

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EFFECTO DE LA ARGININA EN LA DIETA SOBRE
HEMATOLOGIA Y RESPUESTA INMUNE DEL BAGRE
DEL CANAL (*Ictalurus punctatus*)**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARTHA CANDELARIA REYES BECERRIL

TUTOR: Dr. Alejandro Buentello García
COMITE TUTORAL: Dra. María Teresa Viana Castrillón
Dr. Carlos Vázquez Peláez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA

A mis ángeles...

AGRADECIMIENTOS

Al personal docente y de apoyo de la maestría de Ciencias de la Producción y la Salud Animal FESC-UNAM por las facilidades prestadas durante mi estancia como estudiante de esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado, durante mi maestría.

Al Dr. Armando Shimada Miyasaka, por el conocimiento y sabiduría transmitida, así como su amistad y apoyo brindado durante mi estancia en Ajuchitlán, Querétaro.

Quiero agradecer particularmente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz B.C.S., por las instalaciones prestadas durante mi estancia así como el apoyo económico recibido, y especialmente a todo el personal que estuvo involucrado y me brindo su ayuda y amistad, especialmente a los técnicos Jorge Sandoval, Jorge Calvillo, Gilberto Colado y Sandra de La Paz.

A mis asesores de tesis, Dr. Alejandro Buentello, Dra. Viana Castrillón, Dr. Carlos Vásquez, Dr. Ernesto Ávila y Dr. Andrés Romero por compartir sus comentarios y consejos en la elaboración de este documento.

Al Dr. Felipe Ascencio por permitirme trabajar en el laboratorio de patología Microbiana así como su amistad recibida.

A la responsable de laboratorio de patología "La Chulita" por sus conocimientos transmitidos y manejo inicial del laboratorio.

A mis compañeros de maestría Juanito, Jaime y Edgar. A mis amigochis que me acompañan siempre Yesy, Cony, Kary, Laurence, Laura y Oscarito. A mis amigas de laboratorio, Normis y Aliss y al club. Y Carlos por su apoyo y amor brindado durante mi estancia en Querétaro.

A mi apreciable familia a la que quiero mucho y con la que siempre cuento: mi Madre Sra. Martha Becerril, mi hermana Ady y mi sobrino Memito.

Y a la fuente de mi inspiración por salir adelante mi abuelo, Profr. Leonardo Reyes Silva.

Gracias...

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas en la acuicultura son responsables de mortalidades masivas e importantes pérdidas económicas. Sin embargo, hay indicaciones de que optimizando la composición de la dieta puede ayudarse a prevenir dichas enfermedades. La arginina es un aminoácido considerado indispensable en ciertos periodos fisiológicos y su metabolismo tiene una función importante para el óptimo crecimiento de peces y animales terrestres. El presente estudio tuvo por objetivo el evaluar el efecto de la suplementación de arginina dietaria sobre el sistema inmunológico del bagre de canal. Se utilizaron bagres, *Ictalurus punctatus*, con un peso promedio aproximado de 35 g. Los peces fueron alimentados con dietas purificadas basadas en caseína/gelatina con 28% de proteína cruda y suplementadas con hidrocloreto de L-arginina a 0.5, 1, 2 y 4% de la dieta. Una dieta con proteína intacta y 1.3% arginina fue también incluida para evaluar el efecto de la presentación de los aminoácidos (cristalinos libres vs. proteína intacta). Los peces fueron alimentados a saciedad aparente por 6 semanas. Cada dieta experimental se administró por triplicado a grupos de 20 peces seleccionados al azar. Al final del periodo de alimentación se inyectó a los peces peritonealmente 2 mg LPS/Kg de peso vivo. La misma dosis se repitió a los tres días. Seis días después de la inyección inicial, los peces fueron anestesiados y muestras de sus tejidos fueron obtenidas para evaluar los siguientes parámetros: hemoglobina, hematocrito, biología hemática, proteína plasmática, lisozima plasmática, fagocitosis y actividad hepática de superóxido dismutasa. En general, los suplementos de arginina aumentaron de manera significativa ($P < 0.05$) la magnitud de la respuesta fagocítica, elevando la hemoglobina, el hematocrito, y los conteos de hematíes y basófilos, así como la actividad de superóxido dismutasa. Sus efectos fueron mínimos sobre lisozima, valor corpuscular medio y conteos de leucocitos, linfocitos, eosinófilos y monolitos. Los resultados demuestran que algunos componentes del sistema inmune del bagre de canal responden positivamente a suplementos de arginina dietaria.

Palabras clave: •arginina •sistema inmune •bagre de canal •*Ictalurus punctatus*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martha Candelaria
Rojas Becenil
FECHA: 14 Mayo de 2004
FIRMA: 

ABSTRACT

Infectious diseases in aquaculture are responsible for important economic losses due to massive mortalities. Several studies have demonstrated that the optimization of diet formulations may help prevent these problems. Arginine is considered indispensable at certain physiological stages and its metabolism plays important roles on growth and disease resistance of both fish and terrestrial animals.

This study was conducted to assess the effects of dietary arginine on blood chemistry and immune parameters of juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Fishes were fed casein/gelatin-based diets containing 28% crude protein and supplemented with crystalline L-arginine-HCl at 0.5, 1, 2 or 4% of diet. An intact-protein diet containing 1.3% arginine was also included to evaluate the effects of amino acid form (crystalline free vs. intact protein). Each diet was provided to apparent satiation to triplicate groups of fish for 6 weeks. At the end of the feeding period, fishes were injected peritoneally with 2 mg LPS/kg body weight. Three days later, the dose was repeated. Six days after the initial injection, fishes were anesthetized and tissue samples were obtained to evaluate the following parameters: hemoglobin, hematocrit, blood cell counts, plasma protein, serum lysozyme, phagocytosis and superoxide dismutase activity in liver. A moderate supplement of dietary arginine significantly ($P < 0.05$) increased the magnitude of the phagocytic response, whereas higher supplementation increased levels of hemoglobin and hematocrit. Erythrocyte/basophil counts were also augmented as well as the activity of superoxide dismutase. Other parameters were affected to a minor extent only. These results indicate that some components of the immune system of channel catfish are responsive to variations of dietary arginine.

Keywords: • arginine • immune system • channel catfish • *Ictalurus punctatus*

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
1).- Arginina como inmunomodulador	4
2).- Importancia de las proteínas	7
3).- Sistema inmune de los teleósteos: nutrición-inmunología	7
4).- Inmunidad innata o no-específica.....	8
4.1).- Respuesta Celular.....	8
4.1.1).- Fagocitosis.....	9
4.1.2).- Leucocitos o células blancas.....	9
Monocitos	10
Linfocitos.....	10
Granulocitos.....	10
Neutrófilos.....	10
Basófilos.....	11
Eosinófilos.....	11
4.1.3).- Eritrocitos o glóbulos rojos.....	11
4.1.4).- Enzimas antioxidantes	11
4.2).- Respuesta humoral.....	12
4.2.1).- Lisozima.....	12
5).- Inmunidad adquirida o específica.....	13
III).- HIPOTESIS	14
IV).- OBJETIVO GENERAL	14
V).- OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
VI).- METODOLOGIAS	15
1).- Peces.....	15
2).- Dietas experimentales.....	15
3).- Diseño experimental y análisis estadístico.....	16
4).- Mediciones Experimentales.....	17
i).- Proteína plasmática.....	17
ii).- Hemoglobina	17
iii).- Hematocrito.....	18
iv).- Análisis diferencial de células	18
v).- Actividad de lisozimas.....	19
vi).- Extracción de macrófagos de cavidad peritoneal.....	19
vii).- Análisis de fagocitosis con macrófagos.....	20
viii).- Extracción de hígado para análisis de SOD.....	21
xi.) Análisis de SOD.....	22
VII).- RESULTADOS	23
1).- Análisis de proteína.....	23

