

Aplicação de protocolos experimentais para o estudo da  
infecção do linguado (*Solea senegalensis*) por  
*Tenacibaculum maritimum*

Ildefonso José Vital Simões

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar e Recursos Marinhos -  
Esp. em Aquacultura e Pescas

2011

Ildefonso José Vital Simões

Aplicação de protocolos experimentais para o estudo da infecção do linguado (*Solea senegalensis*) por *Tenacibaculum maritimum*

Dissertação de Candidatura ao grau de  
Mestre em Ciências do Mar e Recursos  
Marinhos - Esp. em Aquacultura e Pescas  
submetida ao Instituto de Ciências  
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade  
do Porto

Orientador – Professor Doutor António  
Afonso

Categoria – Professor Associado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas  
de Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador – Benjamin Costas

Categoria – Investigador CIIMAR

Afiliação – Centro Interdisciplinar de  
Investigação Marinha e Ambiental

Instituição de Acolhimento - Centro  
Interdisciplinar de Investigação Marinha e  
Ambiental

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho, em particular:

Ao Professor Doutor António Afonso, meu orientador, pela excelente orientação, confiança e disponibilidade que sempre manifestou.

Ao Doutor Benjamin Costas, meu co-orientador, pela orientação, interesse e disponibilidade demonstrada, importantes para a realização desta dissertação.

À minha colega de laboratório Joana Marques pela colaboração e partilha de conhecimentos e também, pelo excelente ambiente de trabalho.

A toda a minha família e amigos em geral pelo apoio e estimulação tornando possível a realização desta dissertação.

Porto, Novembro de 2011

## Resumo

A aquacultura mundial é responsável pelo fornecimento de peixe para alimentação numa percentagem significativa, e tem aumentado a sua importância nos últimos anos. Portugal é um dos países europeus que está referenciado como oferecendo um elevado potencial para esta actividade. A espécie *Solea senegalensis*, vulgo linguado senegalês, é uma espécie que se apresenta como uma nova oportunidade para a aquacultura portuguesa. Um dos graves problemas que afecta a aquacultura do linguado, é a sua susceptibilidade a um agente patogénico que provoca sérias perdas na aquacultura marinha mundial, a *Tenacibaculum maritimum*, uma bactéria Gram-negativa que é o agente etiológico de uma doença ulcerativa conhecida como tenacibaculose. Dada a dificuldade em cultivar esta bactéria e ao desconhecimento dos seus mecanismos de infecção, pretende-se com este trabalho, contribuir para um melhor conhecimento da bactéria e da sua interacção com o *S. senegalensis*. Nesse sentido procurou-se encontrar um método de infecção *in vivo*, e avaliar a resposta dos leucócitos do rim anterior através de técnicas *in vitro*.

Da experiência de infecção *in vivo* verificou-se que os peixes apresentavam sintomas de infecção, ao criar-se simultaneamente uma situação de stress crónico, tendo sido confirmada posteriormente a infecção por esta bactéria. O trabalho realizado *in vitro* permitiu concluir que uma maior concentração de bactéria, induz uma maior resposta dos leucócitos do rim anterior, e que esta resposta aumenta linearmente da concentração mais baixa para a mais alta. Os resultados obtidos demonstram que é possível induzir a infecção experimental, e que os leucócitos do rim anterior do linguado apresentam respostas *in vitro* ao estímulo da *T. maritimum*, mostrando a explosão respiratória e a produção de óxido nítrico um papel importante na defesa celular inata.

Palavras-chave: *Solea senegalensis*, *Tenacibaculum maritimum*, aquacultura, sistema imunitário inato.

## Abstract

Global aquaculture is responsible for fish supply as food in a significant percentage, and its importance has been increasing during recent years. Portugal is an European country that is referenced as offering high potential for this activity. The species *Solea senegalensis*, commonly known as Senegalese sole, presents itself as a new opportunity for Portuguese aquaculture. One of the main problems affecting sole aquaculture is a high susceptibility to a pathogen that causes serious losses in global aquaculture, *Tenacibaculum maritimum*, a Gram-negative bacterium that is the etiological agent of a disease known as tenacibaculosis. Since this bacterium presents some constrains during culture and there is still a considerable lack of knowledge regarding the mechanisms of infection, this work aims to contribute to a better understanding of the mechanisms of interaction between this bacterium and *S. senegalensis*. Therefore, we tried to develop an infection protocol *in vivo*, and to evaluate head-kidney leukocytes responses *in vitro*.

The *in vivo* assay showed that fish presented symptoms of infection, when simultaneously created a chronic stressful situation, and the presence of this bacterium in infected fish was confirmed. *In vitro* assays showed that a higher bacterial concentration induces a greater response of head-kidney leukocytes, and that this response augmented linearly with increasing concentrations. Results also showed that it is possible to induce an experimental infection, and *S. senegalensis* head-kidney leukocytes present *in vitro* responses following infection by *T. maritimum*. Moreover, respiratory burst activity and nitric oxide production showed an important role as cellular innate defenses.

Key-words: *Solea senegalensis*, *Tenacibaculum maritimum*, aquaculture, innate immune system.

Índice	
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
1. Introdução.....	1
1.1 Aquacultura no Mundo.....	1
1.2 Aquacultura na Europa.....	2
1.3 Aquacultura em Portugal.....	3
1.4 Novas oportunidades para a aquacultura marinha em Portugal.....	3
1.4.1 Aquacultura de linguado.....	3
1.5 Mecanismos imunitários de defesa contra a infecção em peixes.....	5
1.5.1 Sistema imune inato.....	6
1.6 <i>Tenacibaculum maritimum</i> .....	10
2. Material e Métodos.....	14
2.1 Bactéria.....	14
2.1.1 Curva de crescimento.....	15
2.2 Peixes.....	15
2.3 Ensaio de infecção.....	15
2.3.1 Ensaio <i>in vivo</i> .....	15
2.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> .....	16
2.3.2.1 Recolha de células para os ensaios <i>in vitro</i> .....	16
2.3.2.2 Ensaio de explosão respiratória.....	17
2.3.2.3 Ensaio de produção de óxido nítrico.....	18
2.3.2.4 Ensaio de actividade bactericida.....	19
2.4 Estatística.....	19
3. Resultados.....	21
3.1 Curvas de crescimento bacteriano.....	21
3.2 Ensaio de infecção <i>in vivo</i> .....	22
3.3 Ensaio de infecção <i>in vitro</i> .....	23
4. Discussão.....	26
5. Conclusões.....	29
6. Bibliografia.....	30

## 1. Introdução

### 1.1 Aquacultura no Mundo

Dos 145 milhões de toneladas de produção, as pescas e a aquacultura forneceram, em 2009, á população mundial aproximadamente 118 milhões de toneladas de pescado para alimentação, sendo a aquacultura responsável por 47 % deste valor. Este valor equivale ao consumo de 17,2 Kg/ *per capita* (Tabela 1), com o contributo da aquacultura a aumentar de 0,7 Kg em 1970 para 7,8 Kg em 2006 (FAO, 2008) e para 8,1 Kg em 2009 (FAO, 2010).

Tabela 1. Pescas e Aquacultura – Produção e Utilização

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
	milhões de toneladas					
<b>Produção</b>						
<b>Água doce</b>						
Captura	8,6	9,4	9,8	10,0	10,2	10,1
Aquacultura	25,2	26,8	28,7	30,7	32,9	35,0
Total água doce	33,8	36,2	38,5	40,6	43,1	45,1
<b>Água salgada</b>						
Captura	83,8	82,7	80,0	79,9	79,5	79,9
Aquacultura	16,7	17,5	18,6	19,2	19,7	20,1
Total água salgada	100,5	100,1	98,6	99,2	99,2	100,0
Total Capturas	92,4	92,1	89,7	89,9	89,7	90,0
Total Aquacultura	41,9	44,3	47,4	49,9	52,5	55,1
Total	134,3	136,4	137,1	139,8	142,3	145,1
<b>Utilização</b>						
Consumo humano	104,4	107,3	110,7	112,7	115,1	117,8
Usos não alimentares	29,8	29,1	26,3	27,1	27,2	27,3
População (bilhões)	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,8
Consumo <i>per capita</i> (Kg)	16,2	16,5	16,8	16,9	17,1	17,2

(adaptado de FAO, 2010)

A aquacultura mundial sofreu um grande crescimento, de uma produção de menos de 1 milhão de toneladas no início dos anos 50, para em 2009 apresentar uma produção de 55,1 milhões de toneladas.

O maior produtor mundial é a China, que em 2008 apresentou uma produção de 47,5 milhões de toneladas, sendo 32,7 milhões de toneladas provenientes da aquacultura e 14,8 das pescas (Figura 1) (FAO, 2010).

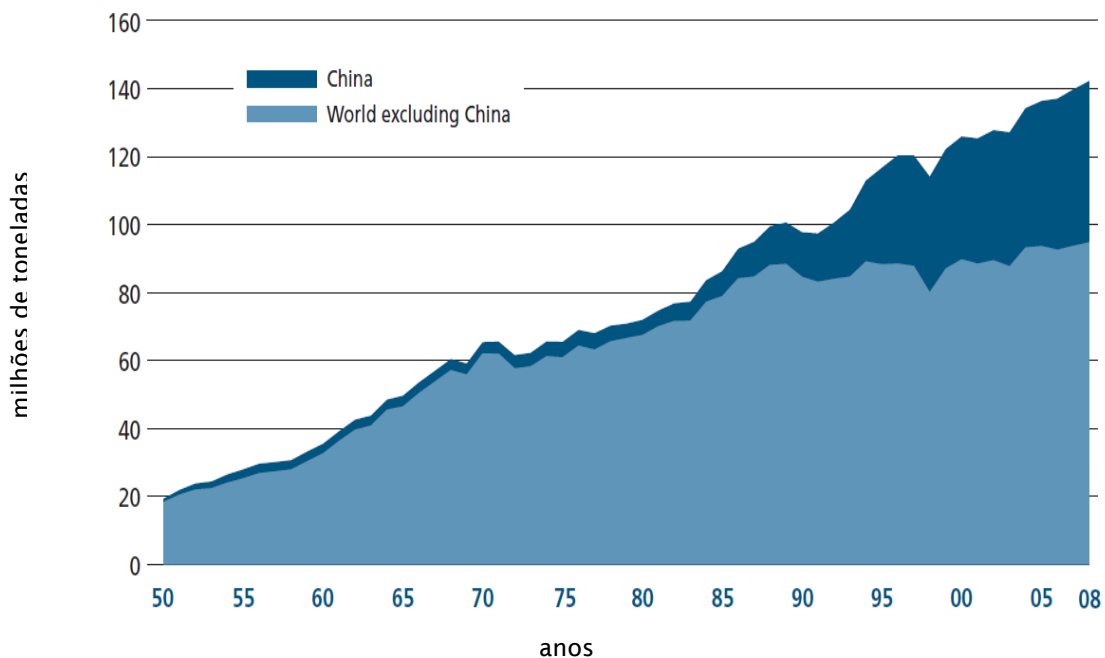


Figura 1. Produção Mundial Total – Pescas e Aquacultura

(adaptado de FAO, 2010)

## 1.2 Aquacultura na Europa

A aquacultura europeia recorre a um menor número de espécies que o resto do mundo (Imsland *et al.*, 2003). A aquacultura mediterrânica é dominada por duas espécies, o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e a dourada (*Sparus aurata*). Deste facto resultou uma saturação do mercado devido a algum excesso de produção, diminuindo assim as margens de lucro (Rigos & Katharios, 2010).

