



Ana Paula Losada García

Tese de doutoramento

**Enteromixosis del rodaballo:
Esclarecimiento de
mecanismos patogénicos y rutas de la
respuesta inmunitaria**

Departamento Ciencias Clínicas Veterinarias
Facultade de Veterinaria

Lugo
2013

Enteromixosis del rodaballo: Esclarecimiento de mecanismos patogénicos y rutas de la respuesta inmunitaria

Tesis Doctoral

Programa de doctorado: “Investigación básica y aplicada en Ciencias Veterinarias”



Dpto. de Ciencias Clínicas Veterinarias

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario, 27002 Lugo

María Isabel Quiroga Berdeal, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la USC, y Roberto Bermúdez Pose, Profesor Interino de Sustitución del Departamento de Anatomía y Producción Animal de la USC

Informan:

Que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada por Ana P. Losada García bajo su codirección y aprueban su presentación para la obtención del Título de Doctora en Veterinaria.

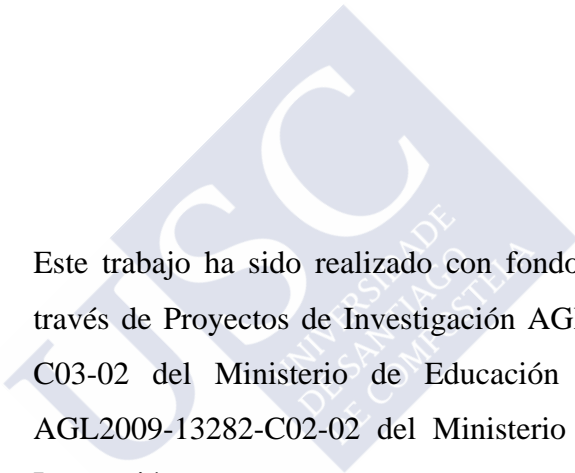
Lugo, 12 de septiembre de 2013

M^a Isabel Quiroga Berdeal

Roberto Bermúdez Pose

La doctoranda

Ana P. Losada García



Este trabajo ha sido realizado con fondos obtenidos a través de Proyectos de Investigación AGL2006-13158-C03-02 del Ministerio de Educación y Ciencia y AGL2009-13282-C02-02 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

La estancia de la doctoranda ha sido financiada con fondos de la Acción Integrada con Italia IT2009-0036 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Ana P. Losada ha sido beneficiaria de una beca-contrato del Programa María Barbeito 2008 de la *Consellería de Innovación e Industria* de la *Xunta de Galicia*.



A mi familia

A Javi

Más allá de todo lo que ha supuesto elaborar una Tesis Doctoral en estos días, con algunas facilidades y a veces también dificultades, quiero dar las más sinceras gracias a todas las personas que han colaborado para que esta Tesis sea una realidad.

Gracias a mis estupendos directores, Maribel y Rober, que en todo este tiempo han sido unos grandes mentores. Desde el principio me abrieron todas las puertas, facilitaron mi completa integración en el grupo y demuestran a diario una paciencia extrema conmigo.

Gracias a los co-autores de las publicaciones que se derivan de esta Tesis Doctoral y a las editoriales Elsevier e Inter-Research por autorizarme a reproducir los contenidos de los artículos.

Gracias a toda la gente con la que he convivido este tiempo en el entorno de la Facultad de Veterinaria, con la que he compartido tanto trabajo como buenos momentos en su compañía. Por todas esas horas de laboratorio y también de ocio, gracias a Dani, Sandri, Meli, Germán, Paolo, Manuela, Rita, Andrés, Fabri, Paulo, Nuri, Sonia, Mónica y José María. Gracias a Lorena, por su amabilidad y por llenarnos la barriga de cosas deliciosas. No me puedo olvidar de Xan, que en esta última etapa me ha tenido que “aguantar” de vecina. También quiero mencionar a los compañeros de Anatomía, que siempre me han ayudado cuando lo necesitaba. De esta experiencia me llevo grandes amistades, y además, unos cuantos sobrinitos.

Gracias a todos mis amigos. En primer lugar, las que siempre han estado ahí, desde muy “guajina”, Leni y Pau. De mi etapa en Lugo, muchas gracias a Marta y Koki, Rai, Manolo, Isma y otros muchos

Agradecimientos

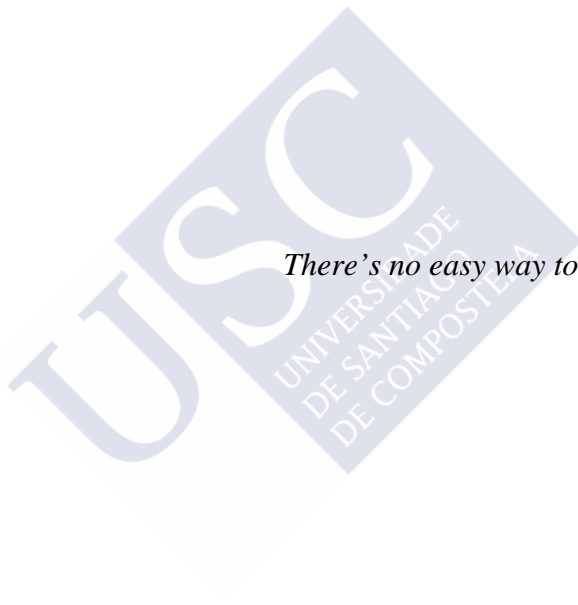
compis de carrera y de batallas. Gracias a la gente de Castro, donde he pasado grandes momentos, sobre todo con las tres Legaspi, mamá Marisa y Vicky.

A mi familia le tengo que agradecer su apoyo en todos los sentidos. Desde el primer día que inicié este camino tuve total respaldo de todos y esta familia es una de las mayores suertes en la vida. Papá siempre tiene una buena cara, un gesto amable ante las adversidades y buena disposición para las celebraciones. Gracias a Angels por estar ahí. Tengo que hacer una mención especial a mis hermanitas, Chofi y Olgui, que me escuchan, me apoyan y me hacen pensar. Gracias a cuñao, con el que siempre hay algún momento gracioso. Gracias a Joselín, y tengo que decir que Mar y Óscar son mis “termitas” favoritas.

Finalmente, muchas gracias a Javi, el escuchador, un gran compañero para la vida, que no solo me atura sino que me anima a que la paciencia y el esfuerzo no se agoten. Además gracias a toda la familia de Javi, que han sido tan acogedores conmigo.

Un recuerdo especial para los que ya no están, pero me quisieron y me apoyaron, sobre todo mami.

La escritura nunca fue mi fuerte, pero quiero que en estas líneas quede patente mi agradecimiento a todos.



There's no easy way to make it better

Jamiroquai



Resumen

La enteromixosis representa una seria amenaza para el cultivo del rodaballo (*Psetta maxima*) en Europa. La enfermedad provoca grandes pérdidas económicas asociadas a altas tasas de morbilidad y mortalidad en los lotes afectados y, en la actualidad, se desconocen medidas terapéuticas eficaces. El agente etiológico de esta enfermedad, *Enteromyxum scophthalmi*, es un mixosporidio parásito que infecta el epitelio de revestimiento digestivo del rodaballo y causa enteritis descamativa severa. Los mecanismos patogénicos de la enfermedad no están completamente esclarecidos, por lo que en la presente memoria, hemos progresado en el conocimiento de las lesiones asociadas a la parasitación por *E. scophthalmi*, aspectos de la respuesta inmunitaria y mecanismos implicados en la descamación epitelial.

En primer lugar, hemos realizado una descripción histológica y ultraestructural de los cuadros lesionales durante las diferentes etapas de la infección. Los peces con infecciones leves no mostraron cambios histológicos evidentes. Se observaron estadios iniciales de desarrollo del mixosporidio en el epitelio digestivo sin una respuesta inflamatoria evidente por parte del hospedador. Las alteraciones más destacables fueron el incremento de células goblet y rodlet en el epitelio de revestimiento, y la detección de la enzima iNOS en el polo apical de enterocitos y en estructuras vasculares en bazo, reflejo de la activación de la respuesta inmunitaria innata. La aplicación de la técnica inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-*E. scophthalmi* permitió la



identificación de estadios parasitarios iniciales, lo que supone una herramienta de diagnóstico temprano de la enfermedad en muestras fijadas y embebidas en parafina.

En las infecciones moderadas, conforme se incrementó la carga parasitaria, aparecieron cambios histológicos en la mucosa digestiva. Se observó ondulación del epitelio de revestimiento como consecuencia de cambios morfológicos en los enterocitos, en algunos casos compatibles con apoptosis, confirmada mediante el inmunomarcaje de caspasa-3 activa. Además, en la lámina propia-submucosa aparecieron células inflamatorias, y en la base del epitelio, mayor cantidad de linfocitos intraepiteliales. Tanto en el infiltrado inflamatorio en el tracto gastrointestinal como en el tejido linfoide de riñón y bazo, se encontraron macrófagos y, en menor medida, granulocitos con inmunotinción positiva para iNOS.

En las infecciones severas, los rodaballos mostraron desprendimiento del epitelio digestivo, quedando expuesta la membrana basal subepitelial, y presencia de células descamadas junto con formas parasitarias en la luz del tubo digestivo. Además de la apoptosis descrita previamente en el revestimiento epitelial, los enterocitos descamados sufrieron anoikis, un tipo de apoptosis desencadenada por pérdida de contacto con la membrana basal y/o células adyacentes. En el lumen intestinal, algunos mixosporidios se encontraban englobados por células epiteliales en anoikis. Teniendo en cuenta la escasez de esporas de *E. scophthalmi* que se observan durante las infecciones tanto naturales como experimentales, esta puede ser una estrategia válida para la dispersión de los estadios de desarrollo no esporulados,



que permita colonizar otras zonas de epitelio o incluso infectar a otros rodaballos.

En la infección severa se observaron abundantes células inflamatorias en la lámina propia-submucosa y, en contraste, intensa depleción leucocitaria sobre todo en el riñón anterior y el bazo. El infiltrado inflamatorio, principalmente mononuclear, estaba compuesto, entre otras células, por macrófagos que se inmunotiñeron intensamente para iNOS, pero además se detectaron muchas imágenes de apoptosis que se inmunomarcaron con caspasa-3 activa. Tanto el número de células que componían el infiltrado inflamatorio en la submucosa digestiva, como las células inmunomarcadas para iNOS fueron más abundantes conforme avanzó la infección. Un hecho destacable fue la presencia de centros de melanomacrófagos (CMMs) en la submucosa intestinal y en los órganos linfohematopoyéticos. En esta última localización, los CMMs fueron de mayor tamaño y se encontraban en mayor proporción que en los peces con infecciones leves. Además, en el bazo, la inmunotinción de iNOS demostró que las células que presentaban esta enzima tendían a agruparse en torno a estructuras vasculares y CMMs, precursores de los centros germinales de los linfonodos de mamíferos. Teniendo en cuenta que la enzima iNOS, productora de óxido nítrico, contribuye a crear un ambiente altamente oxidativo, es posible que la cantidad de células inflamatorias expresando iNOS en la lámina propia-submucosa dañe a las propias células del hospedador y promueva tanto el daño epitelial como la muerte celular de los leucocitos. Este hecho, junto con el incremento de apoptosis en el tejido linfoide y la migración masiva de leucocitos desde los órganos



linfohematopoyéticos al foco inflamatorio, originaría o favorecería la depleción leucocitaria observada.

Finalmente, con el objetivo de complementar el estudio de la respuesta del rodaballo frente a *E. scophthalmi*, se investigaron mediante inmunohistoquímica los cambios en la presencia de cinco moduladores en células enteroendocrinas y sistema nervioso entérico. Se sabe que el sistema neuroendocrino entérico y el sistema inmunitario están interrelacionados, y que en caso de agresiones en el tracto gastrointestinal, se producen interacciones bidireccionales encaminadas a la recuperación de la funcionalidad del tubo digestivo. En estudios previos, se ha demostrado que la infección por *E. scophthalmi* induce cambios en moduladores del sistema neuroendocrino entérico, que a su vez interacciona con el sistema inmunitario, por lo que el estudio del sistema neuroendocrino aporta información sobre el desarrollo de la respuesta sistémica del rodaballo.

En el presente estudio, hemos observado una disminución de bombesina y glucagón, con efectos anorexigénicos, como posible estrategia para incrementar la ingesta de alimentos y mejorar la condición corporal. Por otra parte, el incremento de las encefalinas y somatostatina puede contrarrestar los efectos de la sustancia P sobre la motilidad y secreción de fluidos, ya que estos moduladores disminuyen estas acciones. Como consecuencia, se puede producir la acumulación de líquido que se observa en la inspección del tracto gastrointestinal en la necropsia de rodaballos severamente infectados. En contraposición, las encefalinas tienen efectos proinflamatorios que refuerzan la respuesta posiblemente exacerbada. Por último, el incremento de



somastostatina supone, por una parte, la inhibición de la proliferación de leucocitos, cuya acción no es suficiente para retroalimentar la respuesta inmunitaria, y por otra, un posible factor participante en la descamación del revestimiento epitelial del intestino, por su acción antiproliferativa, en conjunción con la parasitación y los mecanismos de daño oxidativo previamente descritos.





Summary

Enteromyxosis is a serious concern in turbot (*Psetta maxima*) farming in Europe. This disease provokes great economical losses related to the high morbidity and mortality rates in the affected stocks, and nowadays there is a lack of therapeutical measures. The aetiological agent of this disease, *Enteromyxum scophthalmi*, is a myxosporean parasite that infects the turbot's digestive lining epithelium resulting in severe desquamative enteritis. The pathogenic mechanisms of the disease are still uncompletely understood, so in the current document we have made progress in the knowledge of the lesions related to the presence of *E. scophthalmi*, several aspects of the immune response and the mechanisms involved in the epithelial desquamation.

Fisrt of all, we have accomplished a histological and ultraestructural description of the lesions within the different stages of the infection. Fish with slight infections showed initial developmental stages of the myxosporean located in the digestive epithelium, without eliciting an evident inflammatory response in the host. The most noteworthy findings included the increase in goblet and rodlet cells within the lining epithelium, and the detection of iNOS in the apical pole of the enterocytes and vascular estructures in the spleen, corresponding with the activation of the innate immune response. In addition to these findings, the use of an immunohistochemical assay with an anti-*E. scophthalmi* antibody permitted the identification of primary



parasitic stages, which implies a tool for early diagnosis of the disease in paraffin-embedded fixed samples.

As the parasite load increased, histological changes appeared in the gastrointestinal mucosa. Scalloped epithelium was observed due to morphological changes in the enterocytes, in some cases compatible with apoptosis, confirmed by immunostaining of active caspase-3. Besides, inflammatory cells appeared in the lamina propria-submucosa, and increased intraepithelial lymphocytes were found at the base of the epithelium. Macrophages and, to a lesser extent, granulocytes with positive immunostaining for iNOS were found in both the intestinal inflammatory infiltrates and the renal and splenic lymphoid tissue.

In severe infections, turbot showed detachment of the digestive epithelium, resulting in the exposure of the subepithelial basement membrane, and the presence of desquamated cells with parasitic forms in the intestinal lumen. In addition to the previously described apoptosis in the epithelial lining, scaly enterocytes underwent anoikis, a type of apoptosis triggered by loss of contact with the basal membrane and/or adjacent cells. In the intestinal lumen, epithelial cells in anoikis surrounded some myxosporeans. Considering the lack of *E. scophthalmi* spores observed during natural and experimental infections, this may be a valid strategy for the dispersion of non-spore developmental stages, allowing them to colonize other areas of epithelium or to infect other turbot.



In severe infection, abundant inflammatory cells were observed in the lamina propria-submucosa and in contrast, intense leukocyte depletion occurred, particularly in the anterior kidney and spleen. Macrophages intensely immunostained for iNOS were the primary component of the mononuclear inflammatory infiltrates, but we also observed many images of apoptosis, which immunostained with active caspase-3. Both the number of cells composing the inflammatory infiltrate in the digestive lamina propria-submucosa, and iNOS immunolabelled cells were more abundant as the infection progressed. A remarkable fact was the presence of melanomacrophage centers (MMCs) in the intestinal lamina propria-submucosa and lymphohaematopoietic organs. In this location, the MMCs were larger and in greater proportion than in fish with mild infections. Furthermore, in the spleen, iNOS immunostaining showed that cells presenting this enzyme tended to cluster around vascular structures and MMCs, precursors of germinal centers of mammalian lymph nodes. Given that iNOS enzyme, nitric oxide producer, contributes to a highly oxidative environment, it is possible that the amount of inflammatory cells in the submucosa expressing iNOS harms host cells, and therefore promotes epithelial damage as well as leukocyte cell death. This, together with increased apoptosis in lymphoid tissue and the mass migration of leukocytes from the lymphohematopoietic organs to inflammatory foci cause or promote the leukocyte depletion observed.

Finally, in order to complement the study of response against *E. scophthalmi*, changes in the presence of five enteroendocrine modulators and enteric nervous system were investigated using immunohistochemistry. It is known that the enteric neuroendocrine



and immune systems are interrelated and that, in case of aggression in the gastrointestinal tract, bidirectional interactions occur for the recovery of the functionality of the digestive apparatus. In previous studies, it has been shown that infection by *E. scophthalmi* induces changes in enteric modulators of the neuroendocrine system, which in turn interacts with the immune system, so the study of the neuroendocrine system provides valuable information on the development of the systemic response of turbot.

In the present study, we observed a decrease in bombesin and glucagon, anorexigenic effectors, as a possible strategy to increase food intake and improve body condition. Moreover, the increase of enkephalins and somatostatin may counteract the effects of substance P on the motility and fluid secretion, as these modulators decrease these actions. As a result, fluid accumulation, seen in the inspection of the gastrointestinal tract at necropsy of turbot severely infected, may develop. In contrast, the enkephalins have proinflammatory effects reinforcing the possibly exceeded response. Lastly, increased somatostatin involves, on the one hand, inhibition of leukocyte proliferation, action not enough to feed back the immune response, and secondly, the scaling of the intestinal epithelial lining, due to its antiproliferative action in conjunction with the parasites and oxidative damage mechanisms previously described.



Índice

RESUMEN	XI
SUMMARY	XVI
ÍNDICE	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	XXVII
LISTADO DE ABREVIACIONES	XXXI
LISTADO DE ABREVIACIONES CORRESPONDIENTES A LOS ARTÍCULOS.....	XXXIII
LISTADO DE ARTÍCULOS	XXXV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. BIOLOGÍA Y ACUICULTURA DEL RODABALLO.....	1
1.1.1. <i>EL RODABALLO</i>	1
1.1.2. <i>IMPORTANCIA DE LA ACUICULTURA Y DATOS DE PRODUCCIÓN</i>	3
1.1.3. <i>CICLO PRODUCTIVO Y MEJORA DE LA PRODUCCIÓN</i>	5
1.1.4. <i>ENFERMEDADES DE ORIGEN INFECTO-CONTAGIOSO EN RODABALLO CULTIVADO. MEDIDAS DE TRATAMIENTO Y CONTROL</i>	7
1.2. MIXOZOOS	14
1.2.1. <i>TAXONOMÍA DE LOS MIXOZOOS</i>	14
1.2.2. <i>CICLO VITAL Y ESTRUCTURA DE LOS MIXOZOOS</i>	16
1.2.3. <i>ENFERMEDADES CAUSADAS POR MIXOZOOS</i>	20
1.2.4. <i>ENTEROMIXOSIS DESCRITAS EN LA ACTUALIDAD</i>	23
1.3. ENTEROMIXOSIS DEL RODABALLO	25
1.3.1. <i>ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y ETIOLOGÍA</i>	25
1.3.2. <i>CICLO VITAL Y ESTADIOS DE DESARROLLO</i>	26
1.3.3. <i>EPIDEMIOLOGÍA</i>	29
1.3.4. <i>SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES</i>	32
1.3.5. <i>FISIOPATOLOGÍA</i>	35
1.3.6. <i>DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD</i>	40
1.3.7. <i>TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD</i>	41
1.4. RESPUESTA DEL HOSPEDADOR A LAS PARASITOSIS INTESTINALES.....	43

1.4.1. RESPUESTA INMUNITARIA EN LOS TELEÓSTEOS	43
1.4.2. RESPUESTA INMUNITARIA A PARÁSITOS INTESTINALES	46
1.4.3. EFECTOS DE LOS PARÁSITOS EN EL EPITELIO: APOPTOSIS	48
1.4.4. CAMBIOS EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO ENTÉRICO	51
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. MATERIALES BIOLÓGICOS	57
3.1.1. MUESTRAS PROVENIENTES DE INFECCIONES NATURALES Y EXPERIMENTALES.....	57
3.1.2. EXPERIMENTO DE TRANSMISIÓN POR EFLUENTE	58
3.1.3. EXPERIMENTO DE INOCULACIÓN ORAL	60
3.2. TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS	63
3.2.1. FIJACIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	63
3.2.2. MICROSCOPIA ÓPTICA	63
3.2.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	65
3.2.4. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	66
3.3. HISTOMETRÍA	70
3.3.1. RECUENTO DE CÉLULAS INMUNOMARCADAS. OBTENCIÓN DE IMÁGENES DIGITALIZADAS	70
3.3.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	72
3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	75
3.4.1. CORTES Y TINCIONES	76
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	97
CONCLUSIONES	97
CONCLUSIONS	100
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
7. ARTÍCULO I: LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY OF TURBOT ENTEROMYXOSIS	131
7.1. ABSTRACT.....	132



7.2. INTRODUCTION	133
7.3. MATERIALS AND METHODS	135
7.3.1. ANIMALS.....	135
7.3.2. SAMPLING PROCEDURE	136
7.3.3. LIGHT MICROSCOPY (LM)	136
7.3.4. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM).....	136
7.4. RESULTS.....	137
7.4.1. CLINICAL SIGNS AND MACROSCOPIC LESIONS.....	137
7.4.2. HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE COURSE OF INFECTION.....	137
7.5. DISCUSSION	150
7.6. ACKNOWLEDGEMENTS	156
7.7. REFERENCES	157
8. ARTÍCULO II: EVALUATION OF iNOS IN TURBOT	
ENTEROMYXOSIS	161
8.1. ABSTRACT.....	162
8.2. INTRODUCTION	164
8.3. MATERIALS AND METHODS	166
8.3.1. FISH.....	166
8.3.2. INFECTION.....	166
8.3.3. SAMPLING PROCEDURE	166
8.3.4. LIGHT MICROSCOPY	167
8.3.5. IMMUNOHISTOCHEMISTRY.....	168
8.3.6. QUANTITATIVE ANALYSIS OF iNOS+ CELLS	168
8.3.7. STATISTICS.....	169
8.4. RESULTS.....	170
8.4.1. LIGHT MICROSCOPY AND MORTALITY	170
8.4.2. IMMUNOHISTOCHEMISTRY.....	170
8.4.3. QUANTITATIVE ANALYSIS OF iNOS+ CELLS AND STATISTICS.....	174
8.5. DISCUSSION	176
8.6. ACKNOWLEDGEMENTS	180
8.7. REFERENCES	181

9. ARTÍCULO III: STUDIES ON APOPTOSIS IN TURBOT

ENTEROMYXOSIS..... 185

9.1. ABSTRACT..... 186

9.2. INTRODUCTION 187

9.3. MATERIALS AND METHODS 190

 9.3.1. ANIMALS..... 190

 9.3.2. SAMPLING PROCEDURE 191

 9.3.3. STUDY OF DISEASE STATUS 191

 9.3.4. TUNEL STAINING..... 192

 9.3.5. IMMUNOHISTOCHEMISTRY..... 193

 9.3.6. QUANTITATIVE AND SEMI-QUANTITATIVE ANALYSIS OF ACTIVE
 CASPASE-3+ CELLS..... 194

9.4. RESULTS..... 196

 9.4.1. GROSS PATHOLOGY AND MORTALITY 196

 9.4.2. HISTOPATHOLOGY..... 197

 9.4.3. DETECTION OF APOPTOSIS 200

 9.4.4. IMMUNOSTAINING OF THE PARASITES..... 203

 9.4.5. SIMULTANEOUS CHARACTERIZATION OF APOPTOSIS AND
 E. SCOPHTHALMI..... 203

9.5. DISCUSSION 205

9.6. ACKNOWLEDGEMENTS 211

9.7. REFERENCES 212

10. ARTÍCULO IV: CHANGES IN NEUROENDOCRINE SYSTEM

IN TURBOT ENTEROMYXOSIS 217

10.1. ABSTRACT..... 218

10.2. INTRODUCTION 220

10.3. MATERIALS AND METHODS..... 222

 10.3.1. FISH AND SAMPLING PROCEDURE 222

 10.3.2. HISTOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY 222

 10.3.3. QUANTITATIVE ANALYSIS OF POSITIVE CELLS..... 223

 10.3.4. STATISTICS..... 224

10.4. RESULTS..... 225



10.4.1. HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS.....	225
10.4.2. PRESENCE AND DISTRIBUTION OF ENTERO-ENDOCRINE CELLS (ECs) AND NERVOUS STRUCTURES.....	225
10.5. DISCUSSION	231
10.6. ACKNOWLEDGEMENTS	238
10.7. REFERENCES	239







Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1.1: Distribución costera del rodaballo de vida salvaje	1
Figura 1.2: Imagen de un rodaballo	2
Figura 1.3: Datos de producción de rodaballo a nivel mundial	3
Figura 1.4: Principales países europeos productores de rodaballo de crianza	4
Figura 1.5: Evolución de la producción de rodaballo en Europa para el periodo 2002-2011	5
Figura 1.6: Ciclo productivo del rodaballo	6
Figura 1.7: Ciclo vital de los mixosporidios	16
Figura 1.8: Esquema de una actinospora	18
Figura 1.9: Esquema del estadio de desarrollo de un mixosporidio	19
Figura 1.10: Esquema de una mixospora	19
Figura 1.11: Propuesta de ciclo vital hipotético de <i>E. scophthalmi</i>	26
Figura 1.12: Estadio 3 de <i>E. scophthalmi</i>	27
Figura 1.13: Estadios 4 y 5 de <i>E. scophthalmi</i>	28
Figura 1.14: Hallazgos macroscópicos y microscópicos en rodaballos con enteromixosis	34
Figura 1.15: Zona de contacto de los estadios de <i>E. scophthalmi</i> con los enterocitos	36
Figura 1.16: Principales elementos del sistema inmunitario innato y adaptativo en teleósteos	43



Figura 1.17: Esquema de la producción de óxido nítrico por las enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS).....	48
Figura 1.18: Esquema de las vías de la apoptosis.....	50
Figura 1.19: Distribución del sistema nervioso entérico.....	51
Figura 1.20: Esquema de una célula enteroendocrina	54
Figura 3.1: Necropsia del rodaballo	59
Figura 3.2: Esquema e imagen del tubo digestivo del rodaballo	61
Figura 3.3: Esquema de la técnica TUNEL	65
Figura 3.4: Esquema de la técnica inmunohistoquímica utilizando el sistema EnVision™	67
Figura 3.5: Esquema de la inmunotinción doble	69
Figura 3.6: Captura del software Olympus Cell^A	71
Figura 3.7: Captura del software Image-Pro Plus	72
Figura 3.8: Captura de pantalla con el software PASW Statistics 18.....	73
Figura 3.9: Captura de pantalla del software GraphPad Prism.....	74



Tablas

Tabla 1.1: Enfermedades que afectan al rodaballo de crianza.....	8
Tabla 1.2: Clasificación de los mixozoos	15
Tabla 1.3: Especies marinas de mixosporidios con ciclo vital indirecto conocido y sus hospedadores	17
Tabla 1.4: Mixozoos con repercusión económica importante en peces de agua dulce	20
Tabla 1.5: Mixosporidios con repercusión económica importante en peces marinos	21
Tabla 1.6: Clasificación del género <i>Enteromyxum</i>	23
Tabla 1.7: Péptidos estudiados mediante inmunohistoquímica en rodaballos infectados por <i>E. scophthalmi</i>	38
Tabla 1.8: Principales cambios observados en la respuesta del rodaballo a la enteromixosis	39
Tabla 1.9: Resumen de las principales actividades innatas estudiadas en peces.....	44
Tabla 1.10: Resumen de las principales actividades adaptativas estudiadas en peces.....	45
Tabla 1.11: Principales neuropéptidos intestinales y sus funciones	53
Tabla 3.1: Composición de los fijadores	63
Tabla 3.2: Tiempos de desparafinado e hidratación de los cortes histológicos y proceso de deshidratación y aclarado para montar con DPX	64
Tabla 3.3: Tinciones empleadas para microscopía óptica	64
Tabla 3.4: Protocolo utilizado para la técnica TUNEL.....	66
Tabla 3.5: Protocolo genérico de inmunohistoquímica	68
Tabla 3.6: Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica en los artículos II, III y IV	68



Tabla 3.7: Valores del recuento de células positivas para caspasa-3 activa.....	70
Tabla 3.8: Fijación e inclusión de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	75
Tabla 3.9: Contraste de rejillas con acetato de uranilo y citrato de plomo....	76



Listado de abreviaciones

ADN: ácido desoxirribonucleico

art.: artículo

BOM: bombesina

c-3a: caspasa-3 activa

c-3a+: inmunotinción positiva para c-3a

CD3+: inmunotinción positiva para CD3

Célula P: célula primaria

Célula S: célula secundaria

Célula T: célula terciaria

CMM(s): centro(s) de melanomacrófagos

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DPX: xileno plastificante diestireno

dUTP(s): desoxinucleótido(s) de uridina trifosfato

eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial

fig.: figura

GLUC: glucagón

HRP: peroxidasa de rábano

IgM: inmunoglobulina M

iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible

iNOS+: inmunotinción positiva para iNOS

LEU: leucina-encefalina

MET: metionina-encefalina

MMCs: melanomacrophage centres

nNOS: sintasa de óxido nítrico neuronal

NO: óxido nítrico



NOS: sintasa de óxido nítrico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PBS: tampón fosfato salino

PE: post exposición

RA: recuperación antigénica

SNE: sistema nervioso entérico

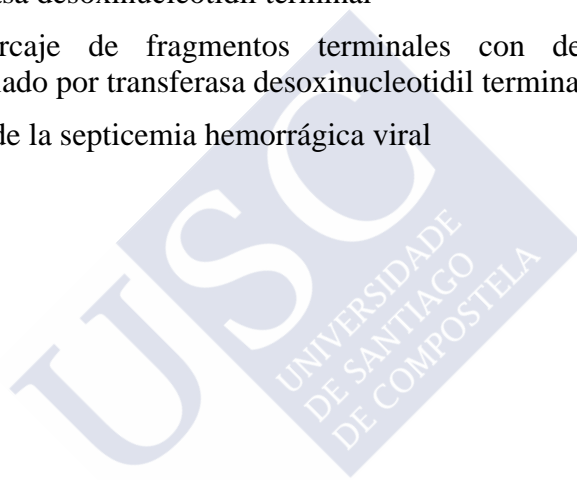
SOM: somatostatina

TA: temperatura ambiente

TdT: transferasa desoxinucleotidil terminal

TUNEL: marcaje de fragmentos terminales con desoxiuridina trifosfato mediado por transferasa desoxinucleotidil terminal

VHSV: virus de la septicemia hemorrágica viral



Listado de abreviaciones correspondientes a los artículos

APS: apoptosis per section
BOM: bombesin
CGRP: calcitonin gene related peptide
DAB: 3,3'-diaminobencidine
ECs: entero-endocrine cells
eNOS: endothelial nitric oxide synthase
fig.: figure
GLUC: glucagon
HRP: horseradish peroxidase
Ig: immunoglobuline
iNOS: inducible nitric oxide synthase
IT: infected turbot
LEU: leucine-enkephalin
LM: light microscopy
LP: lamina propria-submucosa
MET: methionine-enkephalin
MMC(s): melano-macrophage centre(s)
NIT: non-infected turbot
nNOS: neuronal nitric oxide synthase
NO: nitric oxide
NOS: nitric oxide synthase
PAS: periodic acid-Schiff
PBS: phosphate buffered saline



PE: post exposure

PI: post inoculation

RT: room temperature

SEM: standard error of the mean

SOM: somatostatin

SP: substance P

TEM: transmission electron microscopy

TUNEL: terminal deoxyuridine triphosphate nick end labelling

VIP: vasoactive intestinal peptide



Listado de artículos

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha conllevado la elaboración de los siguientes artículos científicos:

1) Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis

Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010). Dis Aquat Organ 89: 209-221.

2) Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*

Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Quiroga MI (2012). Fish Shellfish Immunol 32:243-248.

3) Study of distribution of active caspase-3+ cells in turbot (*Psetta maxima* L.) enteromyxosis

Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Vázquez M, Quiroga MI (2012). J Fish Dis (aceptado enero 2012).

4) Effects of *Enteromyxum scophthalmi* experimental infection on the neuroendocrine system of turbot, *Psetta maxima* (L.)

Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Quiroga MI, Di Giancamillo A, Domeneghini C

Los contenidos de los artículos han sido adaptados para la presente Tesis Doctoral. La doctoranda tiene permiso de los autores y de los editores de Elsevier e Inter-Research para la reproducción de dichos contenidos.





1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biología y acuicultura del rodaballo

1.1.1. El rodaballo

El rodaballo (*Psetta maxima* L.) es una especie marina bentónica, que habita fondos arenosos, pedregosos o mixtos, de profundidades entre los 20 y 75 m. Se distribuye por el mar Báltico, mar del Norte, canal de la Mancha, Atlántico nororiental hasta Marruecos, mar Mediterráneo y mar Negro (fig. 1.1).



Figura 1.1: Distribución costera (naranja) del rodaballo de vida salvaje

El cuerpo de los rodaballos adultos es asimétrico, redondeado, aplanado (fig. 1.2) y puede llegar a alcanzar 100 cm de talla. Poseen ojos saltones en el lado izquierdo (cara ocular), boca grande con mandíbula prominente e igual dentición a ambos lados. La cara ocular

está pigmentada y el color varía de marrón parduzco a grisáceo con manchas, para mimetizarse con el ambiente. La cara ciega, por el contrario, suele estar despigmentada. La piel que recubre el cuerpo del rodaballo no presenta escamas, sino una serie de tubérculos óseos distribuidos con aleatoriedad que hacen que la superficie sea rugosa (FAO 2011, APROMAR 2012).

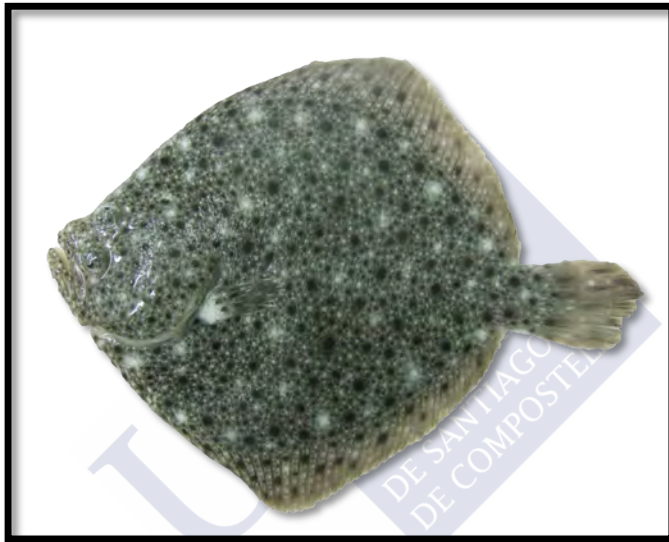


Figura 1.2: Imagen de un rodaballo

Los rodaballos son carnívoros; en etapas juveniles se alimentan de moluscos y crustáceos, y los adultos principalmente de peces y cefalópodos (FAO 2011).

Los huevos poseen una gota de grasa que servirá para nutrir a las larvas tras la eclosión. Inicialmente simétricas, las larvas sufrirán la metamorfosis en torno al día 45 tras la eclosión, en la que el ojo derecho migrará al lado izquierdo. Alcanzan la madurez sexual en torno al cuarto o quinto año de vida (FAO 2011).



1.1.2. Importancia de la acuicultura y datos de producción

En los últimos años, el origen de varias especies marinas comercializadas, como la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) o el rodaballo, es mayoritariamente la acuicultura (FAO 2012).

Durante décadas Europa ha liderado la producción de peces planos, aunque en los últimos años, los países asiáticos encabezan gran parte del sector. De hecho, Asia es el epicentro mundial de la industria de la acuicultura, en gran medida debido a la incorporación y producción masiva de especies acuáticas exóticas, tanto de agua dulce como marina (De Silva y col. 2009).

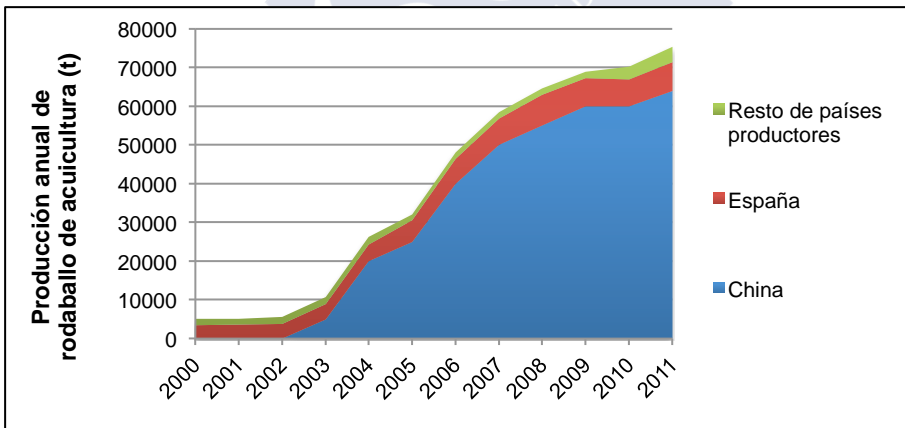


Figura 1.3: Datos de producción de rodaballo a nivel mundial (FAO 2012)

Como consecuencia, la maricultura de peces planos se ha incrementado notablemente en la última década, desde las 26300 t en el año 2000 hasta cerca de 150000 t en 2010, con China y España como principales productores (FAO 2012). En particular, la obtención de rodaballo de acuicultura, originaria de Europa, ha alcanzado en

China datos anuales cercanos a las 60000 t en los últimos años (fig. 1.3), lo que supone seis veces la producción europea (APROMAR 2012, FAO 2010, 2012).

En Europa, el cultivo del rodaballo se realiza en la vertiente atlántica, principalmente en España, seguido de Portugal y Francia, y otros países con producciones notablemente inferiores (fig. 1.4 y 1.5) (APROMAR 2012).

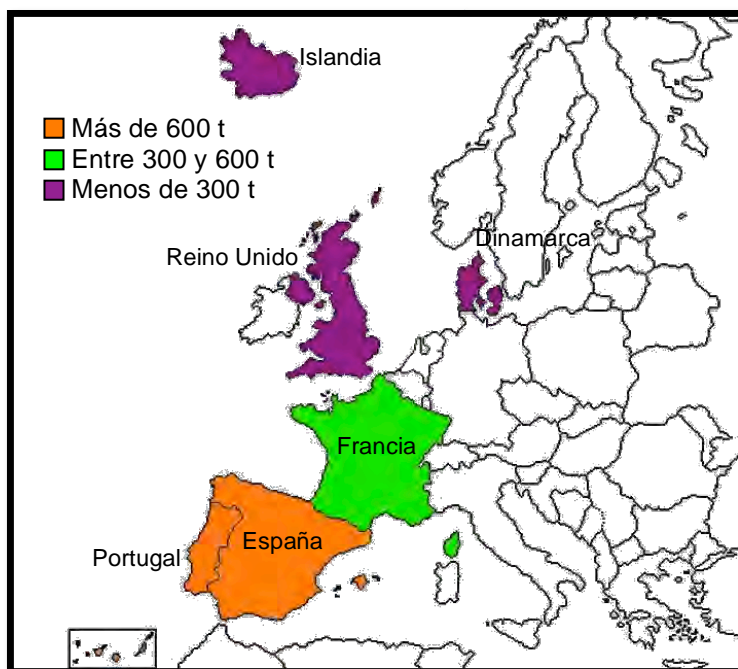


Figura 1.4: Principales países europeos productores de rodaballo de crianza. La clasificación se basa en producciones de 2011 (datos FEAP 2012).

La comercialización de rodaballo de acuicultura se ha ido incrementando paulatinamente en los últimos años y en 2010 representó el 62,5% del total de rodaballo consumido en Europa. Estas



cifras son superiores en España, donde el 99% del rodaballo consumido procede de la acuicultura (APROMAR 2012).

Desde 2002 hasta 2009, la crianza de rodaballo en Europa se duplicó, con valores superiores a las 10000 t (FEAP 2012). En 2011, se produjo un incremento del 12% con respecto a 2010 (fig. 1.5), con un valor de 10633 t (FEAP 2012). España es el principal país productor de rodaballo de acuicultura con 7760 t en 2011, lo que supone el 73% de la industria europea. Dentro del territorio español, Galicia es la principal Comunidad Autónoma productora, con un 99% de la producción nacional (APROMAR 2012, FEAP 2012).

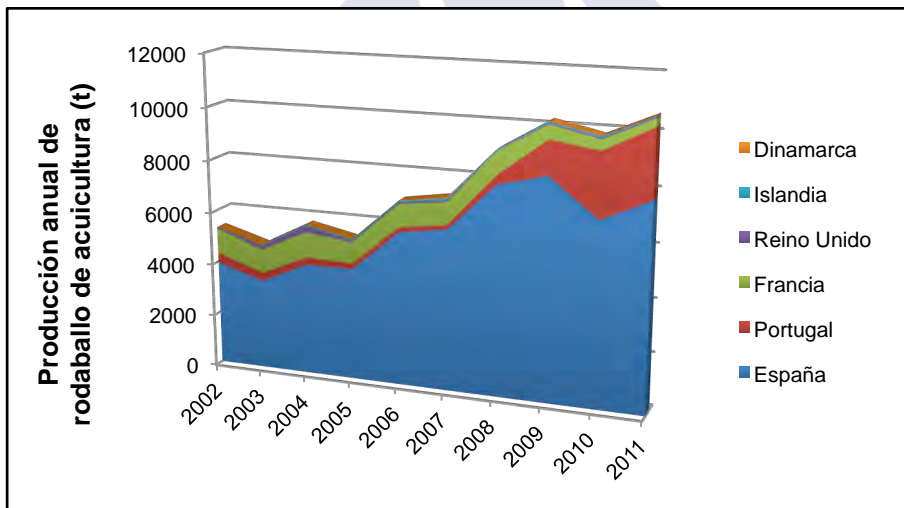


Figura 1.5: Evolución de la producción de rodaballo en Europa para el periodo 2002-2011 (datos FEAP 2012)

1.1.3. Ciclo productivo y mejora de la producción

El rodaballo se cultiva de forma intensiva en granjas situadas en zonas costeras, y los juveniles se suelen engordar en tanques de cemento en tierra. En general, la duración del ciclo productivo se encuentra en

torno a los 2 años (fig. 1.6), desde la obtención de los huevos, hasta que el rodaballo alcanza su talla comercial (FAO 2011).

La optimización de la producción del rodaballo de acuicultura a gran escala pasa por la selección y mejora genética de los individuos. Los principales objetivos que se persiguen con un programa de mejora incluyen el control de la endogamia, el sustento de la diversidad genética, la identificación de los genes determinantes del sexo y tasa de crecimiento, y la selección de reproductores resistentes a enfermedades (Bouza y col. 2007, Vera y col. 2013).

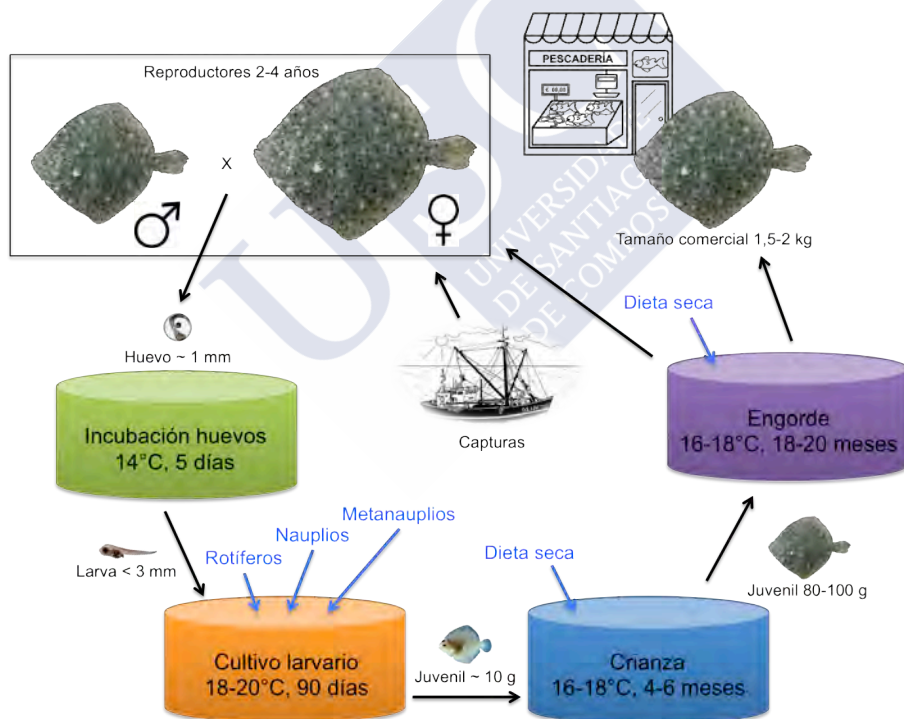


Figura 1.6: Ciclo productivo del rodaballo. Se resumen los principales periodos, temperaturas de cultivo y dietas desde la obtención de huevos hasta la comercialización de los peces.

Además del desafío que supone el control de las enfermedades, en la industria existe un especial interés por obtener poblaciones con mayor



cantidad de hembras (Ribas y col. 2013). El rodaballo es una de las especies cultivadas con mayor dimorfismo sexual en cuanto a la tasa de crecimiento, en favor de las hembras (Person-Le Ruyet y col. 1991), por lo que el control de la reproducción y determinación del sexo de los individuos podría incrementar la biomasa en los stocks.

1.1.4. Enfermedades de origen infecto-contagioso en rodaballo cultivado. Medidas de tratamiento y control

La expansión de la acuicultura, y en esta última década de forma especial la del rodaballo en España, ha hecho que posea gran consideración en el terreno de la industria y la sanidad animal. A este crecimiento se asocian problemas relacionados con la intensificación de las producciones, como la aparición de enfermedades, que causan graves pérdidas económicas (Álvarez-Pellitero 2008, Magnadottir 2010). Para paliar estos efectos negativos, se han desarrollado múltiples investigaciones que pretenden conseguir medidas terapéuticas efectivas y sobre todo estrategias de control y prevención de las enfermedades, principalmente las de tipo infecto-contagioso (Bricknell y Dalmo 2005, Galina y col. 2009, Gatesoupe 2008, Green 2010, Kibenge y col. 2012, Sahu y col 2008). La imposición de mayores medidas de prevención también concuerda con la legislación implantada en los últimos años. Por una parte, se pretende disminuir el empleo de fármacos en las producciones animales y por otra, los consumidores demandan cada vez mayor seguridad alimentaria y bienestar animal (Cole y col. 2009, Grigorakis y Rigos 2011, Tacon y Metian 2008, van de Vis y col. 2012).



1.1.4.1. Principales enfermedades

Las enfermedades más relevantes que afectan o pueden amenazar al cultivo del rodaballo se citan en la tabla 1.1. El impacto de estos patógenos en la producción puede ser variable, pero múltiples agentes provocan elevadas mortalidades en los stocks de rodaballo, como *Enteromyxum scophthalmi* (Bermúdez 2006), *Tenacibaculum maritimum* (Avendaño-Herrera y col. 2006), *Philasterides dicentrarchi* (Iglesias y col. 2001) o *Listonella (Vibrio) anguillarum* (González y col. 2003).

Enfermedad	Agente patógeno	Tipo	Principales lesiones
Septicemia hemorrágica viral (VHS) ¹	<i>Novirhabdovirus VHSV</i>	Rabdovirus	Hemorragias en piel, ojos, musculatura y superficies serosas
Tenacibaculosis ²	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Bacteria Gram -	Úlceras cutáneas profundas
Furunculosis ³	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Bacteria Gram -	Úlceras cutáneas profundas, dermatitis granulomatosa, septicemia hemorrágica
Vibriosis ⁴	<i>Listonella anguillarum</i>	Bacteria Gram -	Hemorragias y úlceras cutáneas
Edwardsielosis ⁵	<i>Edwardsiella tarda</i>	Bacteria Gram -	Tumefacción periorcular, ascitis y abscesos en órganos internos
Estreptococosis ⁶	<i>Streptococcus parauberis</i>	Bacteria Gram +	Inflamación purulenta alrededor de ojos y aletas
Micobacteriosis ⁷	<i>Mycobacterium</i> spp.	Bacteria Gram +	Granulomas, inflamación de la piel y úlceras cutáneas
Microsporidiosis ⁸	<i>Tetramicra brevifilum</i>	Hongo microsporidio	Licuefacción y atrofia del músculo
Trichodinosis ⁹	<i>Trichodina</i> spp.	Protozoo ciliado	Lesiones branquiales
Escuticociliatosis ¹⁰	<i>Philasterides dicentrarchi</i>	Protozoo ciliado	Úlceras profundas y hemorragias
Enfermedad amebiana de las branquias (AGD) ¹¹	<i>Neoparamoeba</i> spp.	Protozoo amebozoo	Afectación branquial: inflamación, exceso de moco, manchas de color grisáceo
Enteromixosis ¹²	<i>Enteromyxum scophthalmi</i>	Myxozoo	Caquexia, ascitis, enteritis descamativa severa

Tabla 1.1: Enfermedades que afectan al rodaballo de crianza. Referencias: ¹Schönherz y col. 2013, ²Faílde 2013, ³Toranzo y col. 2005, ⁴González y col. 2003, ⁵Padrós y col. 2006, ⁶Romalde y col. 1999, ⁷dos Santos y col. 2002, ⁸Rodríguez-Tovar y col. 2011, ⁹Noga 2010, ¹⁰Piazzon y col. 2011, ¹¹Dyková y col. 2010, ¹²Bermúdez 2006.



Varios géneros de virus pueden infectar al rodaballo, como los *Herpesvirus*, *Iridovirus*, *Aquareovirus*, *Aquabirnavirus*, *Nodavirus* y *Rhabdovirus* (Smail y Munro 2012). De acuerdo a la distribución geográfica de las granjas de rodaballo en Europa, el virus de la septicemia hemorrágica viral (VSHV) supone un elevado riesgo para esta especie (Gomez-Casado y col. 2011). Este *Novirhabdovirus* se aisló en rodaballos en Escocia a finales de los 90, durante brotes con alta mortalidad y con un cuadro lesional de exoftalmia, hemorragias en piel, ojos, musculatura y en las superficies serosas (Skall y col. 2005). En infecciones experimentales se observaron tasas de mortalidad cercanas al 100% (López-Vázquez y col. 2007).

En la actualidad, las enfermedades bacterianas con mayor repercusión en el cultivo del rodaballo son la tenacibaculosis, furunculosis, vibriosis, estreptococosis, micobacteriosis y edwardsielosis (Toranzo y col. 2009).

El agente etiológico de la tenacibaculosis o flexibacteriosis, *T. maritimum*, provoca úlceras cutáneas profundas que pueden alcanzar la musculatura (Faílde 2013). Las altas tasas de mortalidad de la enfermedad, el incremento en la susceptibilidad a otros patógenos y los gastos en tratamientos acarrear elevadas pérdidas económicas en la producción de rodaballo (Avendaño-Herrera y col. 2006).

Aeromonas salmonicida subespecie *salmonicida* causa la furunculosis en rodaballo. La forma típica o aguda es una septicemia con elevadas tasas de mortalidad. Las formas atípicas de la enfermedad, crónicas, se caracterizan por focos de dermatitis granulomatosa similares a

“furúnculos”, úlceras profundas que pueden alcanzar la musculatura y afectación de la cavidad celómica y órganos internos (Cipriano y Austin 2011, Coscelli y col. 2009).

La vibriosis, causada por *V. anguillarum*, es una septicemia hemorrágica. Los peces afectados muestran lesiones cutáneas de color rojizo en la zonas ventrales y laterales, con úlceras y exudado sanguinolento. En los brotes más agudos y severos, el curso de la infección es rápido y se produce la muerte sin signos clínicos evidentes. La tasa de mortalidad puede ser cercana al 100 % (Actis y col. 2011, Austin y Austin 2007).

La estreptococosis originada por *Streptococcus parauberis* es considerada como endémica en el rodaballo cultivado en España (Toranzo y col. 2009). Los principales signos y lesiones son pérdida de peso, exoftalmia bilateral con inflamación supurativa, hemorragias en las aletas pectorales y anal, petequias en el abdomen, congestión de los órganos internos, ascitis y enteritis mucohemorrágica (Doménech y col. 1996). Asimismo, la bacteria *S. uberis* es un agente potencialmente zoonótico (Toranzo y col. 2009).

La micobacteriosis, denominada tuberculosis de los peces, es un proceso crónico y progresivo que en el rodaballo cursa con emaciación, exoftalmia y lesiones cutáneas. También se debe considerar su carácter zoonótico (dos Santos y col. 2002).

La edwardsielosis, cuyo agente etiológico es *Edwardsiella tarda*, es una enfermedad re-emergente con relevancia en varias especies de peces, tanto en acuicultura como en el medio natural (Mohanty y Sahoo 2007,



Toranzo y col. 2009). Los rodaballos afectados muestran tumefacción alrededor de los ojos y en la base de las aletas dorsal y anal, hemorragias ocasionales en la musculatura de la cabeza y distensión abdominal. A la apertura de la cavidad celómica se observa ascitis, hígado pálido, congestión de los órganos internos y abscesos en el riñón (Padrós y col. 2006).

Otras bacterias que infectan al rodaballo como *Serratia liquefaciens*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio pelagius* y *Vibrio splendidus*, pueden causar pérdidas de hasta un 5 % de la población (Austin y Austin 2007).