2).- Hematología.....	23
3).- Análisis de lisozima.....	23
4).- Análisis de SOD	24
5).- Análisis de fagocitosis.....	24
VIII).- DISCUSIÓN.....	27
1).- Proteína plasmática.....	27
2).- Análisis de lisozima.....	28
3).- Hematología.....	39
4).- Análisis de SOD	31
5).- Análisis de fagocitosis.....	32
IX).- CONCLUSIÓN.....	34
X). ABREVIATURAS.....	35
XI).- LITERATURA CITADA.....	36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Composición de las dietas experimentales	16
Tabla 2.- Efecto de la arginina dietaria sobre parámetros inmunológicos en el bagre de canal.....	25
Tabla 3.- Efecto de la arginina dietaria sobre hematología del bagre de canal.....	25
Tabla 4. Efecto de la arginina en la dieta y en medio de cultivo sobre la capacidad fagocítica de macrófagos de cavidad peritoneal del bagre de canal.....	26

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Metabolismo de la arginina.....	6
--	---

APENDICES

Apéndice I Sistema Experimental.....	43
Apéndice II. Diagrama de flujo de las metodologías.....	44
Apéndice III. Fotografías peces y sistema.....	45

I. INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas en la acuicultura son responsables de mortalidades masivas e importantes pérdidas económicas (Thomson *et al.*, 1996). Sin embargo hay indicaciones de que optimizando la composición de la dieta puede ayudarse a prevenir algunas enfermedades (Erdal *et al.*, 1991). El contenido proteico de la dieta y la concentración de aminoácidos individuales tanto dietéticos, como plasmáticos ha demostrado tener influencia significativa sobre el sistema inmune de peces (Landolt, 1989). La acción de nutrientes inmunomoduladores como glutamina, arginina, vitaminas C y E, ácidos grasos $\Omega 3$ y $\Omega 6$ tiene gran importancia (Daly *et al.*, 1992), dichos nutrientes desempeñan funciones fisiológicas fundamentales para la actividad del sistema inmune (Hardie *et al.*, 1991). Por ejemplo, la suplementación de la dieta con α -tocoferol ha confirmado la importancia de la vitamina E sobre la inmunidad en homeotermos, en donde ambas defensas humoral y celular son aumentadas (Panush *et al.*, 1985). Así mismo, hay indicaciones de que la vitamina C puede tener efectos indirectos sobre la actividad fagocítica, la producción de citocinas y la opsonización de partículas por complementos en peces (Secombes *et al.*, 1994). En un estudio con salmón Atlántico, *Salmo salar* (Thompson *et al.*, 1996) suplementaron dietas experimentales con ácidos grasos poli-insaturados ($\Omega 3$ y $\Omega 6$) a diferentes niveles, concluyéndose que las dietas con tasas reducidas de ácidos grasos poliinsaturados ($\Omega 3$)/($\Omega 6$) son menos resistentes a infecciones que dietas con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, en esa especie.

La arginina es un aminoácido semiesencial para humanos y animales y es un componente indispensable para el ciclo de la urea, manteniendo al ciclo en estado activo para la detoxificación de amonía (Higashi *et al.*, 1995). Es convertida por la enzima arginasa a ornitina y urea, por lo que es requerida en fases de crecimiento rápido, condiciones de daño tisular y estrés (Loscalzo, 2001).

Este aminoácido es considerado indispensable para el crecimiento óptimo de peces y animales terrestres (Shah *et al.*, 2002). La arginina también tiene un

potente efecto secretagogo sobre glándulas endocrinas y neuroendocrinas (Fournier *et al.*, 2002), aumentando la secreción de insulina, glucagón, polipéptidos pancreáticos, hormona del crecimiento y prolactina e IGF-1 (Loscalzo, 2001; Shah *et al.*, 2002). Este aminoácido participa en la síntesis proteica, activación de los nucleótidos y en la síntesis de poliaminas. Estas moléculas son cruciales para la proliferación y diferenciación celular y son asimismo requeridas para la síntesis de ADN, la biosíntesis de creatina – que participa en el metabolismo de energía en músculo y fibras nerviosas; biosíntesis de prolina – requerida para la síntesis de colágeno, un constituyente fundamental de huesos y matrices extracelulares (Shah *et al.*, 2002). Como activador alostérico de la enzima N-acetilglutamato sintetasa, la arginina participa en la síntesis de N-acetilglutamato – un cofactor esencial para carbamoilfosfato sintasa I. Significativamente, un crecimiento retardado y altas mortalidades han sido reportadas como señales de deficiencia de arginina en trucha arcoiris (Ketola, 1983) y bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Robinson *et al.*, 1981).

Como su precursor único, la arginina es indispensable para la producción de óxido nítrico (NO), sintetizando, a través de la enzima óxido nítrico-sintetasa, NO y citrulina (Soberanes y Cortés, 2001). El NO – una molécula altamente reactiva – ha sido implicada en la acción citotóxica de macrófagos activados de bagre (Buentello y Gatlin, 1999), teniendo efectos antibacterianos, antifungales y antitumorales (Fernández *et al.*, 2001). Estudios con peces han demostrado que la síntesis de NO en macrófagos, como respuesta a lipolisacáridos bacterianos, se incrementa en presencia de arginina (Buentello y Gatlin, 1999). Las dietas suplementadas con arginina pueden ser de enorme importancia sobre la activación de los macrófagos, donde la producción de NO es aumentada cuando este aminoácido se encuentra presente a niveles por encima del requerimiento dietético (Wu y Brosnan, 1992). Buentello y Gatlin (2001), reportaron que la suplementación de arginina en la dieta a un nivel doble del requerido para crecimiento óptimo, aumenta la supervivencia del bagre de canal expuesto experimentalmente al patógeno *Edwardsiella ictaluri*. Es

claro entonces que el metabolismo de la arginina tiene un papel preponderante en el crecimiento y sobrevivencia de los peces.

II. ANTECEDENTES

1).- Arginina como inmunomodulador del sistema inmune

En las últimas dos décadas, numerosos estudios han mostrado que la arginina juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos, biológicos e inmunológicos. En experimentos con animales que han recibido suplementos de arginina, se han delineado algunos de los efectos que este aminoácido ejerce sobre el sistema inmune (Reynolds, 1988). La arginina ha sido clasificada como un aminoácido semiesencial, debido a su requerimiento nutricional para el crecimiento óptimo de algunas especies. La arginina es el ácido 2-amino-5-guanilovalérico ($C_6H_{14}N_4O_2$) y tiene un peso molecular de 174 daltons. Este aminoácido puede ser obtenido de fuentes exógenas, vía absorción intestinal, la degradación intracelular de proteína, o por la síntesis endógena de arginina. A nivel celular, la arginina es metabolizada por diferentes enzimas a varios productos finales que están relacionados con la inmunomodulación. En el ciclo de la urea la ornitina se convierte a citrulina y subsecuentemente a arginina (Fahey, 1956).

