, S. L., Xu, M. Y., Hu, S. N., Li, L. 2004. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen. Aquaculture 240, 115-130.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S., Kim, S. H. 2006. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Letters in Applied Microbiology 42, 452-458.
- Cipriano, R. C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish Disease Leaflet 68, p. 24.
- Civera, R. and Guillaume, J. C., 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 77, 145-156.
- Clark, T. G., Dickerson, H. W. 1997. Antibody-mediated effects on parasite behavior: evidence of a novel mechanism of immunity against a parasitic protist. Parasitology Today 13, 477-480.
- Clarke, J. R., Tyms, A. S. 1991. Polyamine biosynthesis in cells infected with different clinical isolates of human cytomegalovirus. J Med Virol 34, 212-216.
- Clem, L. W., Sizemore, R. C., Ellsaesser, C. F., Miller, N. W. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. Dev Comp Immunol 9, 803-809.
- Cobb, C. S., Levy, M. G., Noga, E. J. 1998. Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response. Dis. Aq. Org. 34, 125-33.
- Colorni, A., 1998. Pathobiology of marine organisms cultured in the tropics. In: De Silva, S.S. (Ed.), Tropical Mariculture. Academic Press, U.S.A, p. 209-255.
- Conroy, D. A. 1984. Agents: Bacteria. In: O. Kinne (Edit.), Diseases of Marine Animals I, 4, Biol. Asalt Helgol., Hamburgo, R. F. A., p. 48-88.
- Consejería de Agricultura y Pesca, 2001. «Especies de Interés Pesquero en el Litoral de Andalucía». Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Sevilla.
- Consejo de Europa. Directiva 91/67 de 28 De enero de 1991, relativa a las condiciones De policía sanitaria aplicables a la puesta en El mercado de animales y productos de la acuicultura. Diario oficial de las Comunidades europeas (doce) l 46, de 19 de febrero de 1991.
- Criscitiello, M. F., Wermenstam, N. E., Pilstrom, L., McKinney, E. C. 2004. Allelic polymorphism of T-cell receptor constant domains is widespread in fishes. Immunogenetics 55, 818-824.
- Cruz-Lacierda, E. R., Maeno, Y., Pineda, A. J., Matey, V. E. 2004. Mass mortality of hatchery-reared milkfish (*Chanos chanos*) and mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) caused by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida). Aquaculture 236, 85-94.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry. Vet Immunol Immunopathol 71, 161-71.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. 2003. Tumoricidal activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) natural cytotoxic cells: the role played *in vitro* and *in vivo* by retinol acetate. Fish Shellfish Immunol 14, 133-144.



- Cuesta, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. 2005. Molecular characterization of the nonspecific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1) demonstrates gilthead seabream NCC heterogeneity. *Dev comp immunol* 29, 637-650.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M. A. 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet Immun Immun* 101, 203-210.
- Cunningham-Rundles, S., Lin, D. H. 1998. Nutrition and the immune system of the gut. *Nutrition* 14, 573-579.
- Cushing, J. E. 1945. A comparative study of complement. I. The specific inactivation of the components. *J Immunol* 50, 61-74.
- Czene, S., Tiback, M., Harms-Ringdahl, M., 1997. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J* 15, 337-341.
- De Simone, C., Bianchi Salvadori, B., Negri, R., Ferrazi, M., Baldinelli, L., Vesely, R., 1986. The adjuvant effect of yogurt on the production of  $\gamma$ -interferon by Con A-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr Rep Int* 33, 419-433.
- Decker, E. A., Xu, Z. 1998. Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technol.* 52, 54-59.
- Derham, B. K., Harding, J. J. 1999. Alfa-crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retinal Eye Res* 18, 463-509.
- Díaz-Uribe, J. G., Elorduy, G. J., González-Valdovinos, M. T. 2001. Age and growth of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in the southern Gulf of California, México. *Pac Sci* 55, 171-182.
- Douglas, L. J. 1989. Adhesion to surfaces. In: *The Yeast*. Rose, A. H. and Harrison, J. S. (Eds). New York: Academic Press, 239-275.
- Drabkin, D. L., Austin, J. H. 1935. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *J Biol Chem* 112, 51.
- Duncan, P. L., Lovell, R. T. 1994. Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, for growth, hematopoiesis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture* 127, 233-244.
- EL-Haroun, E. R., Goda, A. MA-S and Kabir, C. M. A. 2006. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Res* 37, 1473-1480.
- Ellis, A. E. 1998. Fish immune system. In: Delves, P.J., Roitt, I.M. (Eds.). *Encyclopedia of Immunology*. Academic Press, London, p. 920-926.
- Ellis, A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9, 291-308.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25, 827-39.
- Esteban, M. A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Tissue Res* 293, 133-141.
- Evans, P. T. 1989. Do polyamines have role in plant development?. *Plant Physiol. Annu Rev Plant Mol Biol* 40, 235-269.

- FAO, 2007. «*El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2006*» (Sofia 2006). Depósito de documentos de la FAO, Roma.
- Feder, M. E., Hofman, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-282.
- Fernández, A. B., Ruíz, I., De Blas, I. 2003. El sistema inmune de los teleosteos (II): Respuesta inmune inespecifica. *Revista AquaTIC*, nº 19, p. 1-7.
- Fink, A. L., Goto, Y. 1998. Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins: *Structure, Function, and Mode of Action*. New York: Marcel Dekker.
- Fischer, U., Utke, K., Ototake, M., Dijkstra, J. M., Köllner, B. 2003. Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 27, 323-337.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 64, 97-112.
- Fuller, R. 1997. Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall: London.
- Galindo-Villegas, J., Hosokawa, H. 2005. Immunostimulants in marine fish diets. *International aqua feed* 8, 30-39.
- Gamaley, I. A., Kluybin, I. V. 1999. Roles of Reactive Oxygen Species: Signaling and Regulation of Cellular Functions. *Int Review Cytology*. 188:203-255.
- Gastesoupe, F. J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) against pathogenic vibrio. *Aquat Living Resour* 7:277-282.
- Gastesoupe J. F. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, article IN PRESS.
- Gastesoupe, F. J. 1995. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquacul Internat* 3, 150-154.
- Gastesoupe, F. J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10, 239-246.
- Gastesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gastesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Gatlin D. M., Li, P., Wang, X., Burr, G. S., Castille, F., Lawrence, A. L. 2006. Potential application of Prebiotics in Aquaculture. En: *Avances en nutrición acuícolas VIII*. VIII Simposium internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, Nuevo León, México.
- Gatlin, D. M., 2002. Nutrition and fish health. In: Halver, J.E., Hardy, R.W., (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press: San Diego CA, USA, p. 671-702.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiol* 352,279-285.
- Goodyear, C. P., Schirripa, M. J. 1991. The red grouper fishery of the Gulf of México. *Nath. Mar. Fish. Serv., SEFC, Miami Lab. Contrib. No. MIA-90/91-86.80*.
- Gracia, V. L., Kiewek, M. y Maldonado, M. 2004. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture* 237, 485-498.
- Hardie, L. J., Ellis, A. E., Secombes, C. J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum* growth

- concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Dis. Aquat. Org.* 25, 175-83.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C., Secombes, C. J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 95, 201-214.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C., Secombes, C. J. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 87, 1-13.
- Hasko, G., Kuhel, D. G., Marton, A., Nemeth, Z. H., Deitch, E. A., and Szabo, C. 2000. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma. *Shock*. 14,144-149.
- Heemstra, P. C., Randall, J. E. 1993. FAO species catalogue. Grouper of the world (family *Serranidae*, subfamily *epinephelinae*). FAO fish synops. 125, 16.
- Herman, M., Ménard, S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular Molecular Life Scienc* 59, 1151-1165.
- Heys, S. D., Schofield, A. C. and Wahle, K. W. J. 2004. Immunonutrition in clinical practice: what is the current evidence?. *Nutr Hosp* 6, 325-332.
- Hirono, I., Hwang, J. Y., Ono, Y., Kurobe, T., Ohira, T., Nozaki, R., Aoki, T. 2005. Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS Journal* 272, 5257-5264.
- Huizinga, H. W., Esch, G. W. Hazen, T. C. 1979. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *J Fish Dis* 2, 263-277.
- Huizinga, H. W., G. W. Esch, and T. C. Hazen. 1979. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *J Fish Dis* 2: 263 - 277.
- Imzilh, B., Lafdal, O., Barakate, M., Hassani, I., Ouhdouch, Boussaid, A. 1997. Pril-Ampicillin-Dextrin-Ethanol Agar for the Isolation and Quantification of *Aeromonas* spp. from Polluted Environmental Waters. *J Appl Microbiol* 82, 557-566.
- Ingram, G. A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection- a review. *J Fish Biol* 12, 23-60.
- Ingram, G. A. 1990. Complement-fixation test. En: *Techniques in fish immunology*. FITC-1. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson y W.B. Muiswinkel. SOS Publications. Fair Haven, New Jersey. USA. p. 25-44.
- Irianto, A., Austin, B. 2002. Probiotics in Aquaculture. *J fish dis* 5,11-633.
- Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 25, 333-342.
- Irianto, A., Austin, B., 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 26, 59-62.
- Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Salminen, S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?. *Gut* 50, 54-59.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotics, effects on immunity. *Americal J Clin Nutrit* 73, 444S-450.
- Itami, T., Takahashi, Y., Oamoto, T., Kubono, K. 1988. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54,1611-1617.

- IUCN. 2003. IUCN Red List of Threatened Species [www.redlist.org](http://www.redlist.org).
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K. 2004. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? *J Exp. Biol Commentary* 207, 15-19.
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B. and Vijayan, M. M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish* 8, 35-56.
- Iwama, G. k., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B. and Ackerman, P. A. 1999. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoologist* 39, 901-909.
- Janda, J. M., Abbott, S. L. 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*; an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered question. *Clinic infect Dis* 27, 332-344.
- Jaso-Friedmann, L, Leary, J. H. 1997. NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells. 3ed, Evans D. L., *Mol immunol* 34, 955-965.
- Jeney, G., Anderson, D. P. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhances the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116, 315.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture, Amsterdam*, 154, 1-15.
- Kabata, Z. 1985. *Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics*. Taylor and Francis, Philadelphia, USA. p. 318.
- Kim, D. H., Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 21, 513-524.
- Kinoshita, T. 1991. Biology of complement: the overture. *Immunol Today* 12, 291-295.
- Kirjavainen, P. V., Ouweland, A. C., Isolauri, E., Salminen, S. T. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *J Appl Microbiol* 85, 769-777.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldshmidt, T. J. Bishop, G. A., Teasedale, R., Koretzy, G. A., Kinman, D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 6, 546-549.
- Kumar, R., Mukherjee, C. S., Pani, P. K. and Pal, A. K. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.) *Aquaculture Res* 37, 1215-1221.
- Kuperman, I. B., Matey, E. V. 1999. Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. *Dis Aquat Org* 39, 65-73.
- Laird, L. y Needham, T. 1988. The immune system. En: *Salmon and Trout Farming*. Ellis Hordwood Series in Aquaculture and Fisheries support. England. p. 44-46.
- Landolt, M. L. 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* 79, 193-206.
- Li, P., Burr, G.S., Go, J., Whiteman, K.W., Davis, K.B., Vega, R.R., Neill, W.H., Gatlin, D.M. 2005. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singularly or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture Res*. 36, 1120-27.
- Li, P., Lewis, D. H., Gatlin, D. M. 2004. Dietary oligonucleotide influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol* 16, 561-569.