El microsporidio *Tetramicra brevisfilum* provoca pérdidas en etapas tempranas del ciclo productivo, ya que afecta principalmente a rodaballos juveniles, con gran cantidad de bajas. Coloniza y daña el tejido conectivo y muscular, provocando alteración de la natación, oscurecimiento e hipersecreción de moco en la piel (Alonso y col. 2013, Figueras y col. 1992, Leiro y col. 2002).

Varios parásitos protozoarios afectan a la piel y branquias del rodaballo. Los ciliados del género *Trichodina* producen procesos leves y crónicos, ya que únicamente dañan la superficie de los epitelios para alimentarse, aunque en determinadas condiciones pueden causar pérdidas significativas (Noga 2010).

La enfermedad amebiana de las branquias, producida por varias especies de amebas, principalmente del género *Neoparamoeba*, es un proceso grave que en rodaballo puede ocasionar hasta un 25% de bajas en 3 meses. Las branquias afectadas muestran hipertrofia lamelar

multifocal e hiperplasia epitelial y de células mucosas, fusión lamelar severa e infiltrados inflamatorios mononucleares (Dyková y Novoa 2001, Noga 2010).

Los escuticociliados son una subclase de protozoos que agrupa a patógenos de los géneros *Uronema* y *Philasterides*, agentes causales de lesiones branquiales y cutáneas profundas, invasión de órganos internos e infecciones sistémicas (Álvarez-Pellitero y col. 2004, Iglesias y col. 2001, Noga 2010). Además, en rodaballos con lesiones macroscópicas evidentes en las branquias, se han encontrado infecciones mixtas de escuticociliados (*Uronema marinum*) y amebas del género *Neoparamoeba* (Dyková y col. 2010).

1.1.4.2. Medidas de tratamiento y control

En los últimos años existe una tendencia clara a implementar la prevención de las enfermedades en detrimento de su tratamiento, por lo que la gestión de la granja debe estar encaminada a evitar la entrada y propagación de los patógenos. Las principales medidas de control deben incluir una buena calidad de agua, mantenimiento de los estanques y contención de patógenos. En caso de que sea necesario tratar con productos químicos, se debe considerar que los productos utilizados en acuicultura pueden ser peligrosos o tóxicos, e incluso algunos, como el verde malaquita, están prohibidos en la UE por los residuos en los peces tratados (FAO 2006, Noga 2010, Sudova y col. 2007).

Una de las estrategias de prevención y control de las infecciones con mayor repercusión en el cultivo de rodaballo es el desarrollo de



vacunas. La vacunación es cada vez más relevante en la acuicultura, al ser un método de control rentable y que se puede integrar en los protocolos de producción de las especies de peces de interés (Toranzo y col. 2009). En la actualidad se están estudiando inmunizaciones frente a patógenos como el VSHV, *E. tarda*, varias especies de *Vibrio* y *Aeromonas*, e incluso escuticociliados (León-Rodríguez y col. 2012, Pereiro y col. 2012, Toranzo y col. 2009, Wang y col. 2013, Yu y col. 2012, Zheng y col. 2012, Zhou y col. 2010).

Una solución atractiva para el control de las enfermedades son los programas de selección genética. Los estudios genéticos buscan identificar genes inmuno-relevantes y marcadores potenciales de resistencia a enfermedades, para entender la relación entre los patógenos y el hospedador, y estudiar la respuesta inmunitaria a las distintas enfermedades de importancia en el cultivo. Actualmente, se están desarrollando varias investigaciones en rodaballo de genes implicados en la respuesta inmunológica a los agentes patógenos, para obtener reproductores más resistentes a enfermedades (Pardo y col. 2012, Pereiro y col. 2012, Ribas y col. 2013).

Un avance significativo en los últimos años ha sido la elaboración de una base de datos con gran número de secuencias génicas de rodaballo, basada en la respuesta inmunitaria a patógenos como *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *P. dicentrarchi* y *E. scophthalmi* (Millán 2010, 2011, Pardo y col. 2008, 2012, Ribas y col. 2013).



1.2. Mixozoos

1.2.1. Taxonomía de los mixozoos

La clasificación del grupo Myxozoa ha experimentado múltiples variaciones a lo largo de los años. En un principio los mixozoos se consideraron protistas (Lom 1990). El hallazgo de características de metazoos, como la multicelularidad o las uniones estrechas (*tight junction*), y los análisis filogenéticos de ADN ribosómico, propiciaron su ubicación en el reino Animalia como filo propio, con muchas similitudes a Bilateria (Monteiro y col. 2002, Okamura y col. 2002). Sin embargo, los mixozoos comparten elementos comunes a los cnidarios, como por ejemplo las cápsulas polares (Jiménez-Guri y col. 2007). En un reciente estudio, los análisis filogenómicos de nuevas secuencias sitúan a los mixozoos como un grupo dentro del filo Cnidaria (Nesnidal y col. 2013).

Actualmente, el grupo Myxozoa engloba a más de 2000 especies de parásitos de vertebrados e invertebrados con ciclos de vida complejos, que forman esporas con valvas protectoras, de uno a varios esporoplasmas y de una a varias cápsulas polares. Los mixozoos se dividen en dos clases: Myxosporea y Malacosporea (tabla 1.2) (Lom y Dyková 2006).

La mayoría de los mixozoos descritos hasta el momento se encuentran en la clase Myxosporea. Únicamente se han caracterizado cuatro especies de malacosporidios, las cuales parasitan briozoos y algunas en



las que se ha confirmado un ciclo vital que involucra a un pez como hospedador (Grabner y El-Matbouli 2010).

<p>Myxozoa Grassé, 1970</p> <p>Clase Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw y Okamura, 2000</p> <p>Orden Malacovalvulida Canning, Curry, Feist, Longshaw y Okamura, 2000 (1 Familia)</p> <p>Clase Myxosporea Bütschli, 1881</p> <p>Orden Bivalvulida Shulman, 1959</p> <p>Suborden Platysporina Kudo, 1919 (1 Familia)</p> <p>Suborden Sphaeromyxina Lom y Noble, 1984 (1 Familia)</p> <p>Suborden Variisporina Lom y Noble, 1984 (10 Familias)</p> <p>Orden Multivalvulida Shulman, 1959 (3 Familias)</p>

Tabla 1.2: Clasificación de los mixozoos (Lom y Dyková 2006)

Los mixosporidios son parásitos en ambas fases de su ciclo vital. Poseen una fase de mixospora en peces (ocasionalmente en anfibios y reptiles) y una fase de actinospora en anélidos. Aunque la mayoría de las especies no resultan dañinas para sus hospedadores, otras provocan grandes pérdidas económicas en la acuicultura de peces marinos, de agua dulce y diádromos (Feist 2008, Yokoyama y col. 2012).

Dada la gran relevancia y repercusión de las parasitosis por mixozoos, las investigaciones en la actualidad se centran en la filogenia, epidemiología y patogenia de los procesos que producen. Además, se enfatiza en estudios de inmunidad del hospedador, prevención y control de importantes enfermedades, fundamentalmente aquellas

mejor caracterizadas como la ceratomixosis, enfermedad del torneo o la enfermedad proliferativa del riñón (PKD) (Feist y Longshaw 2006).

1.2.2. Ciclo vital y estructura de los mixozoos

El ciclo vital de los mixozoos, en particular el de los mixosporidios (fig. 1.7), incluye un invertebrado anélido (en su mayoría oligoquetos para las especies de agua dulce, y poliquetos para las especies marinas) y un hospedador vertebrado, que es por lo general un pez (Yokoyama y col. 2012).

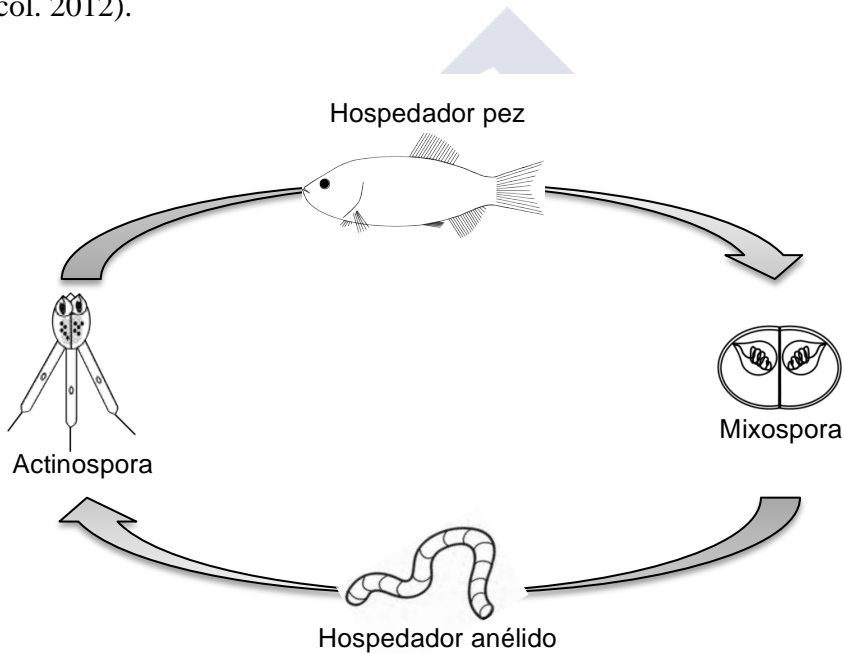


Figura 1.7: Ciclo vital de los mixosporidios

La primera descripción del ciclo vital de un mixosporidio fue el de la especie *Myxobolus cerebralis*, responsable de la enfermedad del torneo, con el que se demostró que las mixosporas no eran infectivas para los salmónidos, sino que infectaban al oligoqueto *Tubifex tubifex*, del que se liberaban posteriormente actinosporas infectivas para los



salmónidos (Wolf y Markiw 1984). Se han descrito ciclos similares en más de 25 especies de mixosporidios de agua dulce (Kent y col. 2001, Lom y Dyková 2006, Yokoyama y col. 2012) y, hasta el momento, se conocen los ciclos de 5 especies marinas (tabla 1.3) (Karlsbakk y Kjøie 2012). Además se ha demostrado la transmisión directa de estadios vegetativos de las tres especies del género *Enteromyxum* (Diamant 1997, Estensoro y col. 2011, Redondo y col. 2002, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012, Yasuda y col. 2002).

Mixosporidio	Hospedador pez	Hospedador anélido
<i>Ceratomyxa auerbachii</i>	<i>Clupea harengus</i>	<i>Chone infundibuliformis</i>
<i>Ellipsomyxa gobii</i>	<i>Pomastoshistus microps</i>	<i>Nereis</i> spp.
<i>Ellipsomyxa mugilis</i>	Mugílidos	<i>Nereis</i> spp.
<i>Gadimyxa atlantica</i>	<i>Gadus morhua</i>	<i>Spirorbis</i> spp.
<i>Sigmomyxa sphaerica</i>	<i>Belone belone</i>	<i>Nereis pelagica</i>

Tabla 1.3: Especies marinas de mixosporidios con ciclo vital indirecto conocido y sus hospedadores

El ciclo presenta alternancia de hospedadores entre invertebrados y peces y en cada hospedador los mixosporidios adquieren morfologías sustancialmente distintas. Cuando un anélido ingiere una mixospora, se desarrolla la fase sexual. Se inicia la merogonia, con la producción de gametos, que se fusionan para producir cigotos, de los que se obtendrán actinosporas (fig. 1.8) (Lom y Dyková 2006).

En la mayoría de las actinosporas existe un cuerpo de la espora que contiene tres cápsulas polares y tres valvas protectoras. Bajo ellas, se localiza un esporoplasma similar a un plasmodio con múltiples núcleos y células infectivas (Kent y col. 2001, Lom y Dyková 2006).

Una vez en el agua, la actinospora se encuentra con el pez hospedador. Al entrar en contacto, las cápsulas polares descargan los filamentos polares para fijar la espora, se abren las valvas y los esporoplasmas entran y migran al lugar en que ocurre la fase esporogónica (Lom y Dyková 2006).

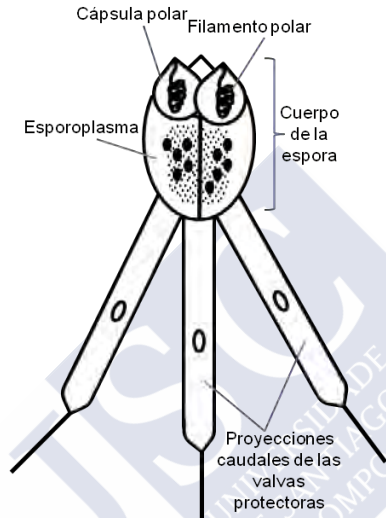


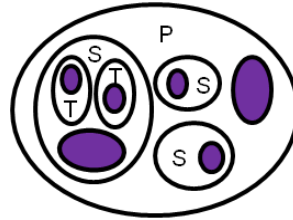
Figura 1.8: Esquema de una actinospora

La formación de la mixospora ocurre en un plasmodio esporogónico. La característica típica de los estadios de desarrollo y formación de la mixospora es su organización denominada “célula dentro de célula” (fig. 1.9) (Lom y Dyková 2006).

Esta organización se basa en la existencia de una célula primaria (P) que alberga células secundarias (S) producidas endógenamente y éstas a su vez pueden llegar a contener células terciarias (T) (Lom y Dyková 2006, Morris 2012).



Dependiendo de su localización, los estadios vegetativos o trofozoítos se denominan celozoicos cuando se ubican en cavidades corporales o de órganos, e histozoicos cuando se encuentran en los tejidos, bien de forma intercelular o, con mayor frecuencia, intracelular (Feist y Longshaw 2006, Lom y Dyková 2006).



P: Célula primaria
S: Célula secundaria
T: Célula terciaria

Figura 1.9: Esquema del estadio de desarrollo de un mixosporidio

La mixospora (fig. 1.10) contiene de una a cuatro cápsulas polares, uno o dos esporoplasmas y de dos a siete valvas protectoras a modo de envoltura. Las valvas se unen entre sí a lo largo de una línea de dehiscencia denominada línea de sutura y cubren incluso el ápice de la cápsula polar (Lom y Dyková 2006).

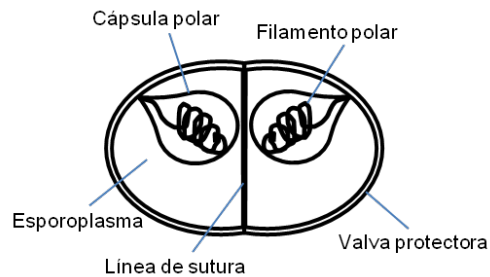


Figura 1.10: Esquema de una mixospora

1.2.3. Enfermedades causadas por mixozoos

Las mixozoosis afectan a las principales especies que se obtienen a partir de la acuicultura: salmónidos, espáridos y lubina, principalmente. Se trata de enfermedades emergentes y re-emergentes que provocan grandes pérdidas económicas (Kent y col. 2001).

Mixozoo	Nombre de la enfermedad o signos típicos	Pez	Referencias
<i>Ceratomyxa shasta</i>	Ceratomixosis	Salmónidos	Bartholomew y col. 1997 Bartholomew y col. 2004 Hallett y Bartholomew 2006
<i>Chloromyxum truttae</i>	Enteritis y vesícula biliar dilatada	Salmónidos	Fiala y Dyková 2004 Lom y Dyková 1993
<i>Henneguya ictaluri</i>	Enfermedad proliferativa de las branquias (PGD)	<i>Ictalurus punctatus</i>	Griffin y col. 2008 Pote y col 2000
<i>Myxidium giardii</i>	Infección sistémica	<i>Anguilla</i> spp.	Benajiba y col. 1993 Ventura y Paperna 1984
<i>Myxobolus cerebralis</i>	Enfermedad del torneo	Salmónidos	Fetherman y col. 2011 Gilbert y Granath 2003 Hedrick y col. 1999
<i>Myxobolus koi</i>	Mixobolosis branquial	<i>Cyprinus carpio</i>	Yokoyama y col. 1997
<i>Myxobolus murakamii</i>	Enfermedad del sueño por mixosporidios	<i>Oncorhynchus masou</i>	Urawa y col. 2009
<i>Myxobolus wulii</i>	Quistes en branquias y hepatopáncreas	<i>Carassius auratus</i>	Zhang y col. 2010
<i>Parvicapsula pseudobranchicola</i>	Inflamación y necrosis de los filamentos branquiales	<i>Salmo salar</i>	Karlsbakk y col. 2002 Nylund y col. 2005 Nylund y col. 2011
<i>Sphaerospora dykova</i>	Inflamación de la vejiga natatoria (SBI)	Ciprínidos	Bartošová y col. 2013 Dyková y Lom 1988 Holzer y col. 2013
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i> *	Enfermedad proliferativa del riñón (PKD)	Salmónidos	Hedrick y col. 1993 Sterud y col. 2007
<i>Thelohanellus hovorkai</i>	Telohanelosis hemorrágica	<i>Cyprinus carpio</i>	Liyanage y col. 2003 Novakov y col. 2011 Yokoyama y col. 1998

Tabla 1.4: Mixozoos con repercusión económica importante en peces de agua dulce. *El género *Tetracapsuloides* pertenece a la clase Malacosporea, las otras especies de la tabla son mixosporidios. Modificado de Yokoyama y col. 2012.

De forma general, las infecciones por mixozoos de agua dulce (tabla 1.4) suelen afectar de forma específica a un género o familia de hospedadores. En particular, las mixozoosis que afectan a salmónidos son relativamente bien conocidas, poseen efectos devastadores en



granjas de salmón y trucha, y se distribuyen ampliamente en el mundo (Yokoyama y col. 2012).

Mixosporidio	Nombre de la enfermedad o signos típicos	Pez	Referencias
<i>Enteromyxum leei</i>	Enteromixosis	<i>Diplodus puntazzo</i>	Álvarez-Pellitero y col. 2008
		<i>Sparus aurata</i>	Cuadrado y col. 2008
		<i>Paralichthys olivaceus</i>	Yanagida y col. 2004
		<i>Pagrus major</i>	Yasuda y col. 2002, 2005
		<i>Takifugu rubripes</i>	Bermúdez 2006
<i>Enteromyxum scophthalmi</i>	Enteromixosis	<i>Psetta maxima</i>	Palenzuela y col. 2002
<i>Henneguya lateolabracis</i>	Henneguyosis cardiaca	<i>Lateolabrax</i> spp.	Yokoyama y col. 2003
<i>Henneguya pagri</i>	Henneguyosis cardiaca	<i>Pagrus major</i>	Yokoyama y col. 2005b
<i>Kudoa amamiensis</i>	Kudoosis amami	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Burger y col. 2008
			Yokoyama y col. 2000
<i>Kudoa iwatai</i>	Quistes en múltiples órganos	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Diamant y col. 2005
		<i>Lateolabrax japonicus</i>	
		<i>Mugil cephalus</i>	
		<i>Oplegnathus punctatus</i>	
		<i>Pagrus major</i>	
<i>Kudoa lateolabracis</i>	Licuefacción muscular	<i>Lateolabrax</i> spp.	Yokoyama y col. 2004
		<i>Paralichthys olivaceus</i>	
<i>Kudoa lutjanus</i>	Infeción sistémica	<i>Lutjanus erythropterus</i>	Wang y col. 2005
<i>Kudoa neurophila</i>	Meningoencefalitis	<i>Latris lineata</i>	Grossel y col. 2003 Grossel 2005
<i>Kudoa shiomitsui</i>	Quistes en el corazón	<i>Thunnus orientalis</i>	Zhang y col. 2010
<i>Kudoa thyrsites</i>	Licuefacción muscular	<i>Coryphaena hippurus</i>	Levsen y col. 2008
		<i>Paralichthys olivaceus</i>	Moran y col. 1999
		<i>Salmo salar</i>	Whipps y col. 2003
		<i>Scomber scombrus</i>	
<i>Kudoa yasunagai</i>	Natación anormal	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Shirakashi y col. 2012
		<i>Oplegnathus fasciatus</i>	
		<i>Seriola quinqueradiata</i>	
		<i>Takifugu rubripes</i>	
		<i>Thunnus orientalis</i>	
<i>Myxobolus acanthogobii</i>	Escoliosis y otras deformaciones esqueléticas	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Yokoyama y col. 2005a
		<i>Scomber japonicus</i>	
<i>Sphaerospora (Leptotheca) fugu</i>	Enfermedad caquectizante	<i>Takifugu rubripes</i>	Tun y col. 2002
<i>Sphaerospora testicularis</i>	Lesiones graves en el aparato reproductor	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Fioravanti y col. 2004

Tabla 1.5: Mixosporidios con repercusión económica importante en peces marinos. Modificado de Yokoyama y col. 2012.



Los mixosporidios que infectan peces marinos (tabla 1.5) se caracterizan por afectar a un amplio rango de hospedadores, como por ejemplo especies del género *Kudoa*, o *Enteromyxum leei*, aunque también se han descrito otros mixosporidios presentes en un sola especie de pez (Yokoyama y col. 2012).

Las localizaciones de los mixosporidios en los hospedadores son múltiples, pero entre las especies marinas histozoicas destacan las infecciones en el corazón (*Henneguya lateolabracis*, *Henneguya pagri* y *Kudoa shiomitsui*) (Yokoyama y col. 2003, 2005b, Zhang y col. 2010), músculo esquelético (varias especies del género *Kudoa*), (Burger y col. 2008, Diamant y col. 2005, Levsen y col. 2008, Matsukane y col. 2011, Moran y col. 1999, Whipps y col. 2003, Yokoyama y col. 2004), sistema nervioso central (*Kudoa neurophila* y *Myxobolus acanthogobii*) (Grossel 2005, Yokoyama y col. 2005a) y tracto digestivo (especies del género *Enteromyxum*) (Álvarez-Pellitero y col. 2008, Cuadrado y col. 2008, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012, Yasuda y col. 2002). Otros mixosporidios marinos son celozoicos, como especies de los géneros *Ceratomyxa*, *Ellipsomyxa* o *Sphaerospora*, y se suelen desarrollar en la vesícula biliar, túbulos renales o aparato reproductor (Alama-Bermejo y col. 2012, Gunter y Adlard 2010, Rangel y col. 2012, Yemmen y col. 2012).



1.2.4. *Enteromixosis* descritas en la actualidad

El género *Enteromyxum* (Palenzuela y col. 2002) pertenece a la familia Myxidiidae que se encuentra en el suborden Variisporina (tabla 1.6). Hasta el momento se conocen tres especies: *Enteromyxum fugu*, *E. leei* y *E. scophthalmi* (Lom y Dyková 2006).

<p>Clase Myxosporea → Orden Bivalvulida</p> <p>Suborden Variisporina (10 Familias)</p> <p>Familia Myxidiidae (4 Géneros)</p> <p>Género <i>Enteromyxum</i></p> <p><i>Enteromyxum fugu</i></p> <p><i>Enteromyxum leei</i></p> <p><i>Enteromyxum scophthalmi</i></p>

Tabla 1.6: Clasificación del género *Enteromyxum* (Lom y Dyková 2006)

La especie *E. fugu*, anteriormente *Myxidium fugu* (Tun y col. 2000) es un mixosporidio celozoico que se desarrolla sobre el epitelio digestivo del pez globo (*Takifugu rubripes*) y no provoca signos clínicos evidentes (Tun y col. 2002, Yanagida y col. 2006). Opuestamente, tanto *E. leei* como *E. scophthalmi* son mixosporidios histozoicos con un alto impacto en la producción. Provocan pérdidas directas por la mortalidad, disminución de peso y empeoramiento de los índices de conversión (Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

E. leei, antes *Myxidium leei* (Diamant y col. 1994), se describió como agente patógeno en dorada, pero su rango de hospedadores es amplio y puede infectar a más de 40 especies marinas y de forma experimental a peces de agua dulce (Diamant y col. 2006, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012). Es uno de los patógenos más devastadores en

maricultura de aguas templadas, afectando a la viabilidad de los cultivos (Rigos y Katharios 2010). También infecta a peces ornamentales y se ha descrito un brote importante en peces mediterráneos en acuario, con alta virulencia en varias especies (Katharios y col. 2011, Padrós y col. 2001).

El cuadro clínico de la enteromixosis causada por *E. leei* varía según la especie, y en los casos más graves se desarrolla como un proceso caquetizante con mortalidad muy elevada. Las especies más susceptibles son el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y el pez globo (Álvarez-Pellitero y col. 2008, Yanagida y col. 2006). El parásito se localiza en el epitelio intestinal entre los enterocitos, lo que altera su morfología, puede causar vacuolización y necrosis del revestimiento epitelial. Los enterocitos pierden su disposición en empalizada y finalmente provoca que se desprendan del tejido subepitelial (Álvarez-Pellitero y col. 2008).

En contraposición, la infección por *E. leei* en la dorada se desarrolla de forma lenta, y los peces sufren un proceso de adelgazamiento más crónico y leve (Sitjà-Bobadilla y col. 2008). En lubina, se ha demostrado la presencia de estadios de *E. leei* a través de inoculaciones experimentales, pero no desarrollan la enfermedad e incluso acaban eliminando las formas parasitarias al cabo del tiempo (Sitjà-Bobadilla y col. 2007a).



1.3. Enteromixosis del rodaballo

1.3.1. Antecedentes históricos y etiología

A mediados de la década de los 90, se detectaron brotes epizooticos de una nueva enfermedad causante de elevada mortalidad en granjas de rodaballo en Galicia. En los años 1997 y 1998, coincidiendo con nuevos episodios de mortalidad, se demostró que los brotes observados se asociaban a la presencia de estadios parasitarios de un mixosporidio. La enfermedad afectaba a tanques de rodaballos de cualquier peso superior a 50 g, y la tasa de supervivencia final era nula en todos los tanques en que se manifestaba el síndrome. Se caracterizaba por el adelgazamiento evidente de los rodaballos, que mostraban los ojos hundidos y las prominencias óseas del cráneo muy evidentes por lo que se denominó “síndrome de la cabeza hundida” (Branson y col. 1999, García 1999).

En los primeros estudios realizados, se encontraron similitudes de esta nueva enfermedad con la producida por *M. leei* (actualmente *E. leei*), en cuanto al órgano diana y patología general, aunque se encontraron diferencias en las mixosporas, por lo que Branson y col. (1999) sugirieron que el mixosporidio encontrado sería una especie distinta del género *Myxidium*. Posteriormente, Palenzuela y col. (2002) realizaron estudios morfológicos, ultraestructurales y filogenéticos de ambos mixosporidios. El análisis filogenético molecular de secuencias génicas de la subunidad menor ribosómica permitió clarificar la sistemática de ambos organismos, con la creación del género

Enteromyxum, la denominación de *E. scopthalmi* para el agente causal del síndrome caquetizante en rodaballo y la reclasificación de *M. lei* como *E. lei*.

1.3.2. Ciclo vital y estadios de desarrollo

En la actualidad, la existencia de un ciclo biológico alterno que incluya un hospedador invertebrado está por determinar en las especies del género *Enteromyxum*.

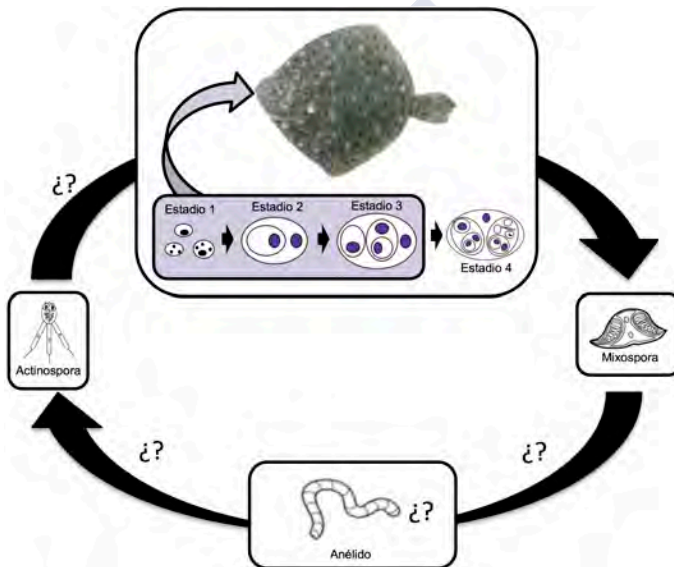


Figura 1.11: Propuesta de ciclo vital hipotético de *Enteromyxum scopthalmi*. En la actualidad solo está descrito el modo de transmisión directa de los trofozoítos (en morado), cuyos principales estadios infectivos son el 2 y 3. Los signos de interrogación indican las etapas de un posible ciclo vital indirecto: la liberación de la mixospora al medio que al ser ingerida por un anélido resultaría en la formación de una actinospora que infectaría al rodaballo. Modificado de Redondo y col. 2004.

Únicamente se conoce la transmisión directa de los trofozoítos entre rodaballos, mientras que se desconoce la posible infección de un anélido por la mixospora y la subsecuente fase de actinospora (fig. 1.11). La fase de mixospora de *E. scopthalmi* ocurre en el



epitelio digestivo del rodaballo, en el que se desarrollan los estadios vegetativos (denominados 1, 2 y 3) y las fases esporogónicas (estadios 4 y 5). El estadio 1 es un trofozoíto con uno o varios núcleos. El estadio 2 es un trofozoíto en el que la célula P contiene una célula S y a veces uno o más núcleos. En el estadio 3 una célula P alberga una o más células S, en la que puede haber células T (fig. 1.12). El estadio 4 es un plasmodio que contiene esporas en formación, del que se obtendrán dos esporas originadas asincrónicamente (fig. 1.13a). El estadio 5 (fig. 1.13b) se refiere a esporas maduras o formadas casi por completo (Palenzuela y col. 2002, Redondo y col. 2004).

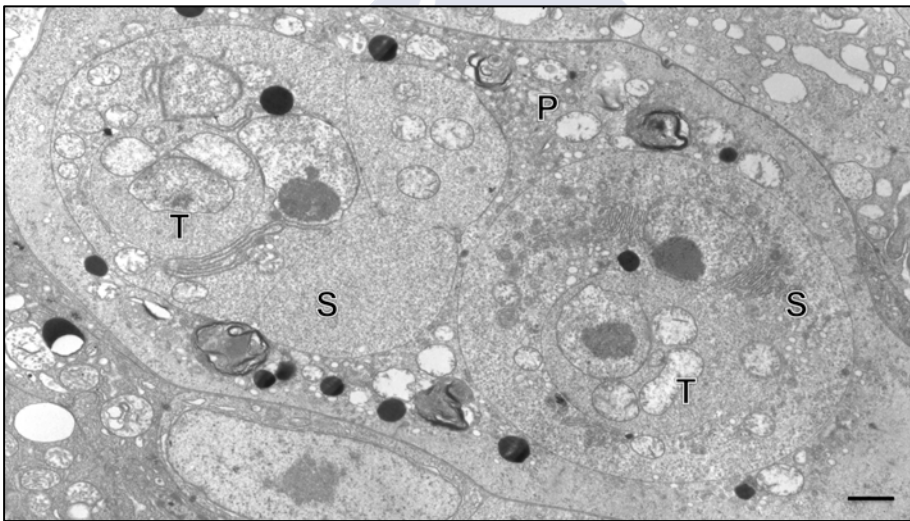


Figura 1.12: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un estadio 3 de *E. scopthalmi* en el que se aprecia la célula principal (P) que alberga células secundarias (S) que a su vez contienen células terciarias (T). Barra = 1 μ m. Imagen del grupo de investigación.

Las esporas de *E. scopthalmi* tienen unas dimensiones aproximadas de 25 x 15 x 15 μ m, poseen forma de media luna, esporoplasma binucleado y línea de sutura discreta. Las cápsulas polares son grandes, alargadas y están orientadas en direcciones opuestas. Los filamentos polares dan de 10 a 13 vueltas (fig. 1.13b) (Palenzuela y col. 2002).

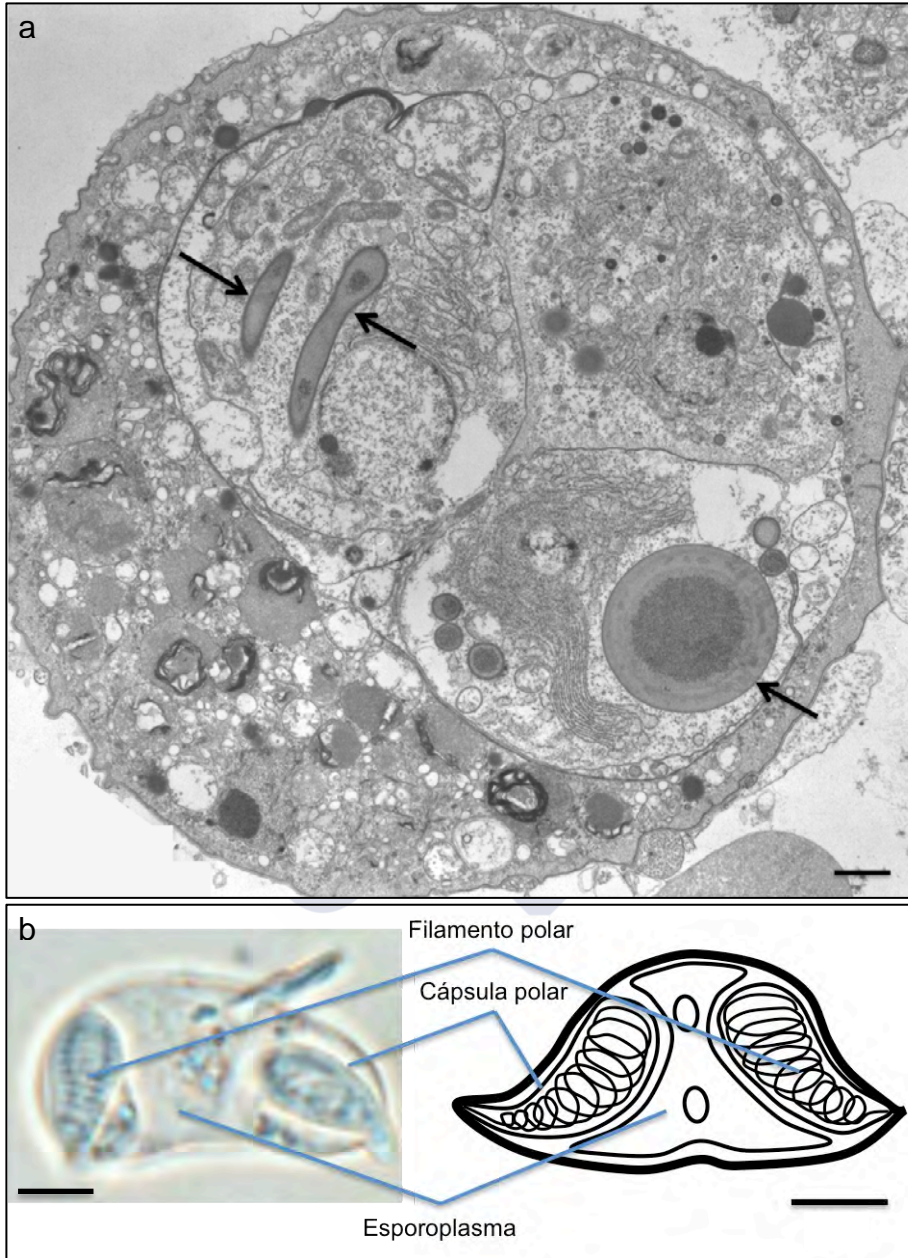


Figura 1.13: Estadios 4 y 5 de *E. scophthalmi*. **a:** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un estadio 4, en cuyo interior se pueden observar primordios capsulogénicos (flechas). Barra = 1 μm . **b:** Esporas de *E. scophthalmi*. Imagen de una preparación en fresco y esquema. En la imagen se observa la morfología alargada de la espora, que contiene dos cápsulas polares, con sus correspondientes filamentos polares enrollados en su interior, orientadas en direcciones opuestas. Barras = 5 μm . Imágenes del grupo investigador.



1.3.3. Epidemiología

1.3.3.1. Distribución y hospedadores

Hasta el momento solo se han encontrado estadios de desarrollo de *E. scopthalmi* en rodaballo de acuicultura y se desconoce su existencia en peces de vida salvaje. Por otra parte, se ha logrado inocular experimentalmente en cultivos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), aunque en esta especie no se desarrolla un síndrome caquetizante ni se produce mortalidad (Palenzuela y col. 2007).

1.3.3.2. Fuentes de contagio y vías de infección

Debido al desconocimiento de su ciclo biológico, el origen de los brotes epizoóticos es incierto, aunque se sugiere que el inicio de la infección puede ser una actinospora liberada por un hipotético hospedador intermediario (Branson y col. 1999, Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2002, 2004).

Se ha podido demostrar que una vez establecida la infección en un tanque, *E. scopthalmi* se transmite de forma horizontal y directa entre rodaballos, sin necesidad de completar un ciclo indirecto con fase de actinospora (Bermúdez y col. 2006a, 2006b, Branson y col. 1999, Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2002, 2004, Sitjà-Bobadilla y col. 2007b).

Redondo y col. (2002) comprobaron la transmisión directa experimentalmente de tres modos: mediante cohabitación de peces sanos e infectados; suministrando el efluente de tanques con rodaballos parasitados a tanques de peces sanos; y por vía oral, administrando raspados intestinales de peces infectados a peces sanos. La infección se

logró en todos los peces sanos expuestos al parásito por cualquiera de las tres vías y el porcentaje de mortalidad fue del 100 % en la práctica totalidad de los lotes.

Sin embargo, existen diferencias en el periodo de detección del parásito post exposición (PE) mediante examen histológico del tracto digestivo. El método de exposición al parásito que provoca la aparición más precoz de estadios de desarrollo es la vía oral, con un periodo de 8 días PE. Cuando los rodaballos se exponen al parásito mediante la transmisión por efluente o cohabitación, se detectan formas parasitarias a los 20 días PE (Bermúdez y col. 2006a, 2006b, Redondo y col. 2002, 2004, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

Además de determinar la transmisión directa de *E. scopthalmi*, se evidenció que los estadios proliferativos (principalmente el estadio 2 y 3), localizados en el intestino y liberados al medio por el desprendimiento del epitelio de revestimiento, podrían llegar a otros peces e iniciar nuevas infecciones (Redondo y col. 2002, 2004). Por otra parte, se ha propuesto que las esporas no serían las principales responsables de la transmisión del parásito a peces no infectados, ya que incluso en infecciones avanzadas, la observación de mixosporas es muy escasa (Redondo y col. 2002).

De acuerdo a las condiciones experimentales, la principal vía de entrada del parásito es la oral, aunque otras vías como la branquial, cutánea o rectal no se pueden descartar (Redondo y col. 2002).



1.3.3.3. Susceptibilidad

Los rodaballos infectados muestran gran variabilidad individual en la respuesta a la enfermedad. De forma general, las tasas de morbilidad y mortalidad observadas en diferentes estudios son muy elevadas (Bermúdez y col. 2006b, Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2002, 2004, Sitjà-Bobadilla y col. 2006). Sin embargo, otros rodaballos son resistentes, sobreviven a brotes epizooticos de la enfermedad y adquieren anticuerpos protectores frente a nuevas infecciones (Sitjà-Bobadilla y col. 2004, 2007b).

1.3.3.4. Curso natural

En condiciones naturales, la enteromixosis se caracteriza por un periodo de prepatencia prolongado, ya que desde la exposición al mixosporidio hasta la aparición de los estadios de desarrollo en el tubo digestivo pueden transcurrir varios meses (Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2004). A partir del momento en que se detectan estadios parasitarios en el stock de rodaballos, y dependiendo de las condiciones de cultivo, el periodo de patencia se puede alargar de semanas a meses, y las tasas de prevalencia y mortalidad pueden ser del 100% (Quiroga y col. 2006).

1.3.3.5. Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo asociados con el medio y el agente etiológico cabe destacar la calidad y temperatura del agua. El suministro de agua es la principal vía de entrada del parásito a las explotaciones y a mayor temperatura, más rápidos son el inicio y progresión de la infección. La presencia de rodaballos infectados en el tanque supone una fuente de contagio para otros rodaballos por



transmisión directa y la densidad del tanque se relaciona con la probabilidad de infección, la disponibilidad y concentración de formas parasitarias infectivas (Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2002).

En cuanto a los rodaballos, se ha constatado la importancia de su origen, ya que muestran diferente susceptibilidad. Además, en etapas juveniles, a mayor peso existe mayor prevalencia de la enfermedad. Finalmente, los rodaballos que superaron la parasitosis con anterioridad adquieren inmunidad y muestran resistencia en retos posteriores (Quiroga y col. 2006, Sitjà-Bobadilla y col. 2004, 2007b).

1.3.4. Signos clínicos y lesiones

La enteromixosis se manifiesta con el empeoramiento de los índices de conversión, alta morbilidad y elevado número de bajas en los tanques afectados. Los principales signos clínicos incluyen adelgazamiento y atrofia del tejido muscular que confieren el aspecto de “cabeza hundida”. En los casos más graves, los rodaballos pierden los depósitos grasos y la cavidad celómica se dilata por la acumulación de líquido ascítico. En la necropsia, a la apertura de la cavidad celómica, los órganos internos están pálidos, aunque los principales hallazgos se encuentran en el tubo digestivo. El tracto gastrointestinal muestra congestión y focos de hemorragia, dilatación con aspecto translúcido de las paredes intestinales y acumulación de líquido de aspecto mucoso, a veces con flóculos blanquecinos (fig. 1.14a) (Branson y col. 1999, Redondo y col. 2002, Sitjà-Bobadilla y col. 2007b).

El estudio histopatológico del tubo digestivo muestra las lesiones características de la enfermedad, que consisten en gastroenteritis catarral (fig. 1.14b) con presencia de trofozoítos de mixosporidios en



el epitelio de revestimiento (fig. 1.14c). En las fases iniciales, los estadios de *E. scophthalmi* se encuentran en el epitelio de los ciegos pilóricos y del intestino anterior, y desde ahí se distribuyen colonizando los tramos intestinales medio y posterior. También se pueden encontrar en el esófago y estómago, en el que colonizan el epitelio glandular. En los casos más graves, el epitelio de revestimiento se separa del tejido subyacente, se observan hemorragias e infiltrados inflamatorios en la lámina propia-submucosa (fig. 1.14d) (Bermúdez 2006, Redondo y col. 2004).

Las esporas están presentes en infecciones muy avanzadas, en rodaballos con claros signos clínicos, y su proporción con respecto al número de estadios de desarrollo es muy baja (fig. 1.14e) (Bermúdez 2006, Branson y col. 1999, Palenzuela y col. 2002, Redondo y col. 2004).

Aunque el órgano diana de los estadios de desarrollo de *E. scophthalmi* es el tubo digestivo, también se han encontrado estadios 1 en otros órganos sin reacción inflamatoria asociada, y en frotis sanguíneos (Redondo y col. 2004, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

Además de las lesiones observadas en el tubo digestivo, la enteromixosis también se asocia a una disminución del tejido linfohematopoyético en bazo y riñón. La depleción leucocitaria se intensifica según avanza la enfermedad, y los efectos de la infección son más claros en el tejido linfoide presente en el riñón (fig. 1.14f-g), donde la cantidad de células blancas disminuye de forma más evidente (Bermúdez y col. 2006b, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

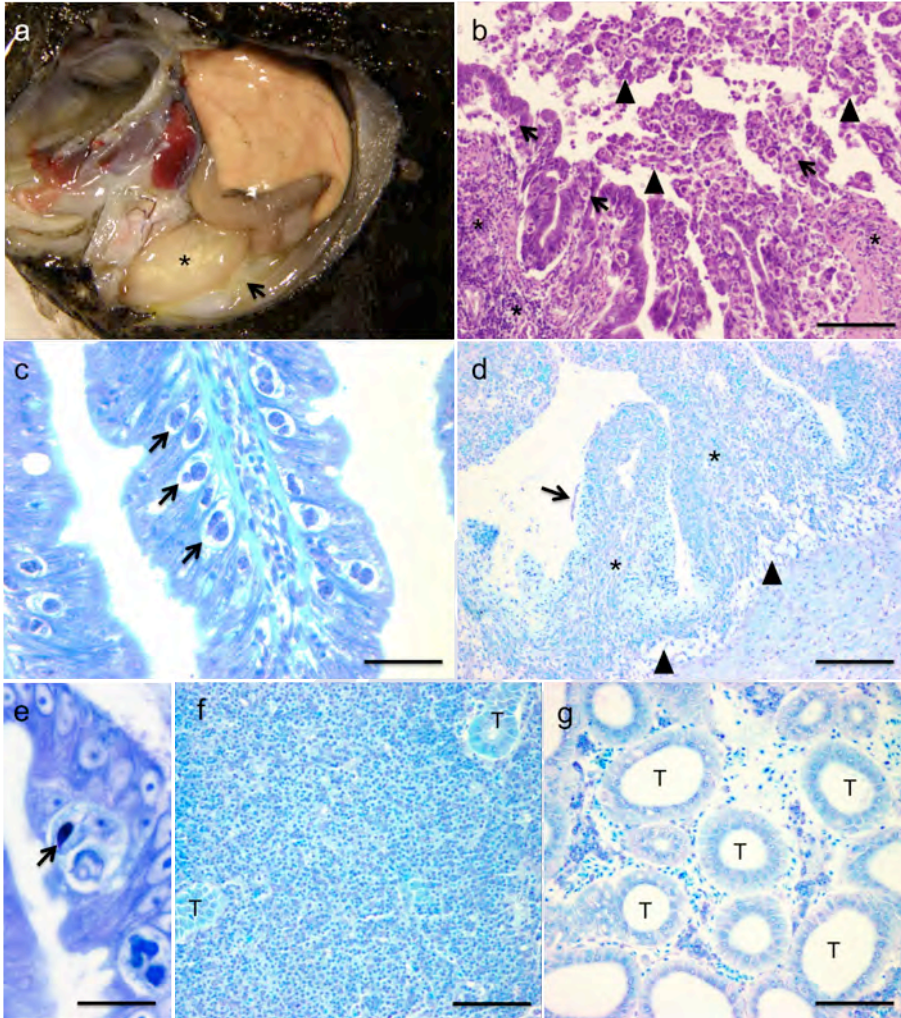


Figura 1.14: Hallazgos macroscópicos y microscópicos en rodaballos con enteromixosis. **a:** Apertura de la cavidad celómica. Ascitis (flecha) y dilatación del intestino posterior con presencia de líquido en el interior (asterisco). **b:** Enteritis debida a la presencia de estadios de desarrollo de *E. scophthalmi* (flechas), con infiltrados inflamatorios en la lámina propia-submucosa (asteriscos) y desprendimiento del epitelio de revestimiento (triángulos). Hematoxilina-eosina, barra = 200 μ m. **c:** Varios estadios 2 y 3 de *E. scophthalmi* (flechas) entre los enterocitos del epitelio de revestimiento intestinal. Azul de toluidina (AT), barra = 50 μ m. **d:** Sección de intestino anterior que presenta enteritis descamativa severa, en la que únicamente se conservan pequeños tramos de epitelio de revestimiento (flecha); en la lámina propia-submucosa se observa presencia de infiltrados inflamatorios (asteriscos), dilatación de vasos linfáticos y acumulación de líquido (triángulos). AT, barra = 200 μ m. **e:** Estadio 4 o diesporoblasto asincrónico en el epitelio de revestimiento intestinal. Contiene una espora en formación que presenta una cápsula polar completamente formada (flecha). AT, barra = 20 μ m. **f-g:** Imágenes de riñón anterior, de un rodaballo sano (**f**) y de uno con enteromixosis (**g**). Se aprecia la depleción del tejido linfohematopoyético que se localiza entre los túbulos renales (T). AT, barras = 100 μ m. Imágenes del grupo investigador.



1.3.5. Fisiopatología

1.3.5.1. Interacción parásito-hospedador y mecanismos de patogenicidad

Durante la infección con *E. scophthalmi* ocurren una serie de eventos que conducen a un síndrome caquetizante, que en la mayoría de los casos resulta letal (Sitjà-Bobadilla y col. 2007b).

Los trofozoítos de *E. scophthalmi* se desarrollan en el epitelio digestivo intercelularmente. La penetración del parásito así como su localización entre los enterocitos es objeto de diversos estudios en la actualidad. En la capa mucínica intestinal se localizan diferentes carbohidratos y sus receptores poseen una elevada relevancia en la interacción entre el epitelio intestinal y el parásito. Los receptores pueden ser utilizados por los parásitos como lugares de fijación y adhesión, y las interacciones entre carbohidratos y lectinas se relacionan con los mecanismos de penetración parasitarios (Álvarez-Pellitero 2008). El patrón de residuos de carbohidratos presente en los rodaballos cambia debido a la infección por *E. scophthalmi*, de tal forma que los terminales de glucosa-manosa, fucosa y N-acetil-glucosamina disminuyen en rodaballos infectados, mientras que se produce un incremento en D-galactosa y N-acetil-galactosamina (Redondo y Álvarez-Pellitero 2010a, Redondo y col. 2008). Por otra parte, las estructuras predominantes en la superficie de *E. scophthalmi* y en la zona de interacción parásito-hospedador son glucosa-manosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y α -D-galactosa (Redondo y col. 2008). El tratamiento de los trofozoítos de *E. scophthalmi* con las lectinas concanavalina A (Con A) y aglutinina

de soja (SBA), que se unen a carbohidratos en la superficie del parásito, inhibe la adhesión y colonización de explantes de epitelio intestinal por el mixosporidio (Redondo y Álvarez-Pellitero 2010b).

Tras penetrar en el epitelio, el mixosporidio establece relaciones con los enterocitos en forma de proyecciones citoplasmáticas intrincadas, en contacto directo con las membranas celulares del hospedador, e incluso formando estructuras similares a uniones en hendidura o *gap junction* (fig. 1.15). Estas uniones participan en la fijación, comunicación y nutrición de los trofozoítos parasitarios (Redondo y col. 2003b).

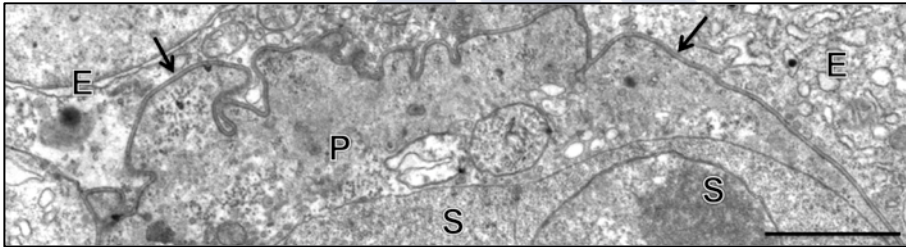


Figura 1.15: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la zona de contacto de los estadios de *E. scophthalmi* con los enterocitos (E). En la imagen se observan partes de células S (S) en el interior de la célula P (P), con proyecciones citoplasmáticas y cuyas membranas están en contacto con las del hospedador (flechas), de una forma similar a uniones en hendidura o *gap junctions*. Barra = 1 μ m. Imagen del grupo investigador.

La presencia de las formas parasitarias de *E. scophthalmi* en el epitelio de revestimiento altera las uniones celulares estrechas o *tight junction* entre los enterocitos, lo que resulta en pérdida de la barrera intestinal y paso indiscriminado de moléculas y electrolitos. El daño intestinal que disminuye la absorción de los nutrientes, acompañado por la letargia y anorexia, provoca el adelgazamiento de los rodaballos (Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).



La presencia de *E. scophthalmi* también incrementa la tasa de muerte celular en el epitelio digestivo. Este hecho afecta igualmente a la integridad de la barrera intestinal y contribuye al agravamiento del síndrome. Aunque se desconocen los mecanismos que desencadenan la muerte celular, durante la respuesta del hospedador se generan moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno, que causan estrés oxidativo con efectos negativos en los tejidos y podrían contribuir al daño y muerte celular (Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

En numerosos trabajos se ha sugerido que la muerte celular puede estar relacionada con una estrategia del hospedador para impedir y prevenir la proliferación y diseminación del parásito. En el caso de la enteromixosis, contrariamente, podría facilitar la dispersión de las formas parasitarias a otras áreas del tubo digestivo, e incluso favorecer la supervivencia de los mixosporidios en el medio, al rodearse de células epiteliales que se desprenden al lumen intestinal (Redondo y col. 2003a).

Otro evento destacable durante la respuesta del hospedador es la liberación de determinados factores o péptidos que influyen en la ingesta de alimentos y estado corporal. En rodaballos infectados con *E. scophthalmi* se producen cambios en los neuropéptidos intestinales (tabla 1.7), que potencian la anorexia, la motilidad intestinal y la secreción de fluidos, a la vez que participan en la respuesta inmunitaria. Esta respuesta además podría estar exacerbada (Bermúdez y col. 2007) y tiene, por lo tanto, un alto coste metabólico.

Péptido	Localización CEEs	Cambios CEEs	Efectos	SNE	Otras
5-HT	Estómago e intestino posterior	Incremento*	Promotor de la motilidad	Neuronas y algunas fibras nerviosas	-
CCK-8	Ciegos pilóricos e intestino	Incremento**	Anorexigénico y estimulante de secreciones	-	-
CGRP	Ciegos pilóricos, intestino anterior y escasas en intestino medio	Disminución	Inhibidor en digestivo y sistema inmune	Fibras nerviosas en PM y alguna neurona	-
SP	Ciegos pilóricos e intestino	Incremento	Estimulante en digestivo y sistema inmune	Fibras nerviosas en PM y PS	Leucocitos y enterocitos
VIP	Ciegos pilóricos e intestino anterior	Disminución*	Inhibidor en digestivo y sistema inmune	Neuronas y fibras nerviosas en PM	Vasculatura

Tabla 1.7: Péptidos estudiados mediante inmunohistoquímica en rodaballos infectados por *E. scophthalmi*. 5-HT: serotonina, CCK-8: colecistoquinina, CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, SP: sustancia P, VIP: péptido intestinal vasoactivo, CEEs: células enteroendocrinas, PM: plexo mientérico, PS: plexo submucoso, SNE: sistema nervioso entérico, *: resultado significativo, **: resultado altamente significativo. Resumen de los resultados de Bermúdez y col. 2007.

1.3.5.2. Respuesta inmunitaria

Un hecho importante en los inicios de la infección, es la capacidad del mixosporidio para evadir la respuesta del hospedador, lo que permite su rápida proliferación. Se ha sugerido que la respuesta específica capaz de controlar la infección está retrasada, como se ha observado en la cinética de producción de anticuerpos en rodaballos supervivientes (Sitjà-Bobadilla y col. 2007b). Además, se ha propuesto la existencia de fallos en las conexiones entre los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, y por otra parte, la activación de varios efectores inmunitarios estudiados parece ser incapaz de frenar la proliferación y colonización del epitelio digestivo por *E. scophthalmi* (Bermúdez y col. 2006b, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).