De una extensa revisión de las funciones fisiológicas de la arginina, García de Lorenzo y Montejo (2000) listan las siguientes como las más importantes:

- Participa en la ureagénesis, regulando la detoxificación del amonio dentro del ciclo de la urea – de limitada importancia en la mayoría de los teleósteos
- Estimula la liberación de hormonas anabólicas y de factores de crecimiento
- Induce un incremento en la secreción de hormonas pituitarias (hormona del crecimiento, prolactina, vasopresina), pancreáticas (insulina, glucagón, somatostatina) y suprarrenales (catecolaminas, aldosterona)
- Interviene en el proceso de cicatrización
- Es el precursor fundamental del NO

- Interviene como sustrato en la síntesis de poliaminas a partir de la ornitina
- Proporciona el grupo amidino para la síntesis de creatina, interviniendo de manera fundamental en la reserva de fosfatos de alta energía y en la regeneración del ATP muscular

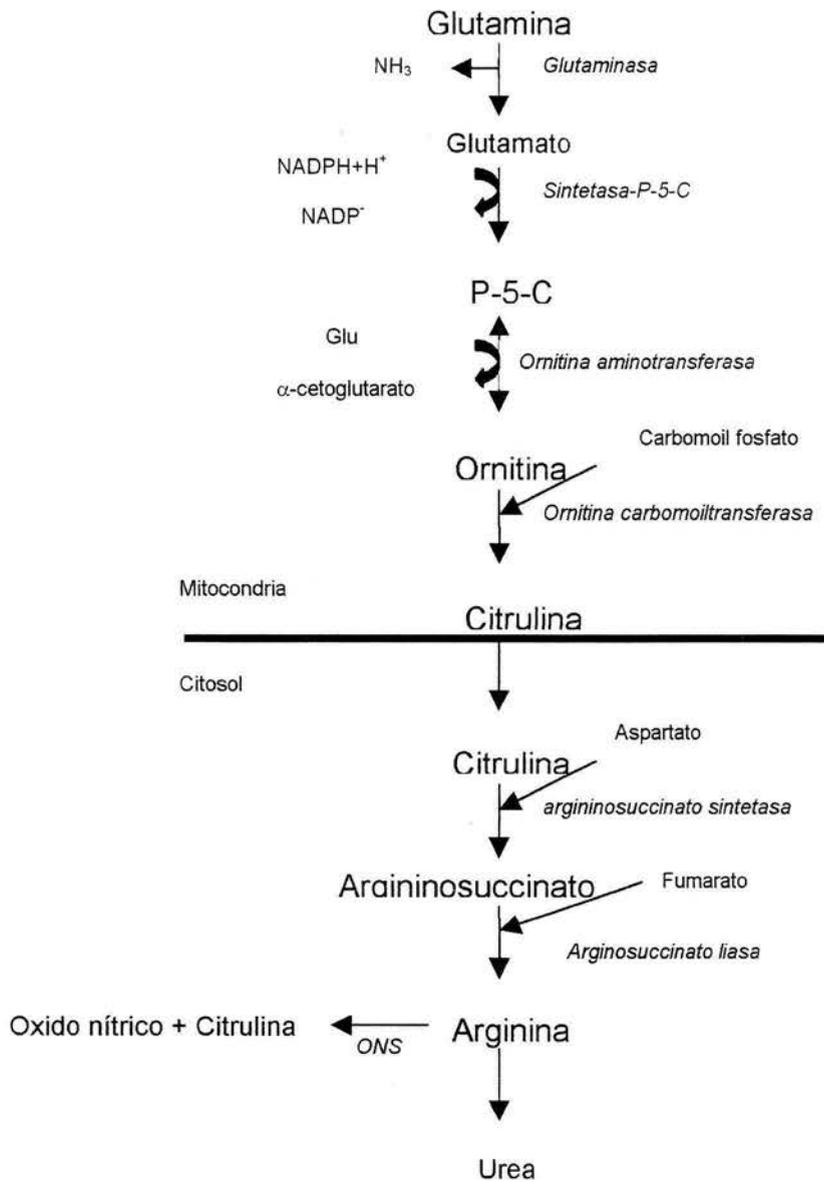


Fig. 1 Metabolismo de la arginina a partir de glutamina.
 Abreviaciones: P-5-C, pirrolina-5-carboxilato; ONS, óxido nítrico sintetasa. Adaptado de Buentello y Gatlin (1999) y Wu y Knabe (2001);

2).- Importancia de la proteína plasmática

Se considera que el estatus nutricional tiene una influencia importante en la salud y en la capacidad de los animales para resistir enfermedades. La concentración de proteína plasmática es un indicador importante del estado fisiológico del animal (Landolt, 1989). La respuesta metabólica a infecciones patógenas se caracteriza, en parte por pérdida de peso, desequilibrio del balance de nitrógeno y una disminución en la absorción de las proteínas (Tischler y Fagan, 1983). Esto debido a que durante un reto inmunológico, el substrato metabólico y energético de las células que conforman el sistema inmune es precisamente el plasma sanguíneo (Buentello y Gatlin, 1999). Dichas respuesta está necesariamente asociada con cambios en la concentración de aminoácidos libres, en plasma y músculo esquelético, incluyendo disminuciones en las reservas de arginina y glutamina (Moinard *et al.*, 1999).

Las concentraciones de arginina normal en plasma en vertebrados tienen un rango de 95 a 250 $\mu\text{mol/L}$, dependiendo del estado fisiológico y nutricional (Wu y Morris, 1998) y para el bagre van de 60 a 240 $\mu\text{mol/L}$ (Buentello y Gatlin 2001; Buentello y Gatlin 2002). Las deficiencias de arginina o proteína en la dieta resultan en una deficiencia de arginina plasmática en animales y en humanos, particularmente en organismos jóvenes (Wu *et al.*, 1999).

3).- Sistema inmune de los teleósteos: nutrición-inmunología

Dentro de los peces, los teleósteos son los organismos evolutivamente más avanzados. Presentan una respuesta inespecífica (innata) y otra específica (adquirida), ambas capaces de actuar frente a los distintos patógenos. El nivel de desarrollo y complejidad de estos sistemas en los teleósteos es semejante al de los vertebrados superiores (mamíferos). Sin embargo, en el caso de los teleósteos, la importancia relativa de la inmunidad innata y la adquirida en el conjunto de su sistema difiere respecto a los vertebrados homeotermos. En todos los poiquilotermos, la inmunidad adquirida se desarrolla más lentamente

(Alexander, 1985). Esto explica el hecho de que los peces conserven un gran número de mecanismos de defensa humorales no específicos (Alexander, 1985). En varias especies ha sido demostrado que el nivel de alimentación tiene gran influencia sobre el número de leucocitos en sangre o producción de anticuerpos, sugiriendo que consumos bajos de alimento (inanición) resultan en concentraciones subóptimas de uno o más factores asociados con la inmunidad (Hardie *et al.*, 1990). Una deficiencia nutricional induce alteraciones en neutrófilos y macrófagos tales como quimiotaxis, fagocitosis y una capacidad microbicida disminuida (Chandra, 1991). La suplementación con arginina produce un aumento en la cicatrización de las heridas y mejora la función inmunológica de los animales mediante la disminución de la disfunción de células T (Fernández *et al.*, 2001). La administración de arginina a ratas en fase postraumática también produce una mejora en la respuesta inmune, manifestada por un aumento del peso del timo, aumento de la celularidad del mismo y aumento de la blastogénesis de las células T (Landolt, 1989).

4).- Inmunidad Innata o no-específica.

En peces, la inmunidad no-específica se considera como la primera línea de defensa y representa una parte considerable de la respuesta inmune y es inducido por un antígeno o cuerpo extraño y discrimina lo propio de lo extraño (Bernstein *et al.*, 1998). El sistema inmune de los peces contiene una serie de mecanismos entre los que incluimos barreras mecánicas, sistema de defensa celular y humoral no específico y sistema de defensa celular y humoral específico.

4.1).- Respuesta celular

Las interacciones celulares con el medio extracelular regulan muchas funciones celulares básicas como proliferación, diferenciación, migración, crecimiento celular y muerte celular programada ó apoptosis (Bly y Clem, 1992). En vertebrados, los leucocitos diferenciados tales como monocitos, macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas, son parte integral de la

respuesta celular no específica ya que pueden actuar directamente sobre el patógeno (Igram, 1990).