Novas espécies candidatas a serem utilizadas em aquacultura, por exemplo o linguado senegalês (*Solea senegalensis*), terão um papel importante na sobrevivência e crescimento desta indústria, compensando assim a saturação do mercado e procurando expandir o mercado a novos alvos (Rigos & Katharios, 2010).

### 1.3 Aquacultura em Portugal

Devido à sua situação geográfica e às suas condições edafoclimáticas, influenciadas pelo mar Mediterrâneo e pelo oceano Atlântico, Diniz, (1998) refere que Portugal apresenta um elevado potencial para a actividade aquícola e para o desenvolvimento da cultura de novas espécies com interesse comercial, enquanto Sardinha (2009), diz que existem um conjunto de características que fazem com que Portugal seja um dos melhores países da Europa para uma expansão do sector da aquacultura.

É também de considerar o facto de Portugal apresentar um consumo de peixe *per capita* bastante elevado, que em 2005 era de 59,3 kg segundo dados da DGPA (Direção Geral das Pescas e da Aquacultura), valor este que coloca Portugal em 3º lugar a nível mundial, depois do Japão e da Islândia. Como a produção nacional permite satisfazer somente níveis de consumo *per capita* da ordem dos apenas 23 Kg/ano (DGPA, 2010), existe espaço para o crescimento da aquacultura. Com a pesca em queda, a aquacultura pode constituir uma importante alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado (Gonçalves, 2006). No entanto, devido a vários tipos de restrições, em particular de ordem burocrática e legal, esta actividade está longe de atingir o grau de desenvolvimento possível e desejado para Portugal, apesar de existirem factores naturais que poderiam favorecer esse objectivo (Sardinha, 2009).

### 1.4 Novas oportunidades para a Aquacultura marinha em Portugal

Entre os candidatos à aquacultura marinha em Portugal duas espécies de peixes planos (ordem Pleuronectiformes): o linguado senegalês e o pregado (*Scophthalmus maximus*) têm recebido particular atenção e tem-se verificado o incremento da sua produção.

#### 1.4.1 Aquacultura de linguado

Um dos candidatos com um grande potencial é o linguado senegalês (Imsland *et al.*, 2003) (Figura 2), que além do preço de mercado ser elevado, é uma espécie que se adapta bem às condições existentes em Portugal (Dinis & Reis, 1995). O linguado é considerado uma nova espécie para a diversificação da aquacultura, que poderá contornar o presente problema de saturação dos mercados. No entanto, segundo Rigos & Katharios (2010) a capacidade de produção de novas espécies poderá ficar comprometida, devido não só a restrições de carácter

nutricional e reprodutivo, mas também devido ao aparecimento de obstáculos de carácter patológico.

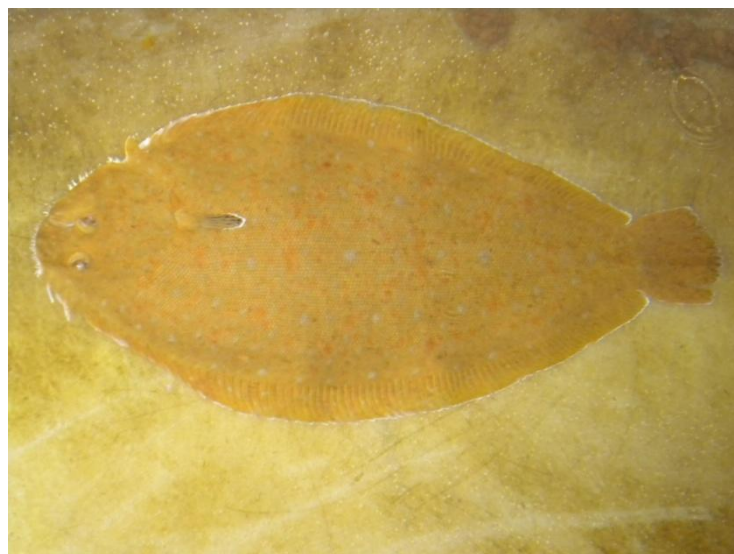


Figura 2. *Solea senegalensis*

(Foto: Catarina Oliveira)

O linguado é um peixe comum nas águas do Mar Mediterrâneo e do Atlântico oriental que se distribui desde o Senegal a La Rochelle (Lagardère *et al.*, 1979, 2010. Rodríguez & Rodríguez, 1980) (Figura 2). É muito semelhante à outra espécie de linguado, o *Solea solea*, sendo este mais comum nas águas do Atlântico Norte (Dinis *et al.*, 1999).

O linguado é um peixe gonocórico, em que as fêmeas atingem a maturidade sexual com a idade 3<sup>+</sup> anos, que pode atingir 32 cm de comprimento. A época natural de desova é na primavera (março/abril-junho), sendo a temperatura da água um factor crítico durante o período reprodutivo para a sobrevivência das larvas na fase pelágica (Ramos, 1982; Dinis, 1986; Imsland *et al.*, 2003). A temperatura óptima vai de  $16,5 \pm 0,5$  °C a  $22 \pm 1$  °C e a salinidade de 30 ‰ a 35 ‰ (Dinis & Reis, 1995), com uma fecundidade de 509 oócitos/g de peixe (Dinis *et al.*, 1996). A reprodução das espécies marinhas em cativeiro depende de numerosos factores ambientais, e a desova pode acontecer naturalmente, mediante a manipulação dos factores ambientais (temperatura, fotoperíodo, etc.) ou ser induzida através da utilização de hormonas (Dinis & Reis, 1995).

O linguado é uma espécie bem adaptada aos climas quentes (Dinis *et al.*, 1999), que apresenta óptimas taxas de crescimento, sendo apenas suplantadas, em

extensivo, pelas taxas de crescimento da dourada (Drake *et al.*, 1984). A taxa de ganho de massa corporal e a duração do período larvar dependem de factores como a temperatura da água e a disponibilidade de alimento. As larvas de linguado começam a sua alimentação dois dias após a eclosão (dae), embora ainda tenham reservas do saco vitelino, e a metamorfose tem o seu início aproximadamente 14-16 dae. Durante esta transformação, a larva perde a sua simetria bilateral e muda o seu plano de natação, adquirindo a morfologia típica dos peixes planos, mudando o seu modo de vida da forma pelágica para bentónica, estando já ao dia 18-20 a migração do olho completa altura em que o animal pousa no fundo do tanque (Parra & Yúfera, 2001). Apesar das altas taxas de crescimento e de sobrevivência registadas nos estágios larvares (Dinis *et al.*, 1999), na fase de pós-larva, o período de desmame (passagem de alimento vivo (*artémia*) para dietas inertes) (Cañavate & Diaz, 1999), é uma das fases mais críticas no seu cultivo, altura em que se registam mortalidades elevadas, o que acontece depois do início da fase bentónica quando o peixe não é muito activo e pode ficar longos períodos sem se alimentar (Dinis & Reis, 1995).

O uso de alimento vivo na fase inicial proporciona maiores taxas de sobrevivência e crescimento em comparação com dietas compostas (Person-Le-Ruyet *et al.*, 1993; Blair *et al.*, 2003). Apesar disso, o uso de alimento vivo apresenta algumas desvantagens, pois pode actuar como vector para algumas patologias, além de que o seu valor nutricional pode ser variável, a sua qualidade nutricional é difícil de manipular e a sua produção requer tempo e tem um custo elevado (Hart & Purser, 1996).

### 1.5 Mecanismos imunitários de defesa contra a infecção em peixes

Os peixes são o maior grupo de espécies de vertebrados, e os seus membros podem ser encontrados nos mais extremos habitats aquáticos (Plouffe *et al.*, 2005). Assim o seu sistema imunológico exhibe uma série de características que lhes permite manter com sucesso uma tal diversidade, e a sua adaptação a uma variedade de ambientes, desde alto mar, rios ou lagos de todos os climas (Tort *et al.*, 2003).

Os peixes estão em contacto directo com o meio ambiente onde vivem, e este meio ambiente (a água), particularmente dentro de uma piscicultura, contém altas concentrações de bactérias, vírus e outros microrganismos, contudo em condições normais os peixes mantêm-se saudáveis (Ellis, 2001). A capacidade de

reconhecer a presença de agentes patogénicos perigosos é essencial para gerar uma apropriada e efectiva resposta imune (Plouffe *et al.*, 2005). O sistema imunitário dos peixes é condicionado pelo ambiente particular em que vivem, mas também pela sua condição de animais poiquilotérmicos (Tort *et al.*, 2003). Dois tipos de imunidade têm sido tradicionalmente aceites, a inata e a adaptativa (também conhecida como adquirida) (Alvarez-Pellitero, 2008).

Devido à sua pronta intervenção e ao longo tempo necessário para a activação da defesa específica nestes seres poiquilotérmicos, é assumido que os mecanismos de defesa inatos são mais importantes na defesa contra a infecção nos peixes, ao contrário do que parece ser o caso dos vertebrados endotérmicos. Por outro lado, alguns destes mecanismos são certamente mais potentes nos peixes que nos mamíferos, tais como a lisozima e o complemento (Ellis, 2001). Tal como nos outros vertebrados, o sistema imune inato dos peixes é o responsável pela primeira linha de defesa contra a infecção (Alvarez-Pellitero, 2008), da qual os peixes dependem para lidarem com os agentes patogénicos (Warr, 1995).

#### 1.5.1 Sistema Imune Inato

Segundo Medzhitov (2007), o sistema imune inato não é uma entidade única, mas sim um conjunto de subsistemas distintos, ou módulos, que aparecem em diferentes estágios de evolução e desempenham diferentes funções na defesa do hospedeiro. A protecção conseguida pela defesa inata diz-se não-específica, pois não depende do reconhecimento da estrutura molecular dos epítopes da espécie invasora. A resposta é relativamente rápida, sendo em primeiro lugar executada pela acção de factores solúveis e também pela acção dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), nomeadamente através da sua resposta fagocitária (Ellis, 1999), dando assim pouco tempo aos agentes patogénicos para se estabelecerem.

A resposta imune inata dos peixes inclui a produção de um amplo espectro de substâncias e de mecanismos anti-microbianos, como as proteínas de fase aguda, a activação da via alternativa do complemento, a libertação de citocinas, a inflamação e a fagocitose (Ellis, 2001). Estes mecanismos de defesa estão geralmente subdivididos em duas partes, respostas de defesa celular e humoral (Aoki *et al.*, 2008), embora esta segunda seja mais vulgarmente conhecida por

factores solúveis, para não serem confundidos com a resposta humoral específica mediada por anticorpos.

A par de outras barreiras físicas como o muco, os tecidos epiteliais, as brânquias e o estômago, impedem a entrada de microorganismos no corpo. As respostas celulares incluem células especializadas capazes de matar e digerir patógenos, quando estes conseguem quebrar as barreiras físicas (Aoki *et al.*, 2008). A resposta humoral é composta por uma variedade de proteínas e glicoproteínas capazes de destruir ou inibir o crescimento dos agentes infecciosos, como o complemento (Aoki *et al.*, 2008).