La invasión del epitelio digestivo por parte del parásito desencadena una respuesta inmunitaria (tabla 1.8), con activación inicial de la leucopoyesis, pero seguida por depleción leucocitaria en los órganos linfohematopoyéticos. A pesar de la activación de la respuesta celular, el desarrollo e invasión del parásito no se detiene (Bermúdez 2006).

La enteromixosis induce en el rodaballo la activación de varios mecanismos de la respuesta inmune inespecífica. En líneas generales, se produce un incremento del estallido respiratorio de los fagocitos circulantes, y existen variaciones en diversos factores humorales innatos, como las peroxidadas, lisozima o complemento, aunque ninguna molécula en particular parece ser clave para eliminar el parásito (Sitjà-Bobadilla y col. 2006, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

Factor	Cambios durante la enteromixosis
Hematocrito	Tendencia a la disminución.
Leucocitos circulantes	Incremento de granulocitos, progranulocitos y células plasmáticas y descenso de linfocitos.
Proteínas séricas	Sin cambios significativos.
Estallido respiratorio	Incremento.
Lisozima sérica	Disminución y posterior aumento.
Complemento sérico	Sin cambios significativos.
Antiproteasas séricas	Tendencia al incremento en antiproteasas, incremento significativo de α -2-macroglobulina.
Anticuerpos específicos	Producción retardada de anticuerpos durante la infección. Incremento significativo en rodaballos resistentes.
Respuesta de células IgM+	Incremento en los órganos linfoides y posterior migración al intestino.

Tabla 1.8: Principales cambios observados en la respuesta del rodaballo a la enteromixosis (Bermúdez y col. 2006b, Sitjà-Bobadilla y col. 2004, 2006, 2007b).

En el rodaballo se desencadena también una respuesta inmune específica frente *E. scophthalmi*. Las células portadoras de inmunoglobulinas se incrementan en los peces infectados, pero la velocidad de producción de anticuerpos es relativamente baja. En desafíos con el mixosporidio, se detectaron anticuerpos específicos contra el parásito a los 48 días PE en rodaballos que superaron previamente la infección, mientras que los peces expuestos por primera vez desarrollaron la enfermedad y murieron sin producir anticuerpos específicos en un periodo de 40 a 49 días (Bermúdez y col. 2006b, Redondo y col. 2002, Sitjà-Bobadilla y col. 2004, 2007b).

1.3.6. Diagnóstico de la enfermedad

Los signos clínicos de la enteromixosis son inespecíficos, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se basa en la detección de las formas parasitarias del mixosporidio.

El diagnóstico de campo se realiza mediante la observación de las esporas de *Enteromyxum* en raspados de intestino, aunque en ocasiones resulta complicado debido a su escasez. La detección de trofozoítos en preparaciones en fresco es posible aunque su evaluación requiere experiencia (Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

El procedimiento estándar que se emplea para el diagnóstico es el estudio histopatológico del intestino del rodaballo. Mediante tinción rutinaria (hematoxilina-eosina) se distinguen los estadios de desarrollo de *E. scophthalmi* en el epitelio digestivo, así como el daño tisular asociado. Además, se puede facilitar la visualización de los mixosporidios con tinciones especiales (azul de toluidina, Giemsa y/o



ácido peryódico de Schiff) que destacan determinadas estructuras en el parásito. El inconveniente del estudio histológico es que las formas parasitarias pueden pasar desapercibidas en etapas muy tempranas de la infección, o si los cortes histológicos no abarcan los pliegues intestinales afectados. Además los estadios 1 pueden confundirse con enterocitos en apoptosis (Bermúdez y col. 2006b, Redondo y col. 2004, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

Las técnicas de diagnóstico molecular de *E. scophthalmi* incluyen la detección de fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ*. La toma de muestras mediante la inserción de un bastoncillo de algodón en el recto, permite detectar *E. scophthalmi* por PCR de forma no letal. Esta herramienta es útil para una detección temprana y por tanto, la vigilancia epidemiológica en las granjas. Además, el uso de la PCR es relevante para la investigación ya que permite la monitorización de la enfermedad, lo que puede ayudar a determinar la vía de entrada del parásito y los posibles portadores y hospedadores intermediarios del ciclo vital (Redondo 2005, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).

Recientemente, el desarrollo de una PCR cuantitativa a tiempo real permite diagnosticar la enteromixosis y estimar la carga parasitaria (Piazzon y col. 2012).

1.3.7. Tratamiento, prevención y control de la enfermedad

En la actualidad no existe ningún tratamiento efectivo contra la enteromixosis del rodaballo. Experimentalmente se han probado diversos fármacos, principalmente coccidiostáticos, con resultados



poco exitosos. El tratamiento por vía oral con toltrazuril indujo vacuolización en los estadios de desarrollo de *E. scophthalmi*, aunque no afectó a las esporas y no mejoró el desarrollo clínico de la enfermedad (Bermúdez y col. 2006a). La combinación de salinomicina y amprolio, así como otros tratamientos con robenidina-sulfamidas y suplementos nutricionales con extractos naturales, mejoraron la tasa de supervivencia de los rodaballos. La disminución de la mortalidad parecía estar asociada a la disminución de la carga parasitaria y menor extensión de la infección a nivel intestinal. Sin embargo, el progreso de la infección no se frenó y las tasas de prevalencia en los stocks afectados siguieron siendo del 100 %. Otros fármacos como la combinación narasina-nicarbazina poseían efectos deletéreos en las células del rodaballo (Palenzuela y col. 2009).

No existen vacunas frente a la enteromixosis, aunque la existencia de resistencia adquirida en algunos rodaballos abre las puertas al desarrollo de estrategias de vacunación (Sitjà-Bobadilla y col. 2007b).

Dada la inexistencia de medidas terapéuticas y vacunas eficaces, el manejo en las granjas de rodaballos es la principal medida de prevención y control de la enfermedad. Para evitar las infecciones se deben aplicar tratamientos a las aguas, tanto de entrada como de salida, que incluyan filtración y desinfección con rayos ultravioleta u ozono. Además se debe realizar vigilancia epidemiológica de la enfermedad, monitorizando los lotes con PCR no letal, sacrificando rápidamente los tanques infectados y procediendo a su desinfección (Quiroga y col. 2006, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012).



1.4. Respuesta del hospedador a las parasitosis intestinales

1.4.1. Respuesta inmunitaria en los teleósteos

Algunas de las funciones inmunitarias de los teleósteos no están completamente esclarecidas, y a veces se deducen de las similitudes entre el sistema inmunitario de los peces y de los mamíferos (Losada y col. 2009, Randelli y col. 2008). En la actualidad, existe un acuerdo general en cuanto a que los principales mecanismos inmunitarios descritos para mamíferos están presentes en los teleósteos. Estos poseen los elementos del sistema inmune tanto innato como adaptativo, que se integran a varios niveles en distintos mecanismos inmunitarios, en contraposición a la división artificial entre ambos sistemas (fig. 1.16) (Álvarez-Pellitero 2008, Magnadottir 2010).

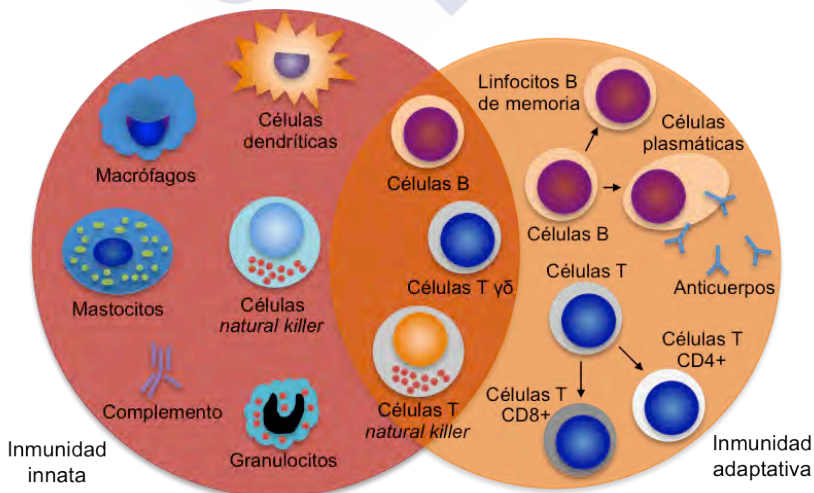


Figura 1.16: Principales elementos del sistema inmunitario innato y adaptativo en teleósteos. Adaptado de Dranoff 2004.

En cuanto a la organización del sistema inmunitario, en los peces no existe médula ósea ni linfonodos. Los órganos linfoides primarios son el riñón anterior (origen de las células sanguíneas) y el timo (donde maduran células T), mientras que los órganos secundarios y también linfohematopoyéticos son el riñón anterior y el bazo. Estos dos órganos presentan agregados o centros de melanomacrófagos, considerados los precursores de los centros germinales de vertebrados superiores (Álvarez-Pellitero 2008, Kato y col. 2013, Saunders y col. 2010, Vigliano y col. 2006).

Actividad o factor	Células involucradas	Secuencias cDNA para	Marcadores celulares	Referencias
Fagocitosis	Fagocitos y células B	-	mAb: M ϕ e IgM, pAb: CSF-1R, granulocitos, neutrófilos y granulina	Bermúdez y col. 2006b Katzenback y Belosevic 2012 Köllner y col. 2001 Li y col. 2006 Magnadottir y col. 2005 Rønneseth y col. 2007
Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	Fagocitos	NADPH-oxidasa iNOS	NBT	Álvarez-Pellitero 2008 Rieger y Barreda 2011
Complemento y respuesta de fase aguda	Hepatocitos	C3, C4, C5, C6, C7, C8, CRP, SAP, AMG	pAb: C3	Álvarez-Pellitero 2008 Franchini y col. 2001 Nakao y col. 2011 Sambrook y col. 2003
Antibacterianos	Varios tipos	Familias de péptidos	Ninguno	Rieger y Barreda 2011 Silphaduang y col. 2006
Antivirales	Leucocitos, fibroblastos	IFN-1, IFN, proteína Mx	Ninguno	Casani y col. 2009 Silphaduang y Noga 2001
Enzimas	Varios tipos	Lisozima, caspasas, proteasas	mAb: M24-2	Álvarez-Pellitero 2008 Marsh y Rice 2010
Inflamación, citoquinas y monoquinas	Leucocitos	TNF- α , PLA2, COX-2, TLRs, ILs, quimioquinas	pAb: IL-1, mAb y pAb: TNF- α	Alejo y Tafalla 2011 Lv y col. 2012 Rebl y col. 2010 Sasaki y col. 2002 Taechavasonyoo y col. 2013
Muerte celular inespecífica	Leucocitos	NCCRP-1	mAb: 5C6	Kazantzi y col. 2003 Seppola y col. 2007

Tabla 1.9: Resumen de las principales actividades innatas estudiadas en peces. AMG: α -2-macroglobulina, COX-2: ciclooxigenasa 2, CRP: proteína reactiva C, iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible, IFN: interferón, IL: interleuquina, M ϕ : macrófagos, mAb: anticuerpo monoclonal, Mx: resistencia a myxovirus, NCCRP-1: proteína 1 del receptor de células citotóxicas no específicas, NBT: nitroazul de tetrazoilo, pAb: anticuerpo policlonal, PLA2: fosfolipasa A2, SAP: amiloide P sérico, TLRs: receptores *toll-like*, TNF: factor de necrosis tumoral.



La primera línea de la defensa inmune son las respuestas innatas, de desarrollo rápido, con redes complejas de moléculas y células que cooperan para inactivar o eliminar los patógenos. El sistema innato de los peces contribuye en mayor proporción a la respuesta inmunitaria global que el de los mamíferos, ya que la respuesta adaptativa depende de la temperatura y en peces es más lenta (Ellis 2001, Magnadottir 2006, 2010).

Las células que participan en las respuesta innatas son de tipo leucocitario, principalmente fagocitos mononucleares (incluyendo las células B), polimorfonucleares y células *natural killer*. Otros tipos celulares, como células dendríticas epiteliales y fibroblastos, también producen moléculas inmunorreguladoras involucradas en la inmunidad innata (tabla 1.9) (Li y col. 2006, Randelli y col. 2008).

Actividad o factor	Células involucradas	Secuencias cDNA para	Marcadores celulares	Referencias
Anticuerpos específicos, memoria	Células B	IgM, IgD, IgT, RAGs	mAb: IgM y células B	Bermúdez y col. 2006b Hikima y col. 2010 Magadán-Mompó y col. 2011 Zhang y col. 2011
Reconocimiento celular, memoria	Células T	TCR α , β y δ , CD3, RAGs	mAb: DLT15, WLC38	Castro y col. 2011 Rombout y col. 2011 Vigliano y col. 2011a Kato y col. 2013
Muerte celular específica	Células T	CD8 α , CD8 β , MHC-I	mAb: CD8 α	Lu y col. 2012 Nakanishi y col. 2011 Shibasaki y col. 2010 Kato y col. 2013
Actividad helper	Células T	CD4, MHC-II	mAb: CD4	Lu y col. 2012 Shibasaki y col. 2010
	Th1	IFN- γ , IL2	Ninguno	Grayfer y Belosevic 2009 Secombes y col. 2011
	Th2	IL4, IL10	Ninguno	Secombes y col. 2011 Zhu y col. 2012
	Leucocitos	ILs: 7, 15, 21, 22, 26, LIB	Ninguno	Secombes y col. 2011

Tabla 1.10: Resumen de las principales actividades adaptativas estudiadas en peces. CD: clúster de diferenciación, IFN: interferón, Ig: inmunoglobulina, IL: interleuquina. LtB: linfotaxina B, mAb: anticuerpo monoclonal, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, RAGs: genes activadores de la recombinasa, TCR: receptor de las células T.



Por otra parte, la respuesta adaptativa es una red compleja de células especializadas, proteínas, genes y mensajeros bioquímicos que tratan de eliminar los patógenos a través de anticuerpos y células efectoras con gran especificidad y afinidad (tabla 1.10) (Uribe y col. 2011).

La inmunidad adaptativa se basa en la generación de receptores aleatorios de gran diversidad en la superficie de linfocitos B (inmunoglobulinas) y T (receptores de células T, TCRs) que reconocen los antígenos. Los linfocitos sufren procesos de recombinación somática y proporcionan memoria del antígeno a largo plazo (Álvarez-Pellitero 2008, Magnadottir 2010).

1.4.2. Respuesta inmunitaria a parásitos intestinales

El tracto gastrointestinal es el lugar donde ocurre la digestión de los alimentos y absorción de los nutrientes, aunque en él también ocurren importantes procesos inmunológicos y juega un papel relevante en la protección del animal frente a los patógenos. El intestino es una barrera física y química que supone la primera línea de defensa contra los organismos invasores a través del sistema digestivo. Las células del tracto gastrointestinal de los peces producen sustancias químicas para favorecer la función de barrera, contribuyen a las defensas innatas y activan procesos que desencadenan una respuesta inmunitaria adaptativa (Álvarez-Pellitero 2008, Cain y Swan 2011, Rombout y col. 2011, Salinas y col. 2011, Sitjà-Bobadilla 2008a).

Los peces carecen de un tejido linfoide asociado organizado en el canal alimentario, y por lo tanto no tienen placas de Peyer ni linfonodos mesentéricos. Las células inmunitarias se distribuyen de



forma dispersa a lo largo del tubo digestivo, aunque se distinguen principalmente dos compartimentos: la lámina propia-submucosa y los linfocitos intraepiteliales. De forma general, en la lámina propia se localizan macrófagos, granulocitos, linfocitos y células plasmáticas, mientras que los linfocitos intraepiteliales son en su mayoría células T y pocas células B (Rombout y col. 1998, Salinas y col. 2011).

En teleósteos, un mecanismo de gran relevancia en la respuesta a las parasitosis es el estallido respiratorio de los fagocitos, como se ha comprobado en mixosporidiosis intestinales (Sitjà-Bobadilla 2008b). El estallido respiratorio se caracteriza por la liberación de sustancias bactericidas, entre las que se encuentran especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico, NO (Álvarez-Pellitero 2008, Magnadottir 2010). Este último es producido por la sintasa de óxido nítrico inducible, iNOS (fig. 1.17), principalmente localizada en macrófagos (Díez y col. 2010, Spratt y col. 2007, Zhao y col. 2010), aunque se puede encontrar en otros tipos celulares, entre ellos los enterocitos (Campos-Pérez y col. 2000, Gookin y col. 2006, Keklikoglu y col. 2008). La expresión de iNOS en macrófagos activados induce un ambiente citotóxico y promueve la vasodilatación, mediando en diferentes fases de la respuesta inmunitaria (Pacher y col. 2007, Vincendeau y col. 2003, Zhao y col. 2010).

La respuesta inmunitaria frente a las enteromixosis engloba importantes eventos innatos, como el incremento del estallido respiratorio en los fagocitos circulantes y valores de NO sérico (Álvarez-Pellitero y col. 2008, Golomazou y col. 2006, Sitjà-Bobadilla y col. 2006). Sin embargo, no hay estudios histológicos que evalúen el

incremento en la expresión de iNOS o la distribución de las células productoras de NO. En cuanto a la respuesta adquirida, se ha constatado la producción de anticuerpos específicos y migración de células portadoras de inmunoglobulinas en rodaballos parasitados por *E. scophthalmi* (Bermúdez et al. 2006b, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

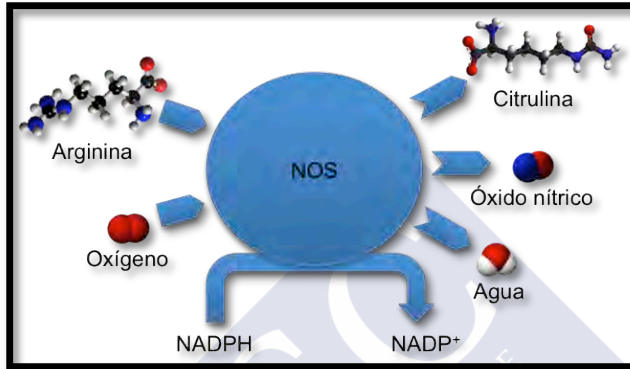


Figura 1.17: Esquema de la producción de óxido nítrico por las enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS). NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida, NADP+: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

1.4.3. Efectos de los parásitos en el epitelio: apoptosis

El epitelio intestinal sano actúa como una barrera que controla el intercambio de agua y electrolitos, absorción de nutrientes e impide el ingreso de los patógenos al organismo. Al colonizar el epitelio digestivo, los patógenos provocan cambios en los enterocitos, que alteran la función intestinal. Por ejemplo, en la enteromixosis del pez globo se ha demostrado que las lesiones intestinales causan un fallo en la regulación osmótica y absorción de los nutrientes que provocan el adelgazamiento rápido del pez (Ishimatsu y col. 2007).

La modificación de la estructura interna y uniones entre las células epiteliales no solo se traduce en un mal funcionamiento del epitelio,



sino que puede llegar a inducir la muerte celular. Por otra parte, a consecuencia de la respuesta inflamatoria, se liberan gran cantidad de moléculas oxidativas que crean un ambiente citotóxico y pueden contribuir al daño tisular. Como se ha mencionado previamente, en las enteromixosis se liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, con posibles efectos deletéreos sobre las células intestinales. Además, se ha podido demostrar en doradas con enteromixosis que los mecanismos antioxidantes, entre ellos el sistema glutatión peroxidasa-glutatión disulfuro, aparecen reducidos, lo que incrementaría el riesgo de daño oxidativo (Estensoro y col. 2011a, Sitjà-Bobadilla y col. 2008).

Además de ocasionar daño celular *per se*, los radicales libres como el óxido nítrico pueden desencadenar la descamación de las células epiteliales (Monteiro y col. 2004). Debido a la pérdida del contacto con otras células y con la matriz subyacente, los enterocitos sufren una forma de muerte celular programada o apoptosis, denominada anoikis (Chiarugi y Giannoni 2008, Lugo-Martínez y col. 2009).

La apoptosis regula la respuesta del hospedador durante infecciones causadas por una gran variedad de parásitos, que a su vez han evolucionado con diversas estrategias para inducir o inhibir apoptosis en las células que infectan, modulando la respuesta inmunitaria y beneficiando su diseminación en el hospedador (Lüder y col. 2001, Mele y col. 2004, Panaro y col. 2007, Schaumburg y col. 2006).

La apoptosis se manifiesta morfológicamente por condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, tumefacción de la membrana plasmática, retracción celular y desintegración en vesículas (cuerpos

apoptóticos). Existen dos vías básicas para la iniciación de la apoptosis, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o de los receptores de muerte (fig. 1.18). Ambas confluyen en la obtención de la forma activa de la caspasa-3 (Duan y col. 2003, Panaro y col. 2007).

En mamíferos, los efectos proapoptóticos y antiapoptóticos de diversos patógenos son muy importantes en el desarrollo de las parasitosis intestinales, como las causadas por *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* o *Entamoeba histolytica* (Becker y col. 2010, Liu y col. 2009, Mele y col. 2004, Panaro y col. 2007, Ralston y Petri 2011).

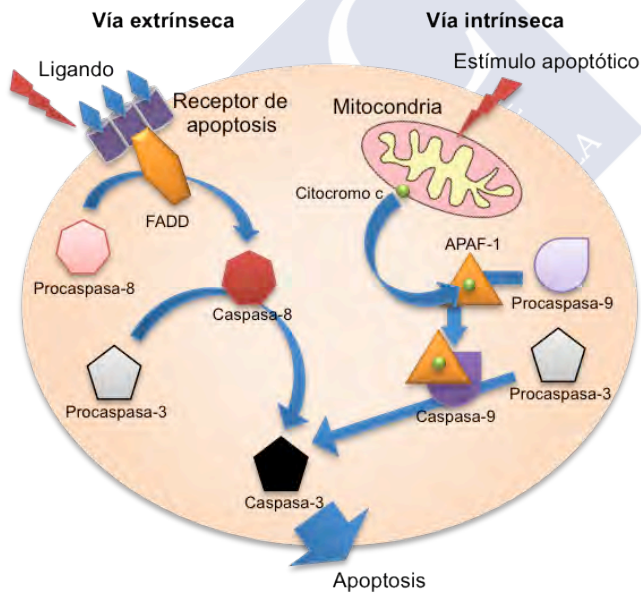


Figura 1.18: Esquema de las vías de la apoptosis. FADD: Dominio de muerte asociado a Fas. APAF-1: Factor 1 activador de la proteasa apoptótica.

En peces infectados por mixosporidios intestinales también se observan cambios en la muerte celular programada. En el rodaballo está descrita la presencia de necrosis y células con caracteres morfológicos de apoptosis en el epitelio digestivo, asociada a la



infección por *E. scophthalmi*, así como muerte celular en el tejido linfohematopoyético (Bermúdez y col. 2006b). En las doradas expuestas de forma crónica a *E. leei* existen diferencias en la expresión de los genes relacionados con la apoptosis, con sobre-expresión de genes proapoptóticos y disminución de otros antiapoptóticos en intestino y riñón (Davey y col. 2011).

1.4.4. Cambios en el sistema neuroendocrino entérico

En los teleósteos, de forma similar a los mamíferos, el sistema neuroendocrino regula los procesos fisiológicos que ocurren en el tubo digestivo (Çinar y col 2006, Vigliano y col. 2011b, Volkoff y col. 2005) y participa en la respuesta a agresiones de forma coordinada con el sistema inmune (Bermúdez y col 2007, Dezfuli y col. 2011, Selleri y col. 2008).

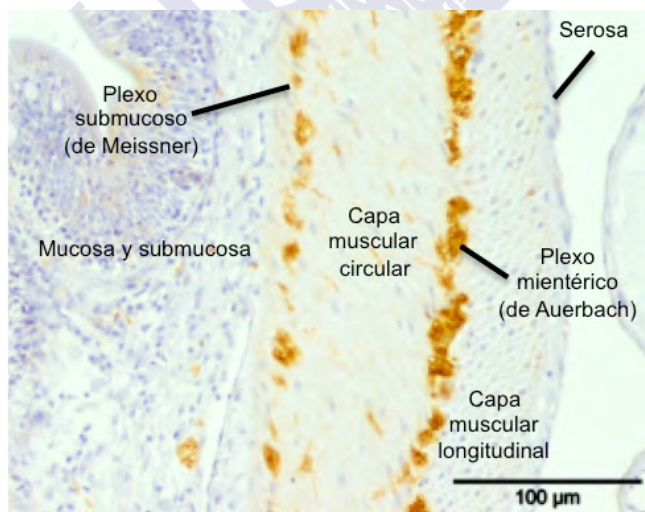


Figura 1.19: Intestino medio de dorada inmunoteñido para tubulina alfa. Distribución del sistema nervioso entérico. Imagen del grupo investigador.



El sistema neuroendocrino incluye los sistemas nervioso entérico (SNE) y endocrino difuso. Las neuronas del SNE se agrupan en dos tipos de ganglios: el plexo mientérico o de Auerbach y el plexo submucoso o de Meissner. El plexo mientérico se localiza entre las capas musculares externa e interna del tubo digestivo, mientras que el plexo submucoso se encuentra bajo la lámina propia-submucosa en el caso de los teleósteos, cerca de la capa muscular interna o circular (fig. 1.19).

En los peces, la mayoría de cuerpos neuronales se encuentran en el plexo mientérico. El plexo submucoso está menos desarrollado y en la mayoría de especies está compuesto únicamente por fibras nerviosas (Olsson 2009).

El sistema endocrino entérico está compuesto por células secretoras individuales distribuidas en la mucosa del estómago e intestino. Las hormonas producidas regulan la secreción, absorción, motilidad y proliferación de la mucosa, además de coordinarse con el sistema inmunitario para poder iniciar una respuesta inmune. Las principales funciones de los neuropéptidos en teleósteos se resumen en la tabla 1.11. Las células enteroendocrinas responden a estímulos procedentes del lumen intestinal y señales somáticas producidas por neurotransmisores, factores de crecimiento y citoquinas (fig. 1.20). Los cambios producidos son detectados a través de neuronas, células endocrinas y células inmunitarias, que se comunican a través de péptidos intestinales de forma endocrina, paracrina y autocrina (Ahlman y Nilsson 2001, Ameri y Ferone 2012, Bilbo y Klein 2012, Snoek y col. 2010).



Péptido	Funciones	Referencias
Bombesina	Estimulante de la secreción de ácido gástrico. Estimulante de la motilidad gastrointestinal. Inhibidor del vaciado gástrico. Inhibidor del apetito.	Jensen 2001 Lin y col. 2000 Volkoff y col. 2005
Colecistoquinina	Regulador de la motilidad intestinal y el vaciado gástrico. Estimulante de la secreción pancreática. Inhibidor del apetito.	Bermúdez y col. 2007 Gélineau y Boujard 2001 Volkoff y col. 2003, 2005
Encefalinas (Leu-encefalina y Met-encefalina)	Inhibidores del vaciado gástrico. Estimulantes del tono de los esfínteres. Inhibidores de la motilidad y secreción intestinal.	Holzer 2009 Lukiw 2006 Metz-Boutigue y col. 2003 Radulović y col. 1996 Sirinek y O'Dorisio 1991
Glucagón	Hiperglucemiante y lipolítico. Inhibidor del apetito.	Geary 1999 Moon 1998 Volkoff y col. 2005
Péptido intestinal vasoactivo	Inhibidor de la motilidad intestinal. Vasodilatador. Inhibidor de la respuesta de células T. Inhibidor de la síntesis de IL-2, IL-4 e Ig. Inhibidor de la actividad de los macrófagos.	Balemba y col. 2001 Bermúdez y col. 2007 Goetzl y Sreedharan 1992 Rudholm y col. 2009 Snoek y col. 2010
Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	Inhibidor de la motilidad intestinal. Vasodilatador. Inhibidor de la proliferación de linfocitos. Inhibidor de la actividad de los macrófagos.	Bermúdez y col. 2007 Geary 1999 Shabhazi y col. 1998 Sirinek y O'Dorisio 1991
Neuropéptido Y	Estimulante del apetito. Regulador del balance energético. Estimulante de la contracción del músculo liso. Estimulante de la respuesta inmunitaria. Inhibidor de la liberación de somatostatina.	Jensen 2001 Nelson y Sheridan 2006 Volkoff y col. 2005
Serotonina	Regulador del apetito. Estimulante de la motilidad intestinal. Vasoconstrictor.	Bermúdez y col. 2007 Khan y Deschaux 1997 Khan y Ghia 2010 O'Hara y col. 2004 Olsson y Holmgren 2001
Somatostatina	Inhibidor de la función de las células parietales. Inhibidor de la proliferación de linfocitos. Inhibidor de la síntesis de Ig.	Rudholm y col. 2009 Scalera y Tarozzi 1998 Sirinek y O'Dorisio 1991 Stanisz 1994
Sustancia P	Estimulante de la motilidad intestinal. Vasodilatador. Estimulante de la proliferación de linfocitos. Estimulante de la síntesis de inmunoglobulinas. Estimulante de la actividad de células NK y macrófagos, y quimiotaxis.	Balemba y col. 2001 Bermúdez y col. 2007 Germonpre y col. 1999 Holzer y Holzer-Petsche 1997 Robinson y col. 2003 Stoyanova y Gulubova 2002

Tabla 1.11: Principales neuropéptidos intestinales y sus funciones

Las parasitosis del tubo digestivo inducen cambios en la liberación de neuromoduladores y distribución de fibras nerviosas, que originan una respuesta con repercusión en la funcionalidad intestinal (cambios en la ingesta y apetito, motilidad, secreción y absorción de fluidos...) y de forma sistémica, al interactuar con el sistema inmunitario (Ameri y Ferone 2012, Bilbo y Klein 2012, Dezfuli y col. 2011, Di Comite y col. 2007, Snoek y col. 2010, Stanisiz 1994).

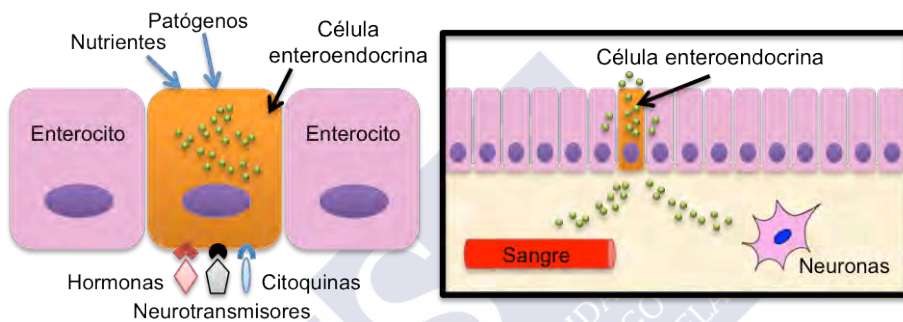


Figura 1.20: Esquema de una célula enteroendocrina. Varios factores luminales y somáticos activan la producción y liberación de péptidos u hormonas por las células enteroendocrinas.

Los cambios en el número y distribución de las células enteroendocrinas y fibras nerviosas del SNE, junto con variaciones en péptidos inmunomoduladores se han estudiado en múltiples especies de peces parasitados con helmintos (Bosi y col. 2005b, 2005c, Dezfuli y col. 2003, 2004, 2008, 2009, 2011). Con respecto a las enteromixosis, del amplio abanico de neuropéptidos conocidos, hasta el momento solo se ha estudiado un número limitado. En doradas infectadas, se ha demostrado un recuento inferior de células positivas para neuropéptido Y y sustancia P, mientras que en rodaballos parasitados se producen incrementos de colecistoquinina y serotonina, y descenso de péptido intestinal vasoactivo tanto en células endocrinas como en el SNE (Bermúdez y col. 2007, Estensoro y col. 2009).

2. OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se enmarca en una línea de investigación iniciada hace más de una década y particularmente en las actividades de dos proyectos financiados:

AGL2006-13158-C03-02 “Enteromixosis de rodaballo y espáridos. Mecanismos patogénicos, respuesta inmunitaria y exploración de dianas terapéuticas.” del Ministerio de Educación y Ciencia.

AGL2009-13282-C02-02 “Control de las enteromixosis del rodaballo y espáridos. Caracterización de la patogenia, la interacción parásito-hospedador y la respuesta inmunitaria.” del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Asimismo, la doctoranda realizó una estancia de tres meses en el *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare* de la Università degli Studi di Milano incluida en el Subprograma de Acciones Integradas del Programa Nacional de Internacionalización de la I+D del Ministerio de Ciencia e Innovación: IT2009-0036 “Enteromixosis de rodaballos y espáridos: estudio histopatológico y del sistema neuroendocrino. Acción Integrada con Italia.”

Las propuestas de todos estos proyectos de investigación surgieron debido a que las enteromixosis son enfermedades con gran impacto en la acuicultura marina, cuyas únicas medidas de control efectivas consisten en prevenir la entrada del patógeno a los tanques de cultivo. Una vez que la infección entra en las instalaciones, las consecuencias

son fatales, debido a la carencia de tratamientos eficaces. Por ello los trabajos en esta línea de investigación se centran fundamentalmente en un mejor conocimiento del parásito y de la respuesta del hospedador a la infección.

En la presente Tesis Doctoral se abordan en mayor profundidad aspectos relacionados con la interacción parásito-hospedador, atendiendo especialmente a mecanismos patogénicos y muerte celular, la respuesta inflamatoria y cambios en el sistema neuroendocrino entérico. Por ello, los principales objetivos son:

- Caracterización de los cambios histológicos y ultraestructurales que ocurren en el rodaballo durante la infección con *Enteromyxum scophthalmi* para obtener una descripción completa de la enfermedad desde el punto de vista morfológico.
- Detección de la enzima iNOS y cuantificación de células iNOS+ en los tejidos de rodaballos con enteromixosis, para evaluar su participación en la patogenia de la enfermedad mediante el estudio de su distribución y su correlación con las lesiones.
- Detección y cuantificación de las células apoptóticas en el tubo digestivo y tejidos linfohematopoyéticos de rodaballos con enteromixosis, para el esclarecimiento del papel de la muerte celular programada en la descamación epitelial y depleción leucocitaria.
- Caracterización de péptidos relacionados con el sistema neuroendocrino entérico, para determinar las variaciones durante la infección de rodaballos con *E. scophthalmi* y su implicación en los trastornos digestivos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales biológicos

Las muestras empleadas en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral provenían de rodaballos juveniles infectados con *Enteromyxum scophthalmi* en granjas con altas tasas de mortalidad situadas en Galicia, así como de varias infecciones experimentales por diferentes vías.

3.1.1. Muestras provenientes de infecciones naturales y experimentales

Para la descripción histopatológica de la enteromixosis del rodaballo y el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (art. I) se emplearon muestras de rodaballos procedentes de brotes epizooticos de la enfermedad, así como de infecciones experimentales por inoculación oral, transmisión por efluente y por cohabitación (Redondo y col. 2002, 2004, Bermúdez y col. 2006a, 2006b, Quiroga y col. 2006; Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

Los peces fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (MS-222, Sigma) o por inmersión en hielo y posterior sección de la médula espinal. Se realizó la necropsia y se tomaron segmentos de tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ciegos pilóricos, intestino anterior, medio y posterior), bazo, branquias, corazón, hígado, músculo, páncreas, piel y riñón que se fijaron en formol tamponado al 10%.



Además, se tomaron muestras de intestino, bazo y riñón en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,3.

Con una jeringa, se recogió el líquido presente en el interior del tubo digestivo de algunos rodaballos infectados. Tras confirmar la presencia de formas parasitarias con el microscopio óptico, se centrifugó el líquido a 365 x g y el pellet obtenido se fijó en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,3.

3.1.2. Experimento de transmisión por efluente

Los tejidos utilizados en los artículos II y IV provenían de un experimento de transmisión por efluente. La infección experimental se realizó mediante el traspaso del efluente de agua de tanques de rodaballos infectados (donantes) a los receptores para reproducir condiciones similares a la infección natural en la acuicultura.

Los rodaballos donantes (199 en total, peso medio de 700 g) se obtuvieron de una granja en el noroeste de España. Los lotes estaban sufriendo elevadas tasas de mortalidad causada por *E. scophthalmi*. La infección se confirmó mediante la observación de los signos clínicos de la enfermedad y por la presencia de esporas del parásito en raspados intestinales de algunos peces.

Los peces sanos procedían de la misma granja y se mantuvieron con un flujo de agua marina filtrada (malla de 1 μ m) y tratada con radiación ultravioleta. Se comprobó la ausencia de esporas de *E. scophthalmi* en heces y se utilizaron como receptores y peces controles.



Un grupo de 80 rodaballos con un peso medio de 120 g se colocó en un tanque que recibía el efluente de agua de otro tanque con donantes durante 10 días. Otro grupo de 80 peces sanos se colocó en un tanque sin contacto con el efluente infeccioso y sirvieron como controles.

A los 20, 40, 56 y 78 días post exposición (PE) se seleccionaron aleatoriamente y se muestrearon cinco rodaballos receptores y cinco controles. El día 107 PE sólo se tomaron 3 rodaballos de cada grupo (individuos que sobrevivieron durante la infección). En cada punto de muestreo los rodaballos se sumergieron en hielo, se sacrificaron seccionando la médula espinal y se realizó la necropsia (fig. 3.1). Se disecaron los órganos internos y se fijaron porciones de tracto gastrointestinal (esófago, estómago, ciegos pilóricos e intestino anterior, medio y posterior), bazo, hígado, riñón anterior y timo en líquido de Bouin.

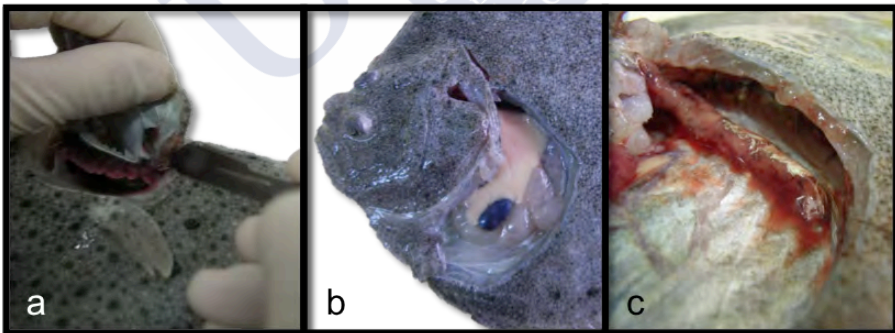


Figura 3.1: Necropsia del rodaballo. **a:** extracción del timo de la cara ocular, **b:** apertura de la cavidad celómica, **c:** extracción del riñón.

Para el estudio de la enzima iNOS (art. II) se emplearon todas las muestras de bazo, riñón, ciegos pilóricos y los tres tramos intestinales. Para el estudio del sistema enteroendocrino (art. IV), se utilizaron las



secciones de estómago, ciegos pilóricos y los tres tramos de intestino de los rodaballos receptores de 40 días PE.

3.1.3. Experimento de inoculación oral

Los animales utilizados en el artículo III procedían de un experimento de inoculación oral. La experiencia se desarrolló en los meses de febrero y marzo de 2007 en las instalaciones del Clúster de la Acuicultura de Galicia (CETGA) en Ribeira, A Coruña.

En total se emplearon 302 rodaballos de 162 g de peso medio, 158 controles y 144 receptores distribuidos en 24 tanques de 50 x 40 cm con una capacidad de unos 40 l. Se realizaron dos experimentos en paralelo, para el seguimiento y determinación de la infección (experimento 1) y para el registro de la mortalidad (experimento 2).

Los peces receptores se inocularon con una solución preparada a base de raspados de intestino de rodaballos donantes, infectados con *E. scophthalmi*. En los receptores se introdujo una jeringa acoplada a una cánula hasta el esófago-estómago a través de la cavidad oral, y se administró 1 ml del inóculo. De forma paralela, se les suministró 1 ml de solución salina a los rodaballos controles.

3.1.3.1. Experimento 1: Seguimiento de la infección

Para este experimento se distribuyeron 182 rodaballos en 14 tanques de acuerdo con el siguiente esquema:

- Rodaballos control: 98 peces en 7 tanques (14 en cada tanque).
- Rodaballos receptores: 84 peces en 7 tanques (12 en cada tanque).



Se realizó la toma de muestras de 14 controles a tiempo 0 y de 14 controles y 14 receptores a los 3, 7, 13, 24, 33 y 39 días post inoculación. En cada punto, se extrajeron aleatoriamente dos rodaballos de cada tanque para que la densidad de individuos fuese uniforme en todos los tanques a lo largo del experimento.

Los rodaballos se anestesiaron con 2-fenoxietanol y se sacrificaron mediante sección de la médula espinal. Se realizó la necropsia y se tomaron muestras del tubo digestivo (esófago, estómago, ciego pilórico, intestino anterior, medio y posterior) (fig. 3.2), bazo, hígado, riñón y timo. Los órganos de los 10 primeros rodaballos de cada grupo se fijaron en líquido de Bouin, y los otros 4 se fijaron en formol tamponado al 10%.

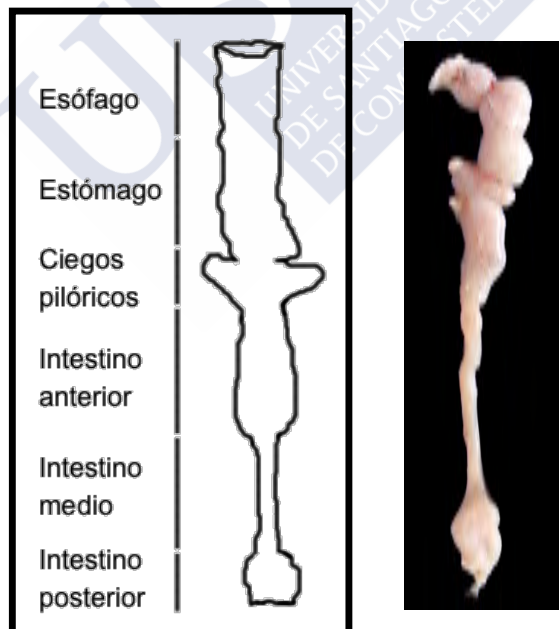


Figura 3.2: Esquema e imagen del tubo digestivo del rodaballo



3.1.3.2. Experimento 2: Determinación de la tasa de mortalidad

Un grupo de 60 rodaballos controles y otro de 60 receptores se distribuyeron en un total de 10 tanques, 5 por cada grupo, a razón de 12 peces por tanque. Durante los 40 días de duración del experimento se monitorizaron y se muestrearon los peces moribundos o recién muertos, de los que se recogió el tubo digestivo en formol tamponado al 10%. La mortalidad acumulada se calculó como el porcentaje de rodaballos muertos cada día sobre el total de rodaballos inoculados al inicio del experimento 2.





3.2. Técnicas histopatológicas

3.2.1. Fijación y procesado de las muestras

Se utilizaron dos fijadores (tabla 3.1):

- formol tamponado al 10%, fijación durante 24 h;
- líquido de Bouin, con tiempos de fijación entre 6 y 18 h a 4°C, y posteriormente cambio de las muestras a alcohol 70%.

Formol tamponado al 10%		Líquido de Bouin	
Formol 37-40%	100 ml	Solución saturada de ácido pícrico	750 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	4 g	Formol 37-40%	250 ml
Na ₂ HPO ₄	6,5 g	Ácido acético glacial	50 ml
Agua destilada	900 ml		

Tabla 3.1: Composición de los fijadores empleados

Tras el periodo de fijación, las muestras se procesaron y se elaboraron bloques de tejidos en parafina.

3.2.2. Microscopía óptica

Para el estudio al microscopio óptico de las muestras fijadas e incluidas en parafina se realizaron cortes de 3 µm de grosor y se secaron en estufa de 60°C un mínimo de 30 min. Posteriormente se desparafinaron con xileno e hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes (tabla 3.2).

Al finalizar la tinción, los tejidos se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes y se preservaron con un cubreobjetos y un



medio de montaje soluble en xileno, xileno plastificante diestireno (DPX) (tabla 3.2).

Proceso de desparafinado e hidratación	Proceso de deshidratación y montaje
1. Xileno 10 min	1. Etanol 96% 30 s
2. Xileno 10 min	2. Etanol 100% 30 s
3. Etanol 100% 5 min	3. Etanol 100% 30 s
4. Etanol 96% 5 min	4. Xileno 30 s
5. Etanol 70% 5 min	5. Xileno 30 s
6. Agua destilada 5 min	6. Montaje con DPX

Tabla 3.2: Tiempos de desparafinado e hidratación de los cortes histológicos y proceso de deshidratación y aclarado para montar con DPX

Las tinciones usadas fueron hematoxilina-eosina, azul de toluidina, ácido periódico de Schiff (PAS) y Giemsa (tabla 3.3).

<p>Hematoxilina-eosina</p> <p>Soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hematoxilina de Harris - Eosina amarillenta 1% <p>Protocolo</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar e hidratar. 2. Hematoxilina (2 min). 3. Lavar. 4. Eosina (30 s). 5. Lavar, deshidratar, aclarar y montar con DPX. 	<p>Azul de toluidina</p> <p>Solución de azul de toluidina</p> <ul style="list-style-type: none"> - Azul de toluidina 0,5 g - Tetraborato de sodio 0,5 g - Agua destilada 100 ml <p>Protocolo</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar e hidratar. 2. Solución de azul de toluidina (5-30 s). 3. Lavar, deshidratar, aclarar y montar con DPX.
<p>Tinción PAS</p> <p>Soluciones</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido periódico 1% - Reactivo de Schiff - Hematoxilina de Harris <p>Protocolo</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar e hidratar. 2. Ácido periódico 1% (15 min). 3. Lavar en agua destilada. 4. Reactivo de Schiff (30 min). 5. Lavar en agua destilada. 6. Hematoxilina (1 min). 7. Lavar, deshidratar, aclarar y montar con DPX. 	<p>Tinción Giemsa</p> <p>Solución de trabajo Giemsa</p> <ul style="list-style-type: none"> - Azur-Eosina-Azul de metileno solución según Giemsa (lento) 20 ml - Agua destilada 80 ml <p>Protocolo</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar e hidratar. 2. Solución de trabajo Giemsa (1 h). 3. Lavar en agua con 3 ó 4 gotas de ácido acético glacial. 4. Sumergir en alcohol 96% hasta lograr el color deseado. 5. Deshidratar en etanol 100%, aclarar y montar con DPX.

Tabla 3.3: Tinciones empleadas para microscopía óptica



3.2.3. Técnicas de detección de fragmentos de ADN

Para la detección *in situ* de la fragmentación del ADN, evento clave de la apoptosis, se puede aplicar la técnica TUNEL o de marcaje de fragmentos terminales con desoxiuridina trifosfato, dUTP, mediado por transferasa desoxinucleotidil terminal, TdT (fig. 3.3).

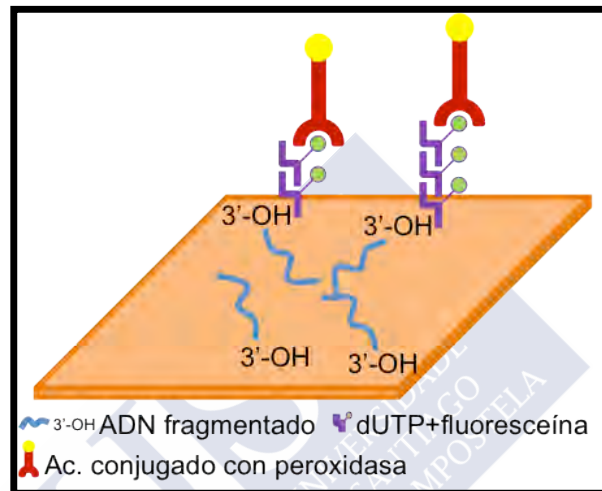


Figura 3.3: Esquema de la técnica TUNEL

La enzima TdT cataliza la adición repetitiva de desoxinucleótidos a los extremos 3'-OH libres de las cadenas de ADN. En la técnica TUNEL se añaden dUTPs con un conjugado de fluoresceína, detectable bajo el microscopio de fluorescencia o mediante el empleo de un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa. En este último caso el marcaje se evidencia con el empleo de un sustrato cromógeno para la peroxidasa, como la 3,3'-diaminobencidina (DAB).

La técnica TUNEL (tabla 3.4) se aplicó en el artículo III. Para la realización de esta técnica especial, los portaobjetos se trataron con silane, 3-(trietoxisilil)-propilamina.



Protocolo de tinción con la técnica TUNEL

1. Secar previamente a 37°C (1 h).
2. Desparafinar e hidratar.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena (Peroxidase-Blocking Solution, Dako, Denmark) (30 min).
4. Lavar con PBS* (3 x 5 min).
5. Tratamiento térmico en olla a presión con tampón citrato (citrato de sodio 10 mM, pH 6) (15 min).
6. Lavar con PBS (3 x 5 min).
7. Bloqueo de inespecificidad con seroalbúmina bovina 3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (20 min).
8. Lavar con PBS (3 x 5 min).
9. Incubación con la mezcla TUNEL (1 h).
10. Lavar con PBS (3 x 5 min).
11. Incubación con el conjugado con peroxidasa (30 min).
12. Lavar con PBS (3 x 5 min).
13. Revelado con DAB (Dako, Denmark).
14. Lavar con agua destilada.
15. Contraste con hematoxilina (1 min).
16. Lavar, deshidratar, aclarar y montar con DPX.

*PBS: Tampón fosfato salino (Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, NaCl 155 mM, Tween-20 0,05% [v/v], pH 7,4).

Tabla 3.4: Protocolo utilizado para la técnica TUNEL

3.2.4. Inmunohistoquímica

Esta técnica permite la detección de antígenos determinados en secciones de tejido fijadas y embebidas en parafina. Para ello, se emplean anticuerpos específicos mono- o policlonales (obtenidos comúnmente de ratón y conejo, respectivamente) y una enzima, normalmente peroxidasa de rábano (HRP), que cataliza una reacción en la que se obtiene color, empleando usualmente DAB como cromógeno.

Existen varios métodos de inmunotinción y los más utilizados son los indirectos. El método indirecto se basa en el uso un antisuero primario sin conjugar que reconoce el antígeno problema. Posteriormente, se



utilizan conjugados que se unen específicamente al primario o bien añadiendo más pasos intermedios.

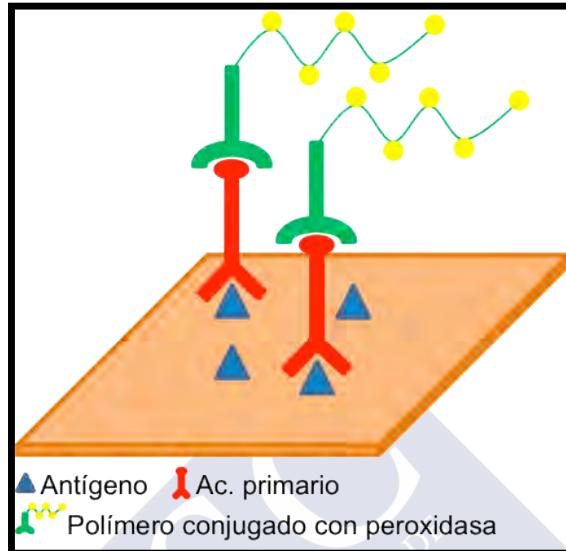


Figura 3.4: Esquema de la técnica inmunohistoquímica utilizando el sistema EnVision™

El método empleado en los artículos II, III y IV fue el sistema EnVision™ (fig. 3.4). En primer lugar se incubó el anticuerpo primario y después se empleó un polímero que lleva varias unidades de anticuerpo secundario (conejo, ratón o ambos) y moléculas de HRP. Las ventajas de este sistema son un protocolo que consta únicamente de dos pasos y las diluciones de los antisueros primarios pueden ser más altas.

El protocolo genérico está detallado en la tabla 3.5 y el listado de los anticuerpos primarios con sus diluciones y tiempos de incubación aparecen en la tabla 3.6. Los cortes histológicos se recogieron en portaobjetos tratados con silane.



Protocolo general de tinción inmunohistoquímica

1. Secar previamente a 37°C (mínimo 1 h).
2. Desparafinar e hidratar.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena (Peroxidase-Blocking Solution, Dako) (30 min).
4. Lavar con PBS (3 x 5 min).
5. Recuperación antigénica (RA, opcional, dependiendo del Ac. primario).
6. Lavar con PBS (3 x 5 min).
7. Incubación con el anticuerpo primario.
8. Lavar con PBS (3 x 5 min).
9. Incubación con EnVision (30 min).
10. Lavar con PBS (3 x 5 min).
11. Revelado con DAB (Dako).
12. Lavar con agua destilada.
13. Contraste con hematoxilina (1 min).
14. Lavar, deshidratar, aclarar y montar con DPX.

Tabla 3.5: Protocolo genérico de inmunohistoquímica

Anticuerpo anti-	Fuente	Dilución	Incubación
Bombesina	Peninsula Lab IHC 7113	1:1000	12 h 4°C
Caspasa-3 activa	Promega G7481	1:500	2 h TA
<i>Enteromyxum scopthalmi</i>	A. Sitja	1:40000	2 h TA
Glucagón	J.M. Pollack	1:2000	48 h 4°C
iNOS	Neomarkers RB-1605	1:1000	2 h TA
Leu-encefalina	Genosys Biotechnol. CA-08-235	1:1000	DN 4°C
Leu-encefalina	Peninsula Lab. RAS 8601N	1:2500	DN 4°C
Met-encefalina	Gene-Tex GTX42620	1:400	DN 4°C
Met-encefalina	Bachem AG T-4294	1:1000	DN 4°C
Somatostatina	Genosys Biotechnol. CA-08325	1:800	DN 4°C
Somatostatina	Chemicon Int. AB1976	1:1000	DN 4°C

Tabla 3.6: Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica en los artículos II, III y IV. Todos los anticuerpos eran policlonales obtenidos en conejo. TA: temperatura ambiente, DN: durante la noche.