- Lin, C. T., Lin, M. T. 1997. The distribution and properties of superoxide dismutase in different Tilapia tissues. *J Chin Agric Chem Soc* 35, 107-11.
- Lindenstrøm, T., Buchmann, K., Secombes, C. J. 2003. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1<sub>β</sub> expression in rainbow trout skin. *Fish and Shellfish Immunol* 15, 107-115.
- Livingstone, D. R., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L. D., Porte, C., Fitzpatrick, P. J., Förlin, L., Nasi, C., Fossato, V., Wootton, N., Goldfarb, P. 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar Environ Res* 39, 235-240.
- Lo, D., Feng, L., Carson, M. J., Crowley, M., Pauza, M., Nguyen, A. 1999. Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol Rev* 169, 225-39.
- Lobb, C. J., Clem, L. W. 1981. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Dev Comp Immunol* 5, 271-282.
- Løvaas, E. 1991. Antioxidative effects of polyamines. *JAOCS* 68: 353-358.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellf Immun* 20, 137-151.
- Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., Isolauri, E. 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. *Ann Nutr Metab* 40, 137-145.
- Marton, L. J., Morris, D. R. 1987. Molecular and cellular functions of polyamines. In: *Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies*. McCann P. P., Pegg A. E., Sjoerdsma A (editors). London: Academic Press.
- McCord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *The Journal of Biol. Chem.* Vol. 244, no. 22, p. 6049-6055.
- McCracken, V. J., Gaskins, H. R. 1999. Probiotics and the immune system. In: Tannock GW, editor. *Probiotics: A Critical Review*. Wymondham, UK Horizon Scientific Press p. 85-112.
- Méndez, J. D, Hicks J. J. 1987. Metabolismo de poliaminas en microorganismos. *Rev Soc Quim Mex.* 31, 4-23.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 64,5403-5.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (mapa). Real decreto 1882/1994, de 16 de septiembre, por el que Se establece las condiciones de sanidad Animal aplicables a la puesta en el mercado De animales y productos de la acuicultura. Boletín oficial del estado (boe), nº 249 de 18 de octubre de 1994.
- Mizra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C., Pradhan, J. 2007. Effects of dietary vitamin c on immunity, growth and survival of indian major carp *labeo rohita*, fingerlings. *Aquac nutrit* 13, 35-44.
- Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastri, R. 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, Vol.1. FAO, Rome, Italy. p. 194.

- Morrison, D. C., Kline, L. F. 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide (LPS). *J Immunol* 118, 362-368.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, y E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191, 89-107.
- Munro, J., Audet, C., Besner, M., Dutil, J. D. 1994. Physiological response of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to low salinity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51, 2448-2456.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol* 25, 807-25.
- Neves, C. A., Santos, E. A., Bainy, A. C. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Dis Aquat Organ* 39, 155-158.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., Liliusa, E-M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellf Immun* 15, 443-452.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. and Ouwehand, A.C. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied Environm Microb* 67, 2430-2435.
- Noga, E. J., Levy, M. G. 1995. Dinoflagellida (*Phylum sarcomastigophora*). In: Woo, P.T.K. (Ed.), *Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections*, vol. 1. CAB International, Cambridge, UK, p. 1-25.
- Ochoa, J. L., Ramírez-Orozco, M., Hernández-Saavedra, N. Y., Hernández-Saavedra, D., Sánchez-Paz, A. 1995. Halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* as an alternative source of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD). *J Mar Biotechnol* 3, 224-227.
- Ochoa, J. L., Vazquez, J. R. 2004. Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. *Universidad y Ciencia. Número Especial I*: 39-50.
- Oficina internacional de epizootias (oie). Código internacional para los animales Acuáticos. Oie fish disease commission. Paris. France. 2001. Url: [http://www.oie.int/Esp/normes/fcode/e\\_summry.htm](http://www.oie.int/Esp/normes/fcode/e_summry.htm)
- Orbea, A., Fahimi, H. D., Cajaraville, M. P. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Immunoch Cell Biol* 114, 393-404.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immun* 85, 41-50.
- Ortuño, J., Esteban, M. A., Mulero, V., Meseguer, J. 1998. Methods for studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream (*Sparus aurata* L.) serum. In: Barnes AC, Davidson GA, Hiney MP, McIntosh D, editors. *Methodology in Fish Diseases Research*. Aberdeen: Albion Press: p. 97-100.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Gronlund, M. M., Isolauri E., Salminen S. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Internat Dairy Journal* 9, 623-630.

- Overath P, Haag J, Mameza MG, Lischke A. Freshwater fish trypanosomes: definition of two types, host control by antibodies and lack of antigenic variation. *Parasitology* 1999;119:591-601.
- Ozmen, I., Bayir, A., Cengiz, M., Sirkesioglu, A. N., Atamanalp, M. 2004. Effects of water reuse system on antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Vet Med Czech* 49, 373-378
- Palenzuela, O. 2006. Mixozoan infections in Mediterranean mariculture. *Parasitologia* 48, 1-2.
- Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H. 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 243, 241-54.
- Panigrahi A, Kiron V, Satoh, S. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immun* 31, 372-382
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterin immunol Immunop* 102, 379-388.
- Paperna, I. 1980. *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *J Fish Dis* 3, 363-372.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim Nutr Health* 29, 4-8.
- Peláez-Mendoza, A. K. 1997. Hábitos alimenticios de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* Street 1877 (Pisces: Serranidae) en la bahía de La Paz B. C. S. y zonas adyacentes. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Mayo 1997.
- Peters, L. D., Porte, C., Albaigés, J., Livingstone, D. R. 1994. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the North coast of Spain. *Mar Pollut Bull* 28, 229-304.
- Picchiatti, S., Mazzini, M., Taddei, A. R., Renna, R., Fausto, A. M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A., Abelli, L. 2006. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol* 22, 57-67.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. 2006 Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*); *Vet Immunol Immunopathol* 113, 339-347.
- Polla, B. S., Bachelet, M., Elia, G., Santoro, G. M., 1998. Stress proteins in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 851, 75-85.
- Popoff, M., Vernon, M. 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J General Microb* 94, 11-22.
- Popovic, N. T., Teskeredzic, E., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R. 2000. *Aeromonas hydrophila* isolated from wild freshwater fish in Croatia. *Veterin Res Commun* 24, 371-377.

- Quade, M. J., Roth, J. A. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol* 58, 239-248.
- Quesada, H. A., Pozo, M., Rosa, P. J. 2004. Selección de probióticos bacterianos para el uso en el cultivo de camaron. En: Comunicación Técnica CIVA 2004 (<http://www.civa2004.org>), 97-100.
- Raa, J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev Fish Sc* 4, 229–288.
- Raa, R., Rørstad, G., Engstad, R., Robertsen, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. En: shariff m, subasighe rp, Arthur jr, eds. *Diseases in asian Aquaculture*. Volume 1. Manila: fish health Section, asian fisheries society, 39-50.
- Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., Buchmann, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis* 26, 495-498.
- Ringo, E., Gatesoupe, F. J. 1998. Lactic acid bacteria in fish; a review. *Aquaculture* 160, 177-203.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C. Burrells, C., Williams, P., Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.
- Rocha, J. M., Rocha, E., Resende, D. A., Lobo-da-Cunha, A. 2003. Measurement of peroxisomal enzyme activities in the liver of brown trout (*Salmo trutta*), using spectrophotometric methods. *BMC Biochemistry* 4, 1-9.
- Rodríguez, A., Cuesta, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. 2004. The effect of dietary administration of the fungus *Mucor circinelloides* on non-specific immune responses of gilthead seabream. *Fish shellfish immunol* 16, 241-249.
- Rodríguez, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. 2003. Phagocytosis and peroxidase response to yeast cells. *Anatomical Record* 272, 415-23.
- Rodríguez, J. 2002. Análisis ecológico de la comunidad de peces de la isla Espíritu Santo y la montaña submarina de El bajo Espíritu Santo en el sur del golfo de California, México. Doctoral tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México.
- Rosenberger R.F. (1976) The cell wall. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 2, Biosynthesis and Metabolism (ed. by J.E. Smith & D.R. Berry), pp. 328–334. Edward Arnold, London.
- Rosenblatt, R. H., Zahuranec, B. J. 1967. The eastern Pacific grouper of the genus *Mycteroperca*, including a new species. *Calif. Fish Game*, 53, 228-245.
- Ruiz, Z. I., De Blas, G. I., Clavero, V. J. L., Muzquiz, M. J. L. 2002. Implementación eficaz de una estrategia en el control y erradicación de las enfermedades de los peces: el modelo de Aragón (España). CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 459-474.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C. 2001. Effect of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish Shellfish Immunol* 11, 683-695.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.