O sistema de reconhecimento do agente patogénico, no caso da imunidade inata, depende de um conjunto de receptores (PRRs – *Pattern recognizing receptors*), que fazem a distinção entre invasores infecciosos ou não infecciosos (Aoki *et al.*, 2008), e que estão envolvidos na execução de tarefas específicas, entre as quais se inclui a opsonização, activação do complemento e a fagocitose (Pasare & Medzhitov, 2004). Os PRRs têm um papel essencial na resposta inflamatória, activam os macrófagos dos tecidos a produzir citocinas. Estas citocinas, por sua vez, activam os hepatócitos para produzirem proteínas de fase aguda, e estas, por sua vez activam o complemento e opsonizam os agentes patogénicos permitindo assim a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos (Alvarez-Pellitero, 2008). Embora em menor número, os peixes possuem um conjunto de citocinas semelhantes às encontradas nos mamíferos (Plouffe *et al.*, 2005). As citocinas são polipéptidos simples ou glicoproteínas de baixo peso molecular, menos de 30 kDa, que actuam como moléculas sinalizadoras dentro do sistema imunitário, controlando a comunicação entre células responsáveis pela resposta imune (Thomson, 1994; Callard & Gearing, 1994). Além disso, agem nas células alvo por via de receptores específicos com elevada afinidade, induzindo diferentes respostas em diferentes alvos (Secombes *et al.*, 1996). As citocinas incluem: interleucinas, TNF (*tumor necrosis factor*), interferons, CSFs (*colony-stimulating factor*) e quimiocinas (Savan & Sakai, 2006).

Outros factores solúveis que cumprem um importante papel na resposta do sistema imune inato na defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos são a lisozima e o complemento.

A lisozima é uma enzima envolvida numa ampla bateria de mecanismos de defesa, participando em acções bacteriolíticas e de opsonização, potenciando

assim a resposta imune (Lie *et al.*, 1989). A sua actividade é considerada um indicador importante da resposta imune inata dos peixes (Saurabh & Sahoo, 2008). A lisozima actua destruindo a ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina das paredes celulares das bactérias Gram-positivas (Saurabh & Sahoo, 2008). A lisozima dos peixes possui actividade lítica, tanto para bactérias Gram-negativas como para bactérias Gram-positivas, além de participar na opsonização e na activação do sistema do complemento e dos fagócitos (Saurabh & Sahoo, 2008).

O sistema do complemento dos teleósteos é único no que respeita a posse de múltiplas isoformas de alguns dos mais importantes componentes do complemento, que são estruturalmente e funcionalmente diversas (Plouffe *et al.*, 2005). Alguns dos componentes do sistema do complemento têm um papel importante no recrutamento dos fagócitos (macrófagos e neutrófilos) (Ellis, 2001). O complemento também intervém como mediador na opsonização, permitindo o reconhecimento, através das isoformas da proteína C3, de uma ampla variedade de microorganismos, e contribuindo para a fagocitose do microorganismo invasor (Boshra *et al.*, 2006). O complemento tem também a capacidade de matar agentes patogénicos criando poros na superfície da membrana celular (Holland & Lambris, 2002).

Outro dos mecanismos de defesa é o muco, que é continuamente produzido e forma uma camada exterior de protecção da superfície corporal dos peixes. O muco além de conter uma série de substâncias com actividade bactericida, é uma primeira barreira física de intercepção e prevenção contra invasão por microorganismos, impedindo que estes se fixem no tecido epitelial e assim invadam os tecidos do peixe (Ellis, 2001).

O papel fundamental das células fagocitárias na defesa do hospedeiro é impedir ou limitar a disseminação inicial e/ou o crescimento do organismo infeccioso (Neumann *et al.*, 2001). O tipo de célula, associado a uma maior capacidade de fagocitose, é o macrófago, e dada a sua distribuição pelos tecidos do hospedeiro, assegura uma “vigilância” contínua contra “invasores estranhos”. Na maior parte dos casos são os macrófagos que constituem a primeira linha de defesa, mediada por células do hospedeiro, contra os agentes patogénicos invasores (Neumann *et al.*, 2001). Tal como os macrófagos, os neutrófilos representam uma classe de leucócitos dedicados à resposta imune (Neumann *et al.*, 2001). Estão presentes

em grande número no sangue e nos órgãos hematopoiéticos como uma *pool* de reserva, por tanto, em condições normais a sua presença nos tecidos e cavidades corporais é rara. Os neutrófilos da *pool* de reserva são rapidamente atraídos para os focos de infecção pelos produtos microbianos e pelas citocinas produzidas pelas células imunes aí presentes, os macrófagos (Afonso *et al.*, 1998).

As bactérias para invadirem e crescerem nos tecidos do hospedeiro necessitam de digerir proteínas do hospedeiro como fonte de aminoácidos. O plasma dos peixes contém inibidores de protease, que restringem a capacidade da bactéria invadir e crescer *in vivo*, mas algumas bactérias mais adaptadas conseguiram estabelecer mecanismos evasivos a esta acção (Ellis, 2001). Assim que uma bactéria invade os tecidos do peixe, uma resposta inflamatória é induzida, com um fluxo de fagócitos com propriedades bactericidas. A iniciação da inflamação é altamente complexa e multifactorial (Warr, 1995; Ellis, 2001). A fagocitose das bactérias pelos macrófagos e neutrófilos dos peixes requer em primeiro lugar a adesão da bactéria á superfície do fagócito. Um dos mais activos promotores da fagocitose é o componente C3 do complemento, que se liga directamente á superfície da bactéria (Nonaka & Smith, 2000; Ellis, 2001; Boshra *et al.*, 2006).

A fagocitose está associada a um aumento do consumo de oxigénio molecular pelas células imunes envolvidas. Este fenómeno é conhecido como explosão respiratória, tendo sido demonstrado que corresponde à produção de compostos reactivos de oxigénio (Plouffe *et al.*, 2005). Os macrófagos e os neutrófilos, produzem ambos radicais livres de oxigénio (ROS - "*reactive oxygen species*") com propriedades bactericidas, os quais são produzidos durante a explosão respiratória quando o fagócito entra em contacto com a bactéria ou durante a fagocitose (Lamas & Ellis, 1994), os quais desempenham um importante papel na destruição de vários agentes patogénicos dos peixes (Neumann *et al.*, 2001).

De maneira a subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro, algumas bactérias possuem superóxido dismutase, que reduz o anião superóxido para peróxido de hidrogénio, e catalase, que por sua vez decompõe o peróxido de hidrogénio em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, inactivando assim a acção dos ROS (Ellis, 1999).

Outro mecanismo de defesa é a produção de óxido nítrico (ON). Nos macrófagos o ON pode ser produzido em resposta a citocinas, LPS ou parasitas (Nathan, 1992; Tafalla & Novoa, 2000). Pensa-se que o ON é a primeira molécula a ter um efeito citotóxico, contudo outros produtos, tais como nitritos, nitratos e

nitrosaminas podem também ser tóxicos para os patógenos (Tafalla & Novoa, 2000). Apesar de a explosão respiratória não ter nenhum papel aparente na produção de ON, o anião superóxido produzido durante a explosão respiratória, pode reagir com o ON e formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), conhecido por ter uma potente actividade microbicida (Zhu *et al.*, 1992; Denicola *et al.*, 1993). A citotoxicidade do ON é um mecanismo antimicrobicida, atribuído primitivamente aos macrófagos activados, contudo os neutrófilos podem também ser estimulados para produzirem ON (Evans *et al.*, 1996).

### 1.6 *Tenacibaculum maritimum*

A *Tenacibaculum maritimum*, anteriormente conhecida como *Flexibacter maritimus*, é o agente etiológico da flexibacteriose ou tenacibaculose, uma doença ulcerativa que afecta um largo número de espécies de peixes marinhos por todo o mundo, e que tem uma importância económica considerável para a aquacultura marinha (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). As células da *T. maritimum* são Gram-negativas, filamentosas, flexíveis, em forma de haste delgada com um tamanho de 0.5 por 2 a 30 µm, embora por vezes possam chegar aos 100 µm de comprimento. Não têm flagelos, mas exibem mobilidade através de deslizamento. As suas colónias são planas, finas e apresentam uma cor amarelada, com bordos irregulares (Wakabayashi *et al.*, 1986). Esta bactéria desenvolve-se a temperaturas entre os 15 e os 34°C, sendo a sua temperatura óptima de crescimento os 30°C, e têm como factor indispensável ao seu crescimento que a salinidade da água do mar seja no mínimo de 30‰ (Wakabayashi *et al.*, 1986), não se observando crescimento na ausência de sais marinhos (López *et al.*, 2009). A temperatura da água é um dos factores cruciais para a expressão da patogenicidade deste microorganismo (Santos *et al.*, 1999). Além disso, a *T. maritimum* apresenta um intervalo óptimo de pH para o crescimento entre 6 e 9 (Hikida *et al.*, 1979). A *T. maritimum* não demonstra grande especificidade para com o hospedeiro. Apesar de, tanto adultos como juvenis, serem afectados pela tenacibaculose, os peixes mais jovens desenvolvem uma forma mais severa da doença (Santos *et al.*, 1999).

Com base nas características fisiológicas e bioquímicas, a *T. maritimum* tem sido considerada um grupo de bactérias fenotipicamente homogéneo (Wakabayashi *et al.*, 1984; Baxa *et al.*, 1986; Bernardet & Grimont, 1989; Bernardet *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1995), contudo estudos recentes demonstraram a existência de

distintos grupos serológicos, intimamente associados com as espécies hospedeiras (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004).

A infecção tem diversas manifestações clínicas, que dependem da espécie e da idade do peixe. O sintoma mais relevante é a presença de lesões extensas na superfície corporal dos animais (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005), estas lesões são caracterizadas pela destruição das células epidérmicas e do tecido conjuntivo, o que deixa o músculo exposto (Gelderen *et al.*, 2010). Além das lesões na pele, pode também ocorrer necrose e hemorragias ao nível da boca e das barbatanas (McVicar *et al.*, 1979; Campbell *et al.*, 1982; Baxa *et al.*, 1986; Devesa *et al.*, 1989), por vezes também se observam hemorragias e palidez ao nível do fígado (López *et al.*, 2009).

Uma forte capacidade de aderência ao muco da pele das diferentes espécies de peixes, e a capacidade de resistência á actividade bactericida, são apontados como possíveis factores de virulência (Magariños *et al.*, 1995). Esta resistência aos efeitos anti-bacterianos do muco pode ajudar a explicar o facto do primeiro local de infecção pela *T. maritimum* ser a superfície corporal, e as lesões típicas que surgem após a infecção serem úlceras cutâneas (Campbell *et al.*, 1982; Devesa *et al.*, 1989; Toranzo *et al.*, 1993). Esta doença parece estar fortemente relacionada com os níveis de stress e particularmente com as condições da superfície corporal (Bernardet *et al.*, 1990). Os produtos extracelulares (ECPs) segregados pela bactéria são componentes que vão facilitar a invasão do hospedeiro (Dalsgaard, 1993). A adesão da bactéria aos diferentes substratos é considerada um importante passo na colonização das células hospedeiras e é um importante passo na iniciação da doença (Vatsos *et al.*, 2001). A falta de resposta inflamatória numa fase precoce da doença, poderá resultar da libertação de exotoxinas pela bactéria, defendendo-se assim da resposta do hospedeiro (Gelderen *et al.*, 2009).