3.2.4.1. Protocolo de tinción inmunohistoquímica doble

Existe la posibilidad de realizar múltiples inmunotinciones en un mismo corte histológico mediante el uso de una solución que inactiva o elimina los antisueros utilizados tras completar una primera reacción.



Como resultado, el cromógeno se deposita en el tejido y se evitan reacciones cruzadas. En cada inmunohistoquímica se debe emplear un cromógeno diferente.

Para la doble detección de caspasa-3 activa (c-3a) y *E. scophthalmi* (art. III) se completó, en primer lugar, el procedimiento para inmunomarcarse c-3a. Tras el revelado con DAB, las muestras se sumergieron en tampón glicina-HCl (glicina 100 mM, pH 2,2) durante 5 min, se realizaron lavados con PBS y se procedió a realizar la inmunohistoquímica para teñir *E. scophthalmi* (fig. 3.5). Para revelar se utilizó un cromógeno púrpura, Vector VIP (VectorLabs, UK).

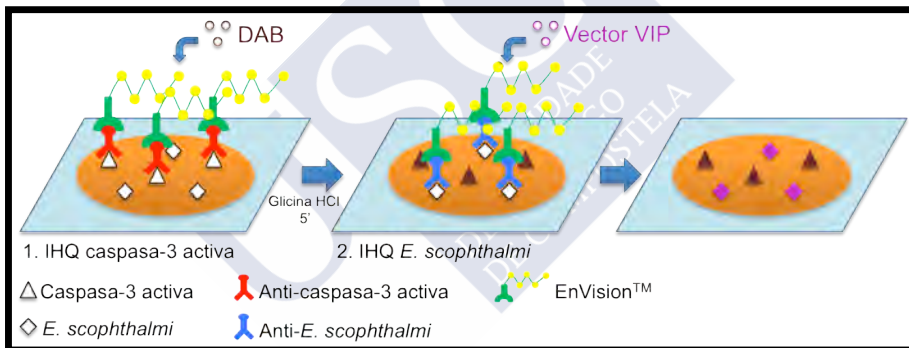


Figura 3.5: Esquema de la inmunotinción doble



3.3. Histometría

3.3.1. Recuento de células inmunomarcadas. Obtención de imágenes digitalizadas

El recuento de células inmunomarcadas se hizo de forma manual o automatizada. El recuento manual se empleó en el caso de las células positivas para c-3a en el epitelio de revestimiento y lámina propia-submucosa del tubo digestivo (art. III). Se eligió esta metodología debido al bajo número de células positivas, la variabilidad en las áreas de epitelio capturadas en imágenes digitalizadas, y la distinción de posibles estadios primarios de *E. scophthalmi* sufriendo apoptosis. La totalidad del epitelio de revestimiento de los cortes histológicos de esófago, estómago, ciegos pilóricos e intestino (anterior, medio y posterior) se examinó con el objetivo de 40x para obtener el número de células positivas en cada sección. Del mismo modo, se hizo el recuento en la lámina-propia submucosa. Se asignaron valores de 1+ a 4+ según el número de células positivas para c-3a (tabla 3.7).

Valor	Recuento en la sección
1+	< 25
2+	25 – 60
3+	60 – 100
4+	> 100

Tabla 3.7: Valores del recuento de células positivas para caspasa-3 activa en las secciones de tubo digestivo

Los recuentos automatizados de células inmunoteñidas con iNOS (iNOS+) en bazo, riñón y tubo digestivo (art. II) y células positivas con c-3a (c-3a+) en bazo y riñón (art. III) consistieron en la toma de



microfotografías y posterior procesamiento informático. Las imágenes se obtuvieron con un fotomicroscopio Olympus BX51 conectado a un ordenador a través de la cámara Olympus DP72. La adquisición de los campos se realizó con el software Olympus Cell^A (Olympus, Japón), que permitió la visualización del tejido en el monitor (fig. 3.6). Los parámetros de captura de imágenes se fijaron en modo manual y a los mismos niveles para lograr unos ajustes uniformes. Se tomaron aleatoriamente 5 fotos de cada órgano a estudiar utilizando el objetivo 20x. Los campos capturados de tubo digestivo se escogieron de forma que fueran similares en todos los casos.

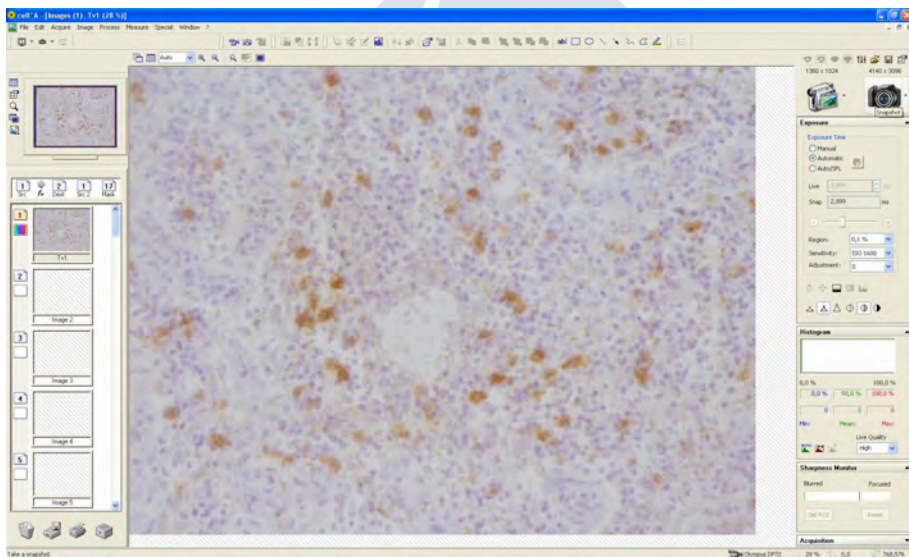


Figura 3.6: Captura del software Olympus Cell^A para obtener imágenes digitales de cortes histológicos

Se contabilizaron todas las células inmunoteñidas en el área total fotografiada ($0,72 \text{ mm}^2$). Los registros fueron manuales cuando el número por imagen era inferior a 10.



El recuento en cada imagen se realizó con el software Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). El programa permitió identificar los elementos con color e intensidad similares (fig. 3.7), de tal forma que se seleccionaron todas las células inmunomarcadas (color marrón). Se creó una nueva máscara con los elementos escogidos. Estos aparecían en blanco y el resto de la imagen en negro. Se introdujo un rango de tamaño de las células y se contaron las áreas blancas que cumplían esa condición. Así se obtuvo el número de células positivas por imagen.

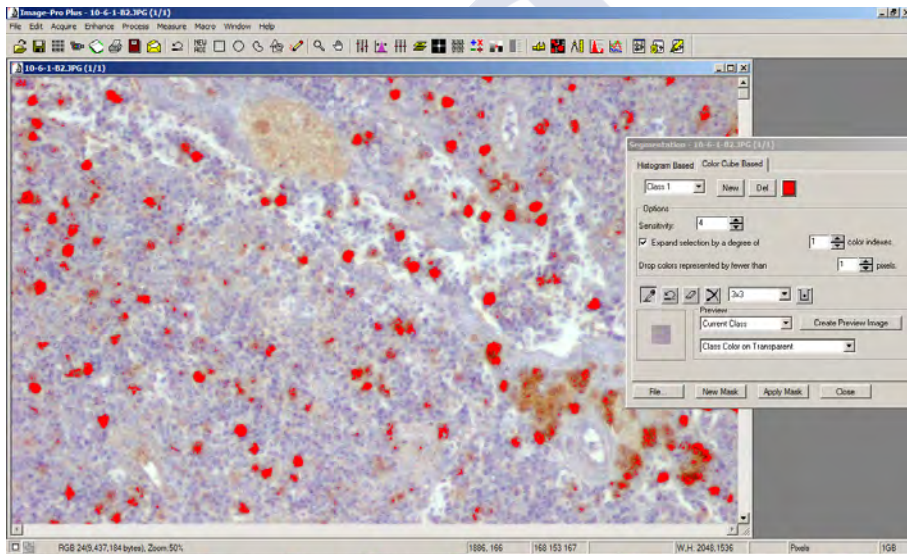


Figura 3.7: Captura del software Image-Pro Plus 4 para el recuento de células inmunoteñidas

3.3.2. Estudio estadístico

Los datos del número de células iNOS+ (art. II) y c-3a+ (art. III) en cada órgano se estudiaron por separado y se agruparon según el estudio histológico de los rodaballos: sin lesiones, leve, moderado y severo.



El grupo leve presentó baja intensidad de parasitación, ausencia de descamación del epitelio de revestimiento intestinal y ausencia o inflamación leve. En el grupo moderado la carga parasitaria fue superior (de un 30 a un 80% de pliegues intestinales afectados), la descamación epitelial fue de leve a moderada y la respuesta inflamatoria en la lámina propia-submucosa fue moderada. El grupo severo se caracterizó por evidentes lesiones macroscópicas (principalmente caquexia, ascitis y hemorragias intestinales), abundantes estadios de desarrollo de *E. scophthalmi* en el epitelio de revestimiento y glándulas gástricas, con escasa presencia de esporas, descamación epitelial severa y gran cantidad de infiltrados inflamatorios.

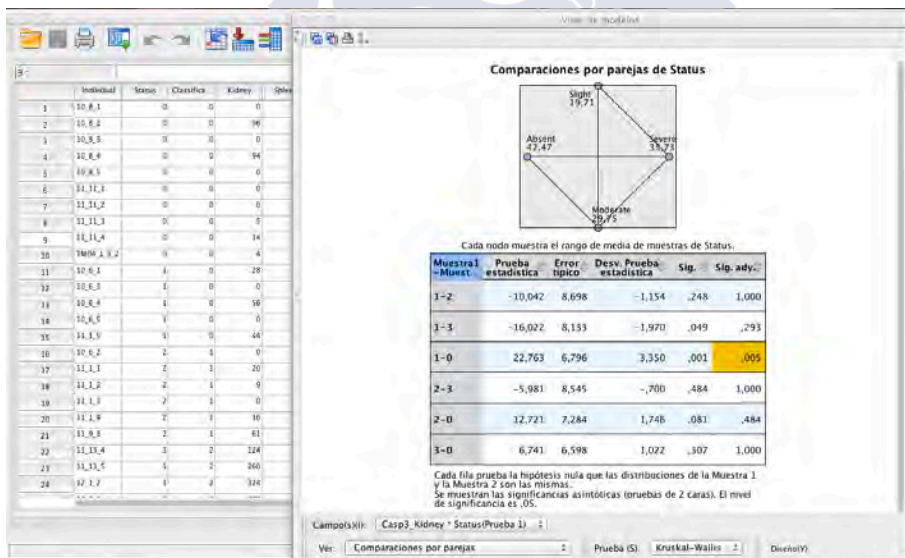


Figura 3.8: Captura de pantalla con el software PASW Statistics 18

El estudio estadístico (fig. 3.8) se realizó con el software PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). El análisis de la varianza por rangos de una vía de Kruskal Wallis seguido de comparaciones



pareadas se utilizó para buscar diferencias entre los grupos. El nivel de significación se estableció en 0,05.

Por otra parte, los registros de las células inmunorreactivas para los neuropéptidos (art. IV) se agruparon y compararon en rodaballos controles e infectados. El software usado (fig. 3.9) para el estudio estadístico fue GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Las medias del número de células positivas a los anticuerpos se compararon mediante la prueba t de Student y el nivel mínimo de significación se estableció en 0,05.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Table format:	RTD1	CTR1	RTD2	CTR2	RTD3	CTR3	RTD4	CTR4	RTD5	CTR5	
Column	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
1	Title	516	278	421	169	215	149	0	346	449	307
2	Title	105	234	312	269	189	310	39	151	135	446
3	Title	103	161	371	152	657	206	38	248	145	326
4	Title	402	262	231	361	312	411	2	86		
5	Title	326	596	215	347	644	394		244		
6	Title										
7	Title										
8	Title										
9	Title										
10	Title										
11	Title										
12	Title										
13	Title										
14	Title										
15	Title										
16	Title										
17	Title										
18	Title										
19	Title										
20	Title										
21	Title										
22	Title										
23	Title										
24	Title										
25	Title										

Figura 3.9: Captura de pantalla del software GraphPad Prism 4.0



3.4. Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio ultraestructural del intestino con el microscopio electrónico de transmisión (art. I) se recogieron las muestras en glutaraldehído y se fijaron con tetróxido de osmio. La solución para diluir los fijadores y realizar los lavados fue el tampón cacodilato. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en etanoles de concentración creciente (incluyendo un paso de contraste con acetato de uranilo en etanol) con un último baño de óxido de propileno y finalmente se incluyeron en resina epoxi o Spurr (tabla 3.8).

<p>Tampón cacodilato 0,1 M</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cacodilato sódico 2,14 g - Agua destilada 100 ml <p>Ajustar pH a 7,3 con HCl</p>	<p>Tampón cacodilato 0,2 M</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cacodilato sódico 4,28 g - Agua destilada 100 ml <p>Ajustar pH a 7,3 con HCl</p>
<p>Glutaraldehído 2,5 % en tampón cacodilato 0,1 M</p> <ul style="list-style-type: none"> - Glutaraldehído 25% 1 ml - Tampón cacodilato 0,1 M pH 7,3 9 ml 	<p>Tetróxido de osmio 1 % en tampón cacodilato 0,1 M</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tetróxido de osmio 2% (acuoso) 1 parte - Tampón cacodilato 0,2 M pH 7,3 1 parte
<p>Protocolo de fijación en glutaraldehído e inclusión en resina epoxi o Spurr</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Glutaraldehído al 2,5% durante 4 h (a 4°C). 2. Tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,3) 3 x 1 h. 3. Post-fijación en tetróxido de osmio al 1% 1 h (a 22°C). 4. Tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,3) 3 x 30 min. 5. Etanol 50% 2 x 20 min. 6. Etanol 70% 2 x 20 min. 7. Acetato de uranilo al 0,5 % en etanol 70% 1-3 h. 8. Etanol 50% 2 x 20 min. 9. Etanol 50% 3 x 30 min. 10. Óxido de propileno 2 x 20 min*. 11. Óxido de propileno/resina epoxi 1 h*. 12. Resina epoxi 12-14 h. 13. Confección de bloques. 14. Polimerización en estufa de 60°C 12-14 h. <p>*Para la inclusión en resina Spurr se suprime el óxido de propileno.</p>	

Tabla 3.8: Fijación e inclusión de las muestras para microscopía electrónica de transmisión



3.4.1. Cortes y tinciones

Se realizaron cortes semifinos para observar de forma preliminar con el microscopio óptico. Los cortes de 500 nm de grosor se recogieron en portas y se tiñeron con una solución de azul de toluidina (tabla 3.3). Para la observación al microscopio electrónico de transmisión, las secciones de 80 nm se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (tabla 3.9). Se empleó el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011.

Acetato de uranilo al 5%	Citrato de plomo
- Acetato de uranilo dihidrato 5 g	- Nitrato de plomo 1,33 g
- Agua destilada 100 ml	- Citrato de sodio 1,76 g
	- Hidróxido de sodio 1 N 8 ml
	- Agua destilada 30 ml
	Completar volumen hasta 50 ml con agua destilada

Doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo
1. Acetato de uranilo 30 min TA.
2. Lavar con agua destilada.
3. Citrato de plomo 20 min TA en ambiente sin CO ₂ .
4. Lavar con agua destilada.

Tabla 3.9: Contraste de rejillas con acetato de uranilo y citrato de plomo. TA: temperatura ambiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente memoria de Tesis Doctoral hemos profundizado en el conocimiento de la enteromixosis del rodaballo (*Psetta maxima*), realizando la descripción histopatológica y ultraestructural de los cambios asociados a la enfermedad, aportando nuevos datos sobre los mecanismos patogénicos y la participación de la respuesta inmunitaria innata y el sistema neuroendocrino en el desarrollo de la enfermedad.

En el artículo I se detalla el conjunto de alteraciones tisulares observadas en los rodaballos infectados con *Enteromyxum scophthalmi*. Este estudio permitió establecer una clasificación de los individuos infectados atendiendo a la severidad de las lesiones y a la intensidad de la parasitación. De esta forma, los cuadros lesionales se clasificaron en leves, moderados y severos.

En relación a estas categorías anteriormente mencionadas, se realizó el estudio de la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) durante la respuesta inflamatoria (art. II) y de la caspasa-3 activa (c-3a) para el estudio de la muerte celular programada en el tracto gastrointestinal y órganos linfohematopoyéticos (art. III). Además, con el propósito de determinar los cambios en la presencia de los neuropéptidos intestinales, se seleccionaron rodaballos en los cuales las lesiones intestinales eran evidentes con abundantes formas parasitarias y reacción inflamatoria, pero con persistencia del epitelio de revestimiento (art. IV).

De forma general, los cambios histológicos y la intensidad de las lesiones variaron en los rodaballos infectados conforme a la progresión

de la enfermedad. En las primeras fases de la infección, el hallazgo más importante fue la presencia de estadios iniciales de desarrollo de *E. scophthalmi*, principalmente en la zona basal del epitelio digestivo, sin otras alteraciones histológicas destacables. La infección se detectó principalmente en el epitelio de revestimiento de los ciegos pilóricos y/o el tramo anterior del intestino. A partir de este punto, el parásito se extendía colonizando el epitelio de revestimiento intestinal de los tramos medio y posterior, estómago, glándulas gástricas e incluso el epitelio esofágico. Esta distribución fue similar a la descrita en otras infecciones tanto naturales como experimentales (Bermúdez y col. 2006a, 2006b, Branson y col. 1999, Palenzuela y col. 2002, Quiroga y col. 2006, Redondo y col. 2002, 2003b, 2004, Sitjà-Bobadilla y col. 2006).

Las fases iniciales o **infecciones leves** se caracterizan por la práctica ausencia de lesiones histológicas, por lo que la identificación de los estadios 1 del mixosporidio en secciones histológicas resulta esencial para el diagnóstico precoz de la enfermedad. En estos casos, Redondo y col. (2002, 2004) describieron los estadios iniciales de desarrollo de *E. scophthalmi* en la parte basal del epitelio y, ocasionalmente en otras localizaciones. En nuestro estudio observamos formas basófilas redondeadas con un halo blanquecino, localizadas en el epitelio de revestimiento digestivo. Por su morfología, estas estructuras podrían ser compatibles con estadios 1 del parásito y/o células en apoptosis, por ello su diferenciación es fundamental para el diagnóstico temprano de la enteromixosis en secciones histológicas. La técnica inmunohistoquímica doble empleando anticuerpos específicos frente *E. scophthalmi* y c-3a (art. III) resultó ser una herramienta útil para

esta caracterización. Esta técnica se puede aplicar en casos dudosos de muestras de tejidos en bloques de parafina, cuando no se detectan trofozoítos con la morfología típica de “célula dentro de célula”, o el rodaballo todavía no ha desarrollado los cambios histológicos asociados a la parasitación. Adicionalmente, la técnica inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-*E. scophthalmi* mostró intensa positividad en fases más avanzadas de desarrollo del parásito, con marcaje más acentuado en las células P. Estos hallazgos coinciden con el inmunomarcaje recientemente descrito por Estensoro y col. (2013).

En el inicio de la infección por *E. scophthalmi* no existieron cambios histológicos aparentes en el epitelio de revestimiento digestivo, aunque en ocasiones, se detectaron lesiones degenerativas a nivel ultraestructural en células que entraban en contacto con las formas parasitarias (art. I). Los enterocitos exhibían un citoplasma más electrolúcido, pérdida de las organelas citoplasmáticas y cambios en el patrón de distribución de la cromatina. Los plasmodios parasitarios formaban uniones especializadas con la membrana del hospedador mediante numerosas interdigitaciones citoplasmáticas, coincidiendo con la descripción realizada en estudios previos de enteromixosis en rodaballo, dorada y sargo picudo (Cuadrado y col. 2008, Redondo y col. 2003b). Estas uniones probablemente están asociadas a funciones de comunicación con las células del hospedador y nutrición de los plasmodios. Las interdigitaciones citoplasmáticas podrían ser el resultado de la deformación celular por cambios ocasionados en el citoesqueleto del enterocito. Esto representaría una estrategia del parásito para incrementar el área de contacto con las células del

hospedador y disponer de una mayor superficie de intercambio para la obtención de nutrientes, favoreciendo de esta manera su rápido desarrollo en el epitelio. Sin embargo, no se conocen los mecanismos que producen o desencadenan los cambios en el citoesqueleto de los enterocitos, por lo que se deberían orientar futuros estudios hacia la caracterización del citoesqueleto de las células epiteliales del rodaballo y sus alteraciones en respuesta a la parasitación.

Otro hallazgo en la fase temprana de la enfermedad, fue el incremento en el número de células goblet y rodlet, lo que hacía que fueran fácilmente detectables en el estudio ultraestructural del epitelio digestivo (art. I). A veces aparecían liberando su contenido hacia la luz intestinal. Este aumento en las células goblet y rodlet, descrito de manera preliminar por nuestro grupo de investigación (Vigliano y col. 2004), indicaría la participación de estos tipos celulares en la respuesta inmunitaria frente a *E. scophthalmi*, como también se ha observado en otras enfermedades digestivas de peces (Dezfuli y col. 2008, 2011, Reite 2005, Reite y Evensen 2006, Ronza y col. 2011, Sitjà-Bobadilla 2008b).

El incremento de las células goblet durante infecciones del epitelio gastrointestinal se ha relacionado con una estrategia para expulsar a las formas parasitarias mediante hipersecreción de moco. Este tipo de respuesta en infestaciones por helmintos (Bosi y col. 2005a, Dezfuli y col. 2009) o colonizaciones bacterianas (Ronza y col. 2011) podría ser útil para eliminar los patógenos extracelulares, aunque en el caso de *E. scophthalmi*, debido a su posición intercelular y su estrecha relación

con los enterocitos circundantes (Redondo y col. 2003b), este mecanismo no presentaría la misma eficacia.

Las células rodlet son un tipo celular presente en peces que posee características estructurales y funcionales comunes a células epiteliales secretoras y a leucocitos (Manera y Dezfuli 2004, Mazon y col. 2007). Se ha sugerido que tienen un papel activo en la defensa, por su localización en branquias, riñón e intestino, y por liberar su contenido a la sangre en riñón, y a las superficies que recubren el tubo digestivo y branquias (Mazon y col. 2007). Dezfuli y col. (2000, 2007, 2009) han destacado su relevancia durante las respuestas inflamatorias y han asociado su reclutamiento a las señales químicas liberadas por leucocitos. Algunos autores incluso han sugerido que las células rodlet representan un tipo de granulocito eosinófilo (Reite 2005) o que poseen características muy similares a macrófagos y granulocitos (Mazon y col. 2007). El hallazgo del incremento de células rodlet en rodaballos infectados indica su papel en la respuesta frente al patógeno en etapas iniciales de la infección. En general este incremento no se asociaba a una respuesta inflamatoria evidente.

En las infecciones leves, los infiltrados inflamatorios estaban ausentes o eran escasos, mayoritariamente de tipo mononuclear, localizándose en la lámina propia-submucosa del intestino o en la parte basal del epitelio de revestimiento digestivo (art. I). La aparición de células inflamatorias en estadios iniciales de la infección se ha descrito en sargo picudo infectado por *Enteromyxum leei*, especie en la que ocurre un reclutamiento de linfocitos en la mucosa intestinal (Álvarez-Pellitero y col. 2008).

Entre los mecanismos implicados en las primeras fases de la inflamación, se encuentra la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estas últimas son originadas en gran medida por iNOS, presente principalmente en macrófagos y granulocitos. En nuestro trabajo, hemos puesto a punto una técnica inmunohistoquímica para la detección de iNOS en los tejidos de rodaballo, con el propósito de establecer los cambios sufridos en la expresión de esta enzima en las células del sistema inmune y de la mucosa gastrointestinal durante la enteromixosis (art. II). Mediante esta técnica, se observó inmunotinción de algunas células mononucleares presentes en el infiltrado inflamatorio de la submucosa intestinal, compatibles con macrófagos, que participan en la respuesta inmune innata a este nivel.

Rumbo y col. (2005) observaron la presencia de iNOS en la mucosa gastrointestinal de humano y ratón, principalmente en el polo apical de los enterocitos. Asimismo se ha comprobado que su expresión se incrementa de forma significativa en branquias de teleósteos, intestino de mamíferos y macrófagos de varias especies durante las infecciones bacterianas y protozoarias, constituyendo una herramienta importante en la lucha contra patógenos (Campos-Pérez y col. 2000, Gookin y col. 2004, Kukuruzovic y col. 2002, Leitch y He 1999, Oladiran y Belosevic 2009). En el rodaballo se observó, en el tracto gastrointestinal, inmunotinción intensa del borde en cepillo (art. II). Adicionalmente, asociada a la presencia de *E. scopthalmi*, se obtuvo marcaje ligero a moderado en el polo apical de los enterocitos y en leucocitos intraepiteliales. Este patrón fue apreciable sobre todo en los tramos medio y posterior del intestino.

En otros órganos, los cambios histológicos no fueron evidentes, aunque en el bazo, mediante inmunotinción de iNOS (art. II) se observó un marcaje punteado en los elipsoides esplénicos, leve marcaje en otras estructuras vasculares y centros de melanomacrófagos (CMMs) y un número variable de células positivas para iNOS (iNOS+), principalmente macrófagos y en menor medida granulocitos, dispersas en el parénquima. La observación de iNOS en vasos sanguíneos se ha descrito en humanos y modelos animales (Gericke y col. 2013, Shah y col. 2013), y la producción de NO está relacionada con la relajación de la musculatura lisa de los vasos (Durand y Gutterman 2013), que ocasiona vasodilatación y congestión en las fases iniciales de la inflamación. En rodaballos infectados, la presencia y distribución de iNOS en el bazo ya en etapas tempranas de la infección indicaría la activación de la respuesta inmunitaria innata y la participación de este órgano linfóide secundario en la enfermedad.

Los principales hallazgos en las **infecciones moderadas** (art. I) consistieron en la presencia de mayor carga parasitaria de *E. scophthalmi* en el epitelio digestivo, con estadios de desarrollo más avanzados y mayor extensión de mucosa afectada en todos los tramos del tracto gastrointestinal. El número más elevado de parásitos se detectó en los ciegos pilóricos y el intestino anterior. Los estadios proliferativos eran principalmente estadios 2 y 3, en tanto que las fases esporogónicas y esporas fueron muy escasas, hallazgo similar a lo observado en otras infecciones tanto naturales como experimentales (Redondo y col. 2002, 2004).

Una característica significativa en esta fase de infección era el ondulamiento o festoneado del epitelio de revestimiento en el margen apical y la vacuolización en la zona basal (art. I). La presencia de plasmodios parasitarios modifica la morfología de los enterocitos, lo que altera la regularidad del epitelio y origina los cambios en la zona basal que pueden desencadenar la descamación. Otros autores han descrito cambios similares en otras enteromixosis (Fleurance y col. 2008, Tun y col. 2002), como por ejemplo en doradas infectadas por *E. leei* donde se describe la pseudoestratificación del epitelio intestinal por la presencia de formas parasitarias.

Ultraestructuralmente, los enterocitos cercanos a los trofozoítos presentaban cambios más evidentes consistentes en tumefacción y pérdida de las crestas mitocondriales, pérdida de las microvellosidades, condensación de la cromatina y descenso de la electrodensidad del citosol (art. I). Todos estos cambios degenerativos están asociados a fases tempranas de muerte celular.

En estas etapas, el epitelio mostraba vacuolización en la zona basal y mayor inmunotinción de iNOS (art. II), sobre todo en el polo luminal. La extensión del inmunomarcaje de iNOS en el epitelio de revestimiento en respuesta a la infección por *E. scophthalmi* se asemeja a lo descrito en otros procesos infecciosos-inflamatorios en tubo digestivo (Gookin y col. 2005, Keklikoglu y col. 2008, Mokrzycka y col. 2010). Los niveles tisulares de iNOS se incrementan en respuesta a los patógenos como mecanismo de defensa innato, pero puede ocurrir una sobreproducción de esta enzima con efectos perjudiciales para los tejidos del hospedador (Chokshi et al. 2008,

Keklikoglu y col. 2008, Pacher et al. 2007). Entre los efectos del NO se encuentra la capacidad antiadhesiva que puede desencadenar apoptosis (Monteiro y col. 2004), producida por el desprendimiento de las células de la membrana basal subyacente. Este tipo de muerte celular en epitelios de revestimiento se denomina anoikis (Chiarugi y Giannoni 2008). En el caso del rodaballo, el incremento progresivo de iNOS en los tejidos de los peces infectados podría contribuir al daño tisular, reflejado en la vacuolización de la base del epitelio, apoptosis de los enterocitos y descamación del revestimiento epitelial. De tal modo, en comparación con rodaballos controles y con infecciones leves, existía un mayor número de células epiteliales con morfología compatible con apoptosis. El inmunomarcaje de c-3a en el epitelio de revestimiento intestinal (art. III) mostró un incremento en el número de células positivas por sección de tubo digestivo en todos los tramos estudiados, más evidente en las porciones anterior y media del intestino. La presencia de patógenos en el epitelio puede inducir la apoptosis en los enterocitos, acelerando la velocidad de renovación epitelial, pero desestabilizando la función de barrera del epitelio (Cliffe y col. 2005, Panaro y col. 2007). Aunque la mayor renovación epitelial se ha descrito como un posible mecanismo para eliminar los parásitos del epitelio (Cliffe y col. 2005), la pérdida de la función de barrera epitelial contribuiría al síndrome de malabsorción y favorecería infecciones secundarias, como se ha observado en algunos rodaballos. Un aspecto similar entre las enteromixosis del rodaballo y de la dorada es el incremento de la apoptosis en el tubo digestivo. En doradas infectadas se ha detectado una mayor expresión de genes con funciones proapoptóticas, junto con un descenso en otros con

funciones antiapoptóticas. Otros genes proapoptóticos estaban también disminuidos, indicando los complejos ajustes de las señales apoptóticas (Davey y col. 2011). La muerte celular programada podría facilitar la infección y dispersión de los parásitos en el epitelio digestivo (Becker y col. 2010, Liu y col. 2009, Ralston y Petri 2011, Redondo y col. 2003b), como se ha observado tanto en rodaballo como dorada.

En comparación con la enteromixosis producida por *E. leei* en dorada, existen varias diferencias que podrían ser determinantes en la progresión de la enfermedad, ya que en dorada se convierte en un proceso crónico con tasas de mortalidad muy inferiores a las observadas en rodaballos infectados con *E. scophthalmi*. En doradas, *E. leei* infecta el epitelio de revestimiento digestivo, llegando a cargas parasitarias muy elevadas, pero que no desencadenan la descamación de los enterocitos (Fleurance y col. 2008). A diferencia de la respuesta inmunitaria desarrollada en rodaballo desde las primeras fases de la infección (Sitjà-Bobadilla y col. 2006), coincidente con el incremento de iNOS en intestino y bazo, en la dorada ocurre una depleción de factores inmunes, como las peroxidasas séricas totales, lisozima u óxido nítrico, y una infraexpresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria (Davey y col. 2011, Estensoro y col 2011a, Sitjà-Bobadilla y col. 2008). Esto, sumado a la sobre-expresión de genes relacionados con los mecanismos antioxidantes (Davey y col. 2011), podría evitar el daño epitelial asociado a los productos de la respuesta inmunitaria y cuyo efecto contribuiría la estabilidad del revestimiento epitelial. A pesar de este efecto beneficioso que los mecanismos antioxidantes realizan sobre el epitelio intestinal en la dorada, la

consecuencia de la evasión de la respuesta inmunitaria de *E. leei* sería la persistencia de los estadios de desarrollo entre los enterocitos y la cronificación de la enfermedad. En esta línea, sería necesario determinar los mecanismos antioxidantes que se desarrollan en rodaballos con enteromixosis, lo que podría aportar información de interés para el diseño de estrategias terapéuticas encaminadas a limitar el daño oxidativo sobre los tejidos, modulando la respuesta inmunitaria.

En las infecciones moderadas, la reacción inflamatoria en la lámina propia-submucosa fue leve o moderada y se localizaba principalmente en los pliegues altamente parasitados. En estos, se observó dilatación de capilares sanguíneos, linfangiectasia e infiltrados inflamatorios mixtos, compuestos por linfocitos, granulocitos y macrófagos, que mediante inmunohistoquímica mostraron intensa inmunotinción para iNOS (art. II). El tipo de infiltrado inflamatorio presente en la lámina propia del tubo digestivo era similar al descrito en dorada, sargo picudo o pez globo parasitados por *E. leei*, si bien en espáridos se describe la presencia de células granulares eosinófilas, ausentes en rodaballo (Álvarez-Pellitero y col. 2008, Fleurance y col. 2008, Tun y col. 2002). Adicionalmente, en la submucosa intestinal del rodaballo se detectaron CMMs, que no solo almacenarían detritos celulares sino que participarían en la respuesta inmunitaria a nivel local; y en la zona basal del epitelio, la presencia de linfocitos dispuestos de manera lineal, siguiendo la membrana basal. El papel de los linfocitos intraepiteliales en la enteromixosis no se ha esclarecido hasta el momento, aunque se ha podido comprobar que la mayor parte resultan positivos frente al anticuerpo anti-CD3 (CD3+, datos no publicados).

En el caso de la gastroenteritis de la trucha arcoiris, Ronza y col. (2011) observaron en el intestino la presencia de linfocitos intraepiteliales CD3+ cercanos a las áreas de desprendimiento epitelial, y relacionaron la descamación de los enterocitos con la inducción de muerte celular por los linfocitos. Otros autores habían descrito previamente en intestino delgado de ratón la acción de los linfocitos intraepiteliales CD3+ activados sobre la fragmentación de ADN y desprendimiento de los enterocitos (Yaguchi y col. 2004). En el rodaballo, los linfocitos localizados en el epitelio de revestimiento también podrían contribuir a la inducción de apoptosis en las células epiteliales, aunque se precisan nuevos estudios sobre mediadores citotóxicos para esclarecer este mecanismo.

Finalmente, en las **infecciones severas**, las formas parasitarias, principalmente plasmodios de mayor tamaño, formas esporogónicas y escasas esporas, se distribuían por la mucosa de todas las secciones del tubo digestivo, en ocasiones, acompañadas por infecciones bacterianas secundarias. Los enterocitos presentaban daños evidentes consistentes en clara vacuolización e imágenes de necrosis y apoptosis. El estudio ultraestructural mostró pérdida de la adhesión de los enterocitos a la membrana basal y ruptura de las conexiones laterales entre células, provocando el desprendimiento de extensas áreas de epitelio de revestimiento digestivo. Las células descamadas mostraban características morfológicas de apoptosis e inmunomarcaje para c-3a (c-3a+) (art. III). Debido a esta descamación, los pliegues intestinales aparecían desprovistos del revestimiento epitelial, aunque en algún rodaballo se observó cierto grado de regeneración con un epitelio cúbico bajo o plano. En ocasiones, entre los detritos celulares presentes

en el lumen intestinal, aparecían formas parasitarias rodeadas de enterocitos.

Hasta el momento, los mecanismos de dispersión de *E. scophthalmi* no están esclarecidos, a pesar de que revisten gran interés, no solo para el diseño de estrategias terapéuticas sino también con el fin de interpretar la patogenia y establecer nuevas medidas de prevención. Por una parte, el desprendimiento de estadios de desarrollo recubiertos de enterocitos puede representar un modo de protección y favorecimiento de su dispersión en el medio (Redondo y col. 2003b). Sin embargo, algunos autores han sugerido que la anoikis *in vivo* impide que las células que se descamen se vuelvan a adherir y establecerse en áreas distintas a los lugares iniciales de desarrollo (Monteiro y col. 2004). Por este motivo, la presencia de anoikis en las células intestinales descamadas asociadas al parásito, sería un mecanismo del hospedador para “secuestrar” las formas parasitarias y evitar la colonización de otras áreas.

En esta fase de la enfermedad, el número de células goblet y rodlet era escaso e incluso en algunos tramos se observó su completa desaparición. Este descenso se asociaría al extenso daño epitelial, que implica la incapacidad de proporcionar soporte a estos tipos celulares (Ronza y col. 2011). La variación en el número de células goblet en el epitelio digestivo es un hecho común en teleósteos en respuesta a diferentes agentes tanto infecciosos como no infecciosos (Bosi y col. 2005a, Bozić y col. 2001, Ronza y col. 2011). El descenso de las células goblet se ha descrito también en doradas infectadas con *E. leei* (Estensoro y col. 2012, Fleurance y col. 2008). Como se ha mencionado anteriormente, el incremento de las células goblet en las

fases iniciales de la enteromixosis es una respuesta del intestino para tratar de expulsar los patógenos, aunque de poca eficacia por la posición intercelular de los mixosporidios. En etapas más avanzadas de la enfermedad, la disminución de células mucosas supone la pérdida de esta estrategia para eliminar los parásitos del epitelio.

En cuanto a los infiltrados inflamatorios presentes en la lámina propia-submucosa, en algunos peces la reacción inflamatoria era muy extensa. Este hecho coincide con la descripción de otras enteromixosis, en las que la presencia de infiltrados inflamatorios más evidentes se asocia a altas cargas parasitarias en el epitelio digestivo (Fleurance y col. 2008, Sitjà-Bobadilla y Palenzuela 2012, Tun y col. 2002). En el infiltrado inflamatorio se encontraba un gran número de células iNOS⁺ (art. II), pero también otras con morfología necrótica y apoptótica, diferenciándose una elevada cantidad de células c-3a⁺ (art. III). Aunque la citotoxicidad producida por NO es beneficiosa para eliminar patógenos, puede contribuir a la destrucción tisular. El NO además actúa sobre los mecanismos de apoptosis de la vía mitocondrial que desencadenan la formación del “apoptosoma”, activación de las caspasas efectoras y finalmente la muerte celular (Monteiro y col. 2004). Por lo tanto, uno de los mecanismos por los que se hallan gran cantidad de células en apoptosis en los infiltrados inflamatorios en rodaballos en fases avanzadas de la enteromixosis, podría ser la inducción de la misma por parte del NO.

Otros hallazgos incluyeron la presencia de células necróticas y/o apoptóticas en los órganos linfohematopoyéticos, CMMs más abundantes y de mayor tamaño y, mediante inmunohistoquímica, se

observó la agrupación de células iNOS⁺ en torno a estructuras vasculares y CMMs (art. II). En trabajos previos se ha comprobado como el número de melanomacrófagos y el porcentaje de superficie ocupada por los CMMs en el bazo es significativamente superior en los rodaballos con enteromixosis severa (Ronza y col. 2012). Los agregados de melanomacrófagos y CMMs se pueden desarrollar asociados a lesiones crónicas en cualquier región corporal. En los teleósteos superiores existen como centros separados que contienen linfocitos y macrófagos. Entre sus funciones primarias se incluyen el depósito de bacterias intracelulares resistentes, y el almacén de hierro y productos de la degradación celular (Agius y Roberts 2003). En la actualidad se sabe que participan en la captación y presentación del antígeno, y constituyen los precursores filogenéticos de los centros germinales de los linfonodos de mamíferos (Kato y col. 2013, Saunders y col. 2010, Vigliano y col. 2006). Además, en estudios anteriores en rodaballo, se observó que las células portadoras de inmunoglobulinas tienden a rodear los CMMs durante la respuesta a *E. scophthalmi* (Bermúdez y col. 2006b). El incremento de los CMMs en órganos linfoides de rodaballos infectados y la presencia de células iNOS⁺, en su mayoría macrófagos, en torno a ellos, representan la activación de los mecanismos relacionados con el procesado del antígeno, como parte de la respuesta inmunitaria adaptativa en los órganos linfoides secundarios.

Por otro lado, en estos peces la depleción leucocitaria en el bazo y riñón anterior era destacable, observándose múltiples células necróticas y apoptóticas, y un incremento en el número de células c-3a⁺ a lo largo de la infección por *E. scophthalmi* (art. III). La

migración de leucocitos al intestino (Bermúdez y col. 2006b), junto con la muerte celular observada tanto en los focos de lesión como en el tejido linfohematopoyético, contribuirían de forma notable a la depleción leucocitaria existente en las infecciones severas.

Además de la descripción de los cuadros lesionales de la enteromixosis, y continuando con el estudio de la respuesta del rodaballo, en el presente trabajo se realizó una caracterización pormenorizada de cinco neuromoduladores en el tracto gastrointestinal durante el desarrollo de la enfermedad. Casi todas las actividades relacionadas con el control fisiológico de las funciones del intestino durante la alimentación y digestión son mediadas por el sistema neuroendocrino, que incluye los sistemas endocrino difuso y nervioso entérico (Olsson y Holmgren 2001, Volkoff y col. 2005). También se sabe que existen interacciones bidireccionales entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino, y que pueden coordinar una respuesta multisistémica dirigida a la eliminación de los parásitos y la recuperación intestinal (Bilbo y Klein 2012, Dezfuli y col. 2011, Selleri y col. 2008, Sirinek y O'Dorisio 1991, Snoek y col. 2010). Se ha demostrado que la infección por *E. scophthalmi* induce cambios en los neuromoduladores liberados por el sistema endocrino entérico (Bermúdez y col. 2007), que a su vez interacciona con el sistema inmunitario (Ameri y Ferone 2012, Bilbo y Klein 2012), por lo que el estudio del sistema neuroendocrino aporta información sobre el desarrollo de la respuesta sistémica del rodaballo.

Para caracterizar los cambios en la presencia y distribución en el tubo digestivo de los moduladores bombesina (BOM), glucagón (GLUC),

leu-encefalina (LEU), met-encefalina (MET) y somatostatina (SOM) mediante inmunohistoquímica, se seleccionaron rodaballos con infecciones moderadas para comparar con rodaballos control (art. IV). Con los cinco antisueros se obtuvo inmunotinción positiva de células en el epitelio de revestimiento del tracto gastrointestinal (células con morfología alargada), mientras que usando los antisueros para GLUC y SOM se detectaron además células positivas de morfología redondeada en las glándulas gástricas. En cuanto a la distribución de las células inmunomarcadas, las que se teñían para BOM y SOM se localizaron en el estómago, para LEU y MET se encontraron en ciegos pilóricos e intestino, y para GLUC se detectaron células positivas en todos los tramos estudiados, aunque fueron más abundantes en los tramos anterior y medio del intestino. En los rodaballos infectados, el número de células positivas para BOM y GLUC disminuyó, mientras que se incrementaron las células positivas para LEU, MET y SOM. Referente a neuronas y fibras nerviosas, los hallazgos más destacables fueron el marcaje neuronas y fibras con BOM, sobre todo en el plexo mientérico de estómago e intestino posterior; pocas fibras positivas para GLUC en el plexo submucoso intestinal y en el plexo mientérico del intestino posterior; y fibras nerviosas positivas para SOM en ambos plexos nerviosos desde el estómago hasta el intestino posterior. Las fibras marcadas para BOM fueron menos abundantes en peces infectados, mientras que el inmunomarcaje de SOM en fibras del intestino anterior de individuos infectados fue más intenso. No se detectaron cambios evidentes de fibras inmunoteñidas para GLUC, ni se marcaron neuronas ni fibras nerviosas con los anticuerpos anti-LEU y anti-MET.

En cuanto a las funciones propias del tubo digestivo, el descenso de los péptidos anorexigénicos BOM y GLUC (Jensen 2001, Volkoff y col. 2005) en los rodaballos infectados con respecto a los controles, retrasaría los mecanismos de saciedad y favorecería la ingesta de alimentos. Sin embargo, las complejas interacciones con otras sustancias con efectos negativos sobre el apetito, y el daño epitelial, que impide la absorción de los nutrientes, resultarían en el estado caquéctico mostrado por los rodaballos parasitados.

Bermúdez y col. (2007) describieron una posible respuesta inmunitaria desproporcionada asociada al incremento del péptido proinflamatorio sustancia P junto con el descenso del péptido intestinal vasoactivo y la persistencia del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), ambos con efectos inhibitorios sobre la motilidad intestinal y sistema inmunitario. En el presente estudio, el incremento en las encefalinas, LEU y MET, también relacionadas con procesos inflamatorios (Holzer 2009, Machelska 2007), pueden estimular igualmente la respuesta inmunitaria, mientras que el incremento de SOM, de amplios efectos inhibitorios (Chatterjee y Van Marck 2001, Van Op den bosch y col. 2009), representaría una estrategia biológica para antagonizar la respuesta exacerbada.

Por otra parte, otras acciones de SOM podrían tener efectos negativos sobre la pervivencia del epitelio de revestimiento digestivo, ya que se ha descrito que el análogo de SOM octreótido causa inhibición de la migración y proliferación de los enterocitos, así como el desencadenamiento de muerte celular (Pyronnet y col. 2008, Thompson 1998). Este hecho, junto con la presencia de formas

parasitarias y la respuesta inflamatoria intestinal (niveles excesivos de especies reactivas de nitrógeno y citotoxicidad de linfocitos intraepiteliales), puede contribuir a la muerte celular de los enterocitos y menor renovación epitelial, lo que provocaría la disfunción y desprendimiento del epitelio de revestimiento digestivo, uno de los hechos más característicos de la enteromixosis del rodaballo.





5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. En las fases iniciales de la enteromixosis las alteraciones histológicas en los rodaballos son escasas y la detección de las formas parasitarias de *Enteromyxum scophthalmi* es compleja, por lo que el empleo de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-*E. scophthalmi* en muestras fijadas e incluidas en parafina es una herramienta eficaz para el diagnóstico precoz.
2. Durante los primeros estadios de la enteromixosis se produce una respuesta inmunitaria innata, reflejada en el incremento de células goblet, células rodlet y linfocitos intraepiteliales en el epitelio de revestimiento, escasa movilización de células mononucleares a la lámina propia-submucosa e incremento de la expresión de iNOS tanto en el tubo digestivo como en el bazo. A pesar del desarrollo temprano de esta respuesta, la progresión de la enfermedad no se frena.
3. Las infecciones moderadas se caracterizan principalmente por el aspecto festoneado y la vacuolización del epitelio de revestimiento digestivo. Las uniones especializadas de los plasmodios parasitarios con la membrana del hospedador resultan en cambios en el citoesqueleto de los enterocitos, alterando la regularidad del epitelio y dañando la zona basal, lo que puede desencadenar la descamación.

4. La infección por *E. scophthalmi* causa el incremento progresivo de la enzima iNOS en los órganos linfohematopoyéticos, enterocitos y células inflamatorias en la lámina propia-submucosa. La activación de iNOS origina óxido nítrico, con alto poder oxidativo, encaminado a eliminar los estadios parasitarios, a pesar de que en niveles elevados puede resultar perjudicial para los tejidos del hospedador.
5. En las infecciones severas de la enteromixosis se produce una descamación marcada del epitelio de revestimiento digestivo. Entre los posibles mecanismos involucrados se encuentra el incremento progresivo de la apoptosis en el epitelio de revestimiento y la acción de moléculas con efecto antiadhesivo (como el óxido nítrico) y antiproliferativo (como la somatostatina), que pueden desencadenar la separación de los enterocitos de la membrana basal y su posterior anoikis.
6. El hallazgo en el lumen intestinal de trofozoitos recubiertos de enterocitos descamados sufriendo anoikis, sugiere un modo de protección y dispersión de los plasmodios en el medio, si bien no se puede descartar que constituya una estrategia del hospedador para “secuestrar” las formas parasitarias y evitar la colonización de otras áreas.
7. La depleción leucocitaria en los órganos linfohematopoyéticos característica de las infecciones severas por *E. scophthalmi*, puede estar originada por la migración masiva de leucocitos a los focos inflamatorios en el tracto gastrointestinal, y el incremento progresivo de apoptosis en los órganos linfohematopoyéticos y en el infiltrado inflamatorio del tracto gastrointestinal.

8. Las variaciones experimentadas por los neuropéptidos estudiados se relacionan con disminución de la motilidad intestinal y secreción de fluidos, así como un detrimento de los mecanismos anorexigénicos. Sin embargo, los peces infectados mostraron un estado caquéctico, que puede ser debido al deterioro histológico del tracto gastrointestinal, y/o a la interacción resultante entre otros neuromoduladores implicados.
9. El incremento de encefalinas en el tubo digestivo de rodaballos infectados, activaría rutas proinflamatorias, contribuyendo al desarrollo de la respuesta inmunitaria observada a este nivel. Por el contrario, el aumento de somatostatina representaría un mecanismo de control destinado a contrarrestar una posible respuesta inmunitaria exacerbada.

Conclusions

According to the results obtained, we can conclude that:

1. In the initial stages of enteromyxosis, histological alterations in turbot are scant and detecting parasitic forms of *Enteromyxum scophthalmi* is complex, so the use of immunohistochemistry with the anti-*E. scophthalmi* antibody in paraffin-embedded fixed samples is an effective tool for early diagnosis.
2. During the early stages of enteromyxosis, innate immune response occurs, reflected in the increase in goblet cells, rodlet cells and intraepithelial lymphocytes in the epithelial lining, scarce mobilization of mononuclear cells to the lamina propria-submucosa and increased expression of iNOS in both the gut and spleen. Despite the early development of this response, disease progression is not halted.
3. Moderate infections are mainly characterized by the scalloped appearance and vacuolization of the digestive epithelial lining. The specialized junctions of the parasitic plasmodia with host membrane result in cytoskeletal changes in the enterocytes, disturbing the regularity of the epithelium and the basal damage, which can trigger the detachment.
4. Infection by *E. scophthalmi* causes progressive increase in iNOS enzyme in lymphohematopoietic organs, enterocytes, and inflammatory cells in the lamina propria-submucosa. Inducible NOS activation produces nitric oxide, with high oxidative power,

aimed at eliminating the parasitic stages, although high levels of this molecule may be detrimental to the host tissues.

5. In the severe infections of enteromyxosis, epithelial desquamation of the digestive lining is produced. Among the possible mechanisms involved, we found a progressive increase in apoptosis in the epithelial lining, and the effect of anti-adhesive molecules (such as nitric oxide) and anti-proliferative mediators (such as somatostatin), which may trigger the separation of the enterocytes from the basement membrane and the subsequent anoikis.
6. The finding of scaly enterocytes undergoing anoikis coating trophozoites in the intestinal lumen, suggests a protective-dispersion mode of plasmodia in the environment, even though a host strategy to "hijack" the parasitic forms and avoid colonization of other areas may not be disregarded.
7. The characteristic leukocyte depletion in the lymphohematopoietic organs in severe infections by *E. scophthalmi* may be due to the massive migration of leukocytes to the inflammatory foci within the gastrointestinal tract, and the progressive increase of apoptosis in lymphohematopoietic tissues and inflammatory infiltration of the gastrointestinal tract.
8. The variations observed in the neuropeptides are related to the diminution of the intestinal motility and fluid secretion, as well as a decrease of the anorexigenic mechanisms. However, the infected fish showed cachexia, which may be due to histological impairment of the gastrointestinal tract and/or the interaction between other neuromodulators involved.

9. The increased enkephalins in the digestive tract of infected turbot activate proinflammatory pathways contributing to the development of the immune response observed at this level. By contrast, increased somatostatin represent a control mechanism aimed at counteracting a possible exacerbated immune response.





6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JM (2011) Vibriosis. En: Woo PTK, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders, Vol 3: viral, bacterial and fungal infections, 2nd Edition. CABI, Wallingford, pp. 570-605.
- Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26:499-509.
- Ahlman H, Nilsson (2001) The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol* 12 Suppl 2:S63-68.
- Alama-Bermejo G, Bron JE, Raga JA, Holzer AS (2012) 3D morphology, ultrastructure and development of *Ceratomyxa puntazzi* stages: first insights into the mechanisms of motility and budding in the Myxozoa. *PLoS One* 7:e32679.
- Alejo A, Tafalla C (2011) Chemokines in teleost fish species. *Dev Comp Immunol* 35:1215-1222.
- Alonso M, Lago FC, Gómez-Reino M, Fernández J, Martín I, Vieites JM, Espiñeira M (2013) Fast real-time PCR assay for detection of *Tetramicra brevifilum* in cultured turbot. *Parasitology* 140:338-342.
- Álvarez-Pellitero P (2008) Fish immunity and parasite infections: From innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol* 126:171-198.
- Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Padrós F, Sitjà-Bobadilla A, Riaza A, Silva R, Aran J (2004) *Histophagous scuticociliatids* (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, in vitro culture and virulence. *Folia Parasitol* 51:177-187.
- Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A (2008) Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol Int* 57:110-120.
- Ameri P, Ferone D (2012) Diffuse endocrine system, neuroendocrine tumors and immunity: What's new? *Neuroendocrinology* 95:267-276.
- APROMAR (2012) La acuicultura marina en España 2012. En: Informes anuales [en línea]. Cádiz. <http://www.apromar.es/Informes/informe%202012/Informe-APROMAR-2012.pdf>
- Austin B, Austin DA (2007) Bacterial fish pathogens. Diseases of farm and wild fish. Springer, Chichester.
- Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Magariños B (2006) A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Dis* 29:371-374.