4.1.1).- Fagocitosis

En peces así como en mamíferos, hay dos tipos celulares que comúnmente tienen capacidad fagocítica: los granulocitos neutrófilos y los fagocitos mononucleares (monocitos/ macrófagos). La fagocitosis – proceso por el cual las células interiorizan, matan y digieren diferentes partículas (células dañadas o infectadas, microorganismos, etc.) – desempeña una función importante en la respuesta inmune innata. La fagocitosis puede dividirse en tres fases principales:

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

Los fagocitos son capaces de matar patógenos usando una variedad de mecanismos de destrucción que pueden ser oxígeno-dependientes (especies de oxígeno reactivo, ROS) y nitrógeno-dependientes (especies de nitrógeno reactivo, RNS; Secombes *et al.*, 1996). Hay diversos activadores capaces de estimular la respuesta fagocítica y entre los factores que inciden en dicho estímulo, el más conocido es el lipopolisacárido (LPS; Morrison y Kline 1977; Byrne, 2002). En un cultivo celular, el LPS puede estimular directamente a los fagocitos (Secombes, 1994). Estimulantes de fagocitosis pueden ser, además de LPS (Byrne, 2002), fragmentos del complemento (Schifferli, 1986), así como aminoácidos como la arginina (Albina, 1989).

4.1.2).- Leucocitos o células blancas

Los leucocitos defienden al organismo contra agentes extraños. Son células que pueden encontrarse en sangre circulante o en tejidos. Su clasificación, según

criterio morfológico, distingue varios tipos: linfocitos, granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y monocitos o macrófagos (Ellis, 1977).

- **Monocitos**

Los monocitos/macrófagos constituyen la principal célula fagocítica en los peces por su capacidad de ingerir y digerir material extraño (Enane *et al.*, 1993). Al igual que los neutrófilos, también tienen gran capacidad microbicida intra y extracelular, gracias a la liberación de ROS durante el proceso de explosión respiratoria (Secombes *et al.*, 1988; Plyzycz *et al.*, 1989). De igual forma, los macrófagos de peces pueden sintetizar RNS a partir de arginina (Schoort y Plumb, 1994; Buentello y Gatlin, 1999).

- **Linfocitos**

Los linfocitos B son responsables de la inmunidad humoral. Son aquellos que producen inmunoglobulinas o anticuerpos y la memoria celular. Los linfocitos T, son los responsables de la inmunidad celular. Previa sensibilización con un antígeno, producen linfocinas o citocinas, que participan activamente en los procesos inflamatorios. Los principales órganos linfoides incluyen el timo, el riñón anterior, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas o intestino (Fernández *et al.*, 2002).

- **Granulocitos**

En peces teleósteos, se ha descrito dentro de los granulocitos a neutrófilos, eosinófilos y basófilos según sus propiedades de tinción con el pigmento de Romanovsky (Campbell y Murru, 1990; Hine, 1992); pero no siempre están presentes todos ellos en la misma especie, ni son comparables funcionalmente con sus análogos de mamíferos (Hine, 1992).

- **Neutrófilos**

La principal función de los polimorfos nucleares o neutrófilos es la fagocitosis (Hine, 1992) y la actividad microbicida (explosión respiratoria), representando una de las primeras barreras frente a la invasión bacteriana. La explosión respiratoria consiste en la capacidad de convertir el oxígeno molecular en una serie de compuestos o metabolitos de oxígeno (ROS), entre ellos el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ambos potentes microbicidas capaces de dañar moléculas orgánicas (Plyzycz *et al.*, 1989).

- **Basófilos**

Los basófilos liberan aminas vaso-activas tales como la histamina y la sustancia de reacción lenta, que juegan un papel importante en las alergias (Hine, 1992).

- **Eosinófilos**

Su función no es clara todavía, pero intervienen en procesos de inflamación y defensa celular mediante degranulación (Powell *et al.*, 1991). Se ha denominado a todos los eosinófilos de teleósteos como eosinófilos granulares homogéneos (HGEs; Hine, 1992).

4.1.3).- Eritrocitos o células rojas

Los glóbulos rojos son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina (HB) y son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo (Fernández *et al.*, 2002).

4.1.4).- Enzimas antioxidantes

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se generan dentro de la célula, pero algunas de estas moléculas son capaces de cruzar al ambiente extracelular y extra-vacuolar causando daño potencial a las células del huésped (Warner,

1994). Las moléculas antioxidantes juegan un papel importante protegiendo a las células del huésped de la acción de ROS y RNS. Las superóxidos dismutasas (SOD), catalasas y glutatión peroxidasas neutralizan a las especies de oxígeno reactivas a través de componentes enzimáticos y no-enzimáticos (Warner, 1994). Las SOD's son uno de los principales mecanismos de defensa en respuesta al estrés oxidativo causado por agentes contaminantes en el medio ambiente, por infecciones de microorganismos, por cambios de temperatura o debido a la acción de inmunoestimulantes (Fridovich, 1995; Neves *et al.*, 2000). Las SOD's catalizan la conversión de dos moléculas de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno – que también causa daño celular difundiendo libremente a través de la membrana celular hacia el ambiente extracelular – es eliminado principalmente por la catalasa y la glutatión peroxidasa. Datos cualitativos relacionados a la evolución de los antioxidantes enzimáticos en peces tales como SOD's y catalasas muestran que los peces son estructuralmente muy similares a los mamíferos (Wilhelm, 1996). Sin embargo, la actividad específica de las enzimas de los peces es cuantitativamente más baja a los mamíferos (Wilhelm y Boveris, 1993).

4.2).- Respuesta humoral

La respuesta humoral comprende moléculas de defensa que actúan sin involucrar directamente a las células, aunque muchos factores humorales son sintetizados y almacenados en las células (Vargas-Albores *et al.*, 1998).

4.2.1).- Lisozima

La lisozima se encuentra en un amplio rango de vertebrados principalmente en secreciones de tejidos, saliva, mucus, lágrimas, leucocitos, etc. (Osserman *et al.*, 1966), y es uno de los principales factores de defensa contra invasiones por microorganismos. Ha sido frecuentemente utilizada como indicador de la función inmune no específica (Yano, 1996). Las lisozimas, también llamadas muramidásas, son enzimas bactericidas las cuales atacan predominantemente

los péptido-glicanos de la pared celular de las bacterias gram-positivas tales como *Micrococcus lysodeikticus* (Alexander, 1985). El sustrato específico de acción es la pared celular de algunas bacterias y cuando ésta es digerida, la membrana del plasma bacteriano se rompe debido a estrés osmótico (Murray y Fletcher, 1976). En peces, las lisozimas están distribuidas principalmente en tejidos ricos en leucocitos, tales como el riñón cefálico, o en sitios donde el riesgo de invasión bactericida es alta (Yousif *et al.*, 1994). Las lisozimas se localizan en los lisosomas de los neutrófilos y macrófagos los cuales las liberan hacia el plasma sanguíneo (Murray y Fletcher, 1976). Una dieta mal equilibrada puede afectar los mecanismos de defensa no específicos, atrofiando las barreras anatómicas, las secreciones de mucosas y/o disminuyendo sustancias bactericidas y/o bacteriostáticas como la lisozima.

5).- Inmunidad adquirida o específica

La inmunidad específica ocurre cuando un organismo es natural o artificialmente expuesto a un antígeno, activándose el sistema inmune el cual produce inmunidad humoral (anticuerpos) y celular (linfocitos T). Los anticuerpos son más efectivos frente a patógenos encontrados fuera de las células y los linfocitos T son más efectivos frente a patógenos encontrados dentro de las células (Zapata *et al.*, 1990). La activación de las células T en vertebrados (también llamados células helper), estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B por secreción de interleukinas (Banchereau *et al.*, 1994).

III).- HIPOTESIS

La arginina dietaria, suplementada en cantidades por encima del requerimiento nutricional del bagre de canal, modifica favorablemente la respuesta inmune.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Permitir la optimización de la composición dietaria y el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas para obtener mayor crecimiento y mejor sobrevivencia de los peces cultivados.