Do ponto de vista microbiológico, uma das maiores restrições na detecção da *T. maritimum* é a falta de métodos para distinguir este microorganismo de outros fenotipicamente semelhantes, particularmente de outras flavobactérias marinhas (Suzuki *et al.*, 2001). Além disso, obter culturas puras de *T. maritimum* de lesões externas é difícil, porque este agente patogénico tem um crescimento lento, o que permite que outras espécies oportunistas se sobreponham (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004). A capacidade da bactéria sobreviver na água e continuar

infecçiosa, ainda não está completamente esclarecida, mas deve ser considerada como um factor determinante na propagação da doença. Por outro lado é possível que em condições adversas a bactéria entre num estado de “dormência”, em que é viável mas não cultivável (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a).

O facto de a *T. maritimum* se poder apresentar num estado viável mas não cultivável (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a) constitui um risco potencial para as aquaculturas, e talvez possa explicar como os surtos de tenacibaculose podem ocorrer em populações de peixes que aparentemente não estiveram em contacto com o agente patogénico.

A via de infecção e o papel do meio-ambiente como reservatório deste agente patogénico ainda não está completamente clarificado (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a). Para Magariños *et al.* (1995) a via de infecção dá-se por ataque directo do microorganismo na superfície corporal dos peixes. Segundo Avendaño-Herrera *et al.* (2006a) a *T. maritimum* tem a capacidade de sobreviver e permanecer num estado cultivável, em água do mar esterilizada, durante mais de cinco meses, enquanto que em água do mar permanece cultivável apenas por 5 dias. O acentuado declínio da capacidade de cultura da bactéria em água do mar sugere um efeito inibitório de outros microorganismos existentes na água, no crescimento e sobrevivência desta bactéria (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a). No ambiente marinho, o antagonismo de outras bactérias tem um papel importante na sobrevivência desta bactéria, o que sugere que a água do mar não é uma via de transmissão da *T. maritimum* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a). Talvez esta bactéria tenha necessidade de estar protegida nos sedimentos, ligada a partículas e/ou superfícies animais até que as condições ambientais sejam favoráveis ao seu crescimento.

A análise dos componentes da superfície celular e das características fenotípicas da *T. maritimum*, após 160 dias em água do mar esterilizada, revelaram que as células mantêm as mesmas características bioquímicas, fisiológicas, serológicas e genéticas que a estirpe original. Contudo estas células diminuem de tamanho do terceiro ao sexto dia de incubação, dependendo do tipo de água utilizado. Esta redução drástica de tamanho pode ser uma estratégia de sobrevivência e de resistência ao stress ambiental (Novitsky *et al.*, 1976; Amy *et al.*, 1983; Kjelleberg *et al.*, 1984).

Como estas lesões favorecem a entrada de outras bactérias oportunistas e outros organismos saprófitas, tais como protozoários ciliados (McVicar *et al.*, 1979; Kimura *et al.*, 1983; Devesa *et al.*, 1989; Handler *et al.*, 1997), a *T. maritimum* aparece assim, com frequência, em infecções mistas (López *et al.*, 2009).

A maioria dos tratamentos propostos para a flexibacteriose baseiam-se na administração de drogas através da alimentação, mas a terapia repetida com o mesmo agente anti-microbiano, originou estirpes resistentes e diminuiu o efeito da quimioterapia (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006b). Uma terapia alternativa é a utilização repetida de desinfetantes de acção superficial, através de banho ou imersão. Um dos tratamentos profilácticos que tem recebido alguma atenção, pelo seu controlo efectivo de numerosos agentes patogénicos externos dos peixes, nomeadamente contra agentes do género *Flavobacterium* e *Cytophaga* (Lumsden *et al.*, 1998; Derksen *et al.*, 1999; Thomas-Jinu & Goodwin, 2004) similares á *T. maritimum*, é o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representa uma alternativa amiga do ambiente, porque é decomposto em água e oxigénio gasoso (Kiemer & Black, 1997). Embora o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja recomendado apenas como método de desinfecção geral, tratamento da água e da superfície dos tanques, antes da introdução dos peixes (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a).

Em aquacultura, apesar da necessidade de vacinas contra doenças bacterianas, apenas algumas vacinas comerciais estão disponíveis, não existindo até agora vacina contra a flexibacteriose (Salati *et al.*, 2005).

Apesar da importância da *T. maritimum* em aquacultura, não se sabe muito em relação à sua patogenicidade e ainda não foi desenvolvido um modelo experimental que possa ajudar a compreender a via de infecção deste agente patogénico (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a).

## 1.7 Objectivos

Com este trabalho pretendeu-se encontrar um método de infecção experimental *in vivo* do linguado com a *T. maritimum*, e avaliar a resposta dos leucócitos do rim anterior *in vitro*, para compreender melhor a interação agente patogénico/hospedeiro entre estas duas espécies.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Bactéria

Foram utilizadas duas estirpes de *Tenacibaculum maritimum* existentes no Laboratório de Imunobiologia do CIIMAR, ACC 6.1 e ACC13.1, ambas isoladas de *Solea senegalensis* de uma piscicultura localizada no norte de Portugal. A bactéria manteve-se armazenada em criotubos a -75°C, em Marine Broth (Laboratórios Conda, Madrid, Espanha) com 15% de glicerol (Sigma-Aldrich, Alemanha). As duas estirpes de *T. maritimum* foram inoculadas em placas de FMM agar (*Flexibacter maritimus* médium) e incubadas a 22-23 °C, durante 48 horas. Após esse período de incubação, foi retirado um inóculo com uma zaragatoa estéril e colocado a crescer em 50 mL de meio líquido, FMM Broth, por mais 48 horas. Destes frascos foram retirados 5 mL de solução e colocados em frascos com 500 mL de FMM Broth, por mais 48 horas, para obtenção de quantidades elevadas de bactéria no mesmo estado de desenvolvimento. À solução de FMM Broth foi sempre adicionado 10% de Tween 80 (Sigma-Aldrich) para evitar a agregação das bactérias.

Findo o último período de 48 horas, as bactérias foram centrifugadas a 3500 × rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente e ressuspendidas em PBS (*phosphate buffered saline*) estéril. Finalmente foi lida a densidade ótica (600 nm) para avaliar a concentração em cada uma das estirpes.

Através de contagem de unidades formadoras de colónias (CFU) em placa, foram confirmadas as concentrações obtidas. Foram feitas as diluições necessárias para obter de cada uma das estirpes tubos com 40 mL de suspensão com concentrações de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  CFU/mL, em duplicado, utilizadas no ensaio de infecção *in vivo*.

Para os ensaios de infecção *in vitro*, a partir do stock original as duas estirpes de bactéria foram colocadas a crescer em Marine agar (Laboratórios Conda) durante 48 horas a 22-23 °C.

Após 48 horas, retirou-se das placas a bactéria crescida com o auxílio de uma zaragatoa estéril, colocou-se a bactéria em tubos de 50 mL com PBS, e retirou-se uma aliquota de 100 µL para confirmar a concentração através de contagem de CFU's. Finalmente adicionou-se glicerol a 15 %, e foram congelados a -75 °C até à

sua utilização. Para o ensaio da quantificação de óxido nítrico, a bactéria foi inactivada por UV durante 4 h.

### 2.1.1. Curva de crescimento

Para obter as curvas de crescimento bacteriano das duas estirpes em estudo, utilizou-se o método de crescimento da bactéria em FMM Broth, com dois inóculos sucessivos. Foram feitas leituras da densidade ótica (1 mL), de hora a hora, em duplicado para cada estirpe. De cada uma dessas leituras foram retirados 100 µl de solução, dos quais foram feitas diluições seriadas e colocadas em placa para posterior contagem de CFU's. Finalmente, estabeleceu-se uma relação entre a densidade ótica e CFU, tendo como limite o valor de 0.8 para a densidade ótica.

### 2.2. Peixes

Os peixes (*S. senegalensis*) foram obtidos de uma piscicultura localizada no norte de Portugal. Dependendo do ensaio, foram utilizados dois tamanhos de peixe com pesos médios aproximados de 42 e de 350 g. Os peixes foram aclimatados durante 7 dias (temperatura: 20-22 °C; salinidade: 34‰; saturação de oxigénio superior a 90 %) e posteriormente colocados em sistema semi-fechado de recirculação de água salgada mantendo-se os mesmos parâmetros físico-químicos. Os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial (Alpis, Póvoa de Varzim, Portugal) uma vez por dia. Os níveis de amónia e nitritos foram monitorizados diariamente, tendo-se efectuado uma mudança parcial da água do sistema quando necessário. Unicamente peixes com comportamento normal e sem sintomas de doença foram utilizados durante todos os ensaios.

### 2.3. Ensaio de infecção

#### 2.3.1. Ensaio *in vivo*

Os peixes de menor tamanho (42 g) foram distribuídos em 2 sistemas de recirculação de água salgada para cada uma das estirpes (ACC6.1 e ACC13.1), constituídos por 8 tanques de plástico com um volume de água de 8 L, temperatura de 20-22 °C, salinidade 34 ‰, e saturação de oxigénio superior a 90

% . Foram colocados 10 peixes por tanque, em duplicado para cada concentração de bactéria. Assim, cada um dos sistemas teve concentrações finais de bactéria na água de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Para tal, a recirculação da água foi interrompida e o nível por cada tanque foi reduzido para 4 L. Procedeu-se então à infecção por banho, introduzindo os 40 mL de cada solução bacteriana anteriormente descrita. Após um período de 18 h de exposição à bactéria, a água dos tanques foi mudada 3 vezes, o nível por cada tanque voltou para 8 L e a recirculação foi reactivada (Avenidaño-Herrera *et al.*, 2006b). Dois tanques de cada sistema foram utilizados como controlo, tendo sido colocado o mesmo volume de PBS em vez da solução bacteriana. Diariamente foram monitorizados todos os tanques e eventualmente retirados os animais mortos. Para confirmar a causa da morte foram feitas colheitas de muco e de células das lesões que os animais apresentavam, e inoculadas em placa com Marine agar (Laboratórios Conda).

### 2.3.2. Ensaio *in vitro*

#### 2.3.2.1. Recolha de células para os ensaios *in vitro*

Para a recolha de leucócitos do rim anterior foram utilizados os peixes de maior tamanho (350 g) e utilizou-se o método descrito por Secombes (1990). O rim anterior foi removido em condições assépticas e macerado suavemente através de uma rede de nylon (poro de 100  $\mu$ m) usando meio Leibovitz (L15, Gibco, Reino Unido) suplementado com penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), heparina (20 unidades/mL) e 2% de FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) (L15 2 %). A suspensão de células resultante foi colocada sobre um gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) 34/51 % e centrifugada a  $400 \times g$  durante 40 minutos a 4 °C. O anel de leucócitos foi retirado da interface do Percoll (Figura 3), lavado 3 vezes em L15 2 % e ressuspendido em L15 Leibovitz com 0,1 % de FBS (L15 0,1 %). A determinação das células viáveis foi estabelecida com o teste de exclusão do azul de tripano, e a concentração ajustada para  $1 \times 10^7$  células/mL com L15 0,1 %. As células foram distribuídas por placas de 96 poços de fundo plano (100  $\mu$ L por poço). Após incubação *overnight* a 18°C, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com L15 e a camada aderente (Figura 4) foi mantida em L15 5 % até à realização dos ensaios.