B

- Balembe OB, Semuguruka WD, Hay-Schmidt A, Johansen MV, Dantzer V (2001) Vasoactive intestinal peptide and substance P-like immunoreactivities in the enteric nervous system of the pig correlate with the severity of pathological changes induced by *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 31:1503-1514.
- Bartholomew JL, Whipple MJ, Stevens DG, Fryer JL (1997) The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *J Parasitol* 83:859-868.
- Bartholomew JL, Ray E, Torell B, Whipple MJ, Heidel JR (2004) Monitoring *Ceratomyxa shasta* infection during a hatchery rearing cycle: Comparison of molecular, serological and histological methods. *Dis Aquat Organ* 62:85-92.
- Bartošová P, Fiala I, Jirků M, Cinková M, Caffara M, Fioravanti ML, Atkinson SD, Bartholomew JL, Holzer AS (2013) *Sphaerospora sensu stricto*: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Mol Phylogenet Evol* 68:93-105.
- Becker SM, Cho KN, Guo X, Fendig K, Oosman MN, Whitehead R, Cohn SM, Houpt ER (2010) Epithelial cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut. *Am J Pathol* 176:1316-1322.
- Benajiba MH, Marques A, Bouix G (1993) Ultrastructural data on the sporogenesis of *Myxidium giardi*, cépède 1906 (Myxozoa, Myxosporidia), parasite of *Anguilla anguilla* (Teleostea). *Eur J Protistol* 29:254-261.
- Bermúdez R (2006) Estudio de la respuesta inmunitaria y búsqueda de nuevas opciones terapéuticas frente a la enteronixosis intestinal del rodaballo, *Psetta maxima* (L.). Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Bermúdez R, Alemañ N, Vigliano F, Vázquez S, Quiroga MI, Nieto JM (2006a) Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A light and electron microscopic study. *Aquaculture* 254:65-71.
- Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006b) Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:501-512.
- Bermúdez R, Vigliano F, Quiroga MI, Nieto JM, Bosi G, Domeneghini C (2007) Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot,



- Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). Fish Shellfish Immunol 22:252-263.
- Bilbo SD, Klein SL (2012) Special Issue: the neuroendocrine-immune axis in health and disease. Horm Behav 62:187-190.
- Bosi G, Arrighi S, Di Giancamillo A, Domeneghini C (2005a) Histochemistry of glycoconjugates in mucous cells of *Salmo trutta* uninfected and naturally parasitized with intestinal helminths. Dis Aquat Organ 64:45-51.
- Bosi G, Domeneghini C, Arrighi S, Giari L, Simoni E, Dezfuli BS (2005b) Response of the gut neuroendocrine system of *Leuciscus cephalus* (L.) to the presence of *Pomphorhynchus laevis* Muller, 1776 (Acanthocephala). Histol Histopathol 20:509-518.
- Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni E, Pironi F, Dezfuli BS (2005c) Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). J Fish Dis 28:703-711.
- Bouza C, Hermida M, Pardo BG, Fernández C, Fortes GG, Castro J, Sánchez L, Presa P, Pérez M, Sanjuán A, de Carlos A, Álvarez-Dios JA, Ezcurra S, Cal RM, Piferer F, Martínez P (2007) A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*). Genetics 177:2457-2467.
- Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). J Fish Dis 22:395-399.
- Bricknell I, Dalmo RA (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish Shellfish Immunol 19:457-472.
- Burger MAA, Barnes AC, Adlard RD (2008) Wildlife as reservoirs for parasites infecting commercial species: host specificity and a redescription of *Kudoa amamiensis* from teleost fish in Australia. J Fish Dis 31:835-844.

C

- Cain K, Swan C (2011) Barrier function and immunology. En: Grossel M, Farrell AP, Brauner CJ (eds) The multifunctional gut of fish, 1st Edition, Fish Physiology, Vol 30. Academic Press, pp. 111-134.
- Campos-Pérez JJ, Ward M, Grabowski PS, Ellis AE, Secombes CJ (2000) The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. Immunology 99:153-161.



- Casani D, Randelli E, Costantini S, Facchiano AM, Zou J, Martin S, Secombes CJ, Scapigliati G, Buonocore F (2009) Molecular characterisation and structural analysis of an interferon homologue in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mol Immunol* 46:943-952.
- Castro R, Bernard D, Lefranc MP, Six A, Benmansour A, Boudinot P (2011) T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* 31:644-654.
- Chatterjee S, Van Marck E (2001) The role of somatostatin in schistosomiasis: a basis for immunomodulation in host-parasite interactions? *Trop Med Int Health* 6:578-581.
- Chiarugi P, Giannoni E (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76:1352-1364.
- Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR (2008) The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 32:92-99.
- Çinar K, Senol N, Ozen MR (2006) Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *World J Gastroenterol* 12:6874-6878.
- Cipriano RC, Austin B (2011) Furunculosis and other aeromonad diseases. En: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders, Vol 3: viral, bacterial and fungal infections*, 2nd Edition. CABI, Wallingford, pp. 424-483.
- Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK (2005) Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science* 308:1463-1465.
- Cole DW, Cole R, Gaydos SJ, Gray J, Hyland G, Jacques ML, Powell-Dunford N, Sawhney C, Au WW (2009) *Aquaculture: environmental, toxicological, and health issues*. *Int J Hyg Envir Heal* 212:369-377.
- Coscelli GA, Sancho AR, Losada AP, Faílde LD, Bermúdez R, Ruiz de Ocenda M, Cabaleiro S, Quiroga MI (2009) Caracterización morfológica de las formas aguda y crónica de la furunculosis en el rodaballo (*Psetta maxima* L.). En: XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, Lugo, España, libro de resúmenes, p. 57.
- Cuadrado M, Marqués A, Diamant A, Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P, Padrós F, Crespo S (2008) Ultrastructure of *Enteromyxum leei* (Diamant, Lom & Dyková, 1994) (Myxozoa), an enteric parasite infecting gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*). *J Eukaryot Microbiol* 55:178-184.



D

- Davey GC, Calduch-Giner JA, Houeix B, Talbot A, Sitjà-Bobadilla A, Prunet P, Pérez-Sánchez J, Cairns MT (2011) Molecular profiling of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) response to chronic exposure to the myxosporean parasite *Enteromyxum leei*. *Mol Immunol* 48:2102-2112.
- De Silva SS, Nguyen TT, Turchini GM, Amarasinghe US, Abery NW (2009) Alien species in aquaculture and biodiversity: a paradox in food production. *Ambio* 38:24-28.
- Dezfuli BS, Simoni E, Rossi R, Manera M (2000) Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). *Dis Aquat Organ* 43:61-69.
- Dezfuli BS, Giari L, Arrighi S, Domeneghini C, Bosi G (2003) Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. *J Fish Dis* 26:155-166.
- Dezfuli BS, Giari L, Shinn AP (2007) The role of rodlet cells in the inflammatory response in *Phoxinus phoxinus* brains infected with *Diplostomum*. *Fish Shellfish Immunol* 23:300-304.
- Dezfuli BS, Giari L, Simoni E, Shinn AP, Bosi G (2004) Immunohistochemistry, histopathology and ultrastructure of *Gasterosteus aculeatus* tissues infected with *Glugea anomala*. *Dis Aquat Organ* 58:193-202.
- Dezfuli BS, Giovinazzo G, Lui A, Giari L (2008) Inflammatory response to *Dentitruncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. *Fish Shellfish Immunol* 24:726-733.
- Dezfuli BS, Lui A, Giovinazzo G, Boldrini P, Giari L (2009) Intestinal inflammatory response of powan *Coregonus lavaretus* (Pisces) to the presence of acanthocephalan infections. *Parasitology* 136:929-937.
- Dezfuli BS, Castaldelli G, Bo T, Lorenzoni M, Giari L (2011) Intestinal immune response of *Silurus glanis* and *Barbus barbus* naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Parasite Immunol* 33:116-123.
- Di Comite G, Grazia Sabbadini M, Corti A, Rovere-Querini P, Manfredi AA (2007) Conversation galante: how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *Autoimmun Rev* 7:23-29.
- Diamant A (1997) Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Dis Aquat Organ* 30:99-105.
- Diamant A, Lom J, Dyková I (1994) *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Organ* 20:137-141.



- Diamant A, Ucko M, Paperna I, Colorni A, Lipshitz A (2005) *Kudoa iwatai* (Myxosporea: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the red sea: redescription and molecular phylogeny. *J Parasitol* 91:1175-1189.
- Diamant A, Ram S, Paperna I (2006) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* to freshwater fish. *Dis Aquat Organ* 72:171-178.
- Díez I, Calatayud S, Hernández C, Quintana E, O'Connor JE, Esplugues JV, Barrachina MD (2010) Nitric oxide, derived from inducible nitric oxide synthase, decreases hypoxia inducible factor-1 α in macrophages during aspirin-induced mesenteric inflammation. *Brit J Pharmacol* 159:1636-1645.
- dos Santos NM, do Vale A, Sousa MJ, Silva MT (2002) Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Organ* 52:87-91.
- Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, García JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD, Dominguez L (1996) Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J Fish Dis* 19:33-38.
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22.
- Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA (2003) Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 199:221-228.
- Durand MJ, Gutterman DD (2013) Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* 20:239-247.
- Dyková I, Lom J (1988) Review of pathogenic myxosporeans in intensive culture of carp (*Cyprinus carpio*) in Europe. *Folia Parasitol* 35:289-307.
- Dyková I, Novoa B (2001) Comments on diagnosis of amoebic gill disease (AGD) in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 21:40-44.
- Dyková I, Týmł T, Kostka M, Pecková H (2010) Strains of *Uronema marinum* (Scuticociliatia) co-isolated with amoebae of the genus *Neoparamoeba*. *Dis Aquat Organ* 89:71-77.

E

- Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25:827-839.
- Estensoro I, Bermúdez R, Losada AP, Quiroga MI, Pérez-Sánchez J, Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (2009) Effect of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) on gastrointestinal



- neuromodulators and cell apoptosis of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). En: Diseases of Fish and Shellfish, 14th European Association of Fish Pathologists International Conference, Prague, Czech Republic, libro de resúmenes, p. 264.
- Estensoro I, Benedito-Palos L, Palenzuela O, Kaushik S, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J (2011a) The nutritional background of the host alters the disease course in a fish-myxosporean system. *Vet Parasitol* 175:141-150.
- Estensoro I, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (2011b) Novel horizontal transmission route for *Enteromyxum leei* (Myxozoa) by anal intubation of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Organ* 92:51-58.
- Estensoro I, Calduch-Giner JA, Kaushik S, Pérez-Sánchez J, Sitjà-Bobadilla A (2012) Modulation of the IgM gene expression and IgM immunoreactive cell distribution by the nutritional background in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) challenged with *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 33:401-410.
- Estensoro I, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (2013) Immunohistochemical characterization of polyclonal antibodies against *Enteromyxum leei* and *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa: Myxosporea), intestinal parasites of fish. *J Fish Dis* doi: 10.1111/jfd.12168.

F

- Fañde LD (2013) Tenacibaculosis en lenguado y rodaballo: caracterización morfológica y de la respuesta inmunitaria. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- FAO (2006) Prevención y tratamiento de las enfermedades de los peces. En: Simple methods for aquaculture. Méthodes simples d'aquaculture. Métodos sencillos para la acuicultura. Version 2. Rome, 2006. CD-ROM.
- FAO (2010) El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA) 2010. En: Departamento de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. <http://www.fao.org/fishery/sofia/es>.
- FAO (2011) Programa de información de especies acuáticas. *Psetta maxima*. © 2005-2011 Texto de Rodríguez Villanueva, JL y Fernández Souto, B. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 4 de mayo de 2005. [Consultado: 6 de octubre de 2011]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta_maxima/es.
- FAO (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA) 2012. En: Departamento de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. <http://www.fao.org/fishery/sofia/es>.
- FEAP (2012) The FEAP Production Report 2010. En: Aquaculture data [en línea]. Lieja. Actualizado 15 de julio de 2011. [Consultado: 1 de noviembre de 2012]. <http://www.feap.info/default.asp?SHORTCUT=582>.



- Feist SW (2008) Myxozoan diseases. En: Eiras J, Segner K, Wahli T, Kapoor BG (eds) Fish diseases, Vol 2. Science Publishers, Enfield, pp. 613–682.
- Feist SW, Longshaw M (2006) Phylum Myxozoa. En: Woo PTK (ed) Fish diseases and disorders, Vol 1: protozoan and metazoan infections, 2nd Edition. CABI, Wallingford, pp. 230-296.
- Fetherman ER, Winkelman DL, Schisler GJ, Myrick CA (2011) The effects of *Myxobolus cerebralis* on the physiological performance of whirling disease resistant and susceptible strains of rainbow trout. *J Aquat Anim Health* 23:169-177.
- Fiala I, Dyková I (2004) The phylogeny of marine and freshwater species of the genus *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxosporea: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Folia Parasitol* 51:211-214.
- Figueras A, Novoa B, Santarém MM, Martínez E, Álvarez JM, Toranzo AE, Dyková I (1992) *Tetramicra brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Organ* 135:127-135.
- Fioravanti ML, Caffara M, Florio D, Gustinelli A, Marcer F (2004) *Sphaerospora dicentrarchi* and *S. testicularis* (Myxozoa: Sphaerosporidae) in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from Italy. *Folia Parasitol (Praha)* 51:208-210.
- Fleurance R, Sauvegrain C, Marques A, Le Breton A, Guereaud C, Cherel Y, Wyers M (2008) Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Organ* 79:219-228.
- Franchini S, Zarkadis IK, Sfyroera G, Sahu A, Moore WT, Mastellos D, LaPatra SE, Lambris JD (2001) Cloning and purification of the rainbow trout fifth component of complement (C5). *Dev Comp Immunol* 25:419-430.

G

- García JC (1999) Estudio anatomopatológico del síndrome de la cabeza hundida del rodaballo. Memoria de licenciatura. Universidade de Santiago de Compostela.
- Galina J, Yin G, Ardó L, Jeney Z (2009) The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol Biochem* 35:669-676.
- Gatesoupe FJ (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14:107-114.
- Geary N (1999) Effects of glucagon, insulin, amylin and CGRP on feeding. *Neuropeptides* 33:400-405.
- Gélineau A, Boujard T (2001) Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *J Fish Biol* 58:716-724.



- Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N (2013) Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res* 109:60-66.
- Germonpre PR, Bullock GR, Lambrecht BN, Van De Velde V, Luyten WH, Joos GF, Pauwels RA (1999) Presence of substance P and neurokinin 1 receptors in human sputum macrophages and U-937 cells. *Eur Respir J* 14:776-782.
- Gilbert MA, Granath WO (2003) Whirling disease of salmonid fish: life cycle, biology, and disease. *J Parasitol* 89:658-667.
- Goetzl EJ, Sreedharan SP (1992) Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *FASEB J* 6:2646-2652.
- Golomazou E, Athanassopoulou F, Karagouni E, Tsagozis P, Tsentilas H, Vagianou S (2006) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dyková, 1994 in sharpshout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. *Aquaculture* 260:44-53.
- Gomez-Casado E, Estepa A, Coll JM (2011) A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* 29:2657-2671.
- González SF, Osorio CR, Santos Y (2003) Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Dis Aquat Organ* 55:109-115.
- Gookin JL, Duckett LL, Armstrong MU, Stauffer SH, Finnegan CP, Murtaugh MP, Argenzio RA (2004) Nitric oxide synthase stimulates prostaglandin synthesis and barrier function in *C. parvum*-infected porcine ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G571-58.
- Gookin JL, Allen J, Chiang S, Duckett L, Armstrong MU (2005) Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 73:3929-3936.
- Gookin JL, Chiang S, Allen J, Armstrong MU, Stauffer SH, Finnegan C, Murtaugh MP (2006) NF-kappaB-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G164-174.
- Grabner DS, El-Matbouli M (2010) Experimental transmission of malacosporan parasites from bryozoans to common carp (*Cyprinus carpio*) and minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Parasitology* 137:629-639.
- Grayfer L, Belosevic M (2009) Molecular characterization, expression and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interferon gamma. *Dev Comp Immunol* 33:235-246.
- Green DM (2010) A strategic model for epidemic control in aquaculture. *Prev Vet Med* 94:119-127.



- Griffin MJ, Wise DJ, Camus AC, Mauel MJ, Greenway TE, Pote LM (2008) A real-time polymerase chain reaction assay for the detection of the myxozoan parasite *Henneguya ictaluri* in channel catfish. *J Vet Diagn Invest* 20:559-566.
- Grigorakis K, Rigos G (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 85:899-919.
- Grossel G (2005) *Kudoa neurophila* in striped trumpeter: Identification, diagnostic development and histopathology. Tesis Doctoral. University of Tasmania.
- Grossel GW, Dyková I, Handlinger J, Munday BL (2003) *Pentacapsula neurophila* sp. n. (Multivalvulida) from the central nervous system of striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *J Fish Dis* 26:315-320.
- Gunter N, Adlard R (2010) The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporaea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporaea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporaea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporaea: Sphaerosporidae). *Syst Parasitol* 75:81-104.

H

- Hallett SL, Bartholomew JL (2006) Application of a real-time PCR assay to detect and quantify the myxozoan parasite *Ceratomyxa shasta* in river water samples. *Dis Aquat Organ* 71:109-118.
- Hedrick RP, MacConnell E, De Kinkelin P (1993) Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annu Rev Fish Dis* 3:277-290.
- Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, Marty GD, Georgiadis MP, MacConnell E (1999) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Dis Aquat Organ* 37:173-183.
- Hikima J-I, Jung T-S, Aoki T (2010) Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Dev Comp Immunol* 35:924-936.
- Holzer AS, Bartošová P, Pecková H, Tysl T, Atkinson S, Bartholomew J, Sipos D, Eszterbauer E, Dyková I (2013) 'Who's who' in renal sphaerosporids (Bivalvulida: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish - Molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora sensu stricto*. *Parasitology* 140:46-60.
- Holzer P (2009) Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul Pept* 155:11-17.



Holzer P, Holzer-Petsche U (1997) Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 73:173-217.

I

Iglesias R, Parama A, Alvarez MF, Leiro J, Fernandez J, Sanmartin ML (2001) *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Organ* 46:47-55.

Ishimatsu A, Hayashi M, Nakane M, Sameshima M (2007) Pathophysiology of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* suffering from the myxosporean emaciation disease. *Fish Pathol* 42:211-217.

J

Jensen J (2001) Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128:469-477.

Jiménez-Guri E, Philippe H, Okamura B, Holland PWH (2007) *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. *Science* 317:116-118.

K

Karlsbakk E, Sæther P, Nylund A (2002) *Parvicapsula pseudobranchicola* n. sp. (Myxozoa), a myxosporidian infecting the pseudobranch of cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 22:381-387.

Karlsbakk E, Kjøie M (2012) The marine myxosporean *Sigmomyxa sphaerica* (Thélohan, 1895) gen. n., comb. n. (syn. *Myxidium sphaericum*) from garfish (*Belone belone* (L.)) uses the polychaete *Nereis pelagica* L. as invertebrate host. *Parasitol Res* 110:211-218.

Katharios P, Rigos G, Divanach P (2011) *Enteromyxum leei* (Myxozoa), a lethal intruder of tropical pet fish: first case in humphead wrasse, *Cheilinus undulatus* (Rüppell, 1835). *J Exot Pet Med* 20:138-143.

Kato G, Goto K, Akune I, Aoka S, Kondo H, Hirono I (2013) CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . *Dev Comp Immunol* 39:293-301.

Katzenback BA, Belosevic M (2012) Colony-stimulating factor-1 receptor protein expression is a specific marker for goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophage progenitors and their differentiated cell types. *Fish Shellfish Immunol* 32:434-445.



- Kazantzi A, Sfyroera G, Holland MC, Lambris JD, Zarkadis IK (2003) Molecular cloning of the beta subunit of complement component eight of rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 27:167-174.
- Keklikoglu N, Koray M, Kocaelli H, Akinci S (2008) iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa. *Dig Dis Sci* 53:1437-1442.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48:395-413.
- Khan N, Deschaux P (1997) Role of serotonin in fish immunomodulation. *J Exp Biol* 200:1833-1838.
- Khan WI, Ghia JE (2010) Gut hormones: Emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol* 161:19-27.
- Kibenge FSB, Godoy MG, Fast M, Workenhe S, Kibenge MJT (2012) Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiv Res* 95:257-281.
- Köllner B, Blohm U, Kotterba G, Fischer U (2001) A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol* 11:127-142.
- Kukuruzovic R, Robins-Browne RM, Anstey NM, Brewster DR (2002) Enteric pathogens, intestinal permeability and nitric oxide production in acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 21:730-739.

L

- Leiro J, Iglesias R, Parama A, Aragort W, Sanmartin ML (2002) PCR detection of *Tetramicra brevifilum* (Microspora) infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) musculature. *Parasitology* 124:145-151.
- Leitch GJ, He Q (1999) Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect Immun* 67:5885-5891.
- León-Rodríguez L, Luzardo-Álvarez A, Blanco-Méndez J, Lamas J, Leiro J (2012) A vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish Shellfish Immunol* 33:21-27.
- Levsen A, Jørgensen A, Mo TA (2008) Occurrence of postmortem myoliquefactive kudoosis in Atlantic mackerel, *Scomber scombrus* L., from the North Sea. *J Fish Dis* 31:601-611.



- Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol* 7:1116-1124.
- Lin X, Volkoff H, Narnaware Y, Bernier NJ, Peyon P, Peter RE (2000) Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 126:415-434.
- Liu J, Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS, Enomoto S (2009) Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 77:837-849.
- Liyanage YS, Yokoyama H, Wakabayashi H (2003) Evaluation of a vector-control strategy of haemorrhagic thelohanellosis in carp, caused by *Thelohanellus hovorkai* (Myxozoa). *Dis Aquat Organ* 55:31-35.
- Lom J (1990) Phylum Myxozoa. En: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (eds) *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, Boston, pp. 36-52.
- Lom J, Dyková I (1993) Scanning electron microscopic revision of common species of the genus *Chloromyxum* (Myxozoa: Myxosporea) infecting European freshwater fishes. *Folia Parasitol* 40:161-174.
- Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53:1-36.
- López-Vázquez C, Dopazo CP, Barja JL, Bandín I (2007) Experimental infection of turbot, *Psetta maxima* (L.), with strains of viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from wild and farmed marine fish. *J Fish Dis* 30:303-312.
- Losada AP, Sancho AR, Faílde LD, Bermúdez R, Coscelli GA, Quiroga MI (2009) ¿Es tan diferente el sistema inmunitario de mamíferos y peces? En: XII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas, libro de resúmenes.
- Lu DQ, Yi SB, Yao M, Li YW, Liu XC, Zhang Y, Lin HR (2012) Identification and expression analysis of major histocompatibility complex IIB gene in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *J Fish Biol* 81:165-180.
- Lüder CG, Gross U, Lopes MF (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: Diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17:480-486.
- Lugo-Martínez VH, Petit CS, Fouquet S, Le Beyec J, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Thenet S (2009) Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G235-244.
- Lukiw W (2006) Endogenous signaling complexity in neuropeptides. Leucine- and methionine-enkephalin. *Cell Mol Neurobiol* 26:1001-1008.



Lv J, Huang R, Li H, Luo D, Liao L, Zhu Z, Wang Y (2012) Cloning and characterization of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) Toll-like receptor 22 gene, a fish-specific gene. *Fish Shellfish Immunol* 32:1022-1031.

M

Machelska H (2007) Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides* 41:355-363.

Magadán-Mompó S, Sánchez-Espinel C, Gambón-Deza F (2011) Immunoglobulin heavy chains in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Evol Biol* 11:165.

Magnadottir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20:137-151.

Magnadottir B (2010) Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol (NY)* 12:361-379.

Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol* 19:429-439.

Manera M, Dezfuli BS (2004) Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *J Fish Biol* 65:597-619.

Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2011) *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitol Res* 108:913-926.

Mazon AF, Huising MO, Taverne-Thiele AJ, Bastiaans J, Verburg-van Kemenade BM (2007) The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish Shellfish Immunol* 22:27-37.

Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E (2004) *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun* 72:6061-6067.

Metz-Boutigue MH, Kieffer AE, Goumon Y, Aunis D (2003) Innate immunity: Involvement of new neuropeptides. *Trends Microbiol* 11:585-592.

Millán A, Gómez-Tato A, Fernández C, Pardo BG, Álvarez-Dios JA, Calaza M, Bouza C, Vázquez M, Cabaleiro S, Martínez P (2010) Design and performance of a turbot (*Scophthalmus maximus*) oligo-microarray based on ESTs from immune tissues. *Mar Biotechnol* 12:452-465.

Millán A, Gómez-Tato A, Pardo BG, Fernández C, Bouza C, Vera M, Alvarez-Dios JA, Cabaleiro S, Lamas J, Lemos ML (2011) Gene expression profiles of the spleen, liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with



- Aeromonas salmonicida* using an immune-enriched oligo-microarray. Mar Biotechnol 13:1099-1114.
- Mohanty BR, Sahoo PK (2007) Edwardsiellosis in fish: A brief review. J Biosci 32:1331-1344.
- Mokrzycka M, Kolasa A, Kosierkiewicz A, Wiszniewska B (2010) Inducible nitric oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. Folia Histochem Cytobiol 48:191-196.
- Monteiro AS, Okamura B, Holland PWH (2002) Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. Mol Biol Evol 19:968-971.
- Monteiro HP, Silva EF, Stern A (2004) Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis-anoikis. Nitric Oxide 10:1-10.
- Moon TW (1998) Glucagon: from hepatic binding to metabolism in teleost fish. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 121:27-34.
- Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML (1999) A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. Aquaculture 172:163-196.
- Morris DJ (2012) A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor. Int J Parasitol 42:829-840.
- Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, Somamoto T (2011) Cytotoxic T cells in teleost fish. Dev Comp Immunol 35:1317-1323.
- Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T (2011) The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. Dev Comp Immunol 35:1296-1308.
- Nelson LE, Sheridan MA (2006) Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. Gen Comp Endocr 148:116-124.
- Nesnidal MP, Helmkampf M, Bruchhaus I, El-Matbouli M, Hausdorf B (2013) Agent of whirling disease meets orphan worm: Phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria. PLoS One 8:e54576.
- Noga EJ (2010) Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd Edition. Wiley, Ames.
- Novakov N, Ćirković M, Ljubojević D, Adžić B, Maletin S, Bjelić-Čabrilo O (2011) *Thelohanellus hovorkai*: In different categories of carp. Contemp Agric 60:158-163.



Nylund A, Karlsbakk E, Sæther PA, Koren C, Larsen T, Nielsen BD, Brøderud AE, Høstlund C, Fjellsøy KR, Lervik K, Rosnes L (2005) *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporaea) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Dis Aquat Organ* 63:197-204.

Nylund S, Andersen L, Sævareid I, Plarre H, Watanabe K, Arnesen CE, Karlsbakk E, Nylund A (2011) Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Dis Aquat Organ* 94:41-57.

O

O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA (2004) Enteroendocrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G998-1007.

Okamura B, Curry A, Wood TS, Canning EU (2002) Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. *Parasitology* 124:215-223.

Oladiran A, Belosevic M (2009) *Trypanosoma carassii* HSP70 increases expression of inflammatory cytokines and chemokines in macrophages of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Dev Comp Immunol* 33:1128-1136.

Olsson C (2009) Autonomic innervation of the fish gut. *Acta Histochem* 111:185-195.

Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128:479-501.

P

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.

Padrós F, Palenzuela O, Hispano C, Tosas O, Zarza C, Crespo S, Álvarez-Pellitero P (2001) *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Dis Aquat Organ* 47:57-62.

Padrós F, Zarza C, Dopazo L, Cuadrado M, Crespo S (2006) Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Dis* 29:87-94.

Palenzuela O, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2002) Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124:369-379.



- Palenzuela O, Redondo MJ, Lopez E, Álvarez-Pellitero P (2007) Cultured sole, *Solea senegalensis* is susceptible to *Enteromyxum scophthalmi*, the myxozoan parasite causing turbot emaciative enteritis. *Parassitologia* 49:73.
- Palenzuela O, Lopez-Grandal E, Zarza C, Álvarez-Pellitero P (2009) Treatment of turbot enteromyxosis with antiparasitic drugs and bioactive natural extracts-supplemented feeds. 14th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Prague, Czech Republic, 14-19 September, libro de resúmenes, pp. 142-143.
- Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, Brandonisio O, Cavallo P (2007) Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:302-309.
- Pardo B, Fernández C, Millán A, Bouza C, Vázquez-López A, Vera M, Álvarez-Dios J, Calaza M, Gómez-Tato A, Vázquez M (2008) Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Vet Res* 4:37.
- Pardo BG, Millán A, Gómez-Tato A, Fernández C, Bouza C, Álvarez-Dios JA, Cabaleiro S, Lamas J, Leiro JM, Martínez P (2012) Gene expression profiles of spleen, liver, and head kidney in turbot (*Scophthalmus maximus*) along the infection process with *Philasterides dicentrarchi* using an immune-enriched oligo-microarray. *Mar Biotechnol* 14:570-582.
- Pereiro P, Martínez-Lopez A, Falco A, Dios S, Figueras A, Coll JM, Novoa B, Estepa A (2012) Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol* 32:1088-1094.
- Person-Le Ruyet J, Baudin-Laurenc F, Devauchelle N, Metailler R, Nicolas J-L, Robin J, Guillaume J (1991) Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*). En: *Handbook of Mariculture, Vol. II Finfish Aquaculture* (CRC Press). <http://archimer.ifremer.fr/doc/00048/15930/>.
- Piazzon C, Mallo N, Martín I, Fernández-Casal J, Sanmartín ML, Lamas J, Leiro JM (2012) Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Enteromyxum scophthalmi* parasites in turbot intestinal samples. *Aquaculture* 366-367:122-128.
- Piazzon MC, Wiegertjes GF, Leiro J, Lamas J (2011) Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on cellular immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 30:1339-1347.
- Pote LM, Hanson LA, Shivaji R (2000) Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporaea). *J Aquat Anim Health* 12:230-240.
- Pyronnet SP, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C (2008) Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol* 286:230-237.



Q

Quiroga MI, Redondo MJ, Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Vázquez S, Pérez A, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Parasitology 133:433-442.

R

Radulović M, Mančev Z, Stanojević S, Vasiljević T, Kovačević-Jovanović V, Pešić G (1996) Modulation of humoral immune response by central administration of leucine-enkephalin: Effects of μ , δ and κ opioid receptor antagonists. J Neuroimmunol 65:155-161.

Ralston KS, Petri WA (2011) The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? Essays Biochem 51:193-210.

Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G (2008) Cell markers and determinants in fish immunology. Fish Shellfish Immunol 25:326-340.

Rangel LF, Azevedo C, Casal G, Santos MJ (2012) Ultrastructural aspects of *Ellipsomyxa mugilis* (Myxozoa: Ceratomyxidae) spores and developmental stages in *Nereis diversicolor* (Polychaeta: Nereidae). J Parasitol 98:513-519.

Rebl A, Goldammer T, Seyfert H-M (2010) Toll-like receptor signaling in bony fish. Vet Immunol Immunopathol 134:139-150.

Redondo MJ (2005) Estudios sobre el ciclo vital y transmisión de *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), parásito entérico del rodaballo. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.

Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. J Parasitol 88:482-488.

Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2003a) In vitro studies on viability and proliferation of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Organ 55:133-144.

Redondo MJ, Quiroga MI, Palenzuela O, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2003b) Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Parasitol Res 90:192-202.

Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. Folia Parasitol (Praha) 51:188-198.



- Redondo MJ, Cortadellas N, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2008) Detection of carbohydrate terminals in the enteric parasite *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) and possible interactions with its fish host *Psetta maxima*. *Parasitol Res* 102:1257-1267.
- Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2010a) Carbohydrate patterns in the digestive tract of *Sparus aurata* L. and *Psetta maxima* (L.) (Teleostei) parasitized by *Enteromyxum leei* and *E. scophthalmi* (Myxozoa). *Parasitol Int* 59:445-453.
- Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2010b) The effect of lectins on the attachment and invasion of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Psetta maxima* L.) intestinal epithelium *in vitro*. *Exp Parasitol* 126:577-581.
- Reite OB (2005) The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish Shellfish Immunol* 19:253-267.
- Reite OB, Evensen O (2006) Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol* 20:192-208.
- Ribas L, Pardo BG, Fernández C, Álvarez-Dios JA, Gómez-Tato A, Quiroga MI, Planas JV, Sitjà-Bobadilla A, Martínez P, Piferrer F (2013) A combined strategy involving Sanger and 454 pyrosequencing increases genomic resources to aid in the management of reproduction, disease control and genetic selection in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics* 14:180.
- Rieger AM, Barreda DR (2011) Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Dev Comp Immunol* 35:1238-1245.
- Rigos G, Katharios P (2010) Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Rev Fish Biol Fisher* 20:47-70.
- Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Weinstock JV, Lewis DE, Actor JK, White AC (2003) Substance P expression correlates with severity of diarrhea in cryptosporidiosis. *J Infect Dis* 188:290-296.
- Rodriguez-Tovar LE, Speare DJ, Markham RJF (2011) Fish microsporidia: immune response, immunomodulation and vaccination. *Fish Shellfish Immunol* 30:999-1006.
- Romalde JL, Magarinos B, Villar C, Barja JL, Toranzo AE (1999) Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiol Lett* 179:297-304.
- Rombout JH, Joosten PH, Engelsma MY, Vos AP, Taverne N, Taverne-Thiele JJ (1998) Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev Comp Immunol* 22:63-77.
- Rombout JH, Abelli L, Picchiatti S, Scapigliati G, Kiron V (2011) Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* 31:616-626.



- Rønneseth A, Wergeland HI, Pettersen EF (2007) Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol* 23:493-503.
- Ronza P, Bermúdez R, Losada AP, Robles A, Quiroga MI (2011) Mucosal CD3epsilon+ cell proliferation and gut epithelial apoptosis: implications in rainbow trout gastroenteritis (RTGE). *J Fish Dis* 34:433-443.
- Ronza P, Coscelli G, Losada AP, Bermúdez R, Quiroga MI (2012) Changes in splenic melanomacrophage centres of turbot, *Psetta maxima* (L.), experimentally infected with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). En: Joint Meeting of: 30th Meeting of ESVP and 24th Meeting of SEAPV, León, Spain, libro de resúmenes, p. 252.
- Rudholm T, Wallin B, Theodorsson E, Naslund E, Hellstrom PM (2009) Release of regulatory gut peptides somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal peptide by acid and hyperosmolar solutions in the intestine in conscious rats. *Regul Pept* 152:8-12.
- Rumbo M, Courjault-Gautier F, Sierro F, Sirard JC, Felley-Bosco E (2005) Polarized distribution of inducible nitric oxide synthase regulates activity in intestinal epithelial cells. *FEBS J* 272:444-453.
- S**
- Sahu MK, Swarnakumar NS, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L (2008) Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian J Microbiol* 48:299-308.
- Salinas I, Zhang Y-A, Sunyer JO (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol* 35:1346-1365.
- Sambrook JG, Campbell RD, Elgar G (2003) Characterisation of a gene cluster in *Fugu rubripes* containing the complement component C4 gene. *Gene* 312:73-83.
- Sasaki Y, Maita M, Okamoto N (2002) Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish Shellfish Immunol* 12:243-252.
- Saunders HL, Oko AL, Scott AN, Fan CW, Magor BG (2010) The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol* 34:669-676.
- Scalera G, Tarozzi G (1998) Somatostatin administration modifies food intake, body weight, and gut motility in rat. *Peptides* 19:991-997.
- Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Luder CG (2006) Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology* 132 Suppl:S69-85.
- Schönherz AA, Lorenzen N, Einer-Jensen K (2013) Inter-species transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from turbot (*Scophthalmus maximus*) to rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J Gen Virol* 94:869-875.



- Secombes CJ, Wang T, Bird S (2011) The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol* 35:1336-1345.
- Selleri S, Palazzo M, Deola S, Wang E, Balsari A, Marincola FM, Rumio C (2008) Induction of pro-inflammatory programs in enteroendocrine cells by the Toll-like receptor agonists flagellin and bacterial LPS. *Int Immunol* 20:961-970.
- Seppola M, Robertsen Br, Jensen I (2007) The gene structure and expression of the non-specific cytotoxic cell receptor protein (NCCRP-1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 147:199-208.
- Shah M, Wedgwood S, Czech L, Kim G, Lakshminrusimha S, Schumacker P, Steinhorn R, Farrow K (2013) Cyclic stretch induces inducible nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle cells. *Int J Mol Sci* 14:4334-4348.
- Shibasaki Y, Toda H, Kobayashi I, Moritomo T, Nakanishi T (2010) Kinetics of CD4+ and CD8α+ T-cell subsets in graft-versus-host reaction (GVHR) in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorffii*. *Dev Comp Immunol* 34:1075-1081.
- Shirakashi S, Morita A, Ishimaru K, Miyashita S (2012) Infection dynamics of *Kudoa yasunagai* (Myxozoa: Multivalvulida) infecting brain of cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* in Japan. *Dis Aquat Organ* 101:123-130.
- Silphaduang U, Colorni A, Noga EJ (2006) Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Dis Aquat Organ* 72:241-252.
- Silphaduang U, Noga EJ (2001) Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414:268-269.
- Sirinek LP, O'Dorisio MS (1991) Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. *Acta Oncol* 30:509-517.
- Sitjà-Bobadilla A (2008a) Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol* 25:358-372.
- Sitjà-Bobadilla A (2008b) Fish immune response to Myxozoan parasites. *Parasite* 15:420-425.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Macías MA, Ferreiro I, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (2004) Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol* 17:335-345.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreiro I, Riaza A, Quiroga I, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporidia: Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 21:485-500.
- Sitjà-Bobadilla A, Diamant A, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2007a) Effect of host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei*



- (Myxozoa) to gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., and European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J Fish Dis* 30:243-250.
- Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías MA, Álvarez-Pellitero P (2007b) Protective acquired immunity to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) is related to specific antibodies in *Psetta maxima* (L.) (Teleostei). *Scand J Immunol* 66:26-34.
- Sitjà-Bobadilla A, Calduch-Giner J, Saera-Vila A, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J (2008) Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporidia) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol* 24:610-619.
- Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O (2012) *Enteromyxum* species. En: Woo PTK, Buchmann K (eds) *Fish parasites: pathobiology and protection*. CABI, Wallingford, pp. 163-176.
- Skall HF, Olesen NJ, Møllgaard S (2005) Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J Fish Dis* 28:509-529.
- Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS (2011) Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol* 62:65-73.
- Smail DA, Munro ES (2012) The virology of teleosts. En: Roberts RJ (ed) *Fish Pathology* 4th Edition. Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 186-291.
- Snoek SA, Borensztajn KS, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ (2010) Neuropeptide receptors in intestinal disease: Physiology and therapeutic potential. *Curr Pharm Des* 16:1091-1105.
- Spratt DE, Taiakina V, Palmer M, Guillemette JG (2007) Differential binding of calmodulin domains to constitutive and inducible nitric oxide synthase enzymes. *Biochemistry* 46:8288-8300.
- Stanisz AM (1994) Neuronal factors modulating immunity. *Neuroimmunomodulation* 1:217-230.
- Sterud E, Forseth T, Ugedal O, Poppe TT, Jørgensen A, Bruheim T, Fjeldstad H-P, Mo TA (2007) Severe mortality in wild atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Dis Aquat Organ* 77:191-198.
- Stoyanova II, Gulubova MV (2002) Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 104:185-192.
- Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T (2007) Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Vet Med-Czech* 52:527-539.

**T**

- Tacon AGJ, Metian M (2008) Aquaculture feed and food safety. *Ann NY Acad Sci* 1140:50-59.
- Taechavasonyoo A, Kondo H, Nozaki R, Suzuki Y, Hirano I (2013) Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol* 34:393-396.
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61.
- Toranzo AE, Romalde JL, Magarinos B, Barja JL (2009) Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Méditerranéennes A* 86:155-176.
- Thompson JS (1998) Somatostatin analogue predisposes enterocytes to apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2:167-173.
- Tun T, Ogawa K, Wakabayashi H (2002) Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J Fish Dis* 25:63-72.

U

- Urawa S, Iida Y, Freeman MA, Yanagida T, Karlsbakk E, Yokoyama H (2009) Morphological and molecular comparisons of *Myxobolus* spp. in the nerve tissues of salmonid fishes with the description of *Myxobolus murakamii* n. sp., the causative agent of myxosporean sleeping disease. *Fish Pathol* 44:72-80.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptative immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56:486-503.

V

- van de Vis JW, Poelman M, Lambooij E, Bégout ML, Pilarczyk M (2012) Fish welfare assurance system: initial steps to set up an effective tool to safeguard and monitor farmed fish welfare at a company level. *Fish Physiol Biochem* 38:243-257.
- Van Op den Bosch J, Adriaensen D, Van Nassauw L, Timmermans JP (2009) The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regul Pept* 156:1-8.
- Vera M, Álvarez-Dios JA, Fernández C, Bouza C, Vilas R, Martínez P (2013) Development and validation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers from two



- transcriptome 454-runs of turbot (*Scophthalmus maximus*) using high-throughput genotyping. *Int J Mol Sci* 14:5694-5711.
- Vigliano F, Bermúdez R, Quiroga MI, Vázquez S, Alemañ N, Nieto JM (2004) Dinámica de proliferación de células rodlet y mucosas en el tubo digestivo de rodaballos infectados experimentalmente con *Enteromyxum scophthalmi*. En: 12th Annual Meeting of the SPPA jointly with 16th Annual Meeting of the SEAPV, Vila Nova de Famalição, Portugal, libro de resúmenes, erratum, p. 10.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:467-471.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Nieto JM, Quiroga MI (2009) Development of rodlet cells in the gut of turbot (*Psetta maxima* L.): relationship between their morphology and S100 protein immunoreactivity. *Fish Shellfish Immunol* 26:146-153.
- Vigliano FA, Losada AP, Castello M, Bermúdez R, Quiroga MI (2011a) Morphological and immunohistochemical characterisation of the thymus in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.). *Cell Tissue Res* 346:407-416.
- Vigliano FA, Muñoz L, Hernández D, Cerutti P, Bermúdez R, Quiroga MI (2011b) An immunohistochemical study of the gut neuroendocrine system in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes). *J Fish Biol* 78:901-911.
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19:9-12.
- Volkoff H, Eykelbosh AJ, Peter RE (2003) Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: Interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res* 972:90-109.
- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol* 142:3-19.

W

- Wang C, Hu Y, Sun B, Chi H, Li J, Sun L (2013) Environmental isolates P1SW and V3SW as a bivalent vaccine induce effective cross-protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Dis Aquat Organ* 103:45-53.
- Wang P-C, Huang J-P, Tsai M-A, Cheng S-Y, Tsai S-S, Chen S-D, Chen S-P, Chiu S-H, Liaw L-L, Chang L-T (2005) Systemic infection of *Kudoa lutjanus* n. sp. (Myxozoa:



- Myxosporea) in red snapper *Lutjanus erythropterus* from Taiwan. Dis Aquat Organ 67:115-124.
- Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Lester RJG, Findlav V, Kent ML (2003) First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). J Eukaryot Microbiol 50:215-219.
- Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225:1449-1452.

Y

- Yaguchi K, Kayaba S, Soga H, Yamagishi M, Tamura A, Kasahara S, Ohara S, Satoh J, Oka Y, Toyota T, Itoh T (2004) DNA fragmentation and detachment of enterocytes induced by anti-CD3 mAb-activated intraepithelial lymphocytes. Cell Tissue Res 315:71-84.
- Yanagida T, Nomura Y, Kimura T, Fukuda Y, Yokoyama H, Ogawa K (2004) Molecular and morphological redescrptions of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. Fish Pathol 39:137-144.
- Yanagida T, Sameshima M, Nasu H, Yokoyama H, Ogawa K (2006) Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). J Fish Dis 29:561-567.
- Yasuda H, Ooyama T, Iwata K, Tun T, Yokoyama H, Ogawa K (2002) Fish-to-fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. Fish Pathol 37:29-33.
- Yasuda H, Ooyama T, Nakamura A, Iwata K, Palenzuela O, Yokoyama H (2005) Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 40:175-180.
- Yemmen C, Marton S, Eszterbauer E, Bahri S (2012) *Ceratomyxa aegyptiaca* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) from the gall-bladder of *Solea aegyptiaca* Chabanaud (Pleuronectiformes: Soleidae) in a Tunisian coastal lagoon. Syst Parasitol 83:21-28.
- Yokoyama H, Inoue D, Kumamaru A, Wakabayashi H (1997) *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporea) forms large-and small-type. Fish Pathol 32:211-217.
- Yokoyama H, Liyanage YS, Sugai A, Wakabayashi H (1998) Hemorrhagic thelohanellosis of color carp (*Cyprinus carpio*) caused by *Thelohanellus hovorkai* (Myxozoa: Myxosporea). Fish Pathol 33:85-89.



- Yokoyama H, Inoue D, Sugiyama A, Wakabayashi H (2000) Polymerase chain reaction and indirect fluorescent antibody technique for the detection of *Kudoa amamiensis* (Multivalvulida: Myxozoa) in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol* 35:157-162.
- Yokoyama H, Kawakami H, Yasuda H, Tanaka S (2003) *Henneguya lateolabracis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of cardiac henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. *Fisheries Sci* 69:1116-1120.
- Yokoyama H, Whipps CM, Kent ML, Mizuno K, Kawakami H (2004) *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: Causative agent of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol* 39:79-85.
- Yokoyama H, Freeman MA, Itoh N, Fukuda Y (2005a) Spinal curvature of cultured Japanese mackerel *Scomber japonicus* associated with a brain myxosporean, *Myxobolus acanthogobii*. *Dis Aquat Organ* 66:1-7.
- Yokoyama H, Itoh N, Tanaka S (2005b) *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* 28:479-487.
- Yokoyama H, Grabner D, Shirakashi S (2012) Transmission biology of the Myxozoa. En: Carvalho ED, David GS, Silva RJ (eds) Health and environment in aquaculture. InTech, Rijeka, p 3-42.
- Yu LP, Hu YH, Sun BG, Sun L (2012) C312M: an attenuated *Vibrio anguillarum* strain that induces immunoprotection as an oral and immersion vaccine. *Dis Aquat Organ* 102:33-42.

Z

- Zhang J, Meng F, Yokoyama H, Miyahara J, Takami I, Ogawa K (2010) Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Japan. *Fisheries Sci* 76:981-990.
- Zhang YA, Salinas I, Oriol Sunyer J (2011) Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol* 31:627-634.
- Zhao K, Huang Z, Lu H, Zhou J, Wei T (2010) Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Biosci Rep* 30:233-241.
- Zheng Z, Yingeng W, Qingyin W, Nannan D, Meijie L, Jiangbo Q, Bin L, Lan W (2012) Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish Shellfish Immunol* 32:391-395.



Zhou L, Wang X, Liu Q, Wang Q, Zhao Y, Zhang Y (2010) A novel multivalent vaccine based on secretary antigen-delivery induces protective immunity against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *J Biotechnol* 146:25-30.

Zhu LY, Pan PP, Fang W, Shao JZ, Xiang LX (2012) Essential role of IL-4 and IL-4R α interaction in adaptive immunity of zebrafish: insight into the origin of Th2-like regulatory mechanism in ancient vertebrates. *J Immunol* 188:5571-5584.







7. ARTÍCULO I: LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY OF TURBOT ENTEROMYXOSIS

Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis

Bermúdez R¹, Losada AP², Vázquez S², Redondo MJ³, Álvarez-Pellitero P³, Quiroga MI²

¹Department of Anatomy and Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

²Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

³Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.



7.1. Abstract

In the last decade, a new parasite that causes severe losses has been detected in farmed turbot *Psetta maxima* (L.), in north-western Spain. The parasite was classified as a myxosporean and named *Enteromyxum scophthalmi*. The aim of this study was to characterize the main histological changes that occur in *E. scophthalmi*-infected turbot. The parasite provoked catarrhal enteritis, and the intensity of the lesions was correlated with the progression of the infection and with the development of the parasite. Infected fish were classified into 3 groups, according to the lesional degree they showed (slight, moderate and severe infections). In fish with slight infections, early parasitic stages were observed populating the epithelial lining of the digestive tract, without eliciting an evident host response. As the disease progressed, catarrhal enteritis was observed, the digestive epithelium showed a typical scalloped shape and the number of both goblet and rodlet cells was increased. Fish with severe infections suffered desquamation of the epithelium, with the subsequent release of parasitic forms to the lumen. The dislodged enterocytes underwent anoikis, a mode of apoptosis triggered by the loss of anchorage, which might facilitate spreading of the parasite. Lymphohaematopoietic depletion was also observed, mainly in head kidney and spleen, which could contribute to the high virulence of this parasite.



7.2. Introduction

Members of the phylum Myxozoa are common parasites of fish and some invertebrates and are also the causative agents of several economically important diseases in wild and farmed fish stocks (Feist 2008). In the last few years, due to the phenomenal increase in fish aquaculture, concerns regarding myxosporean infections have increased significantly (Diamant et al. 1994, Feist 2008, Kent et al. 2001, Lom & Dyková 2006, Palenzuela 2006). Although enormous advances have been made in the last few decades in aspects of myxozoan phylogeny and taxonomy (Bartosová et al. 2009, Fiala 2006), the whole life cycle of many species remains unknown. Due to this fact and to the lack of effective treatments (Athanasopoulou et al. 2004, Bermúdez et al. 2006a, Yokoyama et al. 1990), prevention and control of myxosporean infections is particularly difficult.

Although the vast majority of Myxosporea develops in any part of the fish body (Lom & Dyková 1995, 2006, Molnár 2007), few of them are described from enteric locations (Álvarez-Pellitero et al. 2008, Lom & Dyková 1995, 2006, Padrós et al. 2001). *Ceratomyxa shasta*, causing an important disease in salmonids, invades the intestinal epithelium, though the infection may become disseminated to several organs (Bartholomew et al. 1989). Among myxosporeans with only enteric infection, species of the genus *Enteromyxum* deserve special mention. *Enteromyxum leei* causes high mortalities in the sea bream *Sparus*



aurata L. and other sparids in Mediterranean areas (Álvarez-Pellitero et al. 2008, Fleurance et al. 2008, Padrós et al. 2001).

Another species was initially described in farmed turbot, *Psetta maxima* (L.), in north-western Spain, causing rates of morbidity and mortality of 100% in all fish infected during the epizootic outbreaks (Branson et al. 1999). Infected fish suffer a progressive destruction of the gut due to severe catarrhal enteritis that leads to a cachectic syndrome and death. By means of morphological and ribosomal RNA studies, this parasite was classified as a myxozoan and named *Enteromyxum scophthalmi* (Palenzuela et al. 2002).

Studies concerning *E. scophthalmi* infections in turbot have been focused on the epidemiology and immunopathology of the disease (Bermúdez et al. 2006b, Palenzuela et al. 2002, Redondo et al. 2004, Quiroga et al. 2006, Sitjà-Bobadilla et al. 2006, 2008) rather than on the lesions that it induces in host tissues. Therefore, scarce data exist on the histological changes that enteromyxosis causes in turbot.

The aim of the present study was to characterize the histological changes that occur in *E. scophthalmi*-infected turbot by using light and electron microscopy studies, in order to obtain a complete profile of the disease from a morphopathological point of view.



7.3. Materials and Methods

7.3.1. Animals

Infected juvenile turbot *P. maxima* (weight: 50 to 300 g) were obtained in north-western Spain from several *E. scophthalmi*-affected farms suffering serious mortality records due to the parasite (Redondo et al. 2004, Redondo 2005, Quiroga et al. 2006), as well as from experimental infections performed orally or by cohabitation (mean weight: 161 g) (Bermúdez et al. 2006a, Redondo et al. 2002, 2004, 2006b, Sitjà-Bobadilla et al. 2006). Uninfected control fish were hatched and reared in a flow-through supply of cartridge-filtered (1 µm mesh) and UV-irradiated seawater, ensuring a microbe-free water supply.

Three groups of infected fish were established according to the lesional degree: (1) slight, (2) moderate and (3) severe infections. The criteria employed to classify these individuals are summarized in table 1.

Lesional degree	External signs	Infected digestive folds (%)	Intensity	<i>E. scophthalmi</i> stages	Desquamation	Inflammatory cells
Slight	-/+	<30	+	1-2	-	-/+
Moderate	++	30-80	++	2-3	+ / ++	+ / ++
Severe	+++	>80	+++	2-5	+++	+ / +++

Table 1: *Psetta maxima* and *Enteromyxum scophthalmi*. Classification of infected turbot into 3 groups, according to their lesional degree: absent (-), light (+), moderate (++) and severe (+++). Infection intensity in each intestinal fold was evaluated in the histological sections on a scale of 1+ to 3+, according to the number of parasite stages present in microscope fields at 300x magnification (Quiroga et al. 2006). *E. scophthalmi* developmental stages are given according to Redondo et al. (2004).



7.3.2. *Sampling procedure*

Fish were sacrificed by chilling on ice and spinal cord severance or by overexposure to the anaesthetic MS-222 (Sigma). Tissue samples were collected from the gastrointestinal tract (oesophagus, stomach, pyloric caeca and anterior, medium and posterior gut), kidney, spleen, liver, pancreas, heart, muscle, skin and gills.

7.3.3. *Light microscopy (LM)*

The aforementioned fish tissues were routinely fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Thin sections (1 to 3 μm) were stained with haematoxylin and eosin, Giemsa, toluidine blue and periodic acid-Schiff (PAS) methods.

7.3.4. *Transmission electron microscopy (TEM)*

Small pieces of gut, spleen, kidney and detached intestinal mucosa were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3), for 1 h at 4°C. The liquid present in the digestive tract of some infected fish was collected with a syringe. After confirming the presence of parasitic stages by LM, this liquid was centrifuged at 365 x g and the pellet fixed as above. Samples were post-fixed in 1% (w/v) cacodylic OsO_4 , dehydrated through a graded ethanol series, and embedded in Spurr's or epoxy resin. Semi-thin sections (500 nm) were stained with toluidine blue, while ultrathin sections (80 nm) were double stained with uranyl acetate and lead citrate.



7.4. Results

7.4.1. *Clinical signs and macroscopic lesions*

Initial signs of infection included lethargy and anorexia. As the disease progressed to severe, affected turbot *Psetta maxima* showed external signs consisting of emaciation, endophthalmia and a typical prominent bony ridge on the skull (fig. 1). The main macroscopic lesions consisted of the presence of serosanguineous effusion in the coelomic cavity and hyperemic areas affecting intestinal serosal surfaces, as well as of accumulation of liquid within the digestive tract. Mild splenomegaly was occasionally seen (fig. 1).

7.4.2. *Histopathological changes in the course of infection*

Both the morphopathological changes and the intensity of the lesions varied in the infected fish as the disease progressed. All developmental myxosporidian stages described here occurred in an intercellular position. Turbot belonging to the control group did not show any histological changes and no myxozoan stages occurred in these fish.

7.4.2.1. Slight infections

LM observations

The most evident alteration was the occurrence of early developmental stages of *E. scophthalmi* within the basal part of the epithelium of the digestive tract, without eliciting noticeable histological changes (fig. 2). In general, the infection was first detected in the pyloric caeca or the anterior intestine, and, from there, the parasite proliferated and



extended both upwards and downwards through the digestive tract. Few parasites infiltrated the lining epithelium, and only some intestinal folds were affected. Some rounded, basophilic structures deserve special attention, since they resembled either early stages of the myxozoan (trophozoites) or apoptotic figures, hindering the histological diagnosis of the disease (fig. 3). An additional finding in fish with scarce infection was the increase in the relative number of goblet and rodlet cells in the intestinal mucosa, in some cases proximal to the parasite (figs. 4 to 6). In contrast, inflammatory infiltrates, when present, were slight and mainly consisted of mononuclear cells located within the lamina propria-submucosa and/or the basal part of the digestive epithelium. No evident changes in the other studied organs of fish with slight infection were noticed.