V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar el efecto de la suplementación dietaria de arginina a niveles escalonados (~35 g/pez) sobre los siguientes mecanismos del sistema inmunológico del bagre de canal.

1. Niveles de proteína plasmática
2. Biología hemática
 - *Hematocrito*
 - *Hemoglobina*
 - *Conteo diferencial de células*
 - *Eritrocitos*
 - *Leucocitos*
 - *Linfocitos*
 - *Monocitos*
 - *Basófilos*
 - *Eosinófilos*
3. Actividad de lisozimas
4. Actividad de superóxido dismutasa
5. Fagocitosis

VI).- METODOLOGÍA

1).- Peces

Se utilizaron juveniles de bagre de canal proveniente de una granja comercial (DEPISA, Abasolo, Tamaulipas, México) con un peso inicial aproximado de 5 g. Los peces fueron colocados en dos tanques circulares de fibra de vidrio de 400 L, diseñado como sistema de recirculación (agua dulce). Se llevaron a cabo mediciones diarias de oxígeno disuelto y temperatura, así como mediciones semanales de amonio, alcalinidad, pH, nitritos y nitratos, ajustándolos a los parámetros óptimos para el bagre de canal (Lee, 1991). La temperatura promedio del agua se mantuvo alrededor de los 25 ± 2 °C. Los peces fueron alimentados a saciedad aparente con una dieta comercial ("Pedregal-Silver Cup", iniciador de trucha, 45% proteína cruda [PC] y 10% lípidos). Al llegar a los 35 g (~15 cm longitud total) los peces fueron colocados aleatoriamente en un sistema de 15 acuarios de cristal de 110 L cada uno (20 peces por acuario). Al inicio del experimento la diferencia en peso de peces/acuario (entre acuarios) fue menor al 5%.

2).- Dietas experimentales

Las dietas se formularon para contener 28% de PC, generadas a partir de caseína, gelatina y aminoácidos cristalinos para cubrir los requerimientos nutricionales del bagre de canal (NRC, 1993), excepto el requerimiento de arginina. Dicho requerimiento fue recientemente reevaluado como 3.3% de la proteína dietaria (0.8 – 0.9% de la dieta experimental con 24% de PC) (Buentello y Gatlin, 2000). El nitrógeno se mantuvo constante entre dietas, ajustando su nivel con una mezcla de glicina-aspartato. Se formularon 4 dietas isocalóricas agregando diferentes niveles de hidrocloreuro de L-arginina para proveer arginina al 0.5, 1, 2 y 4% de la dieta. Estas dietas fueron suplementadas con premezclas de vitaminas y minerales y ajustadas a un pH neutro (7). La dieta de proteína intacta

tuvo 28% de PC y 1.3% de arginina. La proteína de esta dieta fue provista únicamente por caseína y gelatina. Por tanto, el diseño experimental contempla el suministro de 4 dietas purificadas y una dieta con proteína entera durante 6 semanas para peces con un peso aproximado de 35 g.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales (g/100 g peso seco). El diseño de las dietas indica el contenido expresado como el porcentaje de proteína en la dieta.

Ingredientes	Dietas				
	% Arg				Control
	0.5	1	2	4	
Caseína	10.4	10.4	10.4	10.4	22.5
Gelatina	2.7	2.7	2.7	2.7	6.6
Premezcla de aminoácidos ^b	7.1	7.1	7.1	7.1	-
Dextrina	25.4	25.4	25.4	25.4	14.3
Celufil	31.0	31.0	31.0	31.0	36.3
Aceite de maíz	4.0	4.0	4.0	4.0	4
Aceite de hígado de bacalao	6.1	6.1	6.1	6.1	6
Premezcla de vitaminas ^c	3.0	3.0	3.0	3.0	3
Premezcla de minerales ^c	4.0	4.0	4.0	4.0	4
Ca(PO ₄) ₂	1.0	1.0	1.0	1.0	1
Carboximetilcelulosa	2.0	2.0	2.0	2.0	2
Mezcla de L-aspartato - glicina	6.0	4.9	2.7	-	0.3
L-arginina-HCl	-	0.6	1.8	4.2	-

^a Dieta con proteína intacta: arginina provista por caseína (0.04 g arginina/g) y gelatina (0.08 g arginina/g).

^b Buentello y Gatlin 2001.

^c Buentello *et al.*, 1997.

3).- Diseño experimental y análisis estadístico

Para cada medición se tomaron tres peces/acuario. El análisis de variancia de una vía con tres repeticiones se utilizó para evaluar el efecto de la arginina dietaria sobre cada parámetro medido. Una $P \leq 0.05$ se tomó como indicativo de significancia estadística. Igualmente, se utilizó la prueba de Shapiro y Wilk para comprobar que los residuos tuvieran distribución normal. La prueba de Conchran se utilizó para determinar la homogeneidad de la variancia. Las medias fueron separadas por medio de la prueba de Tukey.

4).- Mediciones Experimentales

i).- Proteína plasmática

Al final del periodo de alimentación y 14 horas después de proporcionar la última ración, se tomaron muestras de sangre obtenida de la vasculatura caudal con agujas heparinizadas. El plasma fue separado por centrifugación (2000 x g, 10 min.) y almacenado a - 80 °C. Para determinar proteína se utilizó el método de Bradford (1976). Brevemente, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) diluida con buffer de fosfato salino (PBS). A estas diluciones seriales se les agregó el reactivo de Bradford y la mezcla se añadió a pozos de una placa ELISA. Cada dilución, más un blanco, fue medida por triplicado. Para el análisis de proteína plasmática se utilizó el mismo procedimiento, sustituyendo alícuotas de plasma en lugar de BSA. La absorbancia fue leída en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

ii).- Hemoglobina (HB)

Se tomó muestras de sangre entera (1 mL/pez) de la vena caudal utilizando agujas heparinizadas para evitar coagulación. Para analizar la concentración de HB se utilizó el método de Drabkin (1935). Para este análisis se añadió el reactivo a la muestra, se homogenizó y se dejó reposar al menos durante 15 min. a temperatura ambiente (18 - 25 °C). El color fue estable durante varias horas. Posteriormente se midió la absorbancia de la muestra frente al reactivo blanco a 540 nm. Se llevó a cabo una curva de calibración para determinar la concentración de HB total (g/dL) de las muestras. El principio del método de Drabkin es el siguiente: cuando la sangre se mezcla con la solución conteniendo ferricianuro de potasio y cianuro de potasio, el ferricianuro de potasio oxida el hierro para formar metahemoglobina. El cianuro de potasio luego se combina con la metahemoglobina para formar cianmetahemoglobina, la cual se pigmenta con

un color estable que puede ser leído con un espectrofotómetro. Para ajustar a cianmetahemoglobina se utilizó el factor de corrección descrito por Larsen (1964) para sangre de ictalúridos:

$$0.68 + (1.01 \times C - M \text{ valor de HB})$$

Donde: C - M HB es igual a cianmetahemoglobina.

iii).- Hematocrito

Parte de la muestra sanguínea se colocó en un tubo capilar para hematocrito, manteniéndose en posición vertical y sellándolo por el extremo inferior con plastilina moldeable. Los tubos se dejaron reposar por un periodo de 12 horas hasta la sedimentación de los eritrocitos, para posteriormente evaluar el porcentaje de hematocrito contra una escala. El valor del hematocrito se expresó como la fracción porcentual de células rojas en el volumen total. El volumen se determinó con una regla Vernier, sacando por diferencia el porcentaje del paquete celular. Con estos parámetros se calculó el valor corpuscular medio (VCM), el cual revela los cambios en el tamaño de la célula. El VCM fue determinado a partir de la siguiente fórmula (Klinger *et al.*, 1996):

$$\text{VCM} = \text{hematocrito} \times 10 / \text{total de células rojas}$$

iv).- Análisis diferencial de células

El conteo total de leucocitos fue determinado con muestras frescas de sangre con un hemocitómetro. El conteo diferencial de leucocitos se realizó a partir de un frotis sanguíneo con tinción de Wright. Se tomó una gota de sangre colocándola al extremo de un portaobjeto. Con un cubreobjeto se empujó hacia el extremo opuesto, obteniendo un frotis teñido con pigmento de Wright, diluido en una proporción 1:1. Se lavó con agua destilada y con buffer de fosfato ácido de sodio:potasio por 10 min. Estas preparaciones fueron revisadas al

microscopio compuesto con objetivo de 100x. La diferenciación de glóbulos blancos se registró, así como su porcentaje en las diferentes muestras.