- Salinas, I. Cuesta, Esteban, M. A., Meseguer, J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish shellfish immunol* 19, 67-77.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, 147-71.
- Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y., Gorbach, S. L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects* (ed. by S. Salminen & A. von Wright), pp. 211–253. Marcel Dekker, New York.
- Schaperclaus, W. 1954. *Handbuch der Fischkrankheiten*. Akademie Verlag, Berlin.
- Schifferli, J. A., Ng, Y. C., Peters, D. K. 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* 315, 488-495.
- Sealey, W. M., Gatlin III, D. M. 2001. Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish. En: *lim c, webster cd, ed. Nutrition and fish health*. New york: the haworth press, 103-18.
- Secombes, C. J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol* 4, 421-436.
- Secombes, C. J., Hardie, L. J., Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an up date. *Fish Shellfish Immunol* 6, 291-304.
- Secombes, C. J., Manning, M. J., Ellis, A. E. 1982. The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of the carp *Cyprinus carpio* L. *J Exp Zool.* 220, 277-287.
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 19, 293–306.
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2006. Effect of lipopolysaccharide (LPS) administration on survival and some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila* (Communicated).
- Shaharom-Harrison, F. M., Anderson, I. G., Siti, A. Z., Shazili, N. A. M., Ang, K. J., Azmi, T. L. 1990. Epizootics of Malaysian cultured freshwater pond fishes by *Piscinoodinium pillularae* (Schaperclaus, 1954) Lom, 1981. *Aquaculture* 86, 127-138.
- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. In: Guthrie, Ch. and Fink, G. R. (Eds). *Methods in Enzymology*, 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Acad. Press, NY, p. 3-21.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., Fallon, R. D. 1987. Use the monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl Environ Microbiol* 53, 958-65.
- Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Van Olst, J. C. 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 269, 2232-7.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Lim, C. 2001. Immunity and disease resistance in fish. In: *Lim, C., Webster, C. D. (Ed.), Nutrition and fish Health*. Binghamton, New York; Food Products Press p. 149-162.

- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Plumb, J. A. 1997. Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet Immunol Immunopathol* 58,181-190.
- Silveira, C. R. 2005. Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Sinyakov MS, Dror M, Zhevelev HM, Margel S, Avtalion RR. 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* 20, 3668-3674.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 41, 125-139.
- Siwicki, A. K. 1989: Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol* 13, 87-91.
- Snieszko, S. F. 1957. Genus IV. *Aeromonas* Kluyver and van Niel 1936. In: R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith, eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland. p. 189-193.
- Somamoto, T., Yoshiura, Y., Sato, A., Nakao, M., Nakanishi, T., Okamoto, N., Ototake, M. 2006. Expression profiles of TCR $\beta$  and CD8 $\alpha$  mRNA correlate with virus-specific cell-mediated cytotoxic activity in ginbuna crucian carp. *Virology* 348, 370-377.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environm Microbiol* 3, 755-65.
- Stickney, R. R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc., Toronto, Canada. p. 1063.
- Stocker, R., Frei, B. 1991. Endogenous Antioxidant Defences in Human Blood Plasma. En: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies (ed). Academic Press Limited. pp 213-243.
- Subasinghe, R. 1997. Fish health and quarantine. In: *Review of the State of the World Aquaculture*. FAO Fisheries circular no. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. p. 45-49.
- Sullivan, D. J. O. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of agriculture food. Chemistry* 49, 1751-1760.
- Swamm, M. M. 1969. Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. H.S.M.S.O. London, U.K.
- Tabor, C. W., Tabor, H. 1984. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53,749-790.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, C.S., Lee, W.J., Yuge, K., Koshio, S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries scienc* 2, 310-21.
- Teixeria, H. D., Schumacher, R. I., Meneghini, R. 1998. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells over-expressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci.*, 95, 7872-7875.

- Thompson, K. D., Tatner, M. F., Henderson, R. J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrit* 2, 21-31.
- Thorbecke, G. L., Amin, A. R. and Tsiagbe, V. K. 1994. Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB journal* 8, 832-840.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., Romalde, J. L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37-61.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., Vázquez, J. R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture* 234, 415-27.
- Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez, J.R., Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204, 113-23.
- Trust, T. J., Bull, L. M., Currie, B. R., Buckley, J. T. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 36, 1174-1179.
- Tu, C., Shih, C., Lin, Y., Wang, W. 2002. Amyloodinium spp and Centrocestus sp. infection in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Taiwan Vet. J.* 28, 305-11.
- Uma, A. J., Abraham, M. J., Prince, J., Sundararaj, V. 1999. Effects of probiotics feed supplement on performance and disease resistance of Indian White Shrimp *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Journal of Aquaculture of the Tropics* 14, 159-164.
- Vargas-Albores, F., Latchford, J., Scholz, V., Garcia, D. G., Ricque, D., Cruz, S. L. 1998. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 76, 271-283.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* *Letters in Applied Microbiology*, 36, 83-87.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L. 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdner*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6, 64-71.
- Vela, V. S., Ojeda, G. P. J. 2007. *Acuicultura: La Revolución Azul*. Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, 2007.
- Ventura, M. T., Grizzle, J. M. 1988. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Dis* 11,397-407.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol molecular biol reviews* 64, 655-671.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B. 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin Diag Lab Immunol* 9, 1318-1323.
- Wang, G. I. J. 1985. Feasibility of using catalase activity as an index of microbial loads on food surface. M.S. Thesis. Kansas State University. Manhattan, KS.