TEM observations

The epithelial architecture of infected turbot did not substantially differ from the normal simple columnar epithelium. Cells were cylindrical and polarized, with an apical side possessing microvilli forming the brush border, a basolateral side adhering to the basement membrane and adhering laterally to each neighbouring cell through diverse specialized intercellular junctions. Most enterocytes showed the normal structure with a basally located nucleus, numerous mitochondria, rough endoplasmic reticulum and some lysosomes. Rodlet and goblet cells were easily observed within a single TEM field due to their increased number, and in some cases they appeared releasing their content (fig. 7). In only a few cases, epithelial lining cells showed changes in their arrangement and structure. These cells were generally in close contact with parasitic forms and showed a



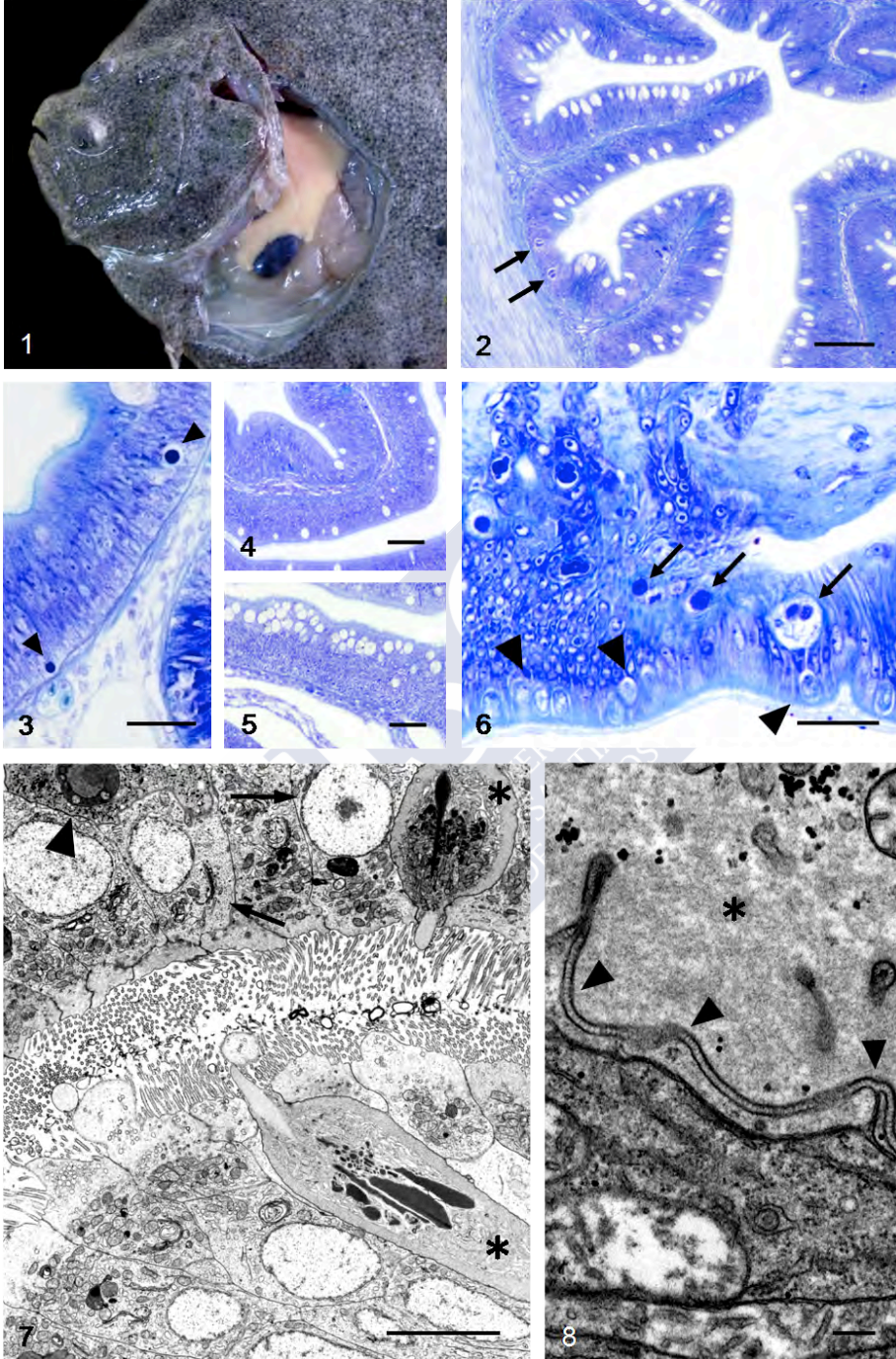
more electron-lucid cytoplasm accompanied with loss of cytoplasmic organelles and changes in the organization of the chromatin pattern (fig. 7). Some parasite plasmodia were seen closely attached to 2 or more adjacent epithelial cells by means of prominent and numerous interdigitated cytoplasmic projections, forming specialized junctions with the membrane of the host cell (fig. 8).

7.4.2.2. Moderate infections

LM observations

As the infection progressed, both the number of *E. scophthalmi* stages within the epithelium and the amount of infected gastrointestinal areas increased (fig. 9). Furthermore, different developmental stages of the parasite could be observed since they matured synchronically. The parasites appeared in the mucosa of all portions of the digestive tract, but the highest parasitic burden was present in the pyloric caeca and anterior gut. A few parasitic forms were also detected in the lining epithelium of the stomach and in the gastric glands, but only scant mucosal damage was observed at this level.

Fish with moderate infections showed mild to moderate catarrhal enteritis, with the epithelial lining of some gastric areas and intestinal folds displaying a typical scalloped apical margin and vacuolation at the base of the epithelium (figs. 9 & 10). A few enterocytes, mostly those located close to the parasites, displayed hypertrophied nuclei with central migration of chromatin and peripheral clearing of the nucleus (fig. 10).





Figures 1 to 8: *Psetta maxima* and *Enteromyxum scophthalmi*. **1:** Macroscopic photograph of an *E. scophthalmi*-infected turbot *P. maxima* with prominent bony ridges and exophthalmia due to cachexy. Note also the generalized hyperaemia in the organs within the celomic cavity, splenomegaly and dilated gut. Turbot intestines from control (**4**) and infected (**2, 3, 5, 6**) fish corresponding to slight infection. Light microscopy micrographs were stained with toluidine blue. **2:** Parasitized pyloric caeca without evident histological changes. Early parasitic forms appear at the base of the epithelium (arrows). Bar = 60 μm . **3:** Basophilic, rounded forms (arrowheads), mainly located at the base of the digestive epithelium, that may resemble either myxosporean trophozoites or apoptotic patterns. Bar = 20 μm . **4:** Histological section of the medium intestine of a control turbot, displaying typical enteric morphology with a moderate number of mucous cells. Bar = 30 μm . **5:** Histological section of the medium intestine of an *E. scophthalmi*-infected turbot, showing a distinct increase in the number of goblet cells when compared with **4**. Bar = 30 μm . **6:** Different developmental stages of *E. scophthalmi* (arrows) within the epithelial lining of the stomach accompanied by numerous rodlet cells (arrowheads). Bar = 20 μm . **7:** TEM micrograph of the pyloric caeca of an infected turbot. Some enterocytes display a more electron-lucid cytoplasm and changes in the arrangement of chromatin pattern (arrows). Two secreting rodlet cells (asterisks), as well as a parasitic stage (arrowhead) are shown. Bar = 5 μm . **8:** Myxosporean plasmodium (asterisk) attached to the adjacent epithelial cells by means of numerous cytoplasmic projections (arrowheads). Bar = 0.2 μm .

Though, digestive areas displaying a lesser parasitic load even exhibited an almost normal architecture. The number of rodlet and goblet cells remained unchanged or even suffered a slight reduction, sometimes accompanied by loss of their content, when compared to turbot with slight infections.

The inflammatory reaction present in the lamina propria–submucosa was scarce or moderate, but it usually occurred in those folds where the number of parasites was high. In these cases, mild dilation of submucosal sanguineous capillaries and lymphangiectasia could be seen (fig. 11). In addition, some small, rounded immune cells identified as lymphocytes were observed infiltrating the basal part of the epithelium (fig. 12). However, a direct relationship between the number of parasitic forms populating the epithelium and the magnitude of the inflammatory response was not always evident, that is, turbot with a moderate number of parasite forms could exhibit either evident or mild inflammatory infiltrates. Occasionally, small

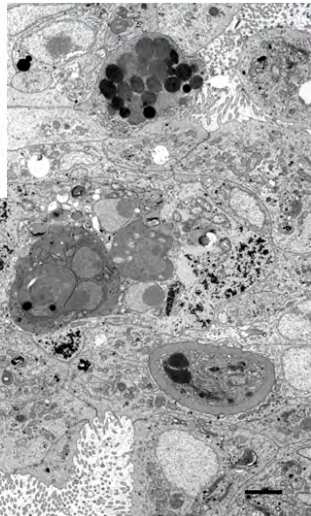
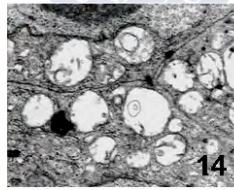
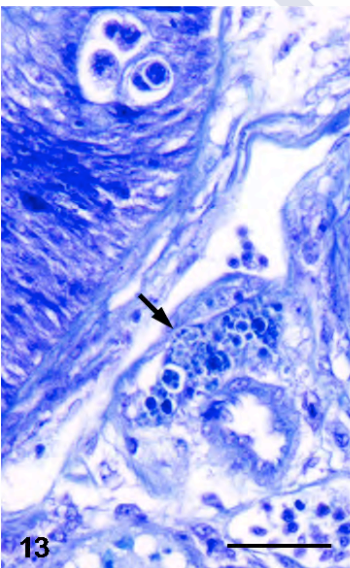
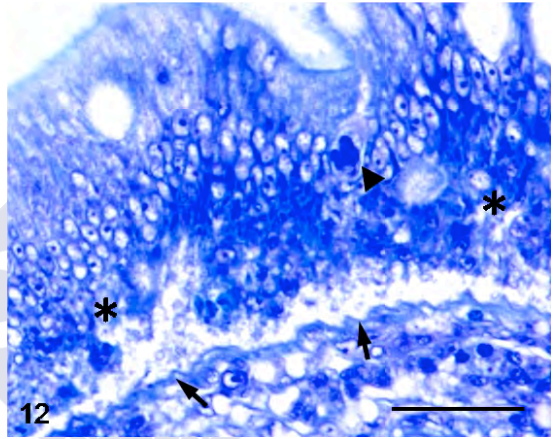
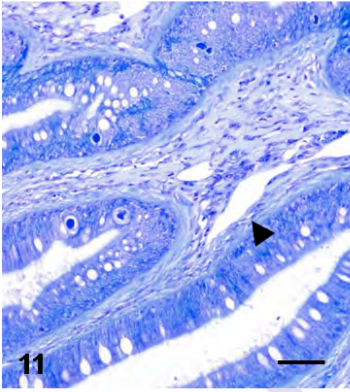
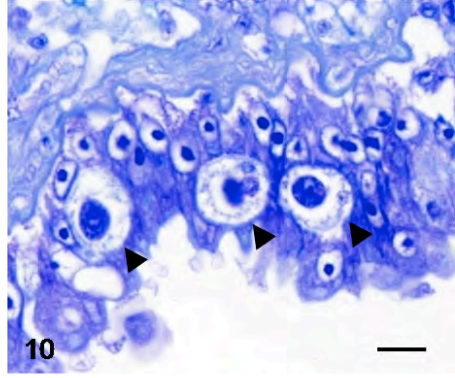
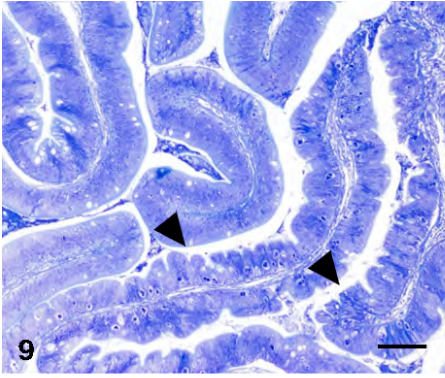


melanomacrophage centres (MMCs) were detected within the lamina propria-submucosa, generally close to submucosal vessels (fig. 13).

Within the lymphohaematopoietic organs (thymus, spleen and anterior kidney), an increase in the number of cells with either necrotic or apoptotic shape occurred, and a scarce number of parasitic forms, mostly in apoptosis and sometimes engulfed by macrophages, were observed at this level. The MMCs present in spleen and anterior kidney were generally bigger and more abundant than those that occurred in fish with slight infections.

The rest of the studied organs showed a normal structure although *E. scopthalmi* stages were identified in the gill filaments, adhering to the fish tegument and also in the bile ducts. No evident host response was observed at these locations.

Figures 9 to 15: *Psetta maxima* and *Enteromyxum scopthalmi*. Photographs of turbot tissues infected with *E. scopthalmi* corresponding to moderate infection. Light microscopy micrographs were stained with toluidine blue. **9:** Different developmental stages of *E. scopthalmi* in the pyloric caeca. The affected intestinal folds acquire a typical scalloped apical margin (arrowheads), while uninfected folds show physiological morphology. Bar = 60 μ m. **10:** Enterocytes proximal to parasites (arrowheads), showing structural changes that mainly consisted of hypertrophy of the nuclei with central migration of chromatin and peripheral clearing of the nucleus. Bar = 6 μ m. **11:** Slight inflammatory reaction in the lamina propria-submucosa of anterior intestine, mainly compounded by mononuclear cells. Note the dilation of sanguineous capillaries in the submucosa (arrowhead). Bar = 30 μ m. **12:** Inflammatory infiltrates, mainly compounded by mononuclear cells, located at the basal part of the epithelium of the anterior intestine. Note also the vacuolization (asterisks), the incipient dislodging at the basis of the epithelial lining (arrows) and the parasitic form (arrowhead). Bar = 20 μ m. **13:** Melanomacrophage centre (arrow) located close to a vessel within the lamina propria-submucosa of the anterior intestine. Bar = 20 μ m. **14:** Detail of the enterocyte mitochondrial damage, with effacement of the cristae. **15:** TEM micrograph of pyloric caeca. *E. scopthalmi* stage can be observed attached to the epithelial cells. Note the alteration of the enterocytes, which display chromatin condensation and decrease in the cytosol density. Bar = 2 μ m.





TEM observations

The alteration of enterocytes, mainly those in close contact with the parasite, was notable, showing swollen mitochondria with effacement of cristae (fig. 14), loss of microvilli, chromatin condensation and decrease in cytosol electron density (fig. 15). Pathological changes in the intestinal folds also included edema and mild vacuolation at the level of basal lamina. As the disease progressed, parasitic stages further increased in number and size, and both proliferative and less abundant sporogonic stages were observed. Some inflammatory cells were detected at the basal level of the epithelium (mainly lymphocytes) and in the lamina propria-submucosa (lymphocytes, granulocytes and macrophages).

7.4.2.3. Severe infections

LM observations

In more advanced infections, parasitic stages were seen in all the studied portions of the digestive tract, from the stomach to the rectum. The epithelium, showing the typical scallop shape, suffered critical damage, with the enterocytes displaying a foamy appearance and either necrotic or apoptotic morphologies (fig. 16). The rodlet and goblet cells underwent a dramatic decrease in their number at this phase of infection, being almost absent in some intestinal folds. Finally, the epithelial lining detached from the subepithelial tissue and indicators of apoptosis, namely, cell rounding and shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation, were present in the isolated dislodged enterocytes (fig. 17). Parasitic stages accompanied desquamated epithelial cells which formed clusters of debris that were



released to the lumen (fig. 17). Sometimes, such dislodged cells showed large rounded empty spaces (fig. 18).

As a consequence of epithelial detachment, completely denuded folds could be seen during this phase of infection (fig. 19). In a few turbot some regeneration of the epithelial lining was observed after detachment and, in these cases, intestinal folds appeared covered with squamous or low cubic cells (fig. 20). The number of *E. scopthalmi* sporogonic stages increased in this phase, though few mature spores, showing metachromasia of their polar capsule with toluidine blue technique, were detected in few fish.

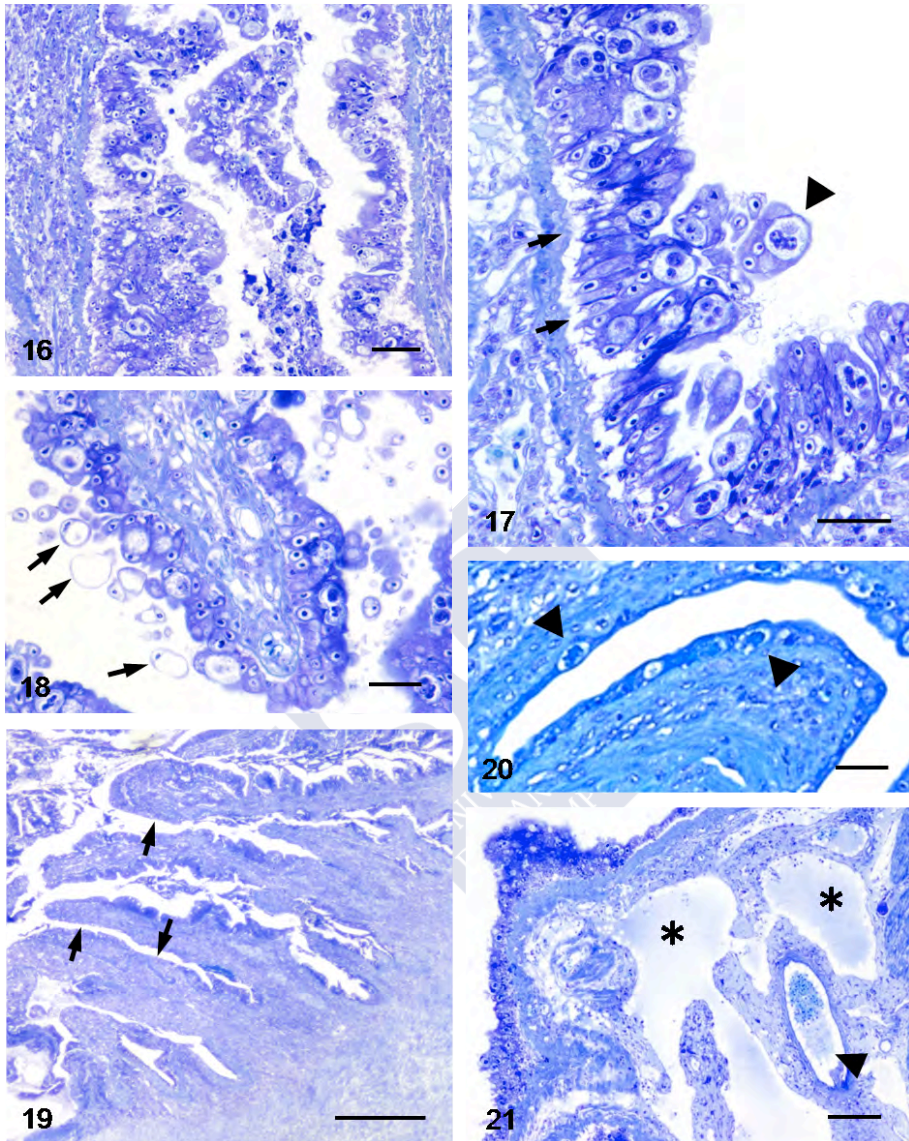
Secondary bacterial infections were occasionally found in association with the presence of *E. scopthalmi*. In these cases, bacteria appeared in the lumen and/or attached to the apical surface of enterocytes. The inflammatory infiltrates observed in the lamina propria-submucosa did not substantially differ from those observed in fish with moderate infections. In some fish the inflammatory reaction was extremely widespread, but in others, which showed evident epithelial damage and huge parasitic load, the recruitment of inflammatory cells was limited. Several cells in the lamina propria-submucosa displayed early signs of necrosis characterized by cytoplasmic eosinophilia and nuclear pyknosis. The MMCs at this level, when present, were not as evident as in fish with moderate infections. The dilatation of blood and lymphatic vessels of the lamina propria-submucosa was extremely apparent (fig. 21).



In fish with severe digestive lesions, cellular depletion became evident in lymphohaematopoietic regions of spleen and kidney, but this feature was not always accompanied by a high number of necrotic and apoptotic cells.

TEM observations

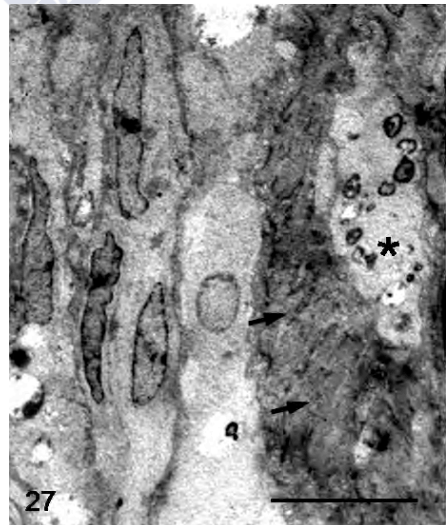
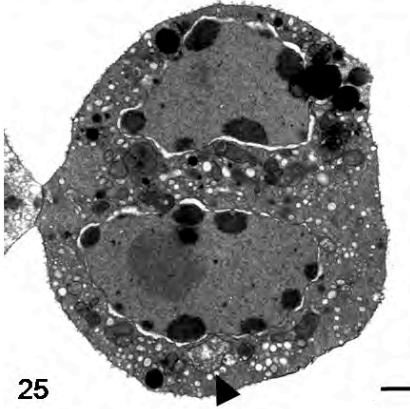
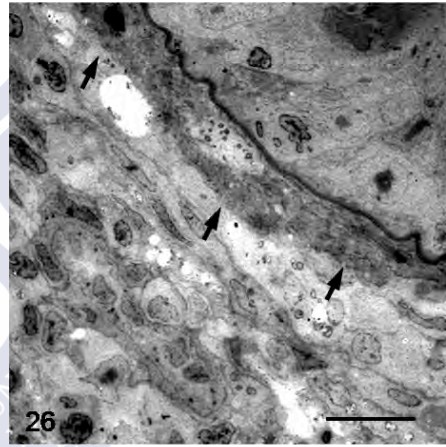
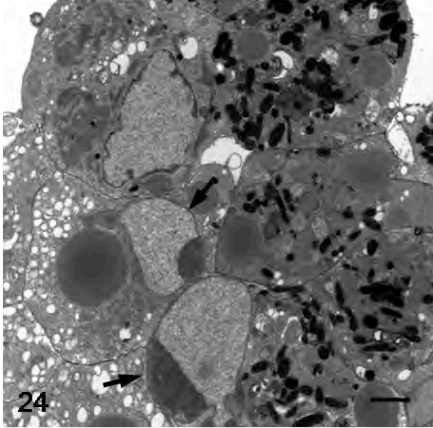
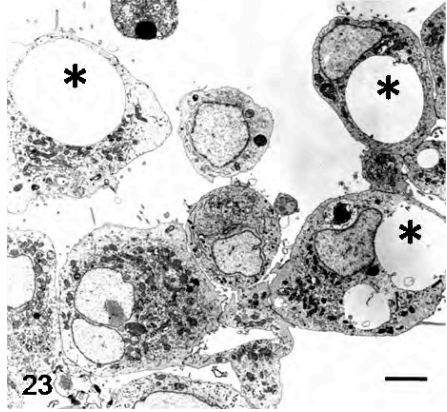
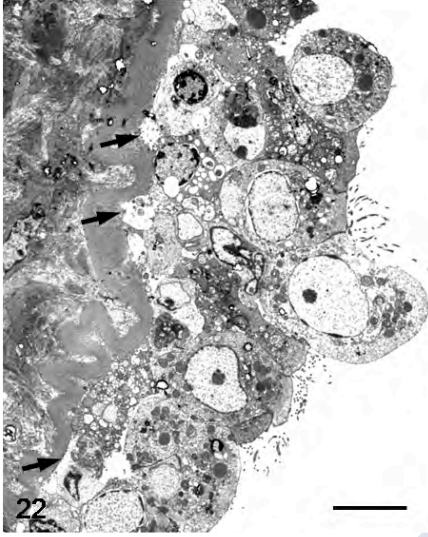
The enterocytes showed evident pathological changes, including loss of adhesion to the basement lamina (with edematous spaces clearly demarcated by deposition of amorphous, electronlucent material), and disruption of lateral cell–cell connections. Thus, enterocytes became isolated and changed to a spherical shape, with loss of polarization and disorganization or loss of the apical brush border (fig. 22). Clusters of rounded, degenerated and detached epithelial cells, some of which contained parasitic forms, were observed. Some of them showed empty spaces of different sizes corresponding to those observed in LM (fig. 23). Cells from the clusters with empty spaces displayed peripheral migration of the nucleus. Some isolated epithelial cells showed evident apoptotic alterations, including cell rounding and fragmentation and/or nuclear condensation (figs. 24 & 25). Significant ultrastructural changes were present at the level of the connective tissue underlying the mucosal epithelium, appearing thin and grossly disorganized (figs. 26 & 27). In some cases, many cells of the lamina propria, as well as cells from haematopoietic areas of the spleen and kidney, showed advanced signs of necrosis, such as cytoplasmic vacuolation and karyorrhexis.



Figures 16 to 21: *Psetta maxima* and *Enteromyxum scopthalmi*. Light microscopy photographs of turbot tissues infected with *E. scopthalmi* corresponding to severe infection. Toluidine blue stain. **16:** Micrograph of anterior intestine, showing detachment of the epithelial lining from the subepithelial tissue and epithelial remnants in the intestinal lumen. Bar = 30 μm . **17:** Epithelial detachment in the anterior intestine. Note the edematous space between the lamina basal and the dislodged epithelial cells (arrows), as well as the structural changes of the enterocytes, namely, cell rounding and shrinkage. An *E. scopthalmi* stage enveloped by dislodged epithelial cells in the intestinal lumen can be seen (arrowhead). Bar = 20 μm . **18:** Several clusters of dislodged epithelial cells in the lumen, some of them possessing large rounded empty spaces (arrows). Bar = 20 μm . **19:** Pyloric caeca displaying some completely denuded folds (arrows) and a moderate number of inflammatory cells in the lamina propria-submucosa. Bar = 120 μm . **20:** Micrograph of the anterior intestine. Intestinal fold covered with low cubic cells due to reepithelialization. Note that the new epithelium has already been invaded by the myxozoan (arrowheads). Bar = 20 μm . **21:** Extreme dilatation of blood (arrowhead) and lymphatic (asterisks) vessels in the lamina propria-submucosa of the posterior intestine. Bar = 60 μm .



Figures 22 to 27: *Psetta maxima* and *Enteromyxum scophthalmi*. TEM micrographs of turbot tissues infected with *E. scophthalmi* corresponding to severe infection. **22:** Anterior intestine. Altered enterocytes with a spherical shape, loss of polarization and loss of apical microvilli. Deposition of amorphous, electron-lucent material (arrows) indicates remnants of adhesion between the epithelium and the basal membrane. Bar = 5 μm . **23:** Anterior intestine containing clusters of rounded, degenerated and detached enterocytes with empty spaces of different sizes (asterisks). Bar = 2 μm . **24:** Micrograph of esophagic dislodged cells. Some isolated cells showed evident apoptotic alterations, including cell rounding and fragmentation and/or nuclear condensation (arrows). Bar = 1 μm . **25:** Enterocyte with incipient apoptotic nuclear alterations (fragmentation and condensation of the chromatin at the periphery of the nucleus). Swollen mitochondria showing effacement of cristae are visible (arrowhead). Bar = 1 μm . **26:** Lamina propria-submucosa of pyloric caeca. The connective tissue underlying the mucosal epithelium appeared thin and grossly disorganized (arrows). Many of inflammatory cells located populating the lamina propria-submucosa showed advanced features of both apoptosis and necrosis. Bar = 10 μm . **27:** Higher magnitude micrograph of **24**. Note the disorganization of collagen fibres (arrows), as well as the apoptotic cells embedded in the basal membrane (asterisk). Bar = 5 μm .





7.5. Discussion

Turbot *P. maxima* infected with *E. scophthalmi* became emaciated and finally died with a cachectic syndrome. The external appearance of these fish and the joint hyperaemic appearance of the gut were considered by Branson et al. (1999) to be pathognomonic signs of the disease, although these lesions might also be seen in fish suffering from other chronic diseases. Of the histological techniques used, PAS, Giemsa and toluidine blue proved to be the most useful stains to identify the parasite in tissues. Parasitic stages occurred almost exclusively within the epithelium throughout the digestive tract. However, some developmental forms were occasionally detected and confirmed by in situ hybridization (results not shown) in the enteric submucosa and in other locations, such as the gill filaments, skin, bile ducts and lymphohaematopoietic organs (spleen and kidney), as previously described by Redondo et al. (2002, 2004). The few parasites found in these organs did not produce lesions, which suggests that such organs might be involved in the invasion or dispersion of the parasite, but they are not target organs. Redondo et al. (2004) also found parasite stages in blood smears, which indicate the role of the vascular system in the parasite's spreading within the fish. These early stages in the digestive submucosa and lymphohaematopoietic organs may have undergone erratic migration, as they occasionally appeared to be engulfed in macrophages, as previously reported (Redondo et al. 2004).



The histopathological study demonstrated the harmful effect of the parasite chiefly on the digestive epithelium. In addition, a variable number of inflammatory cells occurred in the lamina propria-submucosa, as well as in the basal part of the lining epithelium. In several other myxosporean infections no inflammatory response was associated with the presence of the parasite (Adriano et al. 2005, Ali et al. 2003, Barassa et al. 2003, Moran et al. 1999). However, *E. scophthalmi* can elicit a strong inflammatory host response in addition to the direct deleterious effects on the gastrointestinal mucosa. Other enteric myxozoans, such as *C. shasta* (Bartholomew et al. 1989) and *E. leei* (Álvarez-Pellitero et al. 2008, Fleurance et al. 2008) also induce an important inflammatory reaction. In the case of *E. leei*, both the severity of the histological lesions and the elicited immune response vary greatly depending on the host species (Álvarez-Pellitero et al. 2008, Fleurance et al. 2008, Padrós et al. 2001). Similarly, the current results on turbot enteromyxosis demonstrated that the inflammatory response in the digestive tract was not always correlated with the number of parasites populating the epithelium, as has been previously reported (Bermúdez et al. 2006b, Sitjà-Bobadilla et al. 2006, 2007).

An interesting finding was the initial increase in the amount of both rodlet and goblet cells, followed by a decrease in their number in fish suffering severe infections (Vigliano et al. 2004). Such cell types are accepted to be involved in fish response to different pathogens, and the modification in their relative number has been described for several fish species suffering diverse infections or parasitic diseases (Dezfuli et al. 2008, Fleurance et al. 2008, Mazon et al. 2007, Reite 2005). The



low number of mucous and rodlet cells found in fish with severe infections may simply be attributed to the serious damage of the epithelium, which becomes unable to support these cells.

In the present study, developmental (proliferative and sporogonic) stages of *E. scopthalmi* were found in the digestive epithelium, and the increasing severity of damage correlated with the proliferation and maturation of the parasite and subsequent progression of the infection. A similar situation was described by Redondo et al. (2002, 2004) for turbot enteromyxosis and by Álvarez-Pellitero et al. (2008) for *E. leei* infecting *Diplodus puntazzo*. In incipient phases of turbot enteromyxosis, the similarity between the early developmental stages of *E. scopthalmi* and cells undergoing apoptosis was noteworthy, especially when both of them were located at the basal level of the epithelium (Redondo et al. 2004). This fact hinders the histological diagnosis of the disease at the beginning of the infection, but the employment of specific histological techniques (TUNEL, anti-caspase-3 and anti-*E. scopthalmi* antibodies and in situ hybridization) may be used to distinguish between parasitic forms and apoptotic cells (Redondo 2005, authors' unpubl. obs.).

E. scopthalmi plasmodia occupied an intercellular position attached to the epithelial cells by means of cytoplasmic projections, although, in previous observations, some intracellular early stages were rarely seen (Redondo et al. 2003). *Zschokkella mugilis* and *Tetracapsuloides bryosalmonae* form similar folds and windings between intraepithelial plasmodia and the surrounding epithelial cells (Morris & Adams 2008, Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993). These structures together



with their junctions play roles in attachment and communication with host cells. Not only the acquisition of nutrients by the myxosporean through this linkage may contribute to the epithelial injury observed, but also the compression suffered by epithelial cells as the disease progresses and the number and size of parasitic forms increases (Barassa et al. 2003, El-Mansy & Bashtar 2002).

When the infection progressed, parasite stages invaded nearly every fold in the digestive tract and parasitic stages accompanied by dislodged epithelial cells formed clusters of debris that were released to the lumen. The detached enterocytes showed features of apoptosis such as cell rounding and shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation. These detached epithelial cells underwent anoikis, a mode of apoptosis triggered by the loss of anchorage, as described by do Vale et al. (2007) in *Dicentrarchus labrax* infected with *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. Infectious agents are able to induce apoptosis in host cells (Abbasi et al. 2003, Boettner & Petri 2005) and even that apoptosis and epithelial proliferation are increased in those epithelia under infective pressure (do Vale et al. 2007, Von Herbay & Rudy 2000). In turbot enteromyxosis it remains unclear if the increase in apoptotic rates in the lining epithelium is induced by the etiologic agent or the anoikis is an attempt to prevent the local spread of the pathogen (Sherman & Petrak 2005). Nevertheless, in studies conducted by Redondo et al. (2003), the authors interpreted that the epithelial remnants covering the parasites protect them and help to retain their viability in seawater. Therefore, it is possible that anoikis suffered by the enterocytes plays an important role in the spread of the parasite and in the progression of the disease.



In fish with severe infections, the presence of empty rounded spaces within some clusters of dislodged cells was remarkable. The empty spaces were probably attributable to the release of the parasitic stages from the mucosal remnants that formerly lodged them, representing the area that previously was occupied by the parasite. This supports the hypothesis that apoptosis of the epithelial cells might facilitate the spread of the parasite.

Both apoptosis and necrosis were observed in immune cells located in the lamina propria-submucosa and in the haematopoietic areas of the kidney and spleen. In addition, the lymphohaematopoietic depletion in the spleen and kidney of *E. scophthalmi*-infected turbot described by Sitjà-Bobadilla et al. (2006) was confirmed by the current observations. Determining whether this finding is due to the recruitment and migration of lymphocytes to the digestive tract (Bermúdez et al. 2006b) or to a parasite-induced apoptosis in the immune cells from these organs deserves further investigation.

Other cellular structures changing as a consequence of the infection were the MMCs, which increased in number in both the lamina propria-submucosa and the haematopoietic organs of infected turbot (Sitjà-Bobadilla et al. 2006). This observation supports the hypothesis that the MMCs may be involved in fish immune responses during infections (Bermúdez et al. 2006b, Vigliano et al. 2006).

Some infected turbot showed a regenerative epithelium after detachment of the lining epithelium, which suggests that some fish could overcome the disease and eliminate the parasites, as described



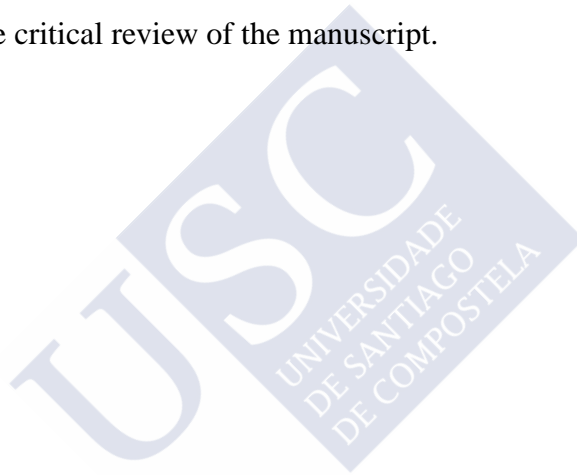
by Fleurance et al. (2008) in *E. leei*-infected sea bream. As a matter of fact, some turbot survive enteromyxosis, and the involvement of a protective acquired immune response related to the production of specific antibodies has been suggested (Sitjà-Bobadilla et al. 2007). The reason why few turbot possess the capability to mount an effective response against enteromyxosis is still a matter of study, though the responses at the gastrointestinal level probably play an important role in this enteric infection.

In summary, the present study describes the main histological lesions in turbot infected with *E. scophthalmi*, providing new information about pathogenic mechanisms and host–parasite relationships. Further studies will be necessary to distinguish between early phases of the myxosporean and apoptotic cells at the beginning of the infection, as well as to elucidate the role of apoptosis and other mechanisms in the progress of the disease, in order to better understand the pathogenesis of the enteromyxosis. This knowledge will assist the design of specific treatments for this important disease.



7.6. Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology under Project AGL2006-13158-C03-02/ACU. A.P. Losada is the recipient of a predoctoral fellowship of the Programa María Barbeito 2008 (Xunta de Galicia). The authors sincerely thank M.C. Carreira Valle for her excellent technical assistance and N. Alemañ for the critical review of the manuscript.



Reprinted from: Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010) Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis. Dis Aquat Organ 89:209-221, with permission from Inter-Research.

AP Losada thanks the other authors their permission to include the reproduction of the article in her PhD thesis.



7.7. References

- Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ (2003) Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 188:608–616.
- Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS (2005) An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Parasite* 12:221–227.
- Ali MA, Abdel-Baki AS, Sakran T, Entzeroth R, Abdel-Ghaffar F (2003) Light and electron microscopic studies of *Myxobolus stomum* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the blackspotted grunt *Plectorhynchus gaterinus* (Forsskal, 1775) in the Red Sea, Egypt. *Parasitol Res* 91:390–397.
- Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A (2008) Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol Int* 57:110–120.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyanis P, Vatsos I (2004) Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Dis Aquat Org* 62:217–226.
- Barassa B, Cordeiro NS, Arana S (2003) A new species of *Henneguya*, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:761–765.
- Bartholomew JL, Smith CE, Rohovec JS, Fryer JL (1989) Characterization of a host response to the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques. *J Fish Dis* 12:509–522.
- Bartosová P, Fiala I, Hypsa V (2009) Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol* 53:81–93.
- Bermúdez R, Alemañ N, Vigliano F, Vázquez S, Quiroga MI, Nieto JM (2006a) Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): a light and electron microscopic study. *Aquaculture* 254:65–71.
- Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006b) Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental



- infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): a histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:501–512.
- Boettner DR, Petri WA (2005) *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:175–184.
- Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). *J Fish Dis* 22:395–399.
- Dezfuli BS, Lui A, Boldrini P, Pironi F, Giari L (2008) The inflammatory response of fish to helminth parasites. *Parasite* 15:426–433.
- Diamant A, Lom J, Dyková I (1994) *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Org* 20:137–141.
- do Vale A, Costa-Ramos C, Silva DS, Macedo PM and others (2007) Cytochemical and ultrastructural study of anoikis and secondary necrosis in enterocytes detached in vivo. *Apoptosis* 12:1069–1083.
- El-Mansy A, Bashtar AR (2002) Histopathological and ultrastructural studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the suprabranchial organ of the freshwater catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 in Egypt. *Parasitol Res* 88:617–626.
- Feist SW (2008) Myxozoan diseases. In: Eiras J, Segner K, Wahli T, Kapoor BG (eds) *Fish diseases*, Vol 2. Science Publishers, Enfield, NH, p. 613–682.
- Fiala I (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int J Parasitol* 36:1521–1534.
- Fleurance R, Sauvegrain C, Marques A, Le Breton A, Guereaud C, Cherel Y, Wyers M (2008) Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Org* 79:219–228.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48:395–413.
- Lom J, Dyková I (1995) Myxosporea (phylum Myxozoa). In: Woo PTK (ed) *Fish diseases and disorders*, Vol 1. Protozoan and metazoan infections. CAB International, Wallingford, p. 97–148.
- Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53:1–36.



- Mazon AF, Huising MO, Taverne-Thiele AJ, Bastiaans J, Verburg-van Kemenade BM (2007) The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish Shellfish Immunol* 22:27–37.
- Molnár K (2007) Site preference of myxozoans in the kidneys of Hungarian fishes. *Dis Aquat Org* 78:45–53.
- Moran JDW, Margolis L, Webster JM, Kent ML (1999) Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporae) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. *Dis Aquat Org* 37:185–193.
- Morris DJ, Adams A (2008) Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology* 135:1075–1092.
- Padrós F, Palenzuela O, Hispano C, Tosas O, Zarza C, Crespo S, Alvarez-Pellitero P (2001) *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Dis Aquat Org* 47:57–62.
- Palenzuela O (2006) Myxozoan infections in Mediterranean mariculture. *Parassitologia* 48:27–29.
- Palenzuela O, Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P (2002) Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124:369–379.
- Quiroga MI, Redondo MJ, Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Vázquez S, Pérez A, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Parasitology* 133:433–442.
- Redondo MJ (2005) Estudios sobre el ciclo vital y transmisión de *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), parásito entérico del rodaballo. PhD thesis, University of Valencia.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J Parasitol* 88:482–488.
- Redondo MJ, Quiroga MI, Palenzuela O, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2003) Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Parasitol Res* 90:192–202.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Alvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol* 51:188–198.



- Reite OB (2005) The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish Shellfish Immunol* 19:253–267.
- Sherman MP, Petrak K (2005) Lactoferrin-enhanced anoikis: a defense against neonatal necrotizing enterocolitis. *Med Hypotheses* 65:478–482.
- Sitjà-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1993) Pathologic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla and Álvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-Bobadilla and Álvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporae: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitol Res* 79:119–129.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreiro I, Riaza A, Quiroga I, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporae: Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 21:485–500.
- Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías MA, Álvarez-Pellitero P (2007) Protective acquired immunity to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) is related to specific antibodies in *Psetta maxima* (L.) (Teleostei). *Scand J Immunol* 66:26–34.
- Sitjà-Bobadilla A, Calduch-Giner J, Saera-Vila A, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J (2008) Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporae) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol* 24:610–619.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2004) Kinetics of goblet and rodlet cells in the digestive tract of *E. scophthalmi*-infected turbot. In: Alves A, Méndez A, Gärtner F, Castaño M (eds) Proc 12th Annual Meeting of the Portuguese Society of Animal Pathology and 16th Annual Meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology. Jun 2–4, 2004, Vila Nova de Famalição.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:467–471.
- Von Herbay A, Rudi J (2000) Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microsc Res Tech* 48:303–311.
- Yokoyama H, Ogawa K, Wakabayashi H (1990) Chemotherapy with fumagilin and toltrazuril against kidney enlargement disease of goldfish caused by the myxosporean *Hofereilus carassii*. *Fish Pathol* 25:157–163.



8. ARTÍCULO II: EVALUATION OF iNOS IN TURBOT ENTEROMYXOSIS

Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*

Losada AP¹, Bermúdez R², Faílde LD¹, Quiroga MI¹

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine,
University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

²Department of Anatomy and Animal Production, School of Veterinary Medicine,
University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.



8.1. Abstract

Enteromyxum scophthalmi is the causative agent of turbot enteromyxosis, an intestinal parasitisation that produces severe desquamative enteritis leading to a cachectic syndrome and eventually the death. It is well known the importance of the innate immune response against parasites in fish, with the release of antimicrobial substances such as reactive oxygen and nitrogen species, produced by the inducible nitric oxide synthase (iNOS). This enzyme is mainly found in phagocytes, but also in structural cells from the intestinal mucosa. The aim of this study was to characterize iNOS in intestine and lymphohaematopoietic organs (spleen and anterior kidney) of turbot by means of immunohistochemistry in order to assess the possible changes of this enzyme through the infection. The presence of the enzyme was evaluated in control and *E. scophthalmi*-infected turbot. The results showed immunoreactivity in the apical border of enterocytes and mild staining of goblet cells in both control and infected turbot although it was more evident and widespread in infected turbot compared to control. Moderate numbers of iNOS⁺ cells were present in the lamina propria-submucosa of fish which presented moderate and severe inflammatory infiltrates at this level. In spleen and kidney, iNOS⁺ cells were scattered through the parenchyma and, in severely infected fish, tended to be allocated near the vascular structures and melano-macrophage centres. The number of positive cells at the lymphohaematopoietic organs was significantly higher in infected turbot and increased as infection progressed. The increase in



the expression of iNOS in the tissues of *E. scophthalmi*-infected turbot was more evident in individuals with severer lesions. The measurement of the levels of iNOS during turbot enteromyxosis reveals a possibly delayed response that would not be able to eliminate the parasites but would exacerbate mucosal injury.





8.2. Introduction

Enteromyxosis is an important disease in turbot culture, with high prevalence and mortality rates (Bermúdez et al. 2006b, Branson et al. 1999) caused by *Enteromyxum scophthalmi*. This myxozoan parasite colonizes the intestinal epithelium of cultured turbot (Palenzuela et al. 2002) and provokes epithelial damage, desquamation of the lining epithelium and mucosal inflammation that result in nutrient malabsorption, diarrhoea and eventually death after a cachectic syndrome (Branson et al. 1999, Redondo et al. 2002). The agent is responsible for heavy economic losses, due to the great number of turbot affected via cohabitation and contamination of marine water supplies (Redondo et al. 2002) and nowadays there is not effective treatment against this parasitisation (Bermúdez et al. 2006a).

The innate immune response against parasites is of great importance in fish. Several humoral and cellular factors are activated in case of infection. Cytotoxic effector molecules, such as reactive nitrogen species, are mainly produced by activated phagocytes (Sitjà-Bobadilla 2008), and have been demonstrated in infections caused by other myxosporeans, as in *Enteromyxum leei*-infected sharp snout sea bream (Golomazou et al. 2006).

In mammals, during intestinal inflammation, synthesis of nitric oxide (NO) is consistently elevated in the intestinal mucosa as well as in the lamina propria-submucosa (LP) (Gookin et al. 2006, Keklikoglu et al. 2008, Kukuruzovic et al. 2002). This molecule is produced by the



enzyme NO synthase (NOS). There are three types of NOS: neuronal (nNOS) and endothelial (eNOS) Ca²⁺-dependent, and inducible (iNOS) Ca²⁺-independent, whose expression rises during inflammatory events and lasts longer than nNOS and eNOS activity (Chen et al. 2002, Kumamoto et al. 2002). This inducible form appears in almost all cell types, and in large amount in phagocytes (Wu et al. 2008, Zhao et al. 2010). It is known that the expression of iNOS in granulocytes and macrophages rises during stressing and inflammatory events (Yu et al. 2005), participates in the macrophage respiratory burst (Grayfer et al. 2009, Zhao et al. 2010), produces a cytotoxic environment and supports proinflammatory events (Vincendeau et al. 2003). The presence of iNOS in the gastrointestinal mucosa mainly occurs in the apical pole of the enterocytes (Rumbo et al. 2005) and its expression is significantly increased in mammals and teleosts during bacterial and protozoan infections, comprising an important tool against pathogens (Campos-Pérez et al. 2000, Gookin et al. 2004, Kukuruzovic et al. 2002, Leitch & He 1999, Oladiran et al. 2009).

Several studies evaluated the innate immune response of fish by means of different techniques, most of them measuring gene expression and serum levels of different mediators (Álvarez-Pellitero 2008, Bermúdez et al. 2006b, Singh et al. 2004, Sitjà-Bobadilla 2008, Sitjà-Bobadilla et al. 2006), but none of them have used immunohistochemistry to characterize the distribution of iNOS and the localization of iNOS+ cells in turbot. For this reason, the main aim of our study is the detection of iNOS by means of immunohistochemistry, in order to establish the changes in the expression of this enzyme in cells of the immune system and mucosa in the response against *E. scophthalmi*.



8.3. Materials and Methods

8.3.1. Fish

All experimental fish came from a farm allocated in Northwestern Spain. *E. scophthalmi*-infected turbot were employed as donor fish. A total of 160 uninfected turbot were checked for the absence of the parasite and 80 individuals used as control and the other 80 as recipient fish. Fish were kept in 500 L tanks and water temperature throughout the experiment was 14.3 ± 1.1 °C.

8.3.2. Infection

The experimental infection was performed by effluent transmission between stocks suffering serious mortality caused by *E. scophthalmi* and recipient fish in order to better recreate the natural infection. The uninfected recipient fish were placed in a tank which received the effluent water from a tank containing donor fish.

8.3.3. Sampling procedure

Five recipient and five control fish were sacrificed by chilling on ice and severing the spinal cord at days 20, 40, 56, and 78 post exposure (PE). At 107 days PE, only three recipient fish were sampled, since they were the only survivors. Samples of spleen, kidney and intestine (pyloric caeca, anterior, mid and hindgut) were taken.



8.3.4. Light microscopy

Tissues were routinely fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections of 3 μm thick were stained with haematoxylineosin and toluidine blue and examined to detect the presence of myxosporean stages and to evaluate the histological changes. Fish were considered infected when the parasite was detected on histological sections from any part of the intestine, the target organ. Infection intensity and the presence and severity of typical lesions of the disease (intestinal inflammation and desquamation, spleen and kidney leukocyte depletion) were semi-quantitatively classified from no infection or absence of lesions (0) to severe infection or lesions (3+), according to Bermúdez et al. (2010). Briefly, the slight degree consisted of low intensity parasitisation, absence of intestinal epithelial desquamation and absence or scarce inflammation; in the moderate degree the parasite burden was higher (from 30 to 80% of intestinal folds affected) and there was mild to moderate epithelial desquamation and moderate inflammatory response in the connective tissue of the mucosa; the severe degree was characterized by evident gross lesions (mainly cachexia, ascitis and intestinal haemorrhages), high amount of developmental stages of *E. scophthalmi* in the lining epithelium, even with the presence of scarce spores, severe epithelial desquamation and high number of inflammatory cells in the lamina propria-submucosa (LP). The entire histological damage represents the total sum of the histological lesions observed in the three studied organs for each fish.



8.3.5. *Immunohistochemistry*

Tissues fixed in Bouin's fluid and embedded in paraffin were cut to 3 mm thickness. The slides were routinely dewaxed and rehydrated. All incubations were performed at room temperature (RT) in a humid chamber and slides were washed with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) 0.5% Tween 20, pH 7.4, in three successive immersions of 5 min. Endogenous peroxidase was blocked by Peroxidase Blocking Solution (Dako, Denmark) for 1 h. No antigen retrieval was required. Primary rabbit polyclonal antibody NOS-2 (RB-1605, Thermo Fisher Scientific, UK) was incubated for 2 h. Immunohistochemical staining was performed using the horseradish peroxidase (HRP) anti-rabbit EnVision (Dako). Diaminobenzidine (Dako) was used as chromogen. Mammal tissues were used as positive controls. Negative controls were included by replacement of the primary antibody by PBS.

8.3.6. *Quantitative analysis of iNOS+ cells*

In order to later on analyze the quantity and distribution of iNOS+ cells in kidney, spleen and the sections of intestine, four groups of turbot were classified according to their health status: absence of lesions, slight, moderate and severe lesions. To count the mean number of immunostained cells, five digitalized images of each studied tissue were randomly taken at 200x magnification using an Olympus DP72 camera connected to a photomicroscope Olympus BX51. All the image parameters were set manually at the same levels to standardize the results. The iNOS-positive cells were counted using Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD).



8.3.7. Statistics

Data were analyzed using PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL). Records of each organ were studied separately. Results were reported as the mean \pm SEM, and they were obtained for each individual and each organ from the summation of counts of positive cells in the five images. A Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by paired comparisons was employed to seek differences amongst the groups. Results were considered significant at $P < 0.05$.





8.4. Results

8.4.1. Light microscopy and mortality

The histological study showed developmental stages of *E. scophthalmi* in the intestinal epithelium from the day 20 PE. The distribution of the parasitic forms started in the pyloric caeca and anterior gut, and spread to the rest of the digestive tract. As the disease progressed, a higher number of developmental stages of *E. scophthalmi* were found in the intestine and an increase in the severity of lesions was observed, with moderate epithelial desquamation and inflammatory infiltrates in the LP. The parasite was neither detected in spleen and kidney from both groups nor in the tissues from the control group.

Mortality started on day 56 PE and reached a cumulative value of 96.25% in the day 107 PE.

8.4.2. Immunohistochemistry

8.4.2.1. Immunostaining of iNOS

Immunoreactivity against iNOS was present in the organs of both non-infected (NIT) and infected (IT) turbot. There were several types and cellular elements showing positivity. A strong diffuse or spotted-like cytoplasmic staining was obtained in some leukocytes (iNOS+ cells) (fig. 1a & b) in the spleen, kidney and intestinal LP. Most iNOS+ cells showed a typical morphology of monocytemacrophage (fig. 1a). These cells were round or ovoid and had a large spherical to kidney-shaped nucleus with slightly condensed chromatin occupying an eccentric



position. The cytoplasm was relatively abundant, with edges that could show extensions, sometimes containing visible vacuoles of different sizes. Another iNOS⁺ cell type was the granulocyte (fig. 1b), round and smaller than the macrophage, with a kidney-shape or indented peripheral nucleus.

8.4.2.2. Location of iNOS⁺ cells in organs

The majority of iNOS⁺ cells was located within the parenchyma of the lymphohaematopoietic organs (spleen and kidney). In turbot with enteromyxosis, especially in moderate and severe cases, the cells were also found in the inflammatory infiltrates in the intestinal LP.

Spleen

A variable number of iNOS⁺ cells was observed isolated and randomly distributed throughout the parenchyma in NIT (fig. 1c). In some individuals presenting slight or moderate lesions, spotted staining was found in the spleen ellipsoids and there was minor staining in other vascular structures and the MMCs (fig. 1d & e). The number of iNOS⁺ cells was higher and tended to cluster near the vascular structures or the MMCs in IT (fig. 1f). The pattern of clustering was more evident as the disease progressed.

Kidney

The renal interstitial tissue showed slight staining and there were scarce positive cells in NIT (fig. 2a). In IT, the immunoreactivity was more intense and there was an increase in the number of iNOS⁺ cells in parallel with the development of the disease (fig. 2b). In severer cases, accompanying the leukocyte depletion, a large proportion of the



cells of the lymphohaematopoietic tissue showed intense immunostaining (fig. 2c).