v).- Actividad de lisozimas

El análisis usado se basa en la lisis celular por lisozima sensitiva a la bacteria Gram positiva *Micrococcus lysodeikticus*. La actividad de lisozima fue determinada por medio de análisis turbidimétrico descrito por Parry *et al.*, (1965), usando un adaptador de placa para la microtitulación de *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*). La sensibilidad de la medición turbidimétrica de la célula bacterial es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz utilizada. Se preparó 0.3 mg/mL de suspensión de *M. lysodeikticus* en 0.05 M de Na_2HPO_4 y el pH fue ajustado a 6. La suspensión bacterial se agregó a placas ELISA de 96 pozos (250 μL /pozo). Lisozima de huevo blanco de gallina con una actividad específica de 25000 U/mg fue utilizada como un estándar externo. Se midió la tasa de cambio a una absorbancia de 450 nm. El estado linear de la reacción fue calculado, dando la siguiente curva estándar:

$$y=0.001 x + 0.0019.$$

Bajo estas condiciones, una unidad de lisozima fue igual a la disminución turbidimétrica de 0.001 por minuto a 450 nm.

vi.) Extracción de macrófagos de cavidad peritoneal

Al final de las seis semanas del periodo experimental, se inyectó (2 mg LPS/kg de peso) intraperitonealmente a tres peces/acuario. Dichos peces fueron marcados con un nudo de estambre de color en la espina de la aleta pectoral (cualquiera). Tres días después se repitió la dosis en los peces marcados. A los seis días de la inyección inicial, dichos peces fueron anestesiados (MS-222, 200 mg/mL) y se introdujo a su cavidad peritoneal 5 mL de buffer de fosfato salino (PBS). El abdomen del pez se masajeó por 5 min y las células liberadas se

removieron con una pipeta de transferencia, colocándoselas en un tubo de poliestireno. La suspensión celular se lavó dos veces por centrifugación a 1000 rpm en buffer de bicarbonato Krebs Ringer (KRBB: 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄ y 25 mM NaHCO₃, pH 7.4) a 4 °C por 5 min. El sobrenadante se desechó, re-suspendiendo las células decantadas en 2 mL de PBS y centrifugándolas nuevamente a 1000 rpm a 4 °C por 5 min. Para la purificación de macrófagos se mezcló 2 mL de suspensión celular con 2 mL de BSA y esta mezcla se transfirió a otro tubo con 3 mL del gradiente Ficoll Hypaque. El preparado se centrifugó a 1200 rpm a 24 °C por 30 min (Buentello y Gatlin, 1999). Al final de la centrifugación se formó una interfase celular en forma de nube, la cual fue cuidadosamente extraída con una pipeta y transferida a otro tubo en donde se realizaron dos lavados más con PBS y centrifugación a 1000 rpm a 24 °C por 10 min. Los macrófagos así purificados fueron contados en una cámara Neubauer al microscopio óptico (20x) y la viabilidad se analizó por el método de tinción con azul trypan (Wu y Brosnan, 1992). Finalmente, para mantener el medio celular se agregó 2 mL de suero fetal bovino y penicilina/estreptomicina (100 U/mL, 100 µg/mL, respectivamente). Esta combinación de antibióticos evita contaminación bacteriana de las células en cultivo. La incubación se llevó a cabo a 27 °C en una cámara con movimiento lento.

vii.) Análisis de fagocitosis con macrófagos de cavidad peritoneal

Para analizar fagocitosis se utilizó un kit comercial (molecular probes, Vybrant™ phagocytosis assay kit [V-6694]). Inicialmente, se preparó las soluciones a utilizar. Se prepararon también los controles negativos agregando 170 µL de medio Dubelco modificado por Eagle (DMEM) a 5 pozos en una placa de ELISA de 96 pozos. Se agregó 100 µL de la suspensión celular ajustada a los pozos de control positivo (5 pozos) y a los pozos experimentales (20 pozos). A los pozos de control positivo se les agregó 70 µL de DMEM. Se añadió 50 µL de efector de

fagocitosis (LPS) a los 20 pozos experimentales y se añadió suficiente L-arginina-HCl para alcanzar las siguientes molaridades, 0.5, 1, 2 y 4 mM. Se utilizaron 5 pozos para cada nivel de arginina. Se cubrió la microplaca, incubándola por 5 horas para permitir que las células se adhirieran a la superficie de la placa. Una vez terminado el periodo de incubación, la solución DMEM fue removida de todos los pozos por aspiración al vacío. Se añadió 100 μ L de la suspensión preparada de bio-partículas fluorescentes a todos los pozos (control-negativo, positivo y experimentales). Se agregaron las diferentes soluciones molares de arginina a los pozos experimentales. La placa fue cubierta y transferida a la incubadora por cuatro horas. Al final del periodo de incubación, las bio-partículas fueron removidas de todos los pozos de la placa por aspiración al vacío. Inmediatamente después se agregó 100 μ L de la suspensión de azul de tripan a todos los pozos. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. El exceso de solución se aspiró al vacío. Los pozos experimentales y de control se analizaron con el lector de placas de fluorescencia usando 480 nm de excitación, 520 nm de emisión. Las siguientes fórmulas fueron utilizadas para calcular la fagocitosis neta y la respuesta al agente de efector de fagocitosis (LPS):

IF = Fagocitosis bajo condiciones fisiológicas normales (Índice fagocítico) = (fluorescencia promedio del control positivo) – (fluorescencia promedio del control negativo).

LEN = Fagocitosis como respuesta al efector = (fluorescencia promedio de los pozos experimentales) – (fluorescencia promedio del control negativo) = lectura experimental neta.

La respuesta fagocítica se expresó como sigue:

$$\% \text{ efecto} = \frac{LEN}{IF} * 100$$

viii.) Extracción de hígado para análisis de Superóxido dismutasa (SOD)

Las muestras de hígado colectadas fueron utilizadas para la extracción de SOD. Para esto, 100 mg de hígado se maceraron con un homogenizador mecánico en 0.5 mL de buffer de fosfato. La muestra fue centrifugada a 5700 x g por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se guardó en otro tubo donde se le agregó 0.3 mL de buffer de fosfato. La solución final se diluyó con buffer fosfato a una proporción de 1:3. Durante todos los pasos anteriores las muestras fueron mantenidas en hielo.

ix.) Análisis de Superóxido dismutasa

La actividad de SOD se midió de acuerdo al método de Beauchamp y Fridovich (1971) usando nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de riboflavina. Este método se basa en la habilidad de la SOD para inhibir la reducción de NBT por el ión superóxido. Para ésto, se colocó 2 mL de la siguiente mezcla: 0.1 mM EDTA, 13 µM metionina, 0.8 mM NBT y 20 µM riboflavina en 50 mM buffer de fosfato a un pH 7.8 en tubos con el extracto crudo de la muestra (homogenado de hígado), bajo luz fluorescente (560 nm) por 2 min. en tubos control hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 0.2 - 0.3 unidades de absorbancia. La actividad específica (unidades por mg de proteína) de SOD fue calculada de acuerdo a lo descrito por Vázquez-Juárez *et al.*, (1993). Brevemente, la actividad total de SOD puede calcularse por el grado al cual la producción de luz se limita en condiciones donde la actividad enzimática generada por el radical oxígeno es el factor limitante para la luminiscencia (Janssens *et al.*, 2000).