- Wang, X. H., Leung, K. Y. 2000. Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology* 146, 989–998.
- Wang, X., Dickerson, H. W. 2002. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 176-81.
- Warner, H. R. 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biol Medic* 3, 249-258.
- Watts, M., Munday, B. L., Burke, C. M. 2001. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. *Dev Comp Immunol* 19, 153-164.
- Wilhelm, F. D. 1996. Antioxidant defenses in fish: a comparative approach. *Brazilian Journal oMed Biol Res* 29, 1735-1742.
- Wilhelm, F. D., Boveris, A. 1993. Anti-oxidant defenses in marine fish I. Teleosts. *Comp Biochem Physiol* 106, 409-413.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 15, 681-692.
- Woo, P. T. K. 1996. Protective immune responses of fish to parasitic flagellates. *Ann Rev Fish Dis* 6, 121-31.
- Yada, T., Nagae, M., Moriyama, S., Azuma, T., 1999. Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 115, 46-52.
- Yambot, A. V., Song, Y. L. 2006. Immunization of grouper, *Epinephelus coioides*, confers protection against a protozoan parasite, *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture* 260, 1-9.
- Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. En: *Techniques in fish immunology*. FITC-2. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, S.L. Kaattari y A.F. Rowley. SOS Publications. Fair Haven, New Jersey. USA. p. 131-141.
- Zapata, A. 1985. Inmunología de peces teleósteos. En: *Primer curso teórico-práctico sobre acuicultura*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 123-205.

**Anexo II. Procedimiento para la obtención de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 y su adhesión al intestino de la cabrilla sardinera.**

Para este trabajo se utilizó la levadura marina *Debaryomyces hansenii* cepa CBS 8339 aislada de trucha arcoiris (Andlid *et al.*, 1995) reactivada en el laboratorio de Patogénesis Microbiana dentro de las instalaciones del CIBNOR. Las levaduras obtenidas se inocularon en medio YPD (agar 2%) suplementado con antibióticos (cloramfenicol, 1 mg l<sup>-1</sup>; sulfato de polimixina B, 1.6 mg l<sup>-1</sup>; amoxicilina, 2.5 mg l<sup>-1</sup>) utilizando varias diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) para hacer un conteo celular.

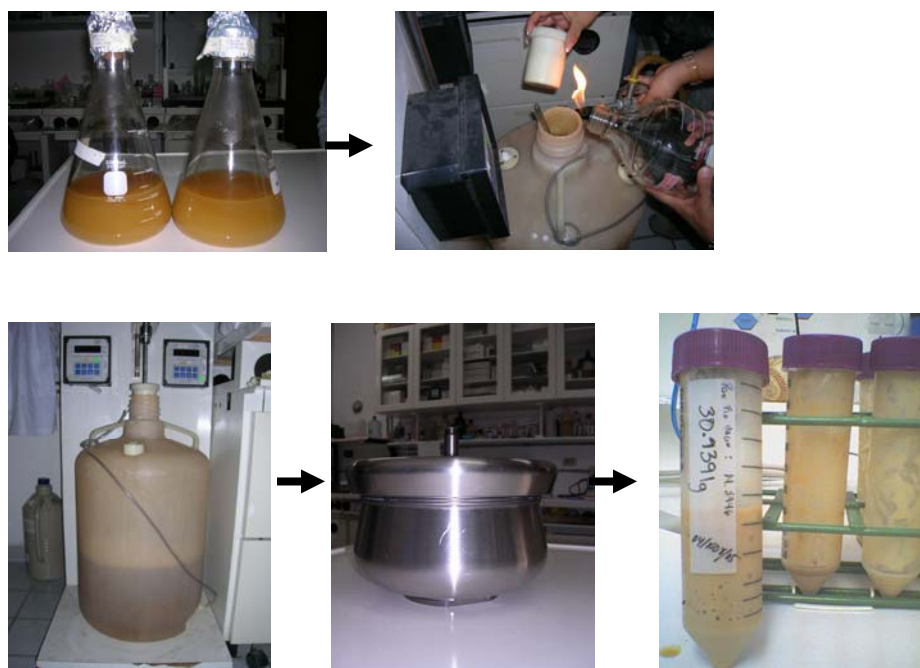


Figura 30. Reactivación y crecimiento de la levadura marina *D. hansenii* cepa CBS 8339 en medio YPD con antibióticos.

Para este estudio se reactivó la levadura en medio líquido YPD (Yeast extract-peptone-dextrose broth, Sherman, 1991) y se marcó con fluorescencia (Sherr *et al.*, 1987). Asépticamente se obtuvieron segmentos de intestino anterior los cuales fueron colocados en amortiguador de fosfatos (NaCl 137 mM, pH 7.4), posteriormente se adicionó el cultivo de las levaduras marcadas con 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl]amino)-fluorescein hydrochloride

(DTAF, Sigma, D 0531) por triplicado más un control. Los segmentos fueron incubados durante 30 min. a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos para eliminar el exceso de células. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se evaluó la cantidad de levaduras adheridas por campo (100X) mediante microscopía de fluorescencia y con el uso del software Image Pro Plus v. 4.5.0.19.

### Anexo III. Formulación y fabricación de las dietas experimentales.

Formulación:

El diseño de las dietas se formuló con el programa MIXIT-WIN® (Agricultural Software Consultants, San Diego, CA, USA) para juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* la cual se basó en la dieta desarrollada en el laboratorio de Nutrición del CIBNOR para peces marinos (Gracia et al., 2005). La composición de las dietas control y levadura se muestra en la Tabla XII. La composición química proximal de las dietas se muestra en la Tabla XIII.