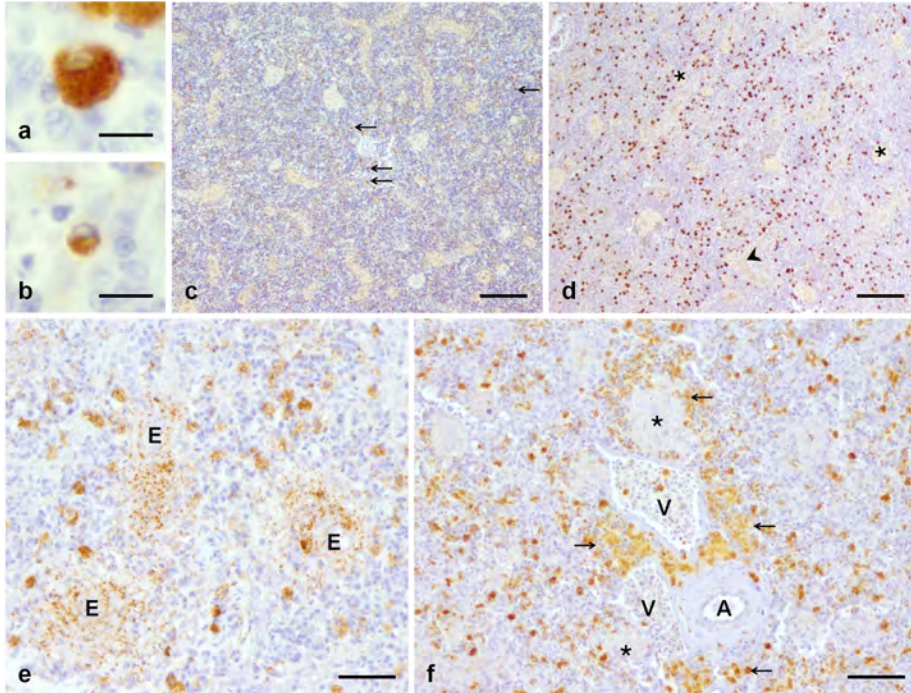


Figure 1: Photomicrographs of the immunostaining with anti-iNOS antibody in the spleen of control turbot (a,b,c) and both slight (d,e) and moderate infection (f). a: Rounded to ovoid macrophage-like cell with an eccentric nucleus displaying intense cytoplasmic immunostaining of iNOS. Bar = 5 μ m. b: Rounded granulocyte-like cell with cytoplasmic immunoreactivity. Bar = 5 μ m. c: Some immunopositive cells were present scattered in splenic parenchyma (arrows). Bar = 100 μ m. d: Strong immunostained cells appeared dispersed throughout the splenic parenchyma. Mild staining was noted in vascular structures (arrowhead) and melano-macrophage centres (\star). Bar = 100 μ m. e: Punctate immunostaining around the splenic ellipsoids (E). Bar = 25 μ m. f: There were iNOS+ cells scattered through the parenchyma and clustered (arrows) around vessels, arteriole (A) and venules (V), and melano-macrophage centres (\star). Bar . 50 μ m.

Intestine

The intestinal epithelial brush border demonstrated strong positivity (fig. 3a-d). In NIT the epithelial brush border showed more intensity of immunoreactivity in the mid and posterior gut, while the cytoplasm of the enterocytes remained unlabelled (fig. 3a). In the sections of mid and hindgut, goblet and some spherical intraepithelial cells in basal position exhibited positivity. IT with scarce or medium parasitisation



did not show differences in the immunoreactivity of the lining epithelium compared to NIT (fig. 3b). Turbot with higher parasite burden presented several positive granules in the apical part of the enterocytes, mainly in the posterior sections of the gut (fig. 3c). When the epithelium acquired the scalloped shape typical of the enteromyxosis, the immunoreactivity was more intense and diffuse. The enterocytes showed positivity not only in the apical pole of the cell but also throughout the cytoplasm. Moreover, in the LP several iNOS⁺ cells appeared among the inflammatory infiltrates (fig. 3d).

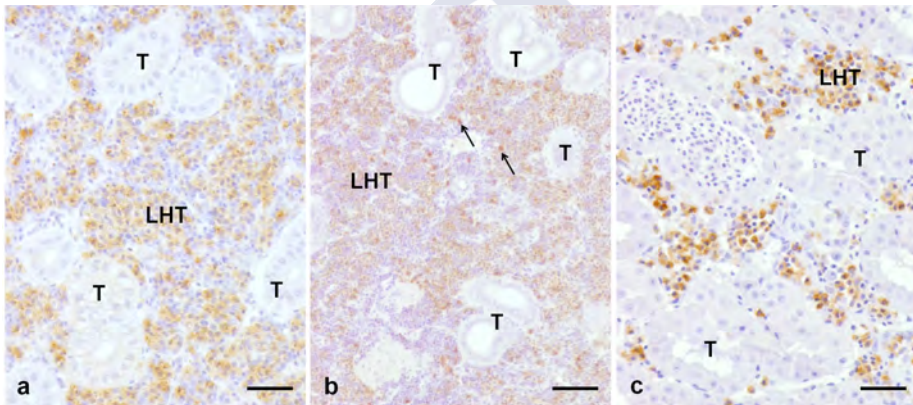


Figure 2: Photomicrographs of the reactivity with anti-iNOS antibody in the kidney of control turbot (a), slight (b) and severe infection (c). **a:** Cells in the lymphohaematopoietic tissue (LHT), situated among the tubules (T), were slightly positive or negative with the anti-iNOS antibody. Bar = 25 μ m. **b:** There was mild cytoplasmic immunoreactivity in most cells of the lymphohaematopoietic tissue (LHT) located between the renal tubules (T). Some cells exhibited more intense immunoreactivity (arrows). Bar = 50 μ m. **c:** The area occupied by the lymphohaematopoietic tissue (LHT) is relatively lower than that occupied by the tubules (T) due to depletion. Several macrophage-like cells show intense immunoreactivity against iNOS. Bar = 25 μ m.

Almost absence of immunoreactivity was found in the LP of NIT and slight IT, but according to the development of the disease the number of iNOS⁺ cells increased (fig. 3e), reaching significant elevated levels in turbot with moderate to severe lesions.

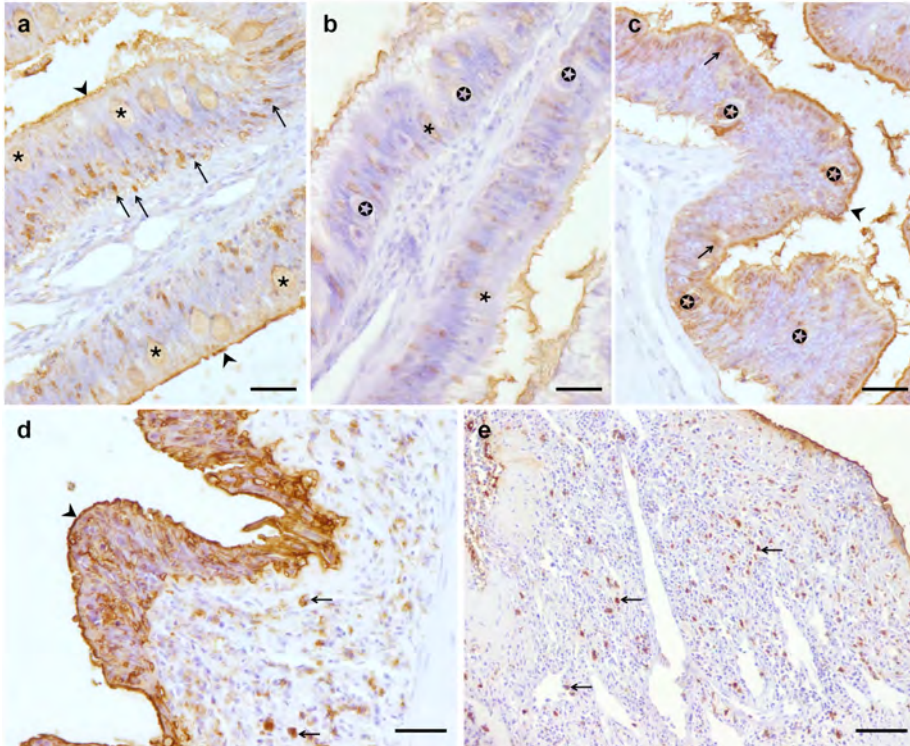


Figure 3: Photomicrographs of the immunoreactivity with the anti-iNOS antibody in the gut of control (a), moderate (b,c) and severe (d,e) *E. scophthalmi*-infected turbot. a: Hindgut. Some spherical intraepithelial cells (arrows) and the brush border (arrowheads) demonstrated positivity as well as a slight immunoreactivity of goblet cells (★). Bar = 25 μ m. b: Midgut. The epithelium was colonized by *E. scophthalmi* (⊙) and the immunostaining appeared in the goblet cells (★). Bar = 25 μ m. c: Hindgut. Several developmental stages of *E. scophthalmi* parasitized the lining epithelium (⊙). The enterocytes showed positivity to anti-iNOS antibody in the apical pole of the cell (arrows). The brush border was also immunostained (arrowhead). Bar = 25 μ m. d: Anterior gut. The lining epithelium was scalloped and the cells displayed variable cytoplasmic immunostaining. The brush border was vividly positive (arrowhead). Various iNOS+ cells appeared in the lamina propria-submucosa (LP, arrows). Bar = 25 μ m. e: Anterior gut presenting entire epithelial desquamation. The iNOS+ cells were dispersed among the inflammatory infiltrates of the LP (arrows). Bar = 50 μ m.

8.4.3. Quantitative analysis of iNOS+ cells and statistics

The number of iNOS+ cells tended to increase according to the worsening of the disease in the three studied organs. In spleen and kidney an upward trend may be seen in all the categories, but in the intestine the number of positive cells noticeably increases in the moderate and severe groups. In the kidney, the counts of iNOS+ cells



in the absent and slight group were different to the moderate and severe ones. The number of immunopositive cells present in the spleen had statistically significant differences between the absent category and the moderate and severe lesion groups, as well as that observed in the intestine. In this organ, the difference between the absent and the severe categories was significant at level $P < 0.001$ (fig. 4).

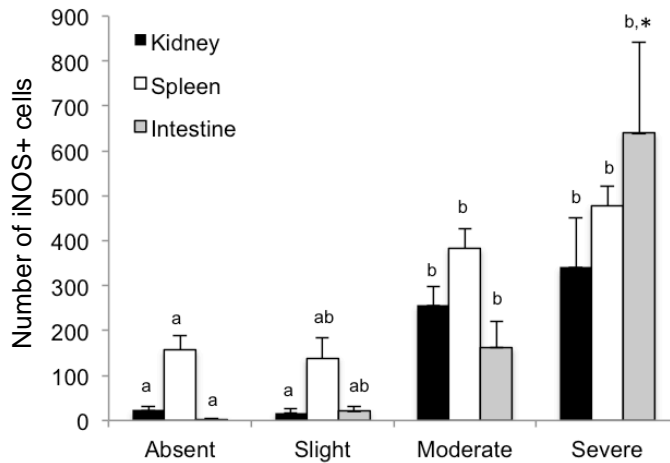


Figure 4: Mean \pm SEM of the total iNOS+ cells scrutinized in the kidney, spleen and intestine of turbot infected with *E. scophthalmi*. The number of iNOS+ cells tended to increase along the disease in the three studied organs and the difference was statistically significant in the groups of moderate and severe enteromyxosis. Distinct letters indicate significant differences between the groups of the same organ at a level $P < 0.05$. The asterisk identifies a level of significance $P < 0.001$.



8.5. Discussion

The aim of this study was to evaluate the expression of iNOS in the kidney, spleen and intestine of turbot infected with *E. scophthalmi* by cohabitation employing immunohistochemistry.

The light microscopy examination permitted to observe developmental stages of *E. scophthalmi* in the intestine of turbot experimentally exposed to the parasite. The magnitude of the lesions increased according to the time PE and the parasitic load in the intestine, similar to that observed in former experiences (Redondo et al. 2002, 2004).

The employment of the polyclonal antibody anti-iNOS made it possible to observe the presence of this enzyme in the three studied organs of turbot.

Immunoreactivity of iNOS was detected in leukocyte populations in the main lymphohaematopoietic organs and the gut, as well as in vascular structures and MMCs in spleen. The stained leukocytes morphologically corresponded to macrophages or granulocytes and the presence of the enzyme in these phagocytes would be similar to that described in other species (Campos-Pérez et al. 2000, Keklikoglu et al. 2008). The expression of iNOS in vascular structures has been reported as the up-regulation of the enzyme in the vascular smooth muscle which causes vascular relaxation, vasodilatation and then congestion due to the infection or related to chronic pathological processes (Jones et al. 2007, Romagnani et al. 1999). The positivity in



the MMCs might be related to their function as macrophages responding to infection and acting as antigen presenting cells (Vigliano et al. 2006).

The production of NO in turbot unstimulated macrophages has been previously reported (Tafalla et al. 2000). So, the presence of iNOS immunopositivity in spleen and kidney of NIT may be related to different activation state of the macrophages. The increase in the iNOS⁺ cells distributed throughout the parenchyma of both spleen and kidney from IT would be due not only to activation of iNOS during inflammation but also to leukocyte proliferation in response to the parasitisation (Álvarez-Pellitero 2008, Álvarez-Pellitero et al. 2008, Golomazou et al. 2006). On the other hand, the noticeable inflammatory infiltrates in the digestive tract would be due to the influx of the monocytes from the blood, the proliferation of these recruited cells in the connective tissue of the mucosa and the migration of Ig⁺ cells from the lymphohaematopoietic organs (Ackermann 2011, Bermúdez et al. 2006b). In the severer cases, the number of inflammatory cells in the intestinal LP would persist as a result of the chronicity of the lesion, injury and loss of the lining epithelium (Ackermann 2011).

In the intestine, the main location of iNOS immunoreactivity was the brush border and goblet cells in the posterior sections. The goblet cells of the gut sections closest to the environment differentially may express molecules related to nonspecific host defence, such as acidic mucins in the oesophagus and lysozyme in the hindgut (authors' unpublished results). A preferential location of iNOS in the apical pole



of enterocytes has been described (Keklikoglu et al. 2008), as well as immunostaining for eNOS in goblet cells of the nasal mucosa, which has been demonstrated to participate in the liberation of NO during inflammatory processes (Zhao et al. 2005). Since the presence of an isoform of NOS was demonstrated in goblet cells, the expression of iNOS in turbot goblet cells in areas close to the anus of the digestive tract would suppose an active participation of this cell type in the liberation of NO during inflammatory responses in the mid and hindgut due to their proximity to the environment.

According to the development of the enteromyxosis, in parallel with longer PE period, the lining epithelium suffered morphological modifications, acquired a scalloped shape and the immunostaining against iNOS formerly located in apical position switched to a stronger and widespread location. This diffuse pattern of staining might be related with a nonspecific and global response of the epithelium to the parasitisation (Gookin et al. 2006).

In the last stages of the turbot enteromyxosis, the lining epithelium tends to completely detach (Bermúdez et al. 2010) and there is an increase in the number of enterocytes undergoing apoptosis (authors' unpublished results). One of the main mechanisms of the NO mediated cytotoxicity is the hinder of cellular adhesion events (Ivanova et al. 1997). Complete loss of epithelium may be in part related to high levels of NO as it interferes with the attachment of the cell to the extracellular matrix, the assembly of the focal adhesion complexes and can participate in the anoikis of epithelial cells (Monteiro et al. 2004). As a result the expression of iNOS may be favouring the epithelial



desquamation in the severe affected turbot. Nevertheless, further studies on cell architecture and intercellular junctions are required to establish the implications on the functionality of the epithelial barrier and influence in the cellular detachment.

Otherwise, the assessment of iNOS in the development of the disease may open a therapeutic strategy to control the disease. As it has been reported for other parasitisation, the supplementation with NO precursors, such as the L-arginine, at the beginning of the disease may help to develop an early innate response that control the *E. scophthalmi* infection in a similar way as it occurs in *Cryptosporidium parvum*-infected piglets or nude mice (Gookin et al. 2005, Leitch & He 1994). On the other hand, the employ of NO inhibitors, for instance N-nitro-L-arginine methyl ester (Leitch & He 1994), may help to diminish the mucosal injury in turbot severely infected due to the exacerbated production of NO. Hence, the possibility of modulate the expression of iNOS and achieve a proper response in turbot against *E. scophthalmi* should be evaluated.

In summary, iNOS expression is increased in the intestine and lymphohaematopoietic organs of turbot infected with *E. scophthalmi*. The high presence of iNOS⁺ cells in the gut LP in severe enteromyxosis might contribute to the epithelial injury and desquamation. A possibly therapeutic approach modulating the levels of iNOS would help to manage an adequate immune response.



8.6. Acknowledgements

The authors would like to thank María del Carmen Carreira and Sandra Maceiras for their technical assistance. This work was funded by the Projects AGL2006-13158-C03-02 and AGL2009-13282-C02-02 from the Spanish Ministry of Science and Technology. A.P. Losada has a grant-contract under the Programa María Barbeito 2008 of the Xunta de Galicia.



Reprinted from: Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Quiroga MI (2012) Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*. Fish Shellfish Immunol 32:243-248, with permission from Elsevier.

AP Losada thanks the other authors their permission to include the reproduction of the article in her PhD thesis.



8.7. References

- Ackermann MR (2011) Inflammation and healing. In: Zackary JF, McGavin MD, editors. Pathologic basis of veterinary disease. 5 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier e Health Sciences Division, p. 89-146.
- Álvarez-Pellitero P (2008) Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol* 126:171-198.
- Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A (2008) Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol Int* 57:110-120.
- Bermúdez R, Alemañ N, Vigliano F, Vázquez S, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): a light and electron microscopic study. *Aquaculture* 254:65-71.
- Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010) Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis. *Dis Aquat Organ* 89:209-221.
- Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): a histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:501-512.
- Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei:Scophthalmidae). *J Fish Dis* 22:395-399.
- Campos-Pérez JJ, Ward M, Grabowski PS, Ellis AE, Secombes CJ (2000) The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology* 99:153-161.
- Chen YK, Hsuen SS, Lin LM (2002) Expression of inducible nitric oxide synthase in human oral premalignant epithelial lesions. *Arch Oral Biol* 47:387-392.
- Golomazou E, Athanassopoulou F, Karagouni E, Tsagozis P, Tsantilas H, Vagianou S (2006) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dykova, 1994 in



- sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. *Aquaculture* 260:44-53.
- Gookin JL, Allen J, Chiang S, Duckett L, Armstrong MU (2005) Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 73:3929-3936.
- Gookin JL, Chiang S, Allen J, Armstrong MU, Stauffer SH, Finnegan C, Murtaugh MP (2006) NF-kappaB-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G164-174.
- Gookin JL, Duckett LL, Armstrong MU, Stauffer SH, Finnegan CP, Murtaugh MP, Argenzio RA (2004) Nitric oxide synthase stimulates prostaglandin synthesis and barrier function in *C. parvum*-infected porcine ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G571-581.
- Grayfer L, Hanington PC, Belosevic M (2009) Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) induces pro-inflammatory gene expression and enhances antimicrobial responses of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol* 26:406-413.
- Ivanova K, Le Poole IC, Gerzer R, Westerhof W, Das PK (1997) Effects of nitric oxide on the adhesion of human melanocytes to extracellular matrix components. *J Pathol* 183:469-476.
- Jones RJ, Jourdeuil D, Salerno JC, Smith SM, Singer HA (2007) iNOS regulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2634-2642.
- Keklikoglu N, Koray M, Kocaelli H, Akinci S (2008) iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa. *Dig Dis Sci* 53:1437-1442.
- Kukuruzovic R, Robins-Browne RM, Anstey NM, Brewster DR (2002) Enteric pathogens, intestinal permeability and nitric oxide production in acute gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 21:730-739.
- Kumamoto H, Suzuki T, Ooya K (2002) Immunohistochemical analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and heat shock proteins (HSPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 31:605-611.
- Leitch GJ, He Q (1994) Arginine-derived nitric oxide reduces fecal oocyst shedding in nude mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* 62:5173-5176.
- Leitch GJ, He Q (1999) Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect Immun* 67:5885-5891.
- Monteiro HP, Silva EF, Stern A (2004) Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis-anoikis. *Nitric Oxide* 10:1-10.



- Oladiran A, Belosevic M (2009) *Trypanosoma carassii* HSP70 increases expression of inflammatory cytokines and chemokines in macrophages of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Dev Comp Immunol* 33:1128-1136.
- Palenzuela O, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2002) Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124:369-379.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol (Praha)* 51:188-198.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J Parasitol* 88:482-488.
- Romagnani P, Pupilli C, Lasagni L, Baccari MC, Bellini F, Amorosi A, Bertoni E, Serio M (1999) Inducible nitric oxide synthase expression in vascular and glomerular structures of human chronic allograft nephropathy. *J Pathol* 187:345-350.
- Rumbo M, Courjault-Gautier F, Sierro F, Sirard JC, Felley-Bosco E (2005) Polarized distribution of inducible nitric oxide synthase regulates activity in intestinal epithelial cells. *FEBS J* 272:444-453.
- Sigh J, Lindenstrom T, Buchmann K (2004) The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 27:409-417.
- Sitjà-Bobadilla A (2008) Fish immune response to Myxozoan parasites. *Parasite* 15:420-425.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreira I, Riaza A, Quiroga I, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scopthalmi* (Myxosporae: Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 21:485-500.
- Tafalla C, Novoa B (2000) Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Dev Comp Immunol* 24:623-631.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:467-471.
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19:9-12.
- Wu F, Tysl K, Wilson JX (2008) iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 217:207-214.



Yu Z, Xia X, Kone BC (2005) Expression profile of a human inducible nitric oxide synthase promoter reporter in transgenic mice during endotoxemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F214-220.

Zhao K, Huang Z, Lu H, Zhou J, Wei T (2010) Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Biosci Rep* 30:233-241.

Zhao Y, Woo JK, Leung PC, Chen GG, Wong YO, Liu SX, van Hasselt CA (2005) Symptomatic and pathophysiological observations in a modified animal model of allergic rhinitis. *Rhinology* 43:47-54.





9. ARTÍCULO III: STUDIES ON APOPTOSIS IN TURBOT ENTEROMYXOSIS

Study of distribution of active caspase-3+ cells in turbot (*Psetta maxima* L.) enteromyxosis

Losada AP¹, Bermúdez R², Faílde LD¹, Ruiz de Ocenda MV³, Quiroga MI¹

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

²Department of Anatomy and Animal Production, School of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

³Cluster de la Acuicultura de Galicia, Aguiño, Ribeira, 15965 A Coruña, Spain.



9.1. Abstract

Enteromyxosis caused by *Enteromyxum scophthalmi* Palenzuela, Redondo & Álvarez-Pellitero, 2002 is one of the parasitizations with higher economic impact on turbot (*Psetta maxima* L.) aquaculture. This myxosporean produces severe catarrhal enteritis with abundant inflammatory infiltrates in the lamina propria-submucosa (LP), epithelial detachment and leucocyte depletion of the lymphohaematopoietic organs. Some advances made on the pathogenesis pointed to the role of the apoptosis in the enteromyxosis. Therefore, the main aim of this work was to employ TUNEL and anti-active caspase-3 immunohistochemical assay for the detection of apoptotic cells in both healthy and *E. scophthalmi*-infected turbot in order to establish the presence and distribution of apoptotic cells during the development of the disease. More apoptotic cells located within the gastrointestinal epithelium were observed in the initial stages of the infection compared to non-infected turbot. As the infection progressed, a higher number of apoptosis occurred in the epithelium of folds intensely parasitized. In the turbot severely infected, apoptosis was also found among the leucocytes of the intestinal inflammatory infiltrates. Moreover, the number of active caspase-3+ cells in the lymphohaematopoietic organs tended to increase along the disease. In view of the results, increased apoptosis in the epithelium may be favouring the scaling that occurs during enteromyxosis and cell death of leucocytes in the intestinal LP contributes to leucocyte depletion in severe cases.



9.2. Introduction

Since turbot enteromyxosis appeared and was firstly described (Branson et al. 1999), there have been serious economic losses in the culture of turbot *Psetta maxima* (L.) (Palenzuela et al. 2002, Redondo et al. 2003, Quiroga et al. 2006). The myxosporean *Enteromyxum scophthalmi* Palenzuela et al. 2002 produces severe catarrhal enteritis and leucocyte depletion of the lymphohaematopoietic organs (mainly anterior kidney and spleen) of infected turbot (Bermúdez et al. 2006, Branson et al. 1999, Sitjà-Bobadilla et al. 2006). The main histological changes consist of a variable number of developmental stages of the parasite colonizing the gastrointestinal lining epithelium and inflammatory infiltrates in the lamina propria-submucosa (LP) (Bermúdez et al. 2010, Redondo et al. 2002).

At the first phases, the parasite is hardly detected by means of light microscopy because parasitic forms may resemble apoptotic cells morphologically, and there is scarce or even absent inflammatory infiltrates within the intestinal LP (Bermúdez et al. 2010). Thereafter, the parasite burden increases, the epithelium appears scalloped and tends to desquamate, several epithelial cells with apoptotic changes are located both in the epithelium and free in the digestive lumen, and progressively more inflammatory cells occur in the LP of the intestinal folds (Bermúdez et al. 2006, 2010). In turbot with severe lesions in the digestive tract, which also show leucocyte depletion, an increase in the



apoptosis in lymphohaematopoietic organs is reported (Bermúdez et al. 2006, 2010, Sitjà-Bobadilla et al. 2006).

Programmed cell death constitutes an important regulator of host response during infections caused by several protozoan parasites. Parasites have developed various strategies to induce or inhibit apoptosis in host cells, modulating the immune response and benefiting their spread in the host tissues (Lüder et al. 2001, Mele et al. 2004, Schaumburg et al. 2006). For instance, *Cryptosporidium parvum* Tyzzer 1912 can modulate the apoptosis of human host cells according to the stage of development of the parasite by inhibiting cell death in the trophozoite stage, but inducing apoptosis in the sporozoite stage (Mele et al. 2004).

Several enteropathogens produce the detachment of single or clusters of intestinal epithelial cells (do Vale et al. 2007), by means of a disruption of cell-cell or cell-matrix relationship provoking anoikis, a form of apoptosis triggered by the release of cells from the subjacent matrix (Frisch & Francis 1994, Lugo-Martínez et al. 2009). Anoikis usually occurs in the renewal of intestinal or glandular epithelia (Boudreau et al. 1995, Hall et al. 1994, Lugo-Martínez et al. 2009), but little of this type of programmed cell death has been studied in parasitized epithelia (do Vale et al. 2007). With respect to turbot enteromyxosis, the presence of stages of development of *E. scophthalmi* causes alterations in the intestinal lining epithelium followed by the detachment from the basement membrane (Bermúdez et al. 2010).



Besides, the leucocyte depletion in the lymphohaematopoietic tissue observed by Sitjà-Bobadilla et al. (2006) and Bermúdez et al. (2010), together with the high virulence of *E. scophthalmi*, might contribute to the deadly outcome of the disease. Other enteromyxosis with high mortality rates, as the enteromyxosis in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti 1777) caused by *Enteromyxum leei* (Diamant, Lom & Dyková 1994), also occurs with the depletion in lymphoid tissues (Álvarez-Pellitero et al. 2008). A relationship between the leucocyte depletion and an increase in the apoptotic rate in anterior kidney and spleen has been suggested (Bermúdez et al. 2006), although non-specific techniques were employed to demonstrate this. Therefore, the main aim of this study was to develop a technique to detect apoptosis in turbot in order to characterize apoptotic cells in the digestive tract and lymphohaematopoietic organs of healthy and *E. scophthalmi*-infected turbot.



9.3. Materials and Methods

9.3.1. Animals

The experiment was designed in accordance with current legislation on animal experimentation and performed in the ‘Centro Tecnológico Gallego de Acuicultura’ (CETGA, Ribeira, Spain). A total of 288 healthy fish (mean weight 176 ± 30 g) were divided into 24 groups of 12 turbot each, and held in 50-L tanks. The water temperature was 18 ± 1 °C. During the trial, all turbot were fed a quality commercial dry pellet appropriate for their size at about 1% of body weight daily. The oral infection was achieved by the administration of a solution containing viable forms of *E. scophthalmi*. The inoculum was prepared from intestinal scrapings of donor fish, mixed and homogenized by shaking in saline solution. The inoculum was introduced in the oesophagus and stomach of the recipient turbot by means of an oral cannula. Totally, 12 groups of recipient turbot were inoculated, maintaining five of these groups to establish the mortality rate until the last sampling. Moreover, the remaining 12 groups were inoculated with saline solution and kept under the same conditions. Analogous to the recipients, seven groups of control turbot were sampled throughout the experiment and another five groups were maintained over time, as a control of mortality.



9.3.2. Sampling procedure

An initial sampling was carried out prior to the inoculation. The sampling points were established at the days 3, 7, 13, 24, 33 and 39 post-inoculation (PI). A total of 14 control and 14 recipient turbot were sampled at each sampling point, two fish from each tank. The animals were killed by overexposure to phenoxyethanol and severing the spinal cord. Complete necropsy was performed and small pieces of the digestive tract (oesophagus, stomach, pyloric caeca, anterior, midgut and hindgut), anterior kidney and spleen were collected in different fixatives for histological studies. Tissues were fixed either in 10 % buffered formalin (4 fish in each sampling point, except in the last sampling where only 3 were sampled) or in Bouin's fluid at 4 °C (10 fish in each sampling point) and embedded in paraffin. The mortality rate was monitored throughout the experiment, and the histopathological examination of the dead fish was performed.

9.3.3. Study of disease status

All the specimens were examined by means of light microscopy. Sections were cut 3 µm thick, stained with haematoxylin-eosin or toluidine blue and studied to establish the prevalence of *E. scophthalmi* and pathological changes. Leucocyte depletion in kidney and spleen was evaluated in the sections and classified from 0+ to 3+ (absent, slight, moderate or severe) according to the diminution of the kidney intertubular tissue and spleen white pulp, respectively. Inoculated fish were divided into four groups consistent with their lesion degree (absent, slight, moderate and severe) according to the scale employed by Bermúdez et al. (2010), to show the results in relation to the health



status of turbot. Briefly, the slight degree consisted of low-intensity parasitization, absence of intestinal epithelial desquamation and absence or scarce inflammation; in the moderate degree, the parasite burden was higher (from 30% to 80% of intestinal folds affected) and there were mild to moderate epithelial desquamation and moderate inflammatory response in the connective tissue of the mucosa; the severe degree was characterized by evident gross lesions (mainly cachexia, ascites and intestinal haemorrhages), high amount of developmental stages of *E. scophthalmi* in the lining epithelium, even with the presence of scarce spores, severe epithelial desquamation and high number of inflammatory cells in the LP.

9.3.4. TUNEL staining

The assay was conducted on paraffin sections from formalin-fixed tissues. All the incubations were carried out at room temperature (RT) in a humid chamber. The washes were performed with 0.01 M phosphate-buffered saline for 5 min, three times. Sections were stained with fragmented DNA detection kit (In Situ Cell Death Detection Kit, POD) with the following modifications: samples were dried for 1 h at 37 °C, dewaxed and hydrated. Blocking of endogenous peroxidase activity was performed for 1 h with peroxidase-blocking solution (Dako), and then, samples were heated under pressure in citrate buffer pH 6.0 for 15 min. Unspecific staining was blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) for 20 min. The incubation of the samples with the TUNEL label solution lasted 1 h. After washing, the peroxidase-conjugated antibody was added and incubated for 30 min.



The chromogen employed for detecting the positive cells was 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako).

9.3.5. Immunohistochemistry

Tissues fixed in Bouin's fluid were used for the immunohistochemical assay. The incubation conditions and washings were the same as in the TUNEL assay. Endogenous peroxidase activity was blocked for 1 h with peroxidase-blocking solution (Dako). A polyclonal anti-active caspase-3 antibody (diluted 1:200, 2 h; Promega) was employed for the detection of apoptotic cells. Antigens were exposed by heating under pressure in EDTA buffer pH 8 for 2 min and allowed to cool at RT. The polyclonal antibody against *E. scophthalmi* (diluted 1:35 000, 2 h) was gently provided by Dr. Sitjà-Bobadilla (IATS, CSIC; Spain).

In both cases, the secondary antibody conjugated with peroxidase was the anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dako) for 30 min, followed by developing with DAB (Dako).

In order to simultaneously observe positive cells to active caspase-3 and parasitic forms, a double immunostaining protocol was carried out. The immunohistochemical technique to stain active caspase-3 was first performed using DAB (Dako) as chromogen. Samples were then rinsed in glycine-HCl buffer pH 2.2 for 5 min in order to block the possible remaining binding sites of the primary antibody. Then, the antibody anti-*E. scophthalmi* was incubated, followed by the EnVision+ complex and employing Vector VIP (Vector Laboratories) as chromogen.



Tissue sections were used as negative controls by substituting the primary antibody for PBS or antibody diluent. Sections of both swine tonsil and *E. scophthalmi*-infected turbot were employed as positive controls for active caspase-3 and *E. scophthalmi* antibodies, respectively.

9.3.6. Quantitative and semi-quantitative analysis of active caspase-3+ cells

To determine the variations in the number of apoptotic cells in spleen and anterior kidney, cells immunostained with anti-active caspase-3 were counted. All the samples fixed in Bouin's fluid from recipient fish were evaluated (N = 60) plus 10 control turbot. Five digitized images of spleen and anterior kidney were randomly taken with a camera Olympus DP72 connected to a photomicroscope Olympus BX51, using 200x magnification. The positive cells in the total area photographed (0.72 mm²) were counted using the software Image Pro-Plus 4 (Media Cybernetics Inc.).

Data on each organ were evaluated independently. The results were reported as the mean number of active caspase-3+ cells in the studied area \pm SEM. Data were pooled into the four categories according to the health status observed through light microscopy. To establish the differences in the number of apoptotic cells among the groups, we conducted a one-way analysis of variance on ranks, Kruskal-Wallis test and paired comparisons of the categories with a significance level $P < 0.05$. The software employed was PASW Statistics 18 (SPSS Inc.).



The number of active caspase-3+ cells of both the intestinal epithelium and LP was manually counted in the histological sections as the amount of immunostained cells was very low and to evaluate and distinguish the possible staining of parasite forms undergoing apoptosis. Free apoptotic cells in the digestive lumen were not counted. All sampled sections of the digestive tract were completely examined, and ranges defining the amount of apoptosis in each case were established [1+ for < 25 apoptosis per section (APS), 2+ for values between 25 and 60 APS, 3+ for values between 60 and 100 APS and 4+ for > 100 APS].





9.4. Results

9.4.1. Gross pathology and mortality

Although mild alterations appear from day 24 PI, more evident lesions were observed in turbot from the last sampling. Affected fish presented external signs consisting of emaciation, endophthalmia and a typical prominent bony ridge on the skull. At necropsy, the principal findings consisted of ascites and areas of hyperaemia affecting serosal surfaces of the coelomic cavity. Accumulation of fluid within the intestine was noticed. Mortality started on day 26 PI, increased throughout the trial until reaching a value of 80% at the end of the experiment (fig. 1).

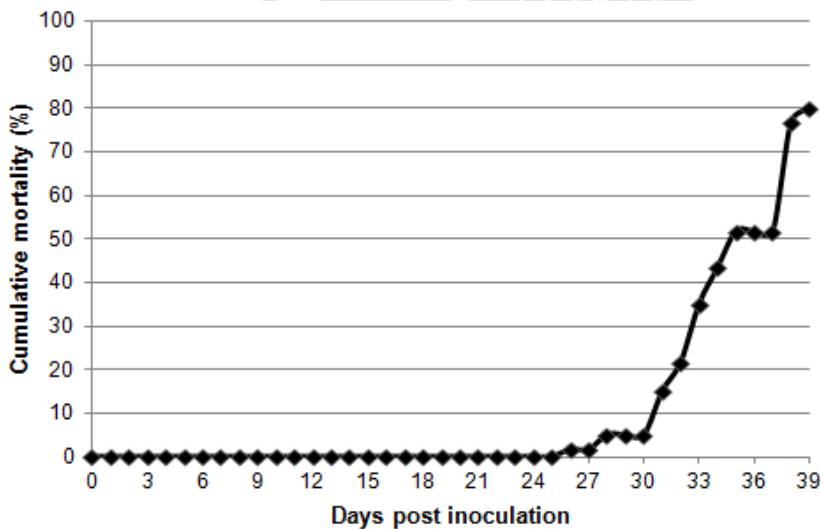


Figure 1: Cumulative mortality throughout the oral inoculation experiment



9.4.2. Histopathology

Pathological findings throughout the experiment are summarized in table 1. In days 3 and 7 PI, the most striking finding was the increase in the number of small spherical basophilic structures either compatible with early stages of *E. scophthalmi* or apoptotic cells in the base of the epithelium from anterior sections of the intestine (fig. 2a). These forms also appeared, but in a fewer number, in the epithelium of the digestive tract of control fish.

		Days PI					
		3	7	13	24	33	39
<i>Enteromyxum scophthalmi</i>	Prevalence (%)	0	7.14	28.57	85.71	92.86	92.31
	Intensity		1	1	2.42	2.69	2.17
Intestinal inflammation	Prevalence (%)	0	7.14	50	78.57	100	61.54
	Intensity		1	1	2.45	2.57	2.13
Epithelial desquamation	Prevalence (%)	0	0	14.29	64.29	92.86	61.54
	Intensity			1	1.67	2.46	2
Kidney leukocyte depletion	Prevalence (%)	0	0	7.14	85.71	78.57	69.23
	Intensity			1	1.58	1.45	1.67
Spleen leukocyte depletion	Prevalence (%)	0	0	7.14	57.14	71.43	69.23
	Intensity			1	1	1.1	1.11

Table 1: Summary of the pathological findings throughout the oral inoculation experiment. Prevalence of infection with *Enteromyxum scophthalmi* and major injuries reported. The intestinal inflammation refers to the presence of inflammatory cells in the lamina propria-submucosa. The intensity is expressed in a range from 1 to 3, according to the presence and severity of the lesions: mild or low (1), moderate (2) or severe (3).

Several developmental stages of *E. scophthalmi* occurred in the different sections of the digestive tract of recipient turbot from day 7 PI. Moderate to severe desquamative enteritis was observed from day 24 PI. The epithelium acquired a scalloped edge as the parasite burden increased (fig. 3a). In severer cases, *E. scophthalmi* stages surrounded by detached cells in the intestinal lumen (fig. 4a) and evident loss of the lining epithelium were seen, mainly at days 33 and 39 PI (fig. 5a).

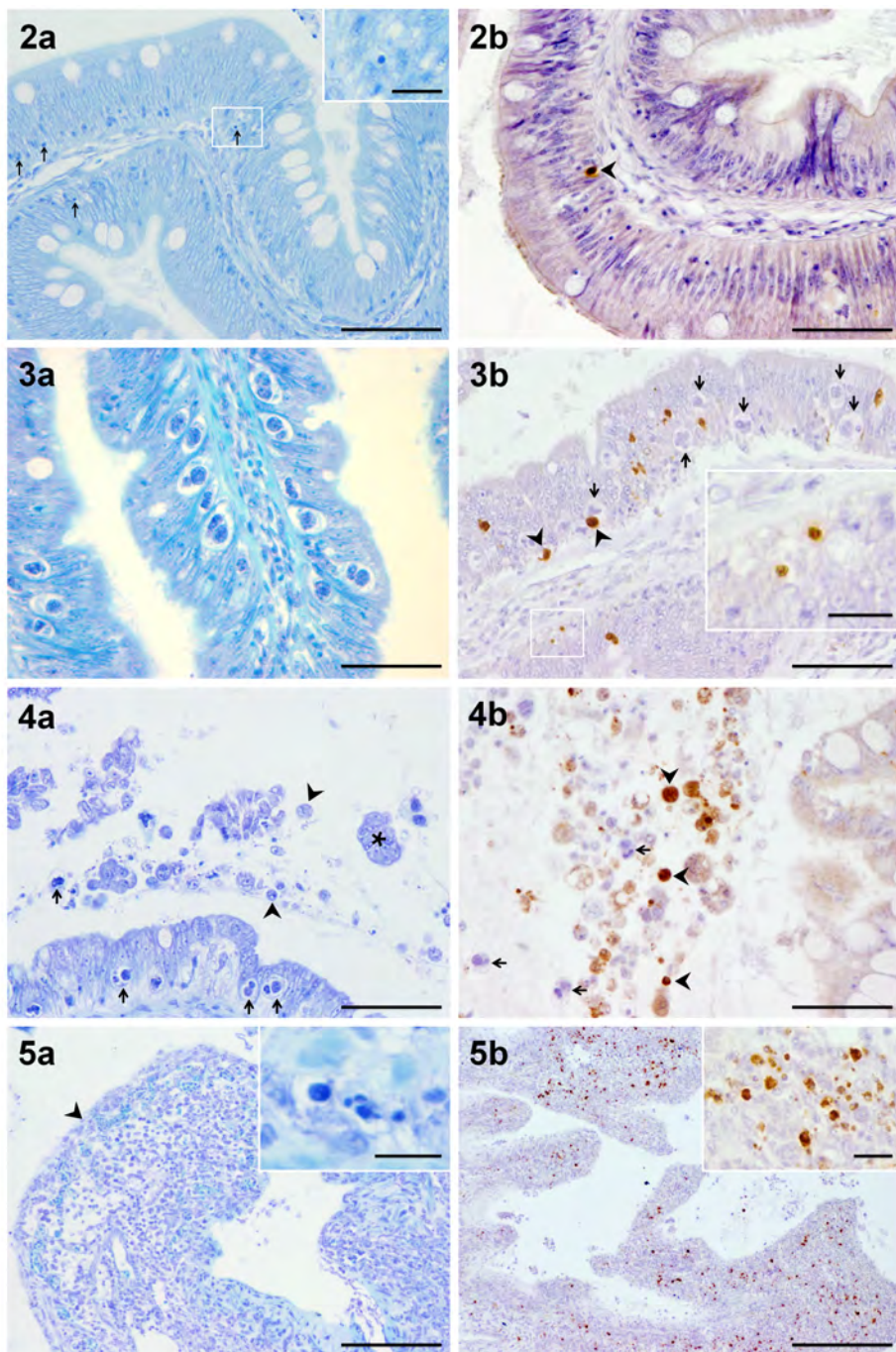


Among the intestinal inflammatory infiltrates, there were several cells with apoptotic shapes (fig. 5a, insert). In these fish, the intertubular tissue of the anterior kidney and white pulp in the spleen were noticeably diminished.

No developmental stages of *E. scophthalmi* were found in the other organs examined. Neither histological changes nor parasitic stages were observed in fish from the control group.

The examination of dead turbot tissue sections revealed severe desquamative enteritis accompanied by high burden of *E. scophthalmi* stages in the lining epithelium of the digestive tract and gastric glands.

Figures 2 to 5: Light microscopy micrographs of control and turbot infected with *Enteromyxum scophthalmi*. Figures **a** are sections stained with toluidine blue and figures **b** are images of the immunohistochemistry with the anti-active caspase-3 antibody. **2:** Anterior intestine in the early stages of the disease (**a**) and pyloric caecum of a control turbot (**b**). **2a:** The arrows point at basophilic forms located at the base of the epithelium, mainly seen in the first post-inoculation samplings. Bar = 50 μm . Insert: Detail of a basophilic form. Bar = 10 μm . **2b:** Solitary immunostained cell in the epithelium (arrowhead). Bar = 50 μm . **3:** Pyloric caecum of turbot with moderate infection. **3a:** Several *E. scophthalmi* stages. Note the scalloped epithelial lining. Bar = 20 μm . **3b:** Active caspase-3+ cells (arrowheads) were mainly seen in the epithelium, but not necessarily in direct contact with *E. scophthalmi* (arrows). Bar = 50 μm . Insert: Two active-caspase-3+ cells with small spherical morphology. Bar = 10 μm . **4:** Hindgut of turbot presenting severe lesions. **4a:** Multiple stages of development of *E. scophthalmi* (arrows) in the lining epithelium. Desquamated cells were either individually (arrowheads) or in clusters (asterisk) in the lumen. Bar = 50 μm . **4b:** Detached epithelial cells (arrowheads) in the intestinal lumen appeared immunostained. Notice the presence of various stages of *E. scophthalmi* free in the lumen (arrows). Bar = 50 μm . **5:** Anterior segment of gut of turbot with severe lesions. **5a:** One severely affected fold devoid of epithelial lining. Basal membrane was exposed (arrowhead) and many inflammatory cells were present in the lamina propria-submucosa, some of them showing morphological changes of apoptosis. Bar = 100 μm . Insert: Rounding, shrinkage and fragmentation of cells in the lamina propria-submucosa. Bar = 10 μm . **5b:** Large number of active-caspase-3+ cells were seen between the inflammatory infiltrates. Bar = 200 μm . Insert: Detail of an area containing immunostained cells showing apoptotic morphology in the inflammatory infiltrates. Bar = 10 μm .





9.4.3. *Detection of apoptosis*

On the one hand, the results of the TUNEL staining for apoptosis were variable and sometimes unspecific images could be seen. Mild levels of background hindered the differentiation between apoptotic and viable cells and sometimes did not allow making a correct assessment of the number of apoptotic cells (fig. 6a).

On the other hand, the immunohistochemical assay to detect active caspase-3 in tissues achieved a more accurate characterization and identification of apoptotic cells in different tissues.

9.4.3.1. Active caspase-3+ cells in the intestinal epithelium

In control fish, the number of active caspase-3+ cells was scarce (table 2; fig. 2b). Some of the spherical basophilic structures in fish with slight infection were positive to anti-active caspase-3 antibody. In turbot with moderate lesions, positive cells occurred along the infected epithelium near the myxosporeans (fig. 3b), although in most cases there was no direct contact between apoptotic cells and parasites. In severe cases, there were many stained cells in the attached epithelium and desquamated cells free in the lumen (fig. 4b).

9.4.3.2. Active caspase-3+ cells in the intestinal LP

There was scarce immunoreactivity in the cells of the LP in fish from absent, slight and moderate groups (table 2). However, numerous positive cells were present in the inflammatory infiltrates of the severe group (fig. 5b), especially in the turbot in which the epithelium was entirely desquamated.



	Disease status					
	Control	Absent	Slight	Moderate	Severe	
Kidney leukocyte depletion	-	-	-/+	+ /++	++ /+++	
Spleen leukocyte depletion	-	-	-/+	-/+	+ /++	
Apoptosis in the lining epithelium	Oesophagus	+	+	++	++	++
	Stomach	+	+	+	++	+++
	Pyloric caeca	+	++	++	++	NM
	Anterior gut	+	++	++	++++	+++
	Midgut	+	+	+	+++	NM
	Hindgut	+	++	+	++	+++
Apoptosis in LP	+	+	+	+ /++	++++	

Table 2: Semi-quantitative study of the leukocyte depletion in the lymphohaematopoietic organs and apoptosis in the intestine. The depletion was evaluated from 0+ to 3+ (absent, mild, moderate, severe) by light microscopy observation. The number of apoptosis was manually counted in the intestinal epithelium and lamina propia-submucosa (LP). The scale ranges correspond to: 1+ < 25 apoptosis per section (APS), 2+ from 25 to 60 APS, 3+ from 60 to 100 APS and 4+ > 100 APS. NM indicates a not measurable value because of the epithelial desquamation.

9.4.3.3. Active caspase-3+ cells in lymphohaematopoietic organs

In the kidney and spleen, positive cells were distributed throughout the parenchyma of both organs without clear association with any histological structure (fig. 6b), except in turbot from the severe group, in which apoptosis appeared mostly in the lymphoid tissue surrounding the melanomacrophage centres (fig. 6c). As infection appears, the number of active caspase-3+ cells tends to increase in both organs, but more clearly in the spleen (fig. 7). In spite of this increasing trend, no significant statistical differences between infected groups were noted. On the other hand, more positive cells were counted in both the control and absent groups. The difference between the number of active caspase-3+ cells in the kidney of control and slight group was statistically significant.

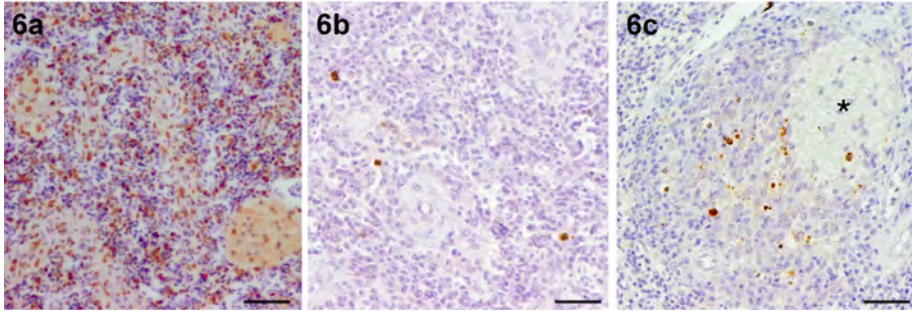


Figure 6: Light microscopy micrographs of the detection of apoptosis in the spleen of control and infected turbot. Figure **6a** was stained using TUNEL technique and figures **6b** and **6c** were immunostained employing the antibody anti-active-caspase-3. **6a:** Turbot from control group. Positive staining appears with different intensities in many nuclei, which prevents the characterization of cells in apoptosis. Bar = 25 μ m. **6b:** Turbot from control group. Scant active-caspase-3+ cells are scattered throughout the parenchyma. Bar = 25 μ m. **6c:** Turbot from severe group. Immunostained cells are mostly distributed near the melanomacrophage centres (asterisk). Bar = 25 μ m.

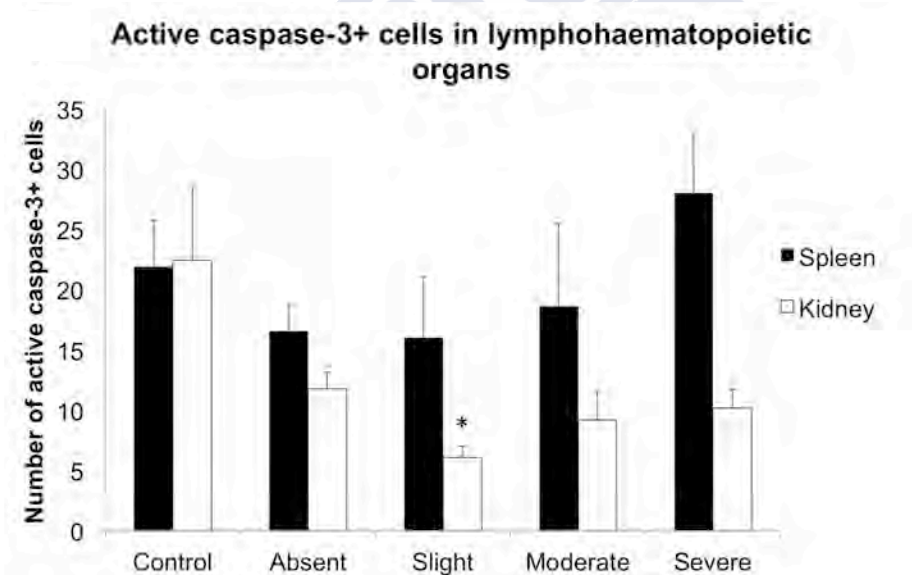


Figure 7. Counts of active-caspase-3+ cells in lymphohaematopoietic organs in control fish and in fish of the four disease status categories. Bars represent the mean of the category and error bars represent the standard error of the mean. The mean is calculated from the sum of all positive cells in the images obtained in each turbot. The spleen showed a non-significant increase in the number of apoptosis along the worsening of the disease. In the kidney the trend over the infection is to increase, however the highest count was obtained in the control group. The diminution of active-caspase-3+ cells of kidney in the slight group (*) compared to the control group was significant at level $P < 0.05$.



9.4.4. Immunostaining of the parasites

The immunohistochemical technique applied for the detection of *E. scophthalmi* showed an evident staining of the different stages of development of the myxosporean (fig. 8a).

During the first phases of the enteromyxosis, some of the spherical basophilic structures distributed among the enterocytes were immunostained (fig. 8b), and they were mainly located near to the basal lamina.

In the stages of development that contained secondary and tertiary cells within, there was more evident immunoreactivity in the primary cell (fig. 8c). When advancing the disease, the parasite might be observed released into the lumen, either free or surrounded by detached epithelial cells. No positive staining against *E. scophthalmi* was found in the remaining studied organs or in control fish.

9.4.5. Simultaneous characterization of apoptosis and *E. scophthalmi*

The double immunostaining against active caspase-3 and *E. scophthalmi* displayed apoptosis and parasites concurrently in the lining epithelium of the digestive tract, although no co-localization of both antibodies was observed in the infected turbot (fig. 8d).

At the beginning of the enteromyxosis, the spherical basophilic structures occurring at the base of the epithelium were differently immunoreactive to either active caspase-3 or *E. scophthalmi* antibodies.



In fish with moderate lesions, a higher number of epithelial cells undergoing apoptosis were noted in the parasitized folds. Occasionally, the stages of the myxosporean appeared with active caspase-3+ epithelial cells near them (fig. 8d).

In turbot with intense parasitization and large epithelial desquamation, various parasites appeared in the intestinal lumen free or surrounded by groups of epithelial cells undergoing apoptosis (fig. 8e).