VII).- RESULTADOS

1).- Análisis de proteína

La concentración de proteína plasmática fue afectada significativamente ($P = 0.027$) por los niveles de arginina dietaria, observándose una relación inversamente proporcional al contenido de arginina en la dieta. Además, la dieta con proteína entera presentó el valor más bajo de proteína plasmática, como se muestra en el cuadro 2. .

2).- Hematología

El efecto de la arginina dietaria sobre los niveles de hematocrito fue directamente proporcional a la cantidad de arginina suministrada en la dieta. Los resultados muestran que el nivel máximo de hematocrito se obtuvo de los peces alimentados con 4% de arginina. Igualmente, el valor más bajo de este parámetro fue obtenido de peces alimentados con 1% arginina. Estas diferencias fueron medianamente significativas ($P < 0.055$) como lo demuestra el análisis de varianza realizado, como se muestra en el cuadro 2. .

Para HB, fue claro que una vez alcanzado el requerimiento dietético del bagre, los niveles de HB permanecieron relativamente estables, alrededor de 9 g/dL. De la misma forma, los valores ajustados para cianmetahemoglobina siguieron una tendencia similar a la de la HB. En cuanto a los análisis de biología hemática, estos identificaron diferencias significativas únicamente para eritrocitos y basófilos ($P = 0.035$ y 0.05 , respectivamente), cuadro 2.

3).- Análisis de lisozima

Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de inclusión de arginina no influyen la actividad de lisozimas en el bagre de canal. Sin embargo, la gran variabilidad encontrada en la medición de este parámetro contribuyó a no

encontrar diferencias significativas ($P = 0.125$). La actividad de lisozima para los animales alimentados con proteína intacta tuvo una magnitud superior al de los alimentados con dietas con aminoácidos cristalinos (cuadro 2).

4).- Análisis de SOD

La actividad específica de SOD (unidad/mg de proteína) mostró diferencias significativas ($P = 0.050$) entre los diferentes tratamientos. Los valores máximos fueron alcanzados para los organismos alimentados con dietas con niveles de arginina por encima del requerimiento nutricional. Significativamente, niveles de arginina por debajo de este nivel mostraron actividad de SOD muy inferiores.

5).- Análisis de Fagocitosis

No se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje del efector al utilizar medio estándar (DMEM). Los macrófagos cultivados bajo estas condiciones no presentaron índices fagocíticos modificados por la arginina dietaria administrada durante el ensayo nutricional. En contraste, la arginina en el medio de cultivo tuvo un impacto altamente significativo ($P < 0.001$), toda vez que la capacidad fagocítica se vio influenciada por la presencia de este aminoácido. Cuadro 4 , es probable que lo de este experimento se haya debido al efecto del lipopolisacárido.

Cuadro 2. Efecto de la arginina dietaria sobre parámetros inmunológicos del bague de canal

Nivel Arginina ^q	Proteína plasmática mg/mL ⁻¹	Lisozima unidad/mg ⁻¹	Hemoglobina g/dL ⁻¹	Volumen Corpuscular Medio (%)	Hematocrito (%)	Superoxido dismutasa unidad/mg ⁻¹
0.5	22.2 ^b	1.0	8.0 ^a	112.1 ^a	22.5 ^{ab}	1.3 ^b
1.0	20.8 ^b	0.6	9.7 ^b	121.6 ^{ab}	25.5 ^b	1.0 ^a
2.0	19.0 ^{ab}	0.9	9.5 ^{ab}	116.2 ^{ab}	26.1 ^a	1.7 ^c
4.0	19.7 ^{ab}	0.9	10.0 ^b	125.0 ^b	27.3 ^a	1.7 ^c
1.3 Intacta	17.0 ^a	1.4	8.5 ^{ab}	120.1 ^{ab}	24.5 ^{ab}	1.6 ^c
ANOVA						
Pr > F ^r	0.027	0.125	0.034	0.076	0.055	0.050
Error estandar	0.685	0.112	0.344	0.679	0.827	0.101

^a Nivel de arginina expresado como porcentaje de la dieta. Valores en la columna que no tienen la misma letra son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$, con base en la prueba de rango múltiple de Duncan.

^r Probabilidad de significancia asociada con el estadístico F.

Cuadro 3. Efecto de la arginina dietaria sobre hematología del bague de canal

Nivel Arg ^a	Eritrocitos	Leucocitos	Linfocitos	Monocitos	Basófilos	Eosinófilos
	10 ³ cells/mm ³ sangre			(%)		
0.5	2.0 ^a	41.6	39.8	6.5	49.7 ^{ab}	3.1
1.0	2.0 ^a	41.2	40.3	7.7	48.5 ^a	2.4
2.0	2.2 ^b	40.9	40.0	6.0	50.0 ^{ab}	2.8
4.0	2.1 ^a	39.7	40.3	5.7	49.6 ^{ab}	3.0
1.3 Intacta	2.0 ^a	40.6	39.0	5.7	51.4 ^b	2.4
ANOVA						
Pr > F ^r	0.035	0.709	0.410	0.456	0.050	0.161
Pooled se	0.053	0.542	0.417	0.257	1.567	0.209

^a Nivel de arginina expresado como porcentaje de la dieta. Valores en la columna que no tienen la misma letra son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$, con base en la prueba de rango múltiple de Duncan.

^r Probabilidad de significancia asociada con el estadístico F.

Cuadro 4. Efecto de la arginina en la dieta y en medio de cultivo, sobre la capacidad fagocítica de macrófagos de bagre de canal

Arginina en la dieta ^a	Índice fagocítico	% Efecto	Arginina en medio de cultivo (mM) ^b	Índice fagocítico	% Efecto
0.5	0.002	155.2	0.5	0.002	102.6 ^b
1.0	0.008	125.7	1.0	0.005	42.4 ^a
2.0	0.002	165.4	2.0	0.014	122.5 ^b
4.0	0.001	168.9	4.0	0.008	248.0 ^c
1.3 PI	0.003	355.7			
ANOVA	Pr > F [*]	0.918		Pr > F [*]	0.001
	Error estandar	15.62		Error estandar	18.60

^a Nivel de arginina expresado como porcentaje de la dieta. Medio estándar Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM) usado como medio de cultivo. Valores en la columna que no tienen la misma letra son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$, con base en la prueba de rango múltiple de Duncan.

^b DMEM estándar más concentraciones de arginina (mM) en medio de cultivo.
^{*} Probabilidad de significancia asociada con el estadístico F.

VIII).- DISCUSIÓN

1).- Proteína Plasmática

Los parámetros inmunológicos medidos en el presente ensayo son importantes componentes del sistema de defensa de los peces. Se sabe que varios nutrientes, incluyendo proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, afectan de manera importante la resistencia a enfermedades en los vertebrados modulando el sistema inmune (Landolt, 1989). Los niveles de proteína plasmática fueron afectados significativamente ($P = 0.027$) por la arginina en la dieta de una manera proporcionalmente inversa. Del mismo modo, los peces alimentados con la dieta de proteína entera mostraron el nivel más bajo de proteína en plasma. Estos niveles (17 - 22 mg/mL, tabla 2) son comparables a los obtenidos para el salmón Atlántico, *Salmo salar* (Hemre *et al.*, 1995; Brandsen *et al.*, 2001), trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Kiron *et al.*, 1993) y bagre de canal (Pérez *et al.*, 2003). Dado que la arginina es conocida por promover la síntesis de proteína (Barbul *et al.*, 1985; Lancaster, 1992) la interpretación de estos resultados resulta complicada. La metodología utilizada para el análisis de proteína por el método de Bradford (1976) aparece incuestionable. Dicho análisis se basa en el cambio de color por medio de tinción en respuesta a la concentración de proteína (Bradford, 1976). Debido a que la tinción (azul brillante Coomassie G-250) enlaza primeramente aminoácidos básicos (ejm. arginina) y residuos de aminoácidos aromáticos, el análisis debió haber sido particularmente sensitivo al detectar proteína plasmática en el presente estudio. Aunque las correlaciones entre la proteína digestible y la proteína en plasma han sido reportados en trucha arcoiris (Kiron *et al.*, 1993) y salmón Atlántico (Hemre *et al.*, 1995; Brandsen *et al.*, 2001) esas respuestas son causadas principalmente por la presencia de ciertos componentes sensitivos al calor tales como inhibidores de tripsina, lectinas e isoflavonas (Pérez *et al.*, 2003). Estas sustancias están presentes en proteínas vegetales (Lim y Akiyama, 1991) – utilizadas en los trabajos previamente descritos – y se asocian típicamente con hipersensibilidad e inflamación en el tracto