Figura 3. Gradiente de Percoll 34:51% para separação do anel de leucócitos do rim anterior.

#### 2.3.2.2. Ensaio de explosão respiratória

No ensaio da explosão respiratória utilizou-se um método de quantificação da redução do ferrocitocromo C pelo anião superóxido ( $O_2^-$ ) extracelular (Secombes, 1990). A camada aderente de células foi lavada com L15, e foi adicionado a cada poço 100  $\mu$ L da suspensão da solução de ferrocitocromo C (2 mg de ferrocitocromo C/mL diluído em HBSS- Hank's balanced salt solution sem vermelho de fenol; Sigma) com as diversas concentrações de bactéria ( $1 \times 10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  CFU/mL) em triplicado, e um controlo negativo constituído pela solução de ferrocitocromo C, 10  $\mu$ g/mL de PMA (phorbol myristate acetate; Sigma) e 300 unidades/mL de SOD (superoxide dismutase; Sigma) para comprovar a especificidade da reacção. As placas foram lidas no espectrofotómetro Power-Wave™ (BioTek) a 550 nm, 30 minutos após a adição dos reagentes às células. As densidades óticas foram convertidas para nmol de  $O_2^-$  multiplicando os valores obtidos por 15,87 como descrito por Pick (1986).

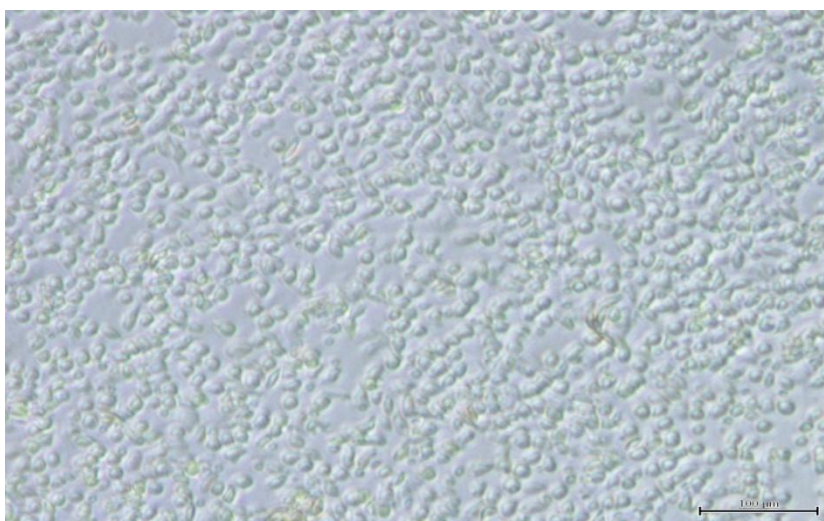


Figura 4. Aspecto da camada aderente após lavagem, em meio L15 5 %.

#### 2.3.2.3. Ensaio de produção de óxido nítrico

O ensaio de produção de óxido nítrico pelos leucócitos do rim anterior foi realizado pelo método descrito por Neumann *et al.* (1995) e modificado por Tafalla & Novoa (2000). Este método baseia-se na reacção de Griess (Green *et al.*, 1982) que quantifica o conteúdo em nitritos no sobrenadante dos leucócitos, dado que o óxido nítrico é uma molécula instável que se degrada em nitritos e nitratos.

Para estimular os leucócitos do rim anterior para a produção de óxido nítrico a camada aderente de células foi exposta a diversas concentrações de bactéria ( $1 \times 10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  CFU/mL). Também se utilizou LPS (lipopolissacarídeo) de *Escherichia coli* serótipo 0111:B4 (Sigma) na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  em L15 5%. Alguns dos poços foram ainda estimulados com LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e N<sup>G</sup>-Methyl-L-arginina (1 mM; Sigma) para confirmação de especificidade da reacção.

Após 72 horas de incubação a 18 °C, foram retirados 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes dos leucócitos, que se colocaram em novas placas de 96 poços. A cada um destes poços adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de sulfanilamida (1% em ácido fosfórico a 2,5 %; Sigma) e em seguida 100  $\mu\text{L}$  de solução de NED (N-naphthyl-ethylene-diamine (0,1 % em ácido fosfórico a 2,5 %; Sigma). Após 5 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, foi medida a absorvância a 540 nm. A

concentração dos nitritos das amostras foi determinada a partir das curvas padrão, geradas por concentrações conhecidas de nitrato de sódio.

#### 2.3.2.4. Ensaio de actividade bactericida

Para determinar a actividade bactericida dos leucócitos, procedeu-se a um ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico; Sigma] (Graham *et al.*, 1988).

A camada aderente de células foi lavada duas vezes com meio L15 para remover meio com antibiótico e foram adicionados 100 µL de meio L15 5%. Colocaram-se 20 µL de cada uma das concentrações de bactéria ( $1 \times 10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  CFU/mL), e as placas foram centrifugadas a  $150 \times g$  durante 5 min a 18 °C, para que a bactéria entrasse em contacto com os leucócitos. Findo este período, as placas foram incubadas a 18 °C durante 0 ( $T_0$ ) e 5 ( $T_5$ ) horas. Após o final de cada período de incubação, o sobrenadante foi removido, e a actividade bactericida foi interrompida pela lise dos leucócitos com 50 µL de água destilada estéril fria. Em seguida foram adicionados 100 µL de Marine Broth para promover o crescimento das bactérias sobreviventes.

Após 48 h a 18 °C, foram adicionados 10 µL de MTT a cada poço, as placas foram agitadas ligeiramente, e passados 15 min foi lida a densidade ótica de cada placa a 600 nm. Calculou-se a média dos valores dos triplicados. A diferença entre as leituras da densidade ótica, para cada uma das concentrações, entre o tempo  $T_0$  e  $T_5$  representa o grau de actividade bactericida:

$$\frac{T_0 \text{ MTT redução} - T_5 \text{ MTT redução}}{T_0 \text{ MTT redução}} \times 100$$

#### 2.4. Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados para a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade da variância (teste de Levene), quando necessário fez-se a transformação logarítmica dos dados, antes de serem tratados estatisticamente. Todos os resultados apresentados como percentagem foram transformados a

arcoseno antes de ser tratados estatisticamente (Zar, 1999). Os dados do ensaio foram analisados através de uma ANOVA de duas vias. Foram ainda aplicados testes não paramétricos quando os dados não cumpriram os requisitos para utilização de uma ANOVA. Quando o resultado da ANOVA apresentou diferenças significativas, foram efectuados testes *post-hoc* para identificar diferenças entre tratamentos (concentração de bactéria/estirpe). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS 15.0 para WINDOWS. O nível de significância utilizado foi de  $P \leq 0,05$  para todos os testes estatísticos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Curvas de crescimento bacteriano

As estirpes ACC6.1 e ACC 13.1 de *Tenacibaculum maritimum* apresentaram, no segundo passo dos dois inóculos sucessivos (ver no ponto 2.1.1 do Material e Métodos), um crescimento exponencial entre os tempos 0 e 37 horas (Figuras 5A e 5B), o qual foi equivalente a  $6,4 \times 10^5$  e  $2,0 \times 10^8$  CFU/mL para a estirpe ACC6.1, e  $7,2 \times 10^5$  e  $4,8 \times 10^8$  CFU/mL para a estirpe ACC13.1, respectivamente (Figuras 6A e 6B). Entre as 37 e as 40 horas foi considerada a transição da fase exponencial para a fase estacionária. A partir deste ponto, ambas as estirpes começaram a mostrar sinais de declínio, e a partir das 41 horas, tanto as leituras das densidades ópticas como as contagens de CFU começaram a decrescer.

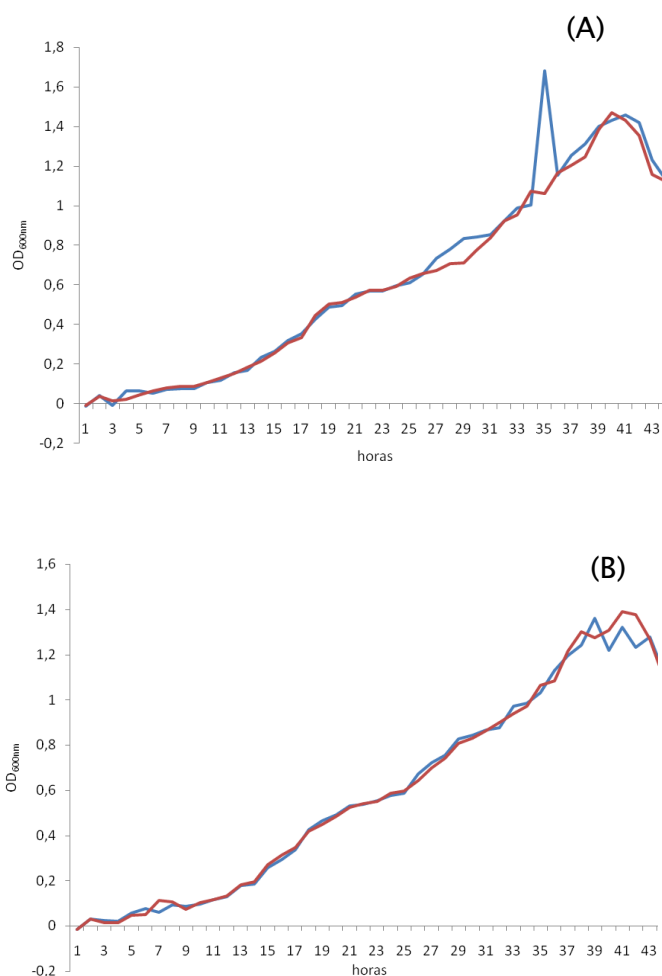


Figura 5. Curvas de crescimento das estirpes ACC6.1 (A) e ACC13.1 (B) de *T. maritimum*. Curva do duplicado 1 (-) e do duplicado 2 (·) para ambas as estirpes.