Tabla XII. Composición en ingredientes de las dietas experimentales (g/100 g de alimento)

Ingrediente	Clave	ALIMENTOS (%)	
		Control	Levadura
Harina de sardina <sup>a</sup>	HP0312	21.56	21.56
Harina Integral Trigo <sup>b</sup>	HIT0312	14.07	13.78
Harina de Calamar	HC0303-1	15.00	15.00
Gluten de trigo <sup>c</sup>	GT0107-1	15.00	15.00
Conc. Prot sol pescado <sup>d</sup>	CPSP2000	20.00	20.00
Aceite de hígado de bacalao <sup>e</sup>	AHB0312-1	5.09	5.09
Lecitina Soya <sup>f</sup>	LS0303	4.87	4.87
Alginato de sodio <sup>g</sup>	Algimar 0703	2.00	2.00
<b>Levadura marina<sup>h</sup></b>	<b>CBS 8339</b>	<b>0.00</b>	<b>0.29</b>
Premezcla vitaminas <sup>i</sup>	PreVit0307 (NRC93)	0.70	0.70
Premezcla Minerales <sup>j</sup>	PreMin0307	0.50	0.50
Cloruro de Colina <sup>k</sup>	CloCol65%	0.13	0.13
Vitamina C <sup>l</sup>	Stay C 35% a.a.	0.08	0.08
BHT <sup>m</sup>	ICN 101162	0.002	0.002
L-lisina HCl	ICN 102218	0.50	0.50
L-arginina HCl	ICN 100743	0.50	0.50
		100.00	100.00

<sup>a</sup> Harina de sardina (66.2 proteína cruda, 9.2 lípidos g 100 g<sup>-1</sup>). Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México.

<sup>b</sup> Harina de trigo (12.7 proteína cruda, 0.7 lípidos g 100 g<sup>-1</sup>) y harina de calamar (71.2 proteína cruda, 3.3 lípidos g 100 g<sup>-1</sup>). Proteínas Marinas y Agropecuarias (Guadalajara, Jalisco, México).

<sup>c</sup> Gluten de trigo (83.2 proteína cruda, 1.5 lípidos g 100 g<sup>-1</sup>). Probst. (Toluca, Edo de México, México).

<sup>d</sup> Concentrado proteico de solubles de pescado (79.3 proteína cruda, 3.2 lípidos g 100 g<sup>-1</sup>). Apligen (México, D.F., México).

<sup>e</sup> Aceite de hígado de bacalao. Farmacia Paris (México, D.F, México).

<sup>f</sup> Lecitina de soya: Distribuidora de Alimentos Naturales y Nutricionales, S.A. de C.V. (México, D.F., México).

<sup>g</sup> Alginato de sodio, Sigma A-7128 (St. Louis, MO, U.S.A.).

<sup>h</sup> Cosechada en el laboratorio de Patogenesis Microbiana del CIBNOR.

<sup>i</sup> Premezcla de minerales ( $\text{g kg}^{-1}$ ). KCl, 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.09;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0234;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.005; KI, 0.005;  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0025;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.37.

<sup>j</sup> Premezcla de vitaminas (Todos los valores son expresados en:  $\text{mg kg}^{-1}$ , excepto donde son indicados). Vitamina A Retinol, 5000 IU; Vitamina D<sub>3</sub> 4000 IU; Vitamina E Tocoferol, 100; Vitamina K, 5; Tiamina, 60; Riboflavina, 25; Piridoxina, 50; dl-ácido Pantoténico, 75; Niacina, 40; Biotina, 1; Inositol, 400; Cianocobalamina, 0.2; Ácido Fólico, 10.

<sup>k</sup> Cloruro de colina (ICN-101382. Biomedicals Inc. Aurora, OH, U.S.A.).

<sup>l</sup> Vitamina C (35% agente reactivo) Roche, D.F., México.

<sup>m</sup> Hidroxitolueno butilado. (ICN-101162 Biomedicals Inc. Aurora, OH, U.S.A.).

Tabla XIII. Composición química proximal (g/100g de materia seca) de la dieta experimental y control.

<b>Análisis</b>	<b>Concentración (%)</b>
Proteína cruda	45.0
Lípidos	13.02
Fibra cruda	32.93
Extracto libre de nitrógeno	30.18
Cenizas	8.87

#### Fabricación:

Los ingredientes (macro y micro ingredientes) de las dietas experimentales fueron pulverizados, pasados a través de un tamiz de 0.5 mm de malla y homogeneizados en una mezcladora de alimentos (Hobart con capacidad de 2 kg). Posteriormente se incorporó una emulsión elaborada con las fuentes de lípidos y el antioxidante (lecitina de soya, aceite de pescado y BHT) a la mezcla y se agregó agua, aproximadamente 40% del peso total de los ingredientes. Finalmente se agregó la levadura en base húmeda a la mezcla. La masa obtenida fue mezclada durante 10 minutos hasta lograr una consistencia adecuada. La masa final fue pasada a través de un molino de carne utilizando un dado de 2 mm una primera vez y en la segunda ocasión los pelets generados fueron cortados manualmente y secados en una estufa con ventilación a 37 °C por 24 hrs.





Figura 31. Elaboración de dietas experimentales en la planta de fabricación de alimentos del laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR.

#### Anexo IV. Descripción del sistema experimental (Bioensayo I).

El agua utilizada era bombeada directamente de un pozo de agua de mar y se transfería por tubería hidráulica a una cisterna de 5,000 l de capacidad donde se almacenaba, para proveer al sistema experimental. De la cisterna el agua pasaba primero a través de cartuchos de 100, 10 y 1 micras. Posteriormente, el agua era bombeada al sistema experimental a través de una serie de filtros: el primero biológico y relleno con esferas para la formación de un tapete bacteriano; AQUATIC ECO-SYSTEMS, INC.), el segundo mecánico, de arena y por último un filtro de luz UV. La salida de agua se encontraba en el centro de cada uno de los tanques teniendo un flujo de agua de 1.2 l/min (200% de recambio diario). Al salir, el agua pasaba nuevamente a través del sistema de filtración mecánica y biológica (tanque de sedimentación, filtro biológico, filtro de arena y ultravioleta) para posteriormente regresar al tanque.

Los tanques experimentales (1.40 x .50 cm) contaban con una capacidad de 300 l en forma cilíndrica estaban provistos de piedras difusoras con salida de aire proveniente de una bomba de aire. El fotoperiodo fue mantenido a 12 horas luz/12 oscuridad (8:00 am-8:00 pm). La temperatura del cuarto estuvo regulada a una temperatura de 26 °C con la ayuda de un aire acondicionado.



Figura 32. Sistema experimental con circulación de agua cerrada, en el bioterio del CIBNOR.

**Anexo V. Análisis de producción de radicales de oxígeno por NBT y hematocrito.**

El análisis de producción de radicales libres por NBT se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Anderson y Siwicki (1995). Para este análisis, 10  $\mu$ l de sangre fresca se colocaron en un tubo conteniendo 10  $\mu$ l de NBT y se incubó por un periodo de 30 min. De esta mezcla se tomaron 10  $\mu$ l y se añadió 200  $\mu$ l de N,N-dimetil formamida (DMF). Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. y el sobrenadante fue leído a 540 nm en un espectrofotómetro.