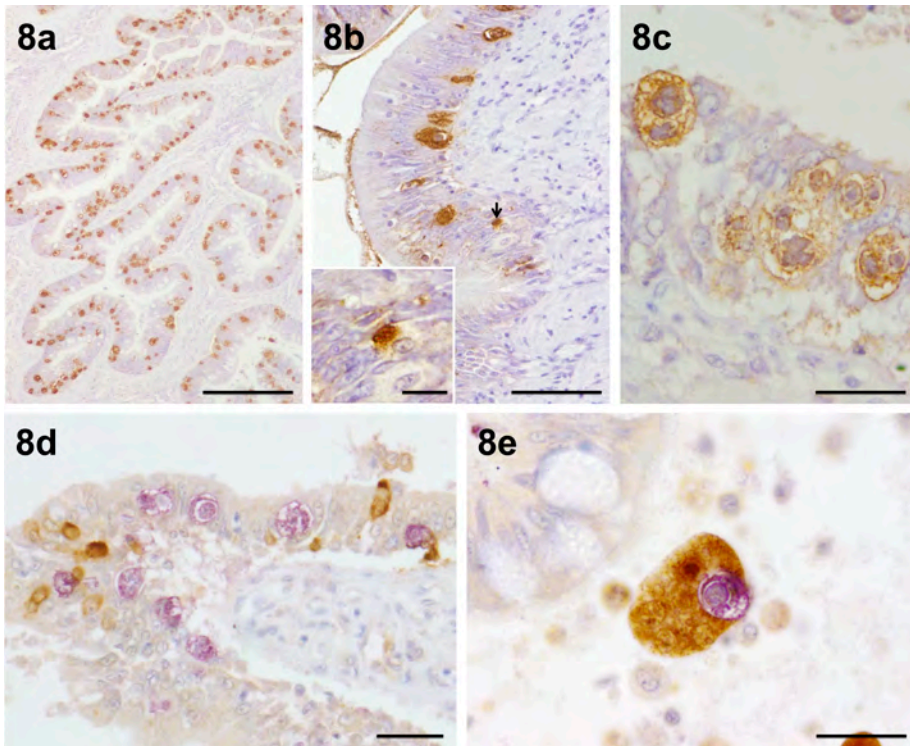


Figure 8: Light microscopy micrographs of the immunostaining of *Enteromyxum scophthalmi* (**8a,b,c**) and double immunostaining of active-caspase-3 and *E. scophthalmi* (**8d,e**) in the digestive tract of infected turbot. **8a:** Parasite stages appeared stained in the epithelium lining of the anterior gut. Bar = 200 μm . **8b:** Gastric epithelium in which there were several *E. scophthalmi* developmental stages, particularly one early stage near the basement membrane (arrow). Bar = 50 μm . Insert: Early stage of *E. scophthalmi* showing uniform staining throughout the cell. Bar = 10 μm . **8c:** Developmental stages of *E. scophthalmi* consisting of a primary cell and inside other secondary or even tertiary cells showed intense immunostaining with the protocol applied. Bar = 20 μm . **8d:** The use of double immunostaining showed no co-localization of active-caspase-3 and *E. scophthalmi*. Apoptotic cells (brown) were in the nearness of the parasites (purple), but not in direct contact. Bar = 25 μm . **8e:** Group of desquamated apoptotic epithelial cells (brown) surrounding a stage of *E. scophthalmi* (purple). Bar = 20 μm .



9.5. Discussion

Throughout the different experiments conducted with turbot exposed to *E. scophthalmi* by several pathways, cells with morphological signs of apoptosis occurring in the digestive epithelium, inflammatory infiltrates and lymphohaematopoietic organs have been observed (Bermúdez et al. 2006, 2010, Redondo et al. 2004, Sitjà-Bobadilla et al. 2006). The necessity of establishing the difference between early stages of *E. scophthalmi* and apoptotic epithelial cells, as well as assessing the occurrence of apoptosis through the disease, supported the use of specific techniques to characterize programmed cell death. So, the main aim of this study was to achieve a reliable technique to identify and quantify the cells undergoing apoptosis during turbot enteromyxosis.

Typical gross lesions of turbot enteromyxosis were observed in challenged turbot, especially at the last samplings. The findings were consistent with the description of the disease (Bermúdez et al. 2010). Developmental stages of *E. scophthalmi* in the digestive epithelium occurred from day 7 PI, and the progression of the disease was similar to the results obtained in other oral inoculations (Redondo et al. 2002). The prevalence of the infection increased as the disease progressed; however, a diminution of the parasitic burden, prevalence and severity of the lesions was noted in the last sampling. This might mean that these fish are particularly resistant to infection, a feature discussed in previous experiments (Bermúdez et al. 2006, Sitjà-Bobadilla et al. 2004).



In initial phases of turbot enteromyxosis, a simultaneous increase in both early parasitic forms and apoptotic epithelial cells was noted. The morphology of the early stages of *E. scophthalmi* located at the base of the intestinal lining epithelium hindered their differentiation from apoptotic cells (Bermúdez et al. 2010, Redondo et al. 2004). To characterize them, on the one hand, we first tried to detect apoptosis using the TUNEL procedure in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Even though the TUNEL assays have been applied in sections of mammals and another fish species (Alemañ et al. 2001, Negoescu et al. 1998, Passantino et al. 2010, Rucker et al. 2010), this technique did not work properly when applied to tissue sections of turbot. Besides, we obtained false positives jointly with moderate levels of background. This fact was already observed by other authors (Sloop et al. 1999, Stähelin et al. 1998, Tateyama et al. 1998), as in the kidney and liver of mice even having eliminated the factors related to the harvesting, preparation and staining of the samples that produce false-positive staining (Pulkkanen et al. 2000). On the other hand, the activation of caspases is one of the most specific indicators of the process of apoptosis (Duan et al. 2003, Wyllie 2010) and constitutes an alternative to the employment of the TUNEL assay (Hughes & Gobe 2007). The immunohistochemical technique stained cells with apoptotic morphological changes and the results were repeatable.

The employment of a double immunohistochemical assay against active caspase-3 and *E. scophthalmi* antibodies provided a method to distinguish apoptosis from developmental stages of the myxosporean, as there was no co-localization of the immunostaining. The



identification of early parasite structures makes easy the histological diagnosis in samples fixed and embedded in paraffin.

In relation to the apoptosis in the lining epithelium, the increase in the cell death is closely related to the epithelial desquamation, and several studies describe that pathogens activate caspase-3 during the contact with the host cell (Chin et al. 2002, Huston et al. 2000, Panaro et al. 2007).

E. scophthalmi may exert direct damage on enterocytes, as its intercellular location compressed adjacent host cells (Bermúdez et al. 2010, Redondo et al. 2003). In fact, the presence of parasites causes alterations in the intestinal lining epithelium that trigger the detachment of enterocytes from the basement membrane (Bermúdez et al. 2010). Strikingly, in the infection by *E. scophthalmi*, the active caspase-3+ cells were located in the parasitized folds, but not necessarily in direct contact with the myxosporean. The stages of development may release substances that induce apoptosis in infected areas. Similar to that occurs in rat intestinal epithelial cells provoked by nematode-derived molecules (Kuroda et al. 2002) or in human intestinal epithelial cells by *Giardia intestinalis* Kofoid & Christiansen, 1915 (Panaro et al. 2007). Another reason would be an increase in the rate of epithelial cell turnover promoted by cytokines as a strategy to expel the parasites, as reported in the infection by *Trichuris trichuria* L. in human (Cliffe et al. 2005). Furthermore, in turbot enteromyxosis, apoptosis might influence the host immune response against the parasite by means of two different ways. On the one hand, the increase in the apoptotic rate in the epithelium of the



digestive tract would reduce the inflammatory response at this level (Chin et al. 2002, Henson et al. 2001, Henson 2004). On the other hand, the viability of the cells surrounding the parasites, which is demonstrated by the absence of the anti-active caspase-3 labelling, would help to maintain the infection and provide nutrients in a similar manner as mammal enterocytes infected with *C. parvum* (Liu et al. 2008).

After damaging the enterocytes and releasing to the environment, *E. scophthalmi* removed from the epithelium individually or surrounded by epithelial cells. These surrounding cells underwent anoikis when detached from the basement membrane. Besides, when parasites are released into the intestinal lumen surrounded by a layer of epithelial cells, these remnant cells might help to protect and maintain the viability of the parasite in external conditions (Redondo et al. 2003).

Another striking finding was the large numbers of active caspase-3+ cells that appeared in the intestinal inflammatory infiltrates of turbot from severe group. The way in which apoptosis triggers in the LP may be due to the mediators released by the parasite during the infection (Gavrilescu & Denkers 2001), or to the existence of an exacerbated inflammatory reaction (Bermúdez et al. 2007, Sitjà-Bobadilla 2008). As a result, that creates an oxidative and full of immune molecule environment resulting in the cytokine-receptor binding that activates the caspases (Wyllie 2010).



The decreasing number of leucocytes in kidney and spleen of turbot with severe infection was already observed by Sitjà-Bobadilla et al. (2006) and Bermúdez et al. (2006, 2010). In sharpsnout sea bream, a similar depletion occurs during the infection by *E. leei* (Álvarez-Pellitero et al. 2008). The former authors attributed this depletion to a possible augment in apoptosis at the level of lymphohaematopoietic tissues or to the leucocyte migration to the intestinal LP. The increment in apoptosis in the kidney and spleen was not significant, although there was a clear increasing trend.

As a consequence, the depletion would not be only caused by the occurrence of apoptosis in cells of anterior kidney and spleen, but also due to the recruitment and migration of leucocytes to the parasitized intestine. Besides, the increment of apoptosis in the inflammatory cells populating the LP would contribute to the leucocyte depletion observed.

Surprisingly, in the current work, the employment of the immunohistochemistry to demonstrate active caspase-3+ cells showed a diminution of apoptosis in the lymphohaematopoietic organs of the infected fish compared to control. The events that occur during the early stages of inflammation, such as hyperaemia and the clonal expansion of Ig+ cells at the beginning of the disease (Bermúdez et al. 2006), contribute to the relative decrease in the number of apoptosis with respect to the total organ area.

To summarize, the infection with *E. scophthalmi* in turbot increased apoptosis in intestinal epithelial cells. However, this fact did not seem



to be the unique cause of epithelial desquamation. It might help to promote the breakdown of the epithelial barrier or may suppose a host response to clear the parasitization. Otherwise, the phenomenon of anoikis in desquamated cells surrounding the parasite promotes the dispersion of the myxosporean. Finally, the widespread apoptosis among the leucocytes in intestinal inflammatory infiltrates aggravates the depletion in the lymphohaematopoietic tissues and appears as an important factor in the severity of the enteromyxosis.





9.6. Acknowledgements

The authors would like to acknowledge María del Carmen Carreira and Sandra Maceiras for their technical assistance. This work was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and Ministerio de Ciencia e Innovación under Projects AGL2006-13158-C03-02 and AGL2009-13282-C02-02. A.P. Losada is the recipient of a predoctoral fellowship of the Programa María Barbeito 2008 (Xunta de Galicia).



Reprinted from: Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Ruiz de Ocenda MV, Quiroga MI (2012) Study of distribution of active caspase-3+ cells in turbot (*Psetta maxima* L.) enteromyxosis. Accepted for publication in J Fish Dis, January 2012.

AP Losada thanks the other authors their permission to include the reproduction of the article in her PhD thesis.



9.7. References

- Alemañ N, Quiroga MI, López-Peña M, Vázquez S, Guerrero FH, Nieto JM (2001) Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J Virol* 75:469-479.
- Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A (2008) Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol Int* 57:110-120.
- Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): a histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:501-512.
- Bermúdez R, Vigliano F, Quiroga MI, Nieto JM, Bosi G, Domeneghini C (2007) Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 22:252-263.
- Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010) Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis. *Dis Aquat Organ* 89:209-221.
- Boudreau N, Simpson CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267:891-893.
- Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). *J Fish Dis* 22:395-399.
- Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG (2002) Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70:3673-3680.
- Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK (2005) Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science* 308:1463-1465.



- do Vale A, Costa-Ramos C, Silva DS, Macedo PM, Fernandes R, Sampaio P, Dos Santos NM, Silva MT (2007) Cytochemical and ultrastructural study of anoikis and secondary necrosis in enterocytes detached in vivo. *Apoptosis* 12:1069-1083.
- Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA (2003) Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 199:221-228.
- Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124:619-626.
- Gavrilescu LC, Denkers EY (2001) IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 167:902-909.
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107:3569-3577.
- Henson PM (2004) Fingering IL-12 with apoptotic cells. *Immunity* 21:604-606.
- Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11:R795-805.
- Hughes J, Gobe G (2007) Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology* 12:452-458.
- Huston CD, Hout ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA, Jr. (2000) Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2:617-625.
- Kuroda A, Uchikawa R, Matsuda S, Yamada M, Tegoshi T, Arizono N (2002) Up-regulation of Fas (CD95) and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells by nematode-derived molecules. *Infect Immun* 70:4002-4008.
- Liu J, Enomoto S, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS (2008) Inhibition of apoptosis in *Cryptosporidium parvum*-infected intestinal epithelial cells is dependent on survivin. *Infect Immun* 76:3784-3792.
- Lüder CG, Gross U, Lopes MF (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17:480-486.
- Lugo-Martínez VH, Petit CS, Fouquet S, Le Beyec J, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Cardot P, Thenet S (2009) Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:235-244.
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E (2004) *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun* 72:6061-6067.



- Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F (1998) Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 52:252-258.
- Palenzuela O, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2002) Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124:369-379.
- Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, Brandonisio O, Cavallo P (2007) Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:302-309.
- Passantino L, Ostillio A, Cianciotta A, Russo C, Carrassi M, Patruno R, Dhaskali L, Passantino GF, Passantino A (2011) Apoptosis of gut-associated lymphoid tissue in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after incubation with *Candida albicans* and bacterial lipopolysaccharide. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33:347-350.
- Pulkkanen KJ, Laukkanen MO, Naarala J, Yla-Herttuala S (2000) False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis* 5:329-333.
- Quiroga MI, Redondo MJ, Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Vázquez S, Pérez A, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Risk factors associated with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Parasitology* 133:433-442.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J Parasitol* 88:482-488.
- Redondo MJ, Quiroga MI, Palenzuela O, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2003) Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Parasitol Res* 90:192-202.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol (Praha)* 51:188-198.
- Rucker EB, 3rd, Hale AN, Durtschi DC, Sakamoto K, Wagner KU (2011) Forced involution of the functionally differentiated mammary gland by overexpression of the pro-apoptotic protein bax. *Genesis* 49:24-35.
- Schaumburg F, Hippe D, Vutova P, Luder CG (2006) Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. *Parasitology* 132:69-85.
- Sitjà-Bobadilla A (2008) Fish immune response to Myxozoan parasites. *Parasite* 15:420-425.



- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Macías MA, Ferreiro I, Rianza A, Álvarez-Pellitero P (2004) Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol* 17:335-345.
- Sitjà-Bobadilla A, Redondo MJ, Bermúdez R, Palenzuela O, Ferreiro I, Rianza A, Quiroga I, Nieto JM, Álvarez-Pellitero P (2006) Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporidia: Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 21:485-500.
- Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balart JT, Hines IIM, Hill JM (1999) Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. *Arch Pathol Lab Med* 123:529-532.
- Stähelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J (1998) False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol* 51:204-208.
- Tateyama H, Tada T, Hattori H, Murase T, Li WX, Eimoto T (1998) Effects of prefixation and fixation times on apoptosis detection by in situ end-labeling of fragmented DNA. *Arch Pathol Lab Med* 122:252-255.
- Wyllie AH (2010) "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42:4-9.



10. ARTÍCULO IV: CHANGES IN NEUROENDOCRINE SYSTEM IN TURBOT ENTEROMYXOSIS

Effects of *Enteromyxum scophthalmi* experimental infection on the neuroendocrine system of turbot, *Psetta maxima* (L.)

Losada AP^{1,*}, Bermúdez R², Faílde LD¹, Quiroga MI¹, Di Giancamillo A³,
Domeneghini C³

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine,
University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

²Department of Anatomy and Animal Production, School of Veterinary Medicine,
University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

³Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety, University of
Milan, Milan, Italy.



10.1. Abstract

Enteromyxum scophthalmi is an intestinal myxosporean parasite responsible for serious outbreaks in turbot *Psetta maxima* (L.) culture, in North-western Spain. The disease affects the digestive tract, provokes severe catarrhal enteritis, emaciation and high rates of mortality. The digestive parasitization triggers a response with the coordinate participation of immune and neuroendocrine systems through the action of peptides released by enteroendocrine cells and present in nervous elements, acting as neuro-immune modulators. The present study was designed to assess the response of the turbot neuroendocrine system against *E. scophthalmi* infection. Immunohistochemical tests were applied to sections of the gastrointestinal tract of uninfected and *E. scophthalmi*-infected turbot to characterize the presence of bombesin (BOM), glucagon (GLUC), somatostatin (SOM), leu-enkephalin (LEU) and met-enkephalin (MET). The occurrence of *E. scophthalmi* in the turbot gastrointestinal tract increased the number of enteroendocrine cells immunoreactive to SOM, LEU and MET. On the other hand, BOM and GLUC immunoreactive cells were less numerous in the gastrointestinal tract of the parasitized turbot. Scarce immunoreactivity to BOM, GLUC and SOM was observed in nerve fibres and neurons of the myenteric plexus of control and infected fish. The results indicate that *E. scophthalmi* infection in turbot induced changes in the neuroendocrine system, with the diminution of the anorexigenic peptides BOM and GLUC; the increase of enkephalins, related to pro-



inflammatory processes; and the increase of SOM, which may cause inhibitory effects on the immune response, constituting a compensatory mechanism to the exacerbated response observed in *E. scophthalmi*-infected turbot.





10.2. Introduction

Turbot *Psetta maxima* (L.) is an increasingly cultured species in Europe, particularly in Spain with 7760 tonnes of production (73% of the global total) in 2011 (FEAP 2012). Amongst the pathologies responsible for high economic losses in turbot, enteromyxosis due to *Enteromyxum scophthalmi* (Palenzuela et al. 2002) is noteworthy causing infection prevalence and mortality near to 100% in the affected stocks during epizootic episodes (Branson et al. 1999). This parasite causes severe desquamating enteritis, which leads to the death of fish with evident emaciation. Prevention and control of turbot enteromyxosis is complicated as the direct transmission of *E. scophthalmi* in natural and experimental infections has been demonstrated (Redondo et al. 2002, 2004), and treatments against several myxosporean infections, including enteromyxoses, are ineffective (Athanasopoulou et al. 2004, Bermúdez et al. 2006a, Yokoyama et al. 1990). Along with the enteritis and leukocyte depletion observed in the head kidney and spleen from infected turbot, either a defective or delayed immune response has been also reported during outbreaks (Bermúdez et al. 2006b, 2010, Sitjà-Bobadilla et al. 2007).

The immune, nervous and diffuse endocrine systems respond cooperatively against intestinal aggressions, as it has been described in mammals and fish responding to digestive tract parasite infection (Bermúdez et al. 2007, Bosi et al. 2005a, Dezfuli et al. 2003, McKay



& Fairweather 1997). The communication between these three systems occurs by means of neuro-immune modulators (Snoek et al. 2010). Bidirectional interactions exist between the immune and neuroendocrine systems and the enteric nervous system may coordinate a multi-system response aimed at eradication of the parasite and, subsequent intestinal recovery. In the last decade, several publications have described variations in neurotransmitters in the digestive tract of parasitized fish (Bosi et al. 2005a, 2005b, Dezfuli et al. 2000, 2002, 2003, 2004, 2009, 2011), and a previous insight into the distribution of neuropeptides in the gut of *E. scophthalmi*-infected turbot was reported (Bermúdez et al. 2007). The aim of this study was to evaluate the gastrointestinal function by assessing the presence and variations of enteroendocrine system related peptides in *E. scophthalmi*-infected turbot by means of immunohistochemistry. The knowledge of the response of the neuroendocrine system of turbot against enteromyxosis may provide light into the development of infection and the improvement of new therapeutic strategies.



10.3. Materials and methods

10.3.1. Fish and sampling procedure

Turbot came from an experimental infection with *E. scophthalmi* by effluent transmission (Bermúdez et al. 2006b). Briefly, eighty turbot obtained from a fish farm in North-western Spain were used as receptor fish and exposed to the water effluent of a tank containing infected donor turbot. Another group of eighty uninfected control fish were hatched and reared with microbe-free water supply (flow-through supply of cartridge-filtered 1 µm mesh and UV-irradiated seawater). At 20, 40, 56, 78 and 107 days post exposure (PE) five turbot of each group were randomly chosen, necropsied and samples of stomach, pyloric caeca and intestine (anterior, medium and posterior intestine) were taken. Five fish, presenting a similar number of parasitic forms and lesions in the digestive tract, were selected for immunohistochemical studies. These fish corresponded to those sampled at 40 days PE to the parasite, presenting enough lesions to elicit an evident inflammatory response but not as severe as to mask the results.

10.3.2. Histology and immunohistochemistry

Samples of the digestive tract were fixed in Bouin's fluid (12 h at 4°C), dehydrated in graded ethanol series and embedded in paraffin wax. Microtome sections of 1-3 µm thick were deparaffinised, hydrated and stained with haematoxylin-eosin or toluidine blue. For



the immunohistochemistry, sections were collected on slides pre-treated with Vectabond (Vector Laboratories, CA, USA), allowed to dry overnight, and then dewaxed and hydrated. All washing procedures consisted of three successive 5 min immersions in phosphate-buffered saline (PBS; 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.5% [v/v] Tween 20, pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% hydrogen peroxide in PBS for 20 min, and sections were treated with normal goat serum (1:20) for 30 min to block non-specific staining. After incubation with the primary antisera (table 1), anti-rabbit EnVision+ System Labelled Polymer-HRP (Dakocytomation, Milan, Italy) was incubated for 30 min. Samples were developed using 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.04% w/v in Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4), washed in distilled water, counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted. The specificity of reactions was tested incubating in parallel negative controls, by substituting the primary antibody for PBS or an irrelevant polyclonal antibody. Sections of mammalian (swine) alimentary canal were used as positive controls.

10.3.3. Quantitative analysis of positive cells

Images were obtained using an Olympus camera (Camedia 3030, Olympus, Italy) connected to a photomicroscope Olympus BX51. Three digitised images were collected from each studied organ (stomach, pyloric caeca and anterior, medium and posterior intestine), using a 200x enlargement, and comparable regions from infected and control turbot were examined. The number of immunoreactive cells to



the used primary antiserum was counted on these images (75 images counted from each of the two groups).

Anti-serum	Working dilution	Incubation time	Code	Source
BOM	1:1000	12 h at 4°C	IHC 7113	Peninsula Lab.
GLUC	1:2000	48 h at 4°C	-	J.M. Pollack
LEU	1:1000	ON at 4°C	CA-08-235	Genosys Biotechnol.
LEU	1:2500	ON at 4°C	RAS 8601N	Peninsula Lab.
MET	1:400	ON at 4°C	GTX42620	Gene-Tex
MET	1:1000	ON at 4°C	T-4294	Bachem AG
SOM	1:800	ON at 4°C	CA-08-325	Genosys Biotechnol.
SOM	1:1000	ON at 4°C	AB1976	Chemicon Int.

Table 1: List of the primary antisera used in this study: BOM: bombesin, GLUC: glucagon, LEU: leu-enkephalin, MET: met-enkephalin, SOM: somatostatin. ON: over night.

10.3.4. Statistics

A Student's *t*-test was used to compare the means (average \pm SEM) of the number of endocrine cells positive to the used primary antisera between uninfected and infected groups of turbot. The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and the minimum significance level was set at $P < 0.05$.



10.4. Results

10.4.1. *Histopathological findings*

In fish from infected group, developmental stages of *E. scopthalmi* were found in the epithelial layer of all examined sections, but they were prevalent in pyloric caeca and anterior intestine. The presence of the parasite in the digestive tract of infected fish was usually associated with mild catarrhal enteritis, with focal detachment of the damaged epithelial layer and moderate numbers of inflammatory cells (mainly lymphocytes) in the lamina propria-submucosa. No parasitic forms were observed in fish from control group, in which the mucosal epithelium was always intact and the tunica propria-submucosa was devoid of inflammatory signs.

10.4.2. *Presence and distribution of entero-endocrine cells (ECs) and nervous structures*

In the present study, the presence of five neuromodulators was recognized in digestive tissue sections taken from either infected or control turbot. The expected negative or positive reactions were observed in the negative or positive controls, respectively.

10.4.2.1. Bombesin (BOM)

Immunohistochemical test with anti-BOM antiserum revealed spindle-shaped positive ECs in the lining epithelium of the stomach, being absent in the other portions of the digestive tract. The number of immunopositive cells was significantly higher in control than infected



animals (fig. 1 and table 2). Nerve fibres and nerve cell bodies immunoreactive to anti-BOM antiserum were noted in the nervous plexuses of the gastrointestinal tract, especially in the myenteric plexus in stomach and posterior intestine, mainly in healthy fish (fig. 2).

10.4.2.2. Glucagon (GLUC)

GLUC-immunoreactive ECs occurred throughout all the portions of gastrointestinal tract of both control and infected turbot. In the stomach, few fusiform-elongated and/or rounded shape GLUC-positive ECs were respectively found at the basis of the lining epithelium and the ad luminal portion of the gastric glands. In the pyloric caeca and the intestine, a moderate amount of spindle GLUC-immunostained cells was detected at the basis of the epithelium. GLUC-ECs were more frequent in the anterior and medium intestine (fig. 1). Recipient turbot showed a significantly fewer number of ECs than control turbot (table 2). Immunoreactive nerve fibres were rarely detected in both infected and control turbot, located in the tunica propria-submucosa in the intestine (fig. 2), and in the myenteric plexus of the posterior intestine.

10.4.2.3. Leu-enkephalin (LEU)

High numbers of LEU-immunoreactive, elongated ECs were demonstrated in all digestive portions of both control and infected turbot (fig. 1), except in the stomach, where they were absent. A significant increase in the mean number of ECs immunoreactive to LEU antiserum was found in turbot infected with *E. scophthalmi* (table 2). Neither positive nerve cell bodies nor nerve fibres were detected. In infected turbot, scattered or grouped rounded cells with



abundant cytoplasm compatible with melanomacrophage aggregates located in the tunica propria-submucosa were also immunostained with LEU antiserum (fig. 2).

10.4.2.4. Met-enkephalin (MET)

Elongated ECs reactive against MET antiserum were observed in the three portions of intestine and pyloric caeca of both control and infected turbot (fig. 2). The mean number of MET-ECs was superior in infected than control turbot although no statistical differences were detected (table 2). No positive nerve cell bodies or nerve fibres were detected.

10.4.2.5. Somatostatin (SOM)

SOM-immunoreactive ECs occurred in the gastric glands and in the lining epithelium of the stomach showing different appearance. Thereby, the ECs in the gastric gland were ovoid while the cells of the epithelial mucosa were spindle-shaped (fig. 2). Immunohistochemical test with antiserum raised against SOM revealed a significantly higher number of positive ECs in infected than control turbot (fig. 1 and table 2). SOM-immunoreactive nerve fibres were observed in the Meissner's and Auerbach's plexuses from the stomach to the posterior intestine of both control and infected animals. Although infrequent, they appeared with more intense immunostaining in the anterior intestine of infected turbot.

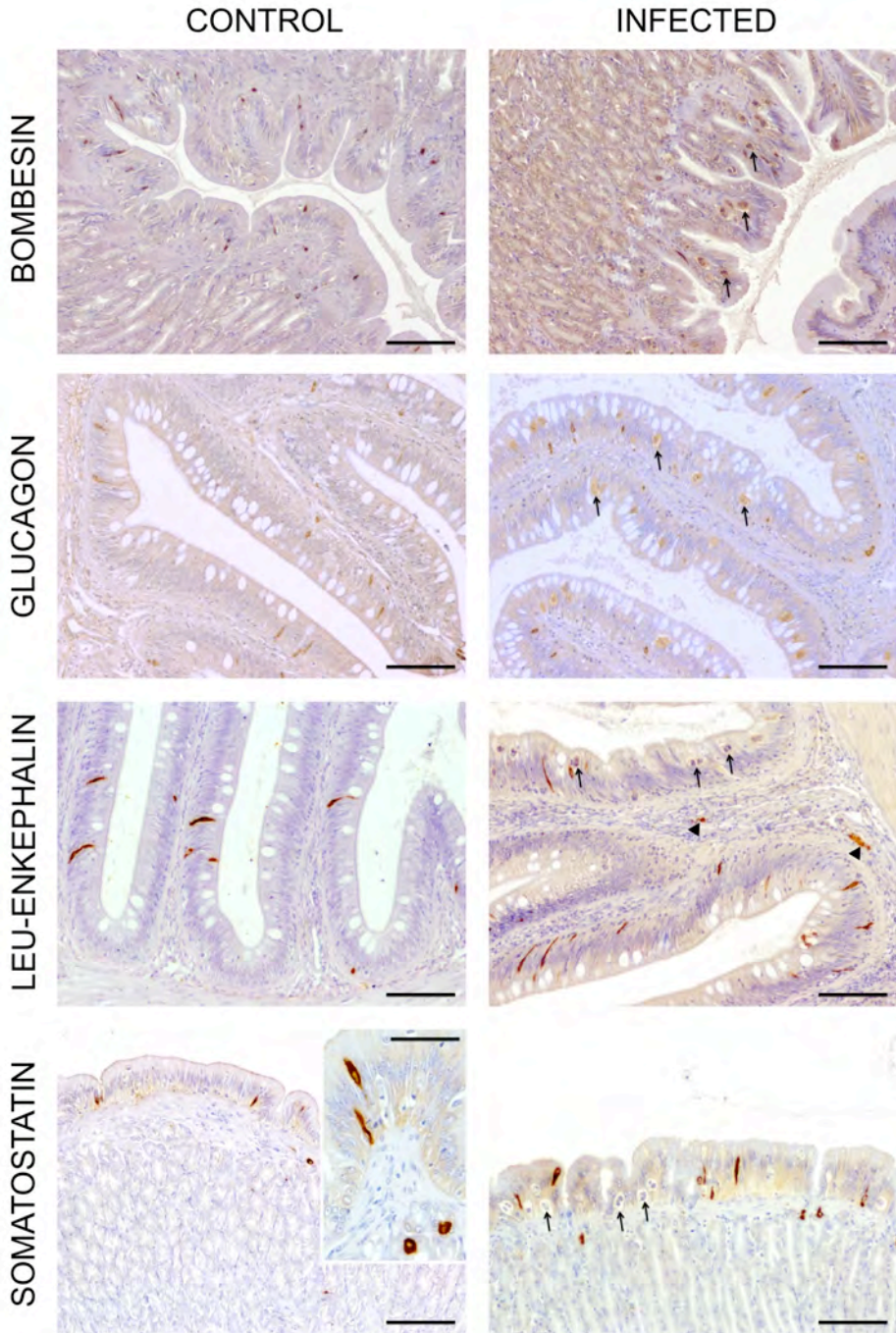




Figure 1: Immunohistochemical assays using anti-bombesin and anti-somatostatin antibodies on stomach, anti-glucagon and anti-leu-enkephalin antibodies on gastrointestinal tract of turbot control and infected with *E. scophthalmi* (arrows). **BOMBESIN:** Stomach. Immunoreactive cells appeared mainly in the lining epithelium of stomach in higher number in the control. Bars = 100 μ m. **GLUCAGON:** Medium intestine. Immunostained cells were ovoid to slightly spindle-shaped and located at the basal area of the lining epithelium. Bars = 100 μ m. **LEU-ENKEPHALIN:** Anterior intestine of control and medium intestine of infected. Elongated immunopositive cells were located in the lining epithelium in higher quantity in infected than in control turbot. In infected turbot there were rounded immunostained cells prone to cluster in the lamina-propria submucosa, compatible with incipient melanomacrophage aggregates (triangles). Bars = 100 μ m. **SOMATOSTATIN:** Stomach. Immunoreactive cells appeared both in the gastric glands and lining epithelium more frequently in the infected turbot. Bars = 100 μ m. Insert: Immunopositive cells were elongated in the gastric lining epithelium whereas ovoid in the gastric glands. Bar = 50 μ m.



Anti-serum	Uninfected fish	Infected fish	t-test	P value
BOM	6.2 \pm 0.57	4.35 \pm 0.41	2.644	0.029*
GLUC	9.68 \pm 0.53	7.27 \pm 0.52	3.252	0.012*
LEU	10.67 \pm 1.04	13.93 \pm 0.85	2.427	0.041*
MET	15.62 \pm 0.96	17.14 \pm 0.92	1.145	0.285
SOM	3.08 \pm 0.16	7.55 \pm 0.56	7.263	0.000**

Table 2: Mean number of endocrine cells immunoreactive to antisera in the digestive tract of turbot uninfected and infected with *E. scophthalmi*. Mean values are given \pm standard error of the mean. Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5. BOM: bombesin, GLUC: glucagon, LEU: leu-enkephalin, MET: met-enkephalin, SOM: somatostatin. Differences between mean numbers of endocrine cells from uninfected and infected turbot are *: significant and **: highly significant.

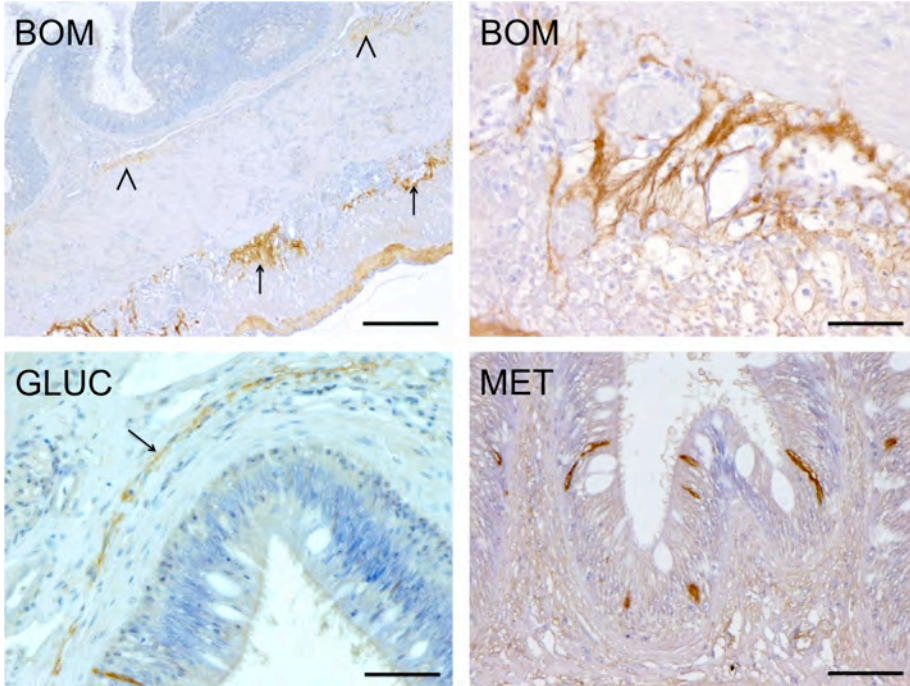


Figure 2: Gut sections of turbot immunostained with anti-bombesin (**BOM**), anti-glucagon (**GLUC**), and anti-met-enkephalin (**MET**) antisera. **BOM:** Hindgut of control turbot. On the left, immunopositive nerve fibres were detected in the submucosal (arrowheads) and myenteric (arrows) plexuses of the hindgut. Bar = 200 μ m. On the right, there is a detail of the fibres in the myenteric plexus. Bar = 50 μ m. **GLUC:** Hindgut of infected turbot. Immunoreactive nerve fibres of the Meissner's plexus, in the submucosa. Bar = 50 μ m. **MET:** Anterior intestine of control turbot. Immunopositive epithelial cells were mainly elongated or spindle-shaped and located in the lining epithelium. Bar = 50 μ m.



10.5. Discussion

By means of light microscopy examination, different developmental stages of the myxosporean *E. scopthalmi* were detected in the digestive tract of turbot experimentally exposed to the parasite. The presence of the parasite was noteworthy in the pyloric caeca and anterior intestine, preferential sites of *E. scopthalmi* invasion, from where it extends to the rest of the digestive tract (Redondo et al. 2004). The association between the presence of the myxosporean in the epithelium of the gastrointestinal tract and epithelial desquamation and inflammatory infiltrates in the intestinal lamina propria-submucosa concurs with other descriptions of the disease (Bermúdez et al. 2010, Branson et al. 1999, Redondo et al. 2002). In general, the extension and severity of the lesions were in accordance with the parasite burden.

BOM is a peptide that may play an endocrine role in the control of gastric functions such as regulation of acid secretion, inhibition of gastric emptying and stimulation of gastrointestinal motility (Holmgren 1985). Furthermore, the ability of BOM to decrease meal size and shorten the duration of eating has been demonstrated in several mammalian and fish species (Jensen 2001, Volkoff et al. 2005). In fish, BOM immunoreactivity is found in both nerves and endocrine cells, although the localization varies among species (Jensen 2001). In this study, BOM immunoreactivity was observed in ECs in the stomach, nerve cell bodies and fibres of the gastrointestinal nervous plexuses of turbot. This distribution is quite similar to the description in other fish species, in which the ECs are located in the



foregoing sections of the gastrointestinal tract (Bosi et al. 2004, Çinar et al. 2006), and the nervous system elements are distributed almost throughout the gastrointestinal tract (Bosi et al. 2004, Domeneghini et al. 2000). In the present study, a significant decrease in the number of BOM-immunoreactive ECs was found in infected turbot. Similar results were obtained in *S. trutta* infected with *Cyathocephalus truncatus* (Dezfuli et al. 2003) and *Oncorhynchus mykiss* infected with *Eubothrium crassum* (Bosi et al. 2005b). The diminution of BOM anorexigenic effects in infected turbot would be related to the favouring of the gastric emptying and a reduction of the satiety sensation.

GLUC is a peptide with hyperglycaemic and lipolytic action in fish (Moon 1998). Its levels appear increased after feeding (Navarro et al. 1993), fact related to higher plasma levels of glucose and stimulation of inhibitory feeding systems, which results in an anorexigenic effect in fish (Le Bail & Roef 1997). The distribution of GLUC-immunoreactive cells observed in this work was similar to that described by Reinecke et al. (1997) in juvenile turbot. The presence of *E. scophthalmi* in the digestive tract of turbot provoked a significant descent in the number of GLUC-immunopositive ECs. These results are analogous to those observed in *S. trutta* infected with *C. truncatus* (Dezfuli et al. 2003), *O. mykiss* infected with *E. crassum* (Bosi et al. 2005b) and *Leuciscus cephalus* infected with *Pomphorhynchus laevis* (Bosi et al. 2005a). Bosi et al. (2005b) suggested that the reduction of GLUC secreting cells would increase appetite. A similar effect might be supposed in *E. scophthalmi* infected turbot, although a hypothetical increase of food intake would not ameliorate turbot body condition,



due to the damage of the intestinal lining epithelium, and the subsequent failure in absorption of nutrients.

Enkephalins (MET and LEU) belong to the endogenous opiate system. In mammals they participate in modulating inflammation, have an inhibitory effect on intestinal peristalsis and reduce fluid and electrolyte secretion (Holzer 2009, Lukiw 2006, Radulović et al. 1996). In the digestive tract, they are released by enteric neurons, endocrine cells and immune cells (Holzer 2009). A significant increase in LEU-immunoreactive cells was noted in *L. cephalus* in response to the presence of *P. laevis* and *Gasterosteus aculeatus* infected with *Glugea anomala* (Bosi et al. 2005a, Dezfuli et al. 2004). Also, the number of cells positive for MET was significantly higher in *Carassius carassius* var. *auratus* subjected to experimental lead intoxication (Pederzoli et al. 1996); *Silurus glanis* and *Barbus barbus* infected with *P. laevis* (Dezfuli et al. 2011); and in *S. trutta* infected with different species of helminths (Dezfuli et al. 2000, 2002, 2008). In turbot infected with *E. scophthalmi*, the increase in the number of ECs immunopositive to LEU and MET antisera may suppose a mechanism to feedback the effects on intestinal motility and fluid secretions promoted by the increase in substance P (SP) and the diminishment of vasoactive intestinal peptide (VIP) (Bermúdez et al. 2007). Although the enkephalins counteract fluid secretion, they inhibit propulsive motor activity and this may be related to the distension and content accumulation within the intestine macroscopically observed in turbot (Holzer 2009).



Mammalian leukocytes (mainly monocytes, some granulocytes, and even lymphocytes) synthesize opioid peptides in response to releasing agents such as cytokines, during stress or inflammation (Machelska & Stein 2006, Rittner et al. 2001). The same functions have yet to be established in fish, but several authors have observed changes in the number of cells or nerve fibres immunoreactive to these peptides in response to helminthic infections (Dezfuli et al. 2002, 2004, 2008, 2011). In infected turbot LEU-immunoreactive rounded cells that tended to cluster in the lamina propria-submucosa were compatible with incipient centres of melanomacrophages (MMCs). LEU-immunostained cells were also observed in the same location in *L. cephalus* infected with *P. laevis* (Bosi et al. 2005a), as well as melanomacrophages in the tissues around *Diphyllobrothrium dendriticum* plerocercoids in *Coregonus lavaretus* (Dezfuli et al. 2007). Melanomacrophages migrate to the inflammatory focus and the development of MMCs occurs within maturing chronic inflammatory lesions (Agius & Roberts 2003). Melanomacrophages accomplish similar functions of mammalian follicular dendritic cells, participating in antigen trapping and presentation (Kato et al. 2013, Saunders et al. 2010, Vigliano et al. 2006) and their changes in size and density are used as indicators of contamination (Dabrowska et al. 2012). The increase of LEU immunoreactive ECs and the presence this neuropeptide in MMCs in the intestinal lamina propria-submucosa and lymphoid tissue of infected turbot (authors' unpublished results) indicates the participation of LEU in the response to the intestinal aggression.



In the current study, no MET-immunoreactive mast/eosinophilic granular cells, such as those reported in other teleost species (Dezfuli et al. 2008, 2009, 2011), could be observed in the lamina propria-submucosa of either infected or control fish. This result also coincides with the absence of this type of cell immunoreactive to serotonin described in previous studies (Bermúdez et al. 2007).

The presence of SOM has been reported in several fish species (Çinar et al. 2006, Domeneghini et al. 2000, Ku et al. 2004, Pan et al. 2000, Pederzoli et al. 1996, Youson et al. 2001). In teleosts, there are two main forms of SOM, SOM-25 and SOM-14, the latter identical to mammalian SOM (Reinecke et al. 1997). In our study in turbot, the use of commercial antisera against SOM (SOM-14) has shown immunopositive cells mainly in the stomach and few nerve fibres in the lamina propria-submucosa, agreeing with the results obtained throughout the ontogeny and the juvenile stage of turbot (Reinecke et al. 1997). SOM modulates almost all functions of gastrointestinal activity, exerting a great suppressing effect on gastric emptying and intestinal peristalsis (Van Op den bosch et al. 2009). SOM inhibits exocrine, endocrine and various peptides secretions, which include GLUC-like peptides and VIP (Larsson 2000, Van Op den bosch et al. 2009). According to our results, the diminution of GLUC and VIP-ECs (Bermúdez et al. 2007) may be influenced by the increase of SOM-ECs.

SOM exerts several immunosuppressing activities or immunomodulation. It inhibits the production of oxygen reactive species, adhesion and accumulation of granulocytes, lymphocyte and



monocyte proliferation and production of proinflammatory substances (Pintér et al. 2006, Sirinek & O'Dorisio 1991). SOM counteracts the effect of SP, due to the reduction of the release of tachykinins from enteric neurons or opposing receptor actions (Holzer & Holzer-Petsche 1997, ten Bokum et al. 2000). The SP actions inhibited by SOM include vasodilatation in arterioles, plasma protein extravasation, leukocyte accumulation and cytokine production by immune cells and other stimulated types of cells (Pintér et al. 2006). The increase in the levels of SP in turbot infected with *E. scophthalmi* has been related with the development of the immune response in the gut and increased immunoglobulin carrier cells, and even a runaway proinflammatory response was suggested associated to the high levels of this peptide in infected turbot (Bermúdez et al 2006b, 2007). In contrast, the increase in the number of SOM-immunoreactive cells in parasitized turbot may be a compensatory mechanism to lessen pro-inflammatory SP effects, as the levels of other inhibitory peptides did not vary (calcitonin gene-related peptide, CGRP) or even decreased (VIP) (Bermúdez et al. 2007).

In addition, SOM and its analogues can promote apoptosis in normal and tumour cells acting on both the extrinsic and the intrinsic cell death pathways (Pyronnet et al. 2008). The SOM analogue octreotide provokes inhibition of enterocyte migration and proliferation, which results in loss of intestinal regeneration. The administration of octreotide was related to enterocyte DNA fragmentation, boosting and predisposition to apoptosis (Thompson 1998). The increase of SOM during turbot enteromyxosis may affect epithelial apoptosis and



regeneration, contributing to the enterocyte cell death and lining desquamation (Losada et al. 2012).

Summarizing, with respect to the digestive processes and functions of the gastrointestinal tract, although the descend of levels of anorexigenic peptides as BOM and GLUC would contribute to delay satiety mechanisms and increase food intake, since infected turbot present gastrointestinal lesions that hamper absorption of nutrients.

A possible disproportioned immune response in enteromyxosis has been previously suggested, with the raise of proinflammatory substances as SP, and the decrease in the inhibitory peptides as VIP (Bermúdez et al. 2007). Increased levels of enkephalins would boost immune response as they have been related to inflammatory processes. On the other hand, the increment in SOM-positive ECs may represent an antagonistic mediator that opposes the rampant proinflammatory response (Bermúdez et al. 2007), although these effects would not be able to diminish the lesions and the inflammatory infiltrates.



10.6. Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology under project AGL2006-13158-C03-02, and Spanish Ministry of Science and Innovation projects AGL2009-13282-C02-02 and IT2009-0036. The authors sincerely thank María del Carmen Carreira Valle, Sandra Maceiras and Paolo Stortini for their excellent technical assistance. The authors also thank Stolt Sea Farm S.A. for kindly providing fish and for the use of their facilities. A.P. Losada was the recipient of a pre-doctoral fellowship under the Program Maria Barbeito 2008 from the (Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, Spain).



10.7. References

- Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis* 26:499-509.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyanis P, Vatsos I (2004) Efficacy and toxicity of orally administered anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Dis Aquat Organ* 62:217-26.
- Bermúdez R, Alemañ N, Vigliano F, Vázquez S, Quiroga MI, Nieto JM (2006a) Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A light and electron microscopic study. *Aquaculture* 254:65-71.
- Bermúdez R, Losada AP, Vázquez S, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P, Quiroga MI (2010) Light and electron microscopic studies on turbot *Psetta maxima* infected with *Enteromyxum scophthalmi*: histopathology of turbot enteromyxosis. *Dis Aquat Organ* 89:209-221.
- Bermúdez R, Vigliano F, Marcaccini A, Sitjà-Bobadilla A, Quiroga MI, Nieto JM (2006b) Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:501-512.
- Bermúdez R, Vigliano F, Quiroga MI, Nieto JM, Bosi G, Domeneghini C (2007) Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). *Fish Shellfish Immunol* 22:252-263.
- Bosi G, Di Giancamillo A, Arrighi S, Domeneghini C (2004) An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758. *Gen Comp Endocr* 138:166-181.
- Bosi G, Domeneghini C, Arrighi S, Giari L, Simoni E, Dezfuli BS (2005a) Response of the gut neuroendocrine system of *Leuciscus cephalus* (L.) to the presence of *Pomphorhynchus laevis* Muller, 1776 (Acanthocephala). *Histol Histopathol* 20:509-518.
- Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni E, Pironi F, Dezfuli BS (2005b) Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *J Fish Dis* 28:703-711.



- Branson E, Riaza A, Álvarez-Pellitero P (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). *J Fish Dis* 22:395-399.
- Çinar K, Senol N, Ozen MR (2006) Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *World J Gastroenterol* 12:6874-6878.
- Dabrowska H, Ostaszewska T, Kamaszewski M, Antoniak A, Napora-Rutkowski I, Kopko O, Lang T, Fricke NF, Lehtonen KK (2012) Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Ecotox Environ Safe* 78:14-21.
- Dezfuli BS, Arrighi S, Domeneghini C, Bosi G (2000) Immunohistochemical detection of neuromodulators in the intestine of *Salmo trutta* L. naturally infected with *Cyathocephalus truncatus* Pallas (Cestoda). *J Fish Dis* 23:265-273.
- Dezfuli BS, Castaldelli G, Bo T, Lorenzoni M, Giari L (2011) Intestinal immune response of *Silurus glanis* and *Barbus barbus* naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Parasite Immunol* 33:116-123.
- Dezfuli BS, Giari L, Arrighi S, Domeneghini C, Bosi G (2003) Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. *J Fish Dis* 26:155-166.
- Dezfuli BS, Giari L, Simoni E, Shinn AP, Bosi G (2004) Immunohistochemistry, histopathology and ultrastructure of *Gasterosteus aculeatus* tissues infected with *Glugea anomala*. *Dis Aquat Organ* 58:193-202.
- Dezfuli BS, Giovinazzo G, Lui A, Giari L (2008) Inflammatory response to *Denitruuncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. *Fish Shellfish Immunol* 24:726-733.
- Dezfuli BS, Lui A, Giovinazzo G, Boldrini P, Giari L (2009) Intestinal inflammatory response of powan *Coregonus lavaretus* (Pisces) to the presence of acanthocephalan infections. *Parasitology* 136:929-937.
- Dezfuli BS, Pironi F, Giari L, Domeneghini C, Bosi G (2002) Effect of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on putative neuromodulators in the intestine of naturally infected *Salmo trutta*. *Dis Aquat Organ* 51:27-35.
- Dezfuli BS, Pironi F, Simoni E, Shinn AP, Giari L (2007) Selected pathological, immunohistochemical and ultrastructural changes associated with an infection by *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) (Cestoda) plerocercoids in *Coregonus lavaretus* (L.) (Coregonidae). *J Fish Dis* 30:471-482.



- Domeneghini C, Radaelli G, Arrighi S, Mascarello F, Veggetti A (2000) Neurotransmitters and putative neuromodulators in the gut of *Anguilla anguilla* (L.). Localizations in the enteric nervous and endocrine systems. *Eur J Histochem* 44:295-306.
- FEAP Aquaculture Data (2012). The FEAP Production Report for 2011. Retrieved from the Web September 15, 2012. <http://www.feap.info/default.asp>
- Holmgren S (1985) Neuropeptide functions in the fish gut. *Peptides* 6, Supplement 3:363-368.
- Holzer P (2009) Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul Pept* 155:11-17.
- Holzer P, Holzer-Petsche U (1997) Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Therapeut* 73:173-217.
- Jensen J (2001) Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128:469-477.
- Kato G, Goto K, Akune I, Aoka S, Kondo H, Hirono I (2013) CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8 α and CD8 β . *Dev Comp Immunol* 39:293-301.
- Ku SK, Lee JH, Lee HS (2004) Immunohistochemical study on the endocrine cells in gut of the stomachless teleost, *Zacco platypus* (Cyprinidae). *Anat Histol Embryol* 33:212-219.
- Larsson L-I (2000) Developmental biology of gastrin and somatostatin cells in the antropyloric mucosa of the stomach. *Microsc Res Tech* 48:272-281.
- Le Bail P-Y, Roef G (1997) What hormones may regulate food intake in fish? *Aquat Living Resour* 10:371-379.
- Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Ruiz de Ocenda MV, Quiroga MI (2012) Study of distribution of active caspase-3+ cells in turbot (*Psetta maxima* L.) enteromyxosis. *J Fish Dis*. doi:10.1111/jfd.12029.
- Lukiw W (2006) Endogenous signaling complexity in neuropeptides. Leucine- and Methionine-Enkephalin. *Cell Mol Neurobiol* 26:1001-1008.
- Machelska H, Stein C (2006) Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:90-97.
- McKay DM, Fairweather I (1997) A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. *Parasitol Today* 13:63-69.
- Moon TW (1998) Glucagon: from hepatic binding to metabolism in teleost fish. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 121:27-34.
- Navarro I, Carneiro MN, Párrizas M, Maestro JL, Planas J, Gutiérrez J (1993) Post-feeding levels of insulin and glucagon in trout (*Salmo trutta fario*). *Comp Biochem Physiol A: Physiology* 104:389-393.
- Palenzuela O, Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2002) Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus*



- maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124:369-379.
- Pan QS, Fang ZP, Zhao YX (2000) Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. *World J Gastroenterol* 6:96-101.
- Pederzoli A, Trevisan P, Bolognani Fantin AM (1996) Immunocytochemical study of endocrine cells in the gut of goldfish *Carassius carassius* (L.) var. *auratus* submitted to experimental lead intoxication. *Eur J Histochem* 40:305-314.
- Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J (2006) Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Therapeut* 112:440-456.
- Pyronnet SP, Bousquet C, Najib S, Azar R, Laklai H, Susini C (2008) Antitumor effects of somatostatin. *Mol Cell Endocrinol* 286:230-237.
- Radulović M, Mančev Z, Stanojević S, Vasiljević T, Kovačević-Jovanović V, Pešić G (1996) Modulation of humoral immune response by central administration of leucine-enkephalin: Effects of μ , δ and κ opioid receptor antagonists. *J Neuroimmunol* 65:155-161.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol (Praha)* 51:188-198.
- Redondo MJ, Palenzuela O, Riaza A, Macías A, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J Parasitol* 88:482-488.
- Reinecke M, Müller C, Segner H (1997) An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* (Teleostei). *Anat Embryol* 195:87-101.
- Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schafer M, Stein C (2001) Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 95:500-508.
- Saunders HL, Oko AL, Scott AN, Fan CW, Magor BG (2010) The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol* 34:669-676.
- Sirinek LP, O'Dorisio MS (1991) Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. *Acta Oncol* 30:509-517.
- Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O, Riaza A, Macías MA, Álvarez-Pellitero P (2007) Protective acquired immunity to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) is related to specific antibodies in *Psetta maxima* (L.) (Teleostei). *Scand J Immunol* 66:26-34.



- Snoek SA, Borensztajn KS, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ (2010) Neuropeptide receptors in intestinal disease: physiology and therapeutic potential. *Curr Pharm Des* 16:1091-1105.
- ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM (200) Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. *Eur Cytokine Netw* 11:161-176.
- Thompson JS (1998) Somatostatin analogue predisposes enterocytes to apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2:167-173.
- Van Op den Bosch J, Adriaensen D, Van Nassauw L, Timmermans J-P (2009) The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regul Peptides* 156:1-8.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:467-471.
- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol* 142:3-19.
- Yokoyama H, Ogawa W, Wakabayashi H (1990) Chemotherapy with fumagillin and toltrazuril against kidney enlargement disease of goldfish caused by the myxosporean *Hoferellus carassii*. *Fish Pathol* 25:157-163.
- Youson JH, Al-Mahrouki AA, Naumovski D, Conlon JM (2001) The endocrine cells in the gastroenteropancreatic system of the bowfin, *Amia calva* L.: An immunohistochemical, ultrastructural, and immunocytochemical analysis. *J Morphol* 250:208-224.