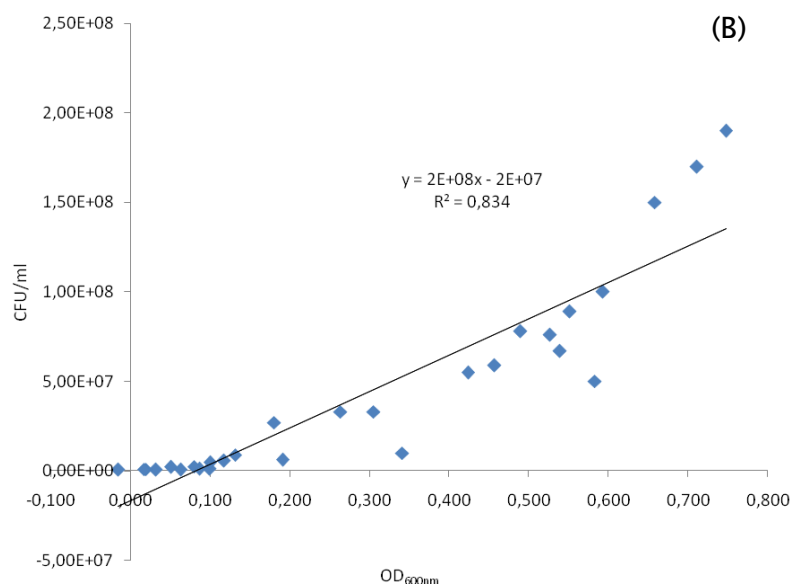
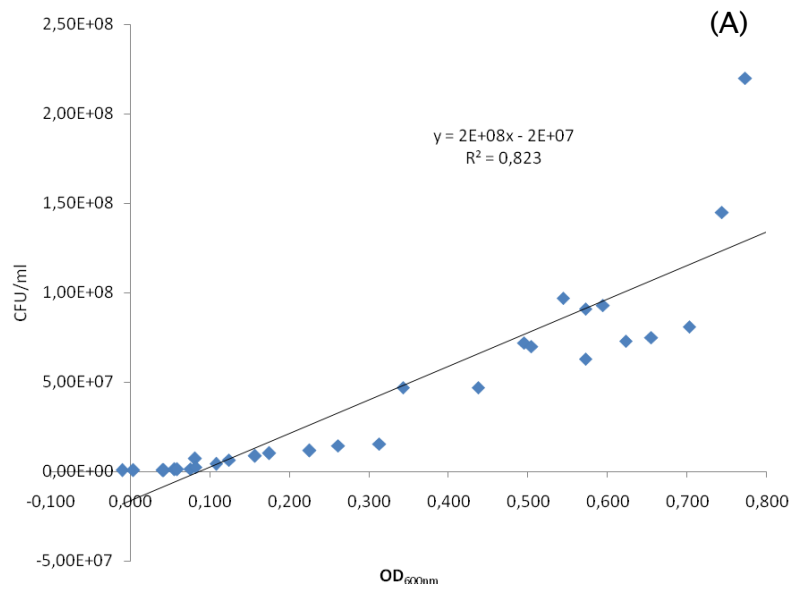


Figura 6. Relação entre OD/CFU da estirpe ACC6.1 (A) e ACC13.1 (B).

### 3.2. Ensaio de infecção *in vivo*

Nos dois grupos de peixes infectados, foi detectado que a concentração bacteriana que se estava a utilizar era desconhecida e inferior à inicialmente calculada, pois durante as contagens de CFUs dos inóculos originais foi verificado

que se encontravam contaminados por outras espécies de bactérias. Sendo assim, 5 dias após as 18 horas de infeção experimental e a recirculação da água nos tanques ter sido reactivada, procedeu-se a uma alteração da distribuição dos peixes. Com esta alteração procurou-se introduzir um novo factor, stress crónico, incrementando a densidade de 5 kg/m<sup>2</sup> para 22 Kg/m<sup>2</sup>. Num outro grupo de tanques manteve-se a densidade baixa (aprox. 5 Kg/m<sup>2</sup>), o qual serviu como controlo, para verificar se a bactéria existente provocaria alguma infeção. As mortalidades surgiram no sistema com densidade alta, no 7º dia depois da alteração da distribuição dos peixes, tendo estas continuado até ao 26º dia. Todos os peixes mortos foram sendo retirados do sistema.

Os animais mortos, apresentavam sintomas de estarem infectados por *T.maritimum* (úlceras e lesões ao nível das barbatanas) (Figura 7). A presença da *T.maritimum* foi confirmada através técnicas microbiológicas e moleculares (resultados não apresentados).

Assim sendo, optou-se por abandonar este ensaio, e não se repetiu a experiência dado que o tempo disponível, no âmbito deste trabalho, não o permitia.

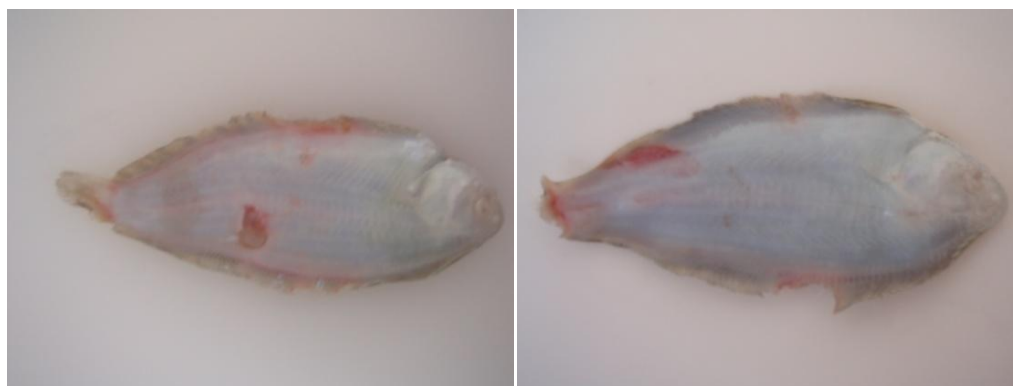


Figura 7. Peixes mortos no decurso do ensaio de infeção *in vivo* de *S. senegalensis* com *T. maritimum*.

### 3.3. Ensaio de infeção *in vitro*

No ensaio referente à explosão respiratória as células exibiram respostas gradualmente superiores, de acordo com o aumento da concentração das bactérias inoculadas ( $P < 0,001$ ). Além disso, na concentração mais elevada ( $1 \times 10^5$  CFU/mL) foi observada uma resposta diferente entre as duas estirpes em estudo. Os leucócitos estimulados com a estirpe ACC6.1 apresentaram um valor de

produção de  $O_2^-$  significativamente superior aos estimulados com a estirpe ACC13.1 ( $P < 0,001$ ), embora nas duas concentrações mais baixas de bactéria ( $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  CFU/mL) não existem diferenças significativas entre as duas estirpes (Figura 8).

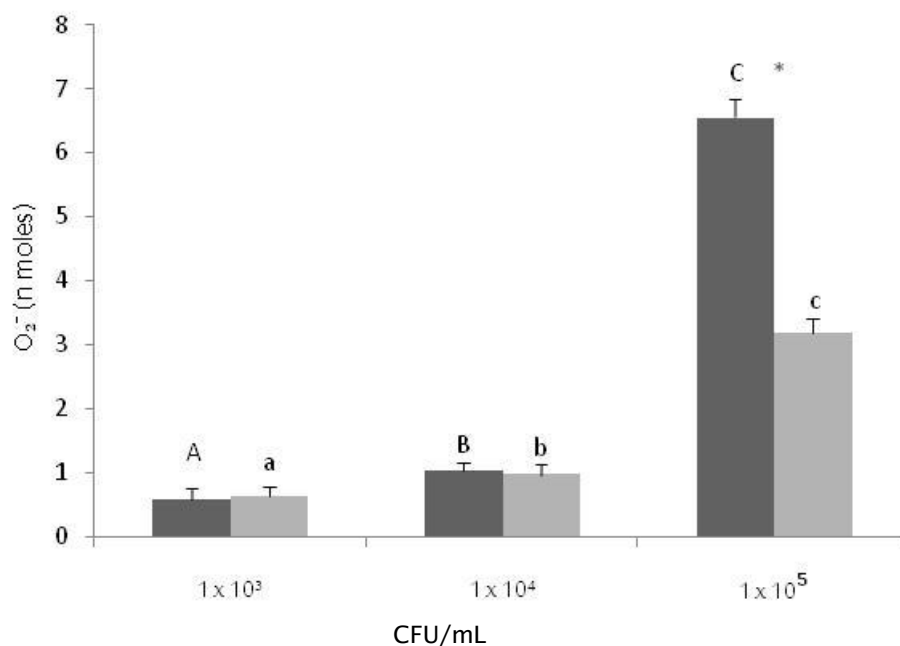


Figura 8. Produção do anião  $O_2^-$  (nmoles) extracelular por leucócitos do rim anterior de *S. senegalensis* estimulados com diferentes concentrações de 2 estirpes [ACC6.1 (■) e ACC13.1 (□)] de *T. maritimum*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações (ANOVA duas vias;  $P < 0,001$ ) e \* indica diferenças significativas entre estirpes (*T* test;  $P < 0,001$ ).

No ensaio referente à produção de óxido nítrico, e numa forma similar ao observado no ensaio da explosão respiratória, os leucócitos do rim anterior apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, de acordo com o aumento da concentração das bactérias inoculadas ( $P < 0,001$ ). Também neste caso, a resposta foi significativamente diferente na estirpe ACC6.1 na concentração de  $1 \times 10^5$  CFU/mL, que apresentou um valor mais elevado de produção de óxido nítrico ( $P < 0,001$ ). As duas concentrações inferiores não apresentaram diferenças significativas entre estirpes. As células estimuladas com LPS apresentaram uma resposta muito ténue (Figura 9).

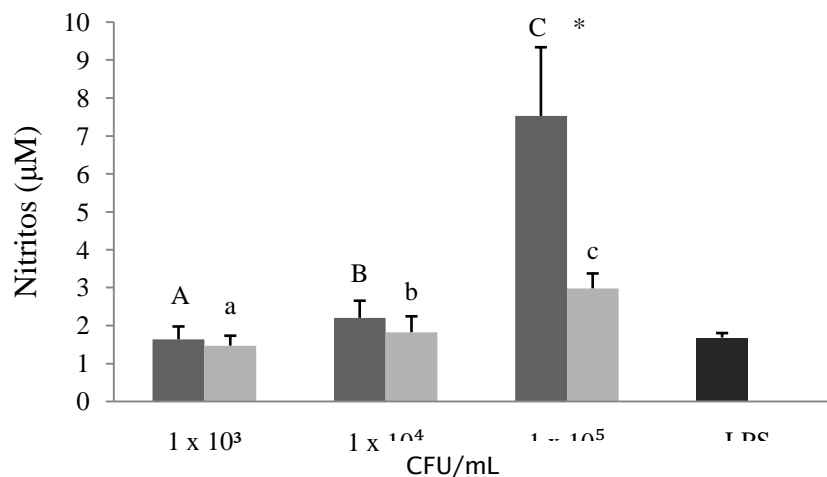


Figura 9. Produção de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) em leucócitos do rim anterior de *S. senegalensis* estimulados com diferentes concentrações de 2 estirpes de *T. maritimum*. Estirpe ACC6.1 (■) e ACC13.1 (▒). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações, e \* diferenças significativas entre estirpes (Teste Kruskal-Wallis;  $P < 0,001$ ).

No ensaio de actividade bactericida os resultados obtidos apenas apresentaram diferenças significativas entre concentrações de bactérias ( $P < 0,001$ ), não existindo diferenças entre estirpes para cada uma das concentrações.

A Figura 10 mostra, que a proporção de bactérias sobreviventes vai aumentando progressivamente com a concentração inoculada.