*Hematocrito (Ht)*

Para el análisis de hematocrito, parte de la muestra sanguínea se colocó en un tubo capilar en una centrifuga para hematocrito y se dejó centrifugar por 2 min. El valor del hematocrito se expresó como la fracción porcentual de células rojas en el volumen total. El volumen se determinó con una regla Vernier, sacando por diferencia el porcentaje del paquete celular.

### Anexo VI. Reactivación de la bacteria *Aeromonas hydrophila* y determinación de la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en juveniles de cabrilla sardinera.

Se utilizó la bacteria *A. hydrophila* Ah-315 aislada de salmón. La bacteria fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Patogénesis Microbiana del CIBNOR y proveniente del stock del Department of Medical Microbiology, University of Lund, Suecia. La bacteria fue reactivada de la siguiente manera: se inoculó 100 µl de la cepa Ah-315 en medio nutritivo de agar LB sembrada por estría cruzada. Las cajas petri fueron incubadas a 30 °C por 48 horas. A partir de este cultivo, se tomó una colonia para ser sembrada por estría cruzada e incubada a la misma temperatura por 24 horas. De la cepa reactivada por estría cruzada, se tomó una colonia para realizar dos pruebas bioquímicas presuntivas de la familia Aeromonadaceae: la prueba de catalasa consistió en colocar 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Posteriormente con un asa bacteriológica estéril, se tomó una pequeña muestra de la colonia bacteriana y se pone en contacto con el peróxido de hidrógeno. La observación de burbujas de aire indicó la producción de O<sub>2</sub> lo que revela la presencia de la enzima catalasa, considerándose positiva la prueba. Para la prueba de citocromo oxidasa, se colocó una pequeña muestra de la colonia bacteriana sobre un trozo de papel Whatman No. 1 impregnado previamente con unas gotas de *tetrametil-p-fenilnediamina* al 1%. Posteriormente, se esperó la aparición de un color púrpura azulado en la colonia, lo que demuestra la positividad de la prueba.

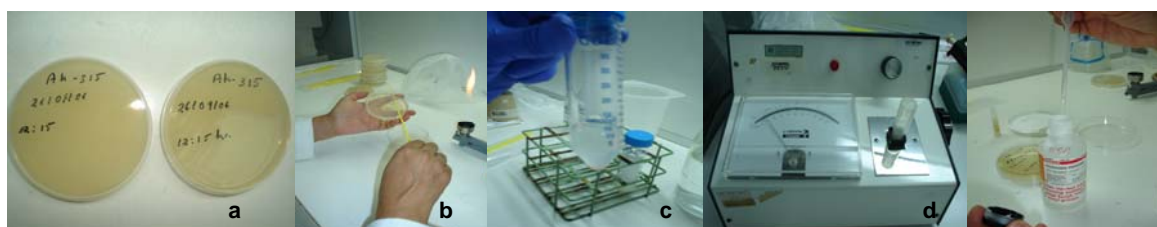


Figura 33. a) *Aeromonas hydrophila*, b y c) Obtención y lavados de la bacteria; d) Ajuste de la concentración bacteriana a  $1 \times 10^7$ ; e) Pruebas de catalasa y oxidasa.

A partir de la cepa reactivada de *A. hydrophila* Ah-315 aislada por estría cruzada, se tomó una colonia y se sembró por estría masiva en un medio nutritivo de agar soya tripticasa y se incubó a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, la bacteria se cosechó en

condiciones de esterilidad y se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril realizando dos lavados por centrifugación a 3,000 rpm a 10 °C por 15 min. La bacteria fue resuspendida en solución salina nueva y se ajustó con la ayuda de un colorímetro a una densidad óptica de 1 que corresponde a una concentración de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml). A partir de esta suspensión, se tomó un 1 ml para preparar diluciones seriadas en tubos Falcón estériles conteniendo 9 ml de solución salina estéril cada uno.

Para conocer la concentración del inóculo utilizada en el reto bacteriano, se llevó a cabo un bioensayo para la determinación de la LD<sub>50</sub>. Para este bioensayo las concentraciones de *A. hydrophila* utilizadas fueron:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Se inocularon 22 peces en etapa juvenil de cabrilla sardinera con una talla y peso promedio de 10.5 cm. y 15.1g, respectivamente. Los organismos fueron inoculados intraperitonealmente (0.1 ml) con las soluciones bacterianas antes mencionadas, disueltas en solución salina estéril, utilizando dos tratamientos: uno con solución salina estéril y un tanque control sin tratamiento. Los peces fueron distribuidos en 6 tanques de fibra de vidrio utilizando un sistema de circulación cerrada en el área del bioterio del CIBNOR. Las concentraciones fueron distribuidas al azar en los seis tanques de acuerdo al esquema que se muestra en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Esquema de inoculación intraperitoneal en juveniles de cabrilla sardinera infectados con *A. hydrophila* para conocer la LD<sub>50</sub>.

Tanque	Concentración bacteriana	Organismos
1	$1 \times 10^5$ UFC/ml	4
2	$1 \times 10^8$ UFC/ml	4
3	$1 \times 10^6$ UFC/ml	4
4	Solución salina estéril	3
5	Control	3
6	$1 \times 10^7$ UFC/ml	4

Después de la inoculación intraperitoneal, los organismos se mantuvieron en observación por 7 días para evaluar el efecto provocado por las bacterias y determinar su LD<sub>50</sub>, es decir, la concentración bacteriana que causa una mortalidad inoculada del 50% en la población. Durante esta semana los peces fueron alimentados a saciedad aparente con

una dieta comercial con un contenido de 45% de proteína cruda y 10% de lípidos (iniciador salmón, Pedregal-Silver Cup, Toluca, Edo de México).

#### Recuperación de la bacteria al final del reto bacteriano

Al final del reto experimental, los organismos fueron anestesiados con MS-222 (Argent Chemical Laboratories Inc., Redmond, WA.) utilizando 1 g/20 l y sacrificados para obtener muestras de hígado e intestino para recuperación y confirmación de la presencia de la bacteria durante el experimento. Los tejidos fueron disectados en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar. Posteriormente se cortó un fragmento pequeño de cada órgano y se pasó sobre un área pequeña de agar con medio selectivo para *Aeromonas* con ampicilina (100 mg/ml, Sigma Aldrich) para el aislamiento de las bacterias. Enseguida los inóculos fueron sembrados con un asa bacteriológica estéril, por estría cruzada. Los medios fueron incubados por 24 horas a 35 °C en una incubadora. Después de este tiempo se llevaron a cabo de nuevo pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) para verificar la morfología colonial.

## Anexo VII. Determinación de expresión génica: PCR Semi-cuantitativa en juveniles de cabrilla sardinera. (Bioensayo II)

Para este segundo experimento se diseñaron primers inespecíficos para *CAT* y *HSP-70* para cabrilla sardinera *M. rosacea*. La cabrilla sardinera es una especie nueva de estudio y no se cuenta con información molecular.

### *Diseño de primers*

Se diseñaron los oligonucleótidos ("primers") degenerados, seleccionando los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con los mRNA de nuestro interés registrados en los bancos de secuencias para otros peces teleósteos.

Tabla XV. Oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR.

Gen	Abreviación del gen	Primer sequence (5' - 3')
Catalasa	<i>CAT</i>	
	Forward	TGACATGGTGTGGGACTTCTGG
	Reverse	CTTGTAGTGGAACCTGCAGTAG
Heat shock protein-70	<i>HSP</i>	
	Forward	GACGTGTCCATCCTGACCAT
	Reverse	TCGATGCCCTCAAACAGAGA

### *Extracción y Purificación de RNA*

Se utilizaron muestras de hígado e intestino recolectados en dos muestreos, a las cuatro semanas de finalizado el ensayo alimenticio y después del reto bacteriano. La disección de los segmentos se realizó sobre una placa de vidrio montado en hielo. Las muestras fueron guardadas en RNA later a -80 °C hasta su uso.

La extracción de RNA se llevó a cabo con el protocolo de extracción por TRIZOL (Invitrogen Cat. No. 15596-026, Carlsbad, CA). Brevemente, 100 mg de tejido fueron homogenizados durante 20 seg usando 1 ml de TRIZOL en un homogenizador FAST-PREP-F-120 (Bio 101 Thermo Savant). Una vez homogenizado el tejido se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 x

g por 15 min a 4 °C. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo, al cual se le agregó isopropanol (0.5 ml/ml trizol), se agita suavemente y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se lleva a cabo otra centrifugación a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante, el pellet es lavado con etanol al 75%, se centrifuga a 7500 x g 5 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante, el pellet es secado a temperatura ambiente, finalmente el pellet se resuspende en agua DEPC (50 µl de dietilpirocarbonato).

Las concentraciones de RNA fueron cuantificadas y purificadas por espectrofotometría y tratados con DNasa (Promega Madison Cat E3730, WI, USA) para remover la contaminación con DNA. El DNA complementario (cDNA) fue generado a partir de 5 µg de RNA total usando el SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) obteniendo un volumen final de 20 µl; 1 µg oligo-dT primer, 1 µl de 10 mM dNTP, 2.4 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.0 µl buffer 5X, 0.5 µl de RNAsin, 0.8 µl de IMPROM II y 5.3 µl de agua DEPC. Posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min, 45 °C por 60 min y una incubación final de 5 min a 90 °C.

La amplificación del cDNA se realizó en un termociclador Stratagene (PCT-100™ Programable Thermal Controller, La Jolla, CA, EUA) con sistema de gradiente de temperatura (Robocycler), optimizándose en términos de temperatura de alineamiento y concentración de Mg<sup>2+</sup> para ambos genes.

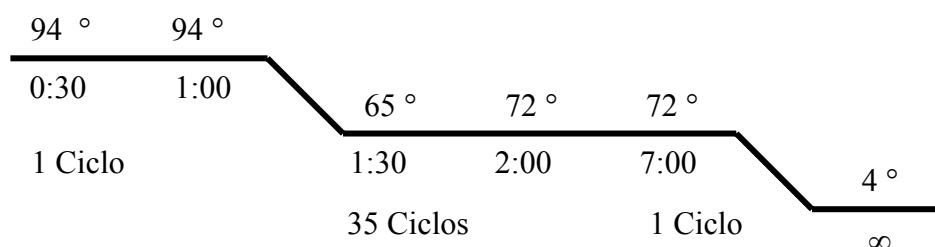


Figura 34. Optimización de temperatura y ciclos para CAT y HSP-70 en PCR.



Tabla XIV. Concentraciones y cantidades estandarizadas para la amplificación por PCR para CAT y HSP-70.

Mezcla maestra	CAT	HSP-70
dNTPS's	0.5	0.5
cDNA	1.0	1.0
Primer forward	1.185	1.28
Primer reverse	1.165	1.275
Buffer PCR 10X	1.25	1.25
Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.10	0.10
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.75	0.75
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> destilada esteril	6.55	6.345
	12.5 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l

Los productos de amplificación fueron separados por electroforésis en agarosa al 2.0 % y después analizados en un fotodocumentador (BIORAD cat 6331, CA USA). La recuperación y purificación del cDNA se obtuvo cortando las bandas de interés con un bisturí estéril en un transiluminador y en base al protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 Inc., La Jolla, California, USA).

#### *Clonación y secuenciación de genes*

Los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA CLONING (INVITROGEN Corporation Carlsbad, California, E. U.) que utiliza células competentes de *E. coli* y el plásmido pCR 2.1 como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA USA) para enviarse a secuenciar (MACROGEN en Seoul, Korea) y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

#### *PCR semi-cuantitativa*

Se obtuvieron las secuencias y se mandaron diseñar nuevos primers específicos para la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Se utilizó como control endógeno el gen *18S* RNA ribosomal. Se verificó la integridad del cDNA con el control endógeno *18S* para todas las muestras. Se determinó la temperatura de alineamiento para los dos genes y el control tomando el número óptimo de ciclos del producto amplificado en el rango exponencial

cuando aún no ha alcanzado su meseta. Las muestras fueron analizadas por duplicado para cada gen, y visualizadas en un mismo gel de agarosa (2%) teñida con bromuro de etidio. El análisis de PCR semi-cuantitativo para los genes de *CAT* y *HSP-70* fue determinado en muestras individuales. Pool de tres peces para cada tratamiento, cuantificando la intensidad de cada banda del producto de PCR con 18S RNA ribosomal usando el software Gel-Pro Analyzer V. 3.1. (BIORAD cat 6331, CA USA).