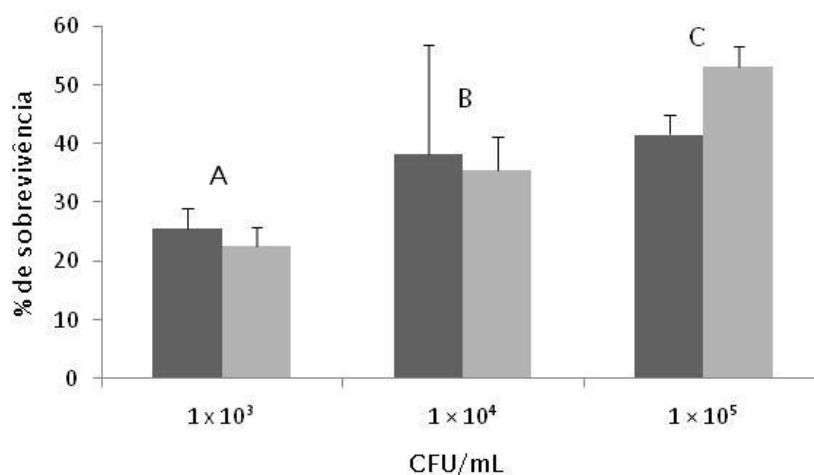


Figura 10. Proporção de sobrevivência de bactéria ( $\pm$  erro padrão) após incubação com os leucócitos do rim anterior. Estirpe ACC6.1 (■) e ACC13.1 (▒). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre concentrações (ANOVA duas vias;  $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Apesar da tenacibaculose ser uma doença que afecta várias espécies marinhas, a interação da *Tenacibaculum maritimum* com o hospedeiro é ainda desconhecida. A via de infecção e o possível papel do ambiente marinho como reservatório deste agente patogénico ainda não está totalmente clarificado (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006a). Contudo, embora neste trabalho não se tenha concluído a experiência de infecção *in vivo*, podemos afirmar que é possível induzir a infecção experimental quando os peixes se encontram em condições de stress crónico. As altas densidades de cultivo são práticas comuns na piscicultura marinha e, junto com o transporte e o manuseamento necessário a procedimentos de triagem e vacinação, são indutoras de stress (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

Embora no presente estudo, nenhum parâmetro de condição de stress tenha sido analisado., Costas *et al.* (2008) e Salas-Leiton *et al.* (2010) verificaram no linguado que em condições de stress crónico similares, os níveis de cortisol no plasma e a susceptibilidade à infecção por patógenos oportunistas aumentava, assim como os níveis de transcrição dos genes HAMP1 (*hepcidin antimicrobial peptide 1*) e gLYS (*g-type lysozyme*) diminuía no fígado. Portanto, verificou-se o papel imunossupressor do cortisol, a principal hormona do stress (Wendelaar Bonga, 1997). Assim, neste estudo, poder-se-á especular que as altas densidades provocadas durante o ensaio de infecção *in vivo* induziram uma situação de stress crónico que facilitou a infecção por *T. maritimum*. Contudo, mesmo tendo-se verificado a sintomatologia de tenacibaculose e a presença desta bactéria nos peixes mortos, outras bactérias oportunistas poderão ter contribuído na incidência destas mortalidades. Devido a esta falta de informação e aos problemas de contaminação verificados durante a preparação do inóculo, este ensaio *in vivo* foi considerado preliminar mas fundamental para o considerar na preparação de futuros ensaios de infecção com *T. maritimum*.

No presente trabalho, estudou-se a resposta dos leucócitos do rim anterior a estímulos produzidos por duas estirpes de *T. maritimum*, contribuindo pela primeira vez para o estudo das interacções célula do hospedeiro (linguado) - *T. maritimum*.

A explosão respiratória é uma importante resposta antimicrobiana das células fagocitárias, tais como os macrófagos e os neutrófilos (Neumann *et al.*, 2001). Estes fagócitos podem ser estimulados de modo a desencadear a explosão respiratória (Neumann *et al.*, 2001). Nesta resposta é desencadeada a produção de um grupo de agentes oxidantes, cujo precursor é o  $O_2^-$ , gerado por estas células do sistema imunitário (Chanock *et al.*, 1994). Segundo Chung & Secombes (1988) existe uma evidência directa de que o  $O_2^-$  é produzido e segregado pelos macrófagos dos peixes no decurso da explosão respiratória. A explosão respiratória dos macrófagos de peixe pode ser estimulada pelo LPS da membrana das bactérias Gram-negativas (Neumann *et al.*, 2001). Portanto, os resultados deste ensaio demonstram que uma concentração maior de bactéria tem como resultado uma maior produção de  $O_2^-$ , o que poder-se-á atribuir a uma maior presença de LPS, implicando este facto uma maior estimulação da explosão respiratória, confirmando o que foi demonstrado no trabalho de Solem *et al.* (1995) em que estes autores concluíram que o aumento da explosão respiratória está dependente da dose de LPS. Esta hipótese é ainda suportada pelo trabalho de Salati *et al.* (2005), no qual se verificou que leucócitos do sangue de robalos imunizados com LPS de *T. maritimum* apresentavam um maior índice de fagocitose *in vitro*. Por outro lado, o facto de se terem obtido diferentes respostas a diferentes estirpes, mostra que outros factores de virulência estão presentes durante a infeção do linguado por esta bactéria. O facto de não existirem diferenças entre estirpes nas concentrações inferiores, poderá ser indicativo de que as concentrações de bactéria utilizadas nos ensaios não serem suficientes para provocar uma resposta diferenciada das células.

Assim, poder-se-á afirmar que a estirpe ACC6.1 induz uma resposta significativamente superior à da estirpe ACC13.1, na concentração mais alta. Em estudos de infecção do linguado com a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* no nosso laboratório, foi verificado que quanto maior a virulência da bactéria, maior o valor da resposta celular na produção de anião  $O_2^-$  (Costas *et al.*, comunicação pessoal). Logo, poder-se-á sugerir que a estirpe ACC6.1 apresenta um grau de virulência superior ao da estirpe ACC13.1. Por outro lado, esta maior resposta celular mostrada contra a estirpe ACC6.1 também pode ser devida a que os PRRs dos leucócitos do rim anterior do linguado poderão ter reconhecido diferentes PAMPS (*Pathogen-associated molecular pattern*) associados a características genéticas únicas para cada estirpe. Estudos posteriores de

infecção de linguados com *T. maritimum* poderão contribuir para o esclarecimento destas hipóteses.

A produção de ON pelas células é parte de uma resposta efectiva do hospedeiro à infecção, e tal como a produção de anião  $O_2^-$  na explosão respiratória, desempenha um importante papel na defesa celular contra as infecções bacterianas (Neumann *et al.*, 1995; Fang, 1997; Tafalla & Novoa, 2000). O ON pode ser produzido por uma ampla variedade de tipos celulares devido à existência de três isoformas da enzima NOS (*nitric oxide synthase*), as quais foram descritas em mamíferos como neuronal, indutível (iNOS) e constitutiva (Nathan & Xie, 1994). Em peixes, a produção de ON em leucócitos através da estimulação com LPS tem sido verificado em várias espécies (Neumann *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1997; Tafalla & Novoa, 2000; Sarmiento *et al.*, 2004), incluindo o linguado (Costas *et al.*, 2011). No presente ensaio, a resposta das células ao estímulo induzido por LPS foi muito ténue, o que pode indicar que o LPS por si só não é um bom estimulador da produção de óxido nítrico, tal como verificado por Tafalla & Novoa (2000), em que a resposta ao tratamento com LPS não foi evidente em todos os peixes testados. Segundo os mesmos autores é necessária uma combinação entre LPS com diferentes citocinas ou outros factores de activação dos macrófagos (MAFs). Além disso, Sarmiento *et al.* (2004) sugerem ainda que a diferenciação celular é um factor muito importante na produção do ON, pois culturas primárias de leucócitos do rim anterior são maioritariamente compostas por células imaturas, portanto células do tipo monócito.

Sendo este trabalho a primeira vez que se estuda a resposta das células do rim anterior do linguado à infecção por *T. maritimum*, foi encontrada aqui alguma dificuldade em estabelecer correlações com trabalhos anteriores. Contudo, os resultados deste estudo corroboram o papel essencial do ON na defesa celular contra patógenos. Saeij *et al.* (2003) verificaram um aumento de ON no plasma de carpas (*Cyprinus carpio*) infectadas com uma parasitose. De uma forma similar, foi ainda observado um aumento na expressão da iNOS em trutas (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas com *Aeromonas salmonicida*, uma bactéria Gram-negativa (Laing *et al.*, 1999). Neste estudo, a produção de ON foi muito similar à produção do anião  $O_2^-$ , mostrando portanto a importância destas defesas celulares contra a infecção por *T. maritimum*.

A técnica da actividade bactericida é um método rápido e directo, comprovado por Graham *et al.* (1988), em que o MTT é reduzido na proporção directa do número de bactérias viáveis. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que na presença de monocamadas de leucócitos do rim anterior de linguado, quanto maior é a concentração de bactérias maior é a taxa de sobrevivência destas, e que menores concentrações apresentam menores taxas de sobrevivência. Trabalhos similares mostram a mesma resposta celular independentemente da bactéria e da espécie utilizados no estudo (Graham *et al.*, 1988; Skarmeta *et al.*, 1995; Arijó *et al.*, 1998). Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios da explosão respiratória e do ON no presente trabalho, é surpreendente não se terem verificado diferenças na actividade bactericida entre estirpes para a maior concentração de bactéria utilizada. No entanto, o tempo de incubação dos leucócitos com a *T. maritimum* foi apenas de 5 h, tempo insuficiente para se produzir ON em quantidade suficiente. A produção do ON é exponencial e são necessários tempos de incubação superiores a 48 h (Neumann *et al.*, 1995; Tafalla & Novoa, 2000). Portanto, unicamente um maior aumento da produção do anião  $O_2^-$  não terá sido suficiente para lisar um maior número de bactérias de forma significativa, pois verifica-se uma tendência a ocorrer maior mortalidade de *T. maritimum* quando incubada com células que apresentam uma maior explosão respiratória.

## 5. Conclusões

O presente trabalho mostra pela primeira vez as respostas celulares inatas do linguado senegalês perante um desafio com *Tenacibaculum maritimum*, o qual contribui para o estudo das interacções parasita/hospedeiro no caso desta bactéria e deste peixe. Com os resultados obtidos neste estudo pode concluir-se que os leucócitos do rim anterior do linguado apresentam respostas celulares ao estímulo inflamatório provocado pela *T. maritimum*, cuja magnitude é incrementada conforme a concentração de bactéria aumenta. Além disso, verificou-se que a estirpe ACC6.1 deu origem a uma resposta mais intensa, e que, por isso, poderá eventualmente ser considerada mais virulenta do que a ACC13.1. Ambas as respostas, produção de ON e de  $O_2^-$ , mostram a participação destes mecanismos de defesa celular contra a infecção por *T. maritimum*.

## 6. Bibliografía

- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998.** Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34, 27-37.
- Afonso, A., Silva, J., Lousada, S., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998.** Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 8, 319-338.
- Alvarez-Pellitero, P., 2008.** Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 126, 171-198.
- Amy, P.S., Morita, R.Y., 1983.** Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 45, 1109-1115.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H., Hirono, I., 2008.** Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives, in: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T.D., Kaiser, M.J. (Eds), *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress. pp 263-276.
- Arijo, S., Borrego, J.J., Zorilla, I., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., 1998.** Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L) macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*. 8, 63-72.
- Avendaño-Herrera, R., Rodríguez, J., Magariños, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2004.** Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 871-877.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Magariños, B., 2005.** Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11), 6947-6953.

- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Magariños, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2006a.** Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environmental Microbiology*. 8(5), 921-928.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Magariños, B., 2006b.** A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 29, 371-374.
- Barton, B.A., Iwama, I.W., 1991.** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis*. 1, 3 - 26.
- 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.
- Baxa, D.V., Kawai, K. and Kusuda, R., 1986.** Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. *Fish Pathology*. 21, 251-258.
- Bernardet, J.F., Grimont, P.A., 1989.** Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev. and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, 346-354.
- Bernadet, J.F., Campbell, A.C., Buswell, J.A., 1990.** *Flexibacter maritimus* is the agent of "black patch necrosis" in Dover sole in Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms*. 8, 233-237.
- Blair, T., Castell, J., Neil, S., D'Abramo, L., Cahu, C., Harmon, P., Ogunmoye, K., 2003.** Evaluation of microdiets versus live feeds on growth, survival and fatty acid composition of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture*. 225(1-4), 451-461.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006.** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 239-262.

- Callard, R. & Gearing, A., 1994.** *The Cytokine Factsbook*. London: Academic Press.
- Campbell A.C., Buswell, J.A., 1982.** An investigation into the bacterial aetiology of “black patch necrosis” in Dover sole, *Solea solea* L. *J Fish Dis.* 5, 495-508.
- Cañavate, J.P., Fernández-Díaz, C., 1999.** Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture.* 174, 255-263.
- Chanock, S.J., Bennis, J.E., Smith, R.M., Babior, B.M., 1994.** The respiratory burst oxidase. *The Journal of Biological Chemistry.* 269(40), 24519-24522.
- Chen, M.F., Henry-Ford, D., Groff, J.M., 1995.** Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health.* 7, 318-326.
- Chung, S., Secombes, C.J., 1988.** Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 89, 539-544.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008.** High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research.* 39, 1-9.
- Dalsgaard, I., 1993.** Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annu Rev Fish Dis.* 3, 127-144.
- Derksen, J.A., Ostland, V.E., Ferguson, H.W., 1999.** Effects of hydrogen peroxide on clearance of formalin-killed *Flavobacterium branchiophilum* from the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 22, 59-67.
- Denicola, A., Rubbo, H., Rodriguez, D., Radi, R., 1993.** Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys.* 304, 279-286.

- Devesa, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1989.** Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L). J Fish Dis. 12, 323-333.
- Dinis, M.T., 1986.** Quatre soleidae de l'estuaire du Tage. Reproduction et croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'État ès-Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M.T., Reis, J., 1995.** Culture of *Solea* spp. Cahiers Options Mediterraneennes (CIHEAM). 9-19.
- Dinis, M.T., Reis, J., Arrobas, I., 1996.** Evaluation of the farming potential for *Solea senegalensis* Kaup, a new species for aquaculture in the Mediterranean area. Book of Abstracts World Aquaculture 96, Bangkok, 107-109.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999.** A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture. 176, 27-38.
- Diniz, M., 1998.** A Aquacultura, in: Henriques, M.A.R. (Eds.), Manual de Aquacultura. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, pp. 13-15.
- Drake, P., Arias, A.M., Rodriguez, A., 1984.** Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando Cadiz.: II. Características de la producción de peces. Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq. 116, 1-23.
- Ellis, A.E., 1999.** Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology. 9, 291-308.
- Ellis, A.E., 2001.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental & Comparative Immunology. 25, 827-839.
- Evans, T.J., Buttery, L.D., Carpenter, A., Springall, D.R., Polak, J.M., Cohen, J., 1996.** Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 9553-9558.

- Fang, F.C., 1997.** Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. J. Clin. Invest. 99(12), 2818-2825.
- FAO, 2008.** The State of World Fisheries and Aquaculture. Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 196pp.
- FAO, 2010.** The State of World Fisheries and Aquaculture. Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 218pp.
- Gelderen, R., Carson, J., Nowak, B., 2009.** Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. Aquaculture. 288, 7-13.
- Gelderen, R., Carson, J., Gudkovs, N., Nowak, B., 2010.** Physical characterisation of *Tenacibaculum maritimum* for vaccine development. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. 1-9.
- Graham, S., Jeffries, A.H., Secombes, C.J., 1988.** A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish; factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Diseases. 11, 389-396.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S., 1982.** Analysis of nitrate, nitrite, and (<sup>15</sup>N) nitrate in biological fluids. Analyt Biochem. 126,131-138.
- Gonçalves, J.F., 2006.** Cultivar o mar – A aquacultura em Portugal, in: Garrido, A. (Eds), A Economia Marítima Existe. Âncora Editora. Pp 155-170.
- Handler J., Soltani H., Percival, V., 1997.** The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species of Tasmania, Australia. Journal of Fish Diseases. 20, 159-168.
- Hart, P.R., Purser, G.J., 1996.** Weaning of hatchery-reared greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Gunther) from live to artificial diets: Effects of age and duration of the changeover period. Aquaculture. 145, 171-181.

- Hikida, M., Wakabayashi, H., Egusa, S., Masumura, K., 1979.** Flexibacter sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45(4), 421-428.
- Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002.** The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*. 12, 399-420.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003.** A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. Senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 13, 379-407.
- Kiemer, M.C.B., Black, K.D., 1997.** The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*. 153, 181-189.
- Kimura H., Kusuda, R., 1983.** Microbial succession in gliding bacterium infection in red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries*. 49, 1553-1559.
- Kjelleberg, S., Hermansson, M., 1984.** Starvation-induced effects on bacterial surface characteristic. *Appl Environ Microbiol*. 48, 497-503.
- Lamas, J., Ellis, A.E., 1994.** Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol*. 4, 210-219.
- Lagardère, F., Decamps, P., Quero, J.-C., 1979.** Découverte les longs des costes de la Charente-Maritime d'une population de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Soleidae, Pleuronectiformes). *Ann. Soc. Sci. Nat. Charente-Maritime*. 6, 563-572.
- Laing, K.J., Hardie, W., Grabowski, P.S., Secombes, C.J. 1999.** Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 23,71-85.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., Froysadal, E., 1989.** Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 6, 1-5.
- López, J.R., Núñez, S., Magariños, B., Castro, N., Navas, J.I., de la Herran, R., Toranzo, A.E., 2009.** First isolation of *Tenacibaculum maritimum* from

wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Journal of Fish Diseases*. 32, 603-610.

**Lumsden, J.S., Ostland, V.E., Ferguson, H.W., 1998.** Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*. 10, 230-240.

**Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 1995.** Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21, 103-108.

**McVicar A.H., White, P.G., 1979.** Fin and skin necrosis of Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 2, 557-562.

**Medzhitov, R., 2007.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449, 819-826.

**Nathan, C.F., 1992.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*. 6, 3051-3064.

**Nathan, C.F., Xie, Q., 1994.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 269,13725-13728.

**Neumann, N.F., Fagan, D., Belosevic, M., 1995.** Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production. *Developmental and Comparative Immunology*. 19(6), 473-482.

**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. *Developmental & Comparative Immunology*. 25, 807-825.

**Nonaka, M., Smith, S.L., 2000.** Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 10, 215-228.

**Novitsky, J.A., Morita, R.Y., 1976.** Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl Environ Microbiol*. 32, 617-622.

- Parra, G., Yúfera, M., 2001.** Comparative energetic during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *The Journal of Experimental Biology*. 204, 2175–2183.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2004.** Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 6, 1382–1387.
- Person-Le-Ruyet, J, Alexandre, J.C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993.** Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey? *J. World Aquaculture Soc.* 24(2), 211-224.
- Pick, E., 1986.** Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Meth. Enzymol.* 132, 407-421.
- Plouffe, D.A., Hanington, P.C., Walsh, J.G., Wilson, E.C., Belosevic, M., 2005.** Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*. 12, 266-277.
- Ramos, J., 1982.** Estudio de la edad y crecimiento del lenguado *Solea solea* (L. 1758)(Pisces Soleidae). *Investig. Pesq.* 46, 275–286.
- Rigos, G., Katharios, P., 2010.** Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Rev Fish Biol Fisheries*. 20, 47–70.
- Rodríguez, A., Rodríguez, R.B., 1980.** First record of *Solea senegalensis* Kaup 1858 (Heterosomata, Soleidae) from Mediterranean Sea. *Invest. Pesq.* 44, 291-295.
- Saeij, J.P.J., Verburg-van Kemenade, L.B.M., van Muiswinkel, W.B., Wiegertjes, G.F., 2003.** Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. *Dev Comp Immunol.* 27,233-245.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo D., Planas, J.V., Infante C., Cañavate, J.P., Manchado, M., 2010.** Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea*

- senegalensis*): Potential effects on the immune response. Fish Shellfish Immunol. 28, 296 - 302.
- Salati, F., Cubadda, C., Viale, I., Kusuda, R., 2005.** Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. Fisheries Science. 71, 563-567.
- Santos, Y., Pazos, F., Barja, J.L., 1999.** *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriose in marine fish. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet n°55.
- Sardinha, M., 2009.** Aquaculture on a national context. European Aquaculture Society Student Group.
- Sarmiento, A., Marques, F., Ellis, A.E., Afonso, A., 2004.** Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol 16, 79-92.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. 39, 223-239.
- Savan, R., Sakai, M., 2006.** Genomics of fish cytokines. Comparative Biochemistry and Physiology. Part D 1, 89 - 101.
- Secombes, C.J., 1990.** Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity, in: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, pp. 137-154.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J., Daniel, G., 1996.** Cytokines in fish: an update. Fish & Shellfish Immunology. 6, 291-304.
- Skarmeta, A.M., Bandin, I., Santos, Y., Toranzo, A.E., 1995.** *In vitro* killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. Diseases of Aquatic Organisms. 23, 51-57.

- Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B., 1995.** Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*. 5, 475-491.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S., 2001.** Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. Nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. Nov. and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. Nov. and *Tenacibaculum amyloiticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1639-1652.
- Tafalla, C., Novoa, B., 2000.** Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 623 - 631.
- Thomas-Jinu, S., Goodwin, A.E., 2004.** Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *J. Fish Dis.* 27, 23-28.
- Thomson, A., 1994.** *The Cytokine Handbook*, 2nd edition. London: Academic Press.
- Toranzo, A.E., Novoa, B., Romalde, J.L., Nunez, S., Devesa, S., Marino, E., Silva, R., Martinez, E., Figueras, A., Barja, J.L., 1993.** Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in Northwest Spain. *Aquaculture*. 114,189-202.
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., 2003.** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*. 22(3), 277-286.
- Vatsos, I.N., Thompson, K.D., Adams, A., 2001.** Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and n-hexadecane. *Lett Appl Microbiol.* 33, 178-182.
- Wakabayashi, H., Hikida, M. and Masumura, K., 1984.** Flexibacter infection in cultured marine fish in Japan. *Helgolander Meeresunter-suchungen*. 37, 587-593.

- Wakabayashi, H., Hikida, M., Masumura, K., 1986.** *Flexibacter maritimus* sp. nov., a Pathogen of Marine Fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36(3), 396-398.
- Warr, H.G., 1995.** The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 1.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997.** The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 7, 591 – 625.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 1997.** Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defense against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 7,93-104.
- Zar, J.H., 1999.** *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall International Editions, IL, USA. 662pp.
- Zhu, L., Gunn, C., Beckman, J.S., 1992.** Bacterial activity of peroxy nitrite. *Arch Biochem Biophys.* 298, 452-457.