digestivo (Rumsey *et al.*, 1994; Krogdahl *et al.*, 2000). En el presente experimento, se suministró dietas semi-purificadas, lo que excluye la posibilidad de irritación gastrointestinal. Además, en el presente estudio los peces fueron alimentados a saciedad aparente (alrededor de 3% de la biomasa/día) y no se encontró algún modelo apropiado que relacionara proteína plasmática con la suplementación de arginina en la dieta. Esto es en contraste con estudios en salmón Chinook, *O. tshawytscha*, en el cual la alimentación se administró a niveles diferentes (100, 64 y 40% de saciedad, respectivamente; Alcorn *et al.*, 2003) y el tamaño de ración afectó significativamente las concentraciones de proteína en plasma.

2).- Lisozima

El análisis turbidimétrico de la actividad de lisozima en el plasma de bagre de canal reveló rangos de 0.7 - 1.4 unidades/mL (tabla 2), los cuales son de igual magnitud a los reportados para pez lancero, *Stizostedion vitreum* (Holloway *et al.*, 1993), salmón Atlántico (Roed *et al.*, 1993) y la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculofasciatus*) (Merino, 1998). En el presente experimento, la actividad de lisozima no fue significativamente diferente ($P > 0.05$) entre los tratamientos dietéticos. La lisozima es sintetizada por los macrófagos activados para llevar a cabo actividades degradativas contra patógenos a través de mecanismos independientes de oxígeno reactivo (Goldsby *et al.*, 2003). Estas enzimas tienen una respuesta retardada en comparación con mecanismos más rápidos, por ejemplo, la lisis celular oxígeno-dependiente (Halliwell y Gutteridge, 2000), y requiere de periodos comparativamente largos antes que actividades máximas puedan ser alcanzadas. Por ende, es posible que el efecto reducido de la actividad de lisozima en plasma en el presente experimento se deba en parte a la falta de suficiente tiempo para posibilitar el proceso sintético de esta enzima hidrolítica. Efectos similares han sido observados en enzimas hepáticas antioxidantes en dorada, *Sparus aurata* (Mourente *et al.*, 2002), y trucha arcoiris (Fevolden *et al.*, 1994), cuando la exposición fue menor a la necesaria, ya sea en magnitud o tiempo. La exposición insuficiente en el último caso fue determinada por niveles

bajos de cortisol plasmático. Es muy probable que parte del problema en este experimento fuera el método que usaste para determinar la lisosima ya que no tiene alta sensibilidad.

3).- Hematología

Numerosos estudios han demostrado que la diferencia en la formación y función de células sanguíneas reflejan la manipulación dietética (Poston, 1964; Leray *et al.*, 1985; Greene y Selivonchick 1990; Duncan *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 1993; Klinger *et al.*, 1996) siendo parámetros adecuados para evaluar el estado nutricional y de estrés de los peces. Las medias obtenidas en valores hematológicos del bagre de canal alimentado con diferentes niveles de arginina se presentan en el cuadro 3. Los valores sanguíneos del presente experimento son comparables a los obtenidos para la misma especie en varios estudios nutricionales y toxicológicos (Lumlertdacha, 1995; Klinger *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000). El nivel de hematocrito y el conteo de eritrocitos y basófilos fueron significativamente afectados ($P < 0.05$) por los diferentes niveles de arginina en la dieta experimental. Lim *et al.* (2000), obtuvieron efectos importantes sobre el conteo celular total, células rojas, hematocrito y hemoglobina, únicamente cuando agregaron niveles excesivos de vitamina C y/o hierro (3000 y 300 mg/Kg, respectivamente). Esos niveles constituyen un 5000 y 1000% del requerimiento nutricional determinado para el bagre de canal (ácido ascórbico y hierro, respectivamente; NRC, 1993). En contraste, el presente experimento suministró arginina en la dieta a niveles moderados situados dentro del estándar comercial (1 - 4 veces el requerimiento, Buentello y Gatlin, 2000). Significativamente, los máximos valores de hematocrito se obtuvieron de los peces alimentados con 4% de arginina (27.3%) y el porcentaje menor (20.9%) fue obtenido de peces alimentados con 1% de arginina. La celularidad de los eritrocitos evidenció una marcada dependencia sobre la arginina dietaria ($P < 0.05$), mostrando niveles mínimos y máximos correspondientes a los valores de arginina más bajo y más alto, respectivamente. Debido a que el valor de hematocrito junto con los conteos

totales de eritrocitos y leucocitos pueden ser utilizados como indicadores de la hematopoyesis (Goldsby *et al.*, 2003), los resultados observados sugieren un importante papel fisiológico para la arginina sobre el proceso hematopoyético. Sin embargo, los niveles de leucocitos, linfocitos, eosinófilos y monocitos, no mostraron cambios imputables a la arginina (Tabla 3). Dada su capacidad de auto renovación las células germinales hematopoyéticas – células pluripotentes que más tarde se diferencian en varios “citos” (leucocitos, granulocitos, monocitos, etc.) – son mantenidas a niveles estables, a menos que haya una demanda para aumentar la hematopoyesis (Goldsby *et al.*, 2003). Varias citocinas son requeridas para la proliferación, diferenciación y maduración de células hematopoyéticas. En peces, estas proteínas reguladoras de bajo peso molecular son secretadas en sangre principalmente por las células blancas en respuesta a un número de estímulos (Secombes *et al.*, 1996). Aparentemente, el LPS por sí mismo fue incapaz de aumentar la secreción de citocinas en el bage de canal. Morrison y Kline (1977) demostraron que la co-estimación de LPS y fito-hemaglutinina es necesaria para inducir respuestas de proliferación y diferenciación celular en el pargo dorado, *Pagrus auratus*., los valores de leucocitos, linfocitos, eosinófilos y monocitos se asemejan cercanamente a estudios previos con bage de canal (Klinger *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000) y pudieran indicarnos que la respuesta proliferativa y de diferenciación celular se mantienen estables, sin embargo es necesario realizar más pruebas.

Varios trabajos han determinado el nivel de HB en la sangre de ictalúridos por diferentes métodos encontrando valores normales de 4 a 11 g HB/100 mL sangre (g/dL, Larsen, 1964). Los niveles encontrados en el presente estudio son de igual magnitud e igualmente similares a los reportados más recientemente por Lim *et al.* (2000) para la misma especie. La función principal de las células rojas es el transporte de HB, la cual a su vez transporta oxígeno de los pulmones a los tejidos. Por tanto, era predecible que el nivel de HB y el número de eritrocitos tuvieran una evolución paralela. En el presente estudio, el oxígeno disuelto en el

agua se mantuvo a niveles aproximados a la saturación (8.3 mg/L, al nivel del mar) para todo los acuarios a lo largo del experimento. Similarmente, la cianocobalina y el ácido fólico se mantuvieron igual entre dietas. Ninguna condición de disminución de oxígeno disuelto o anemia influenciaron el nivel de HB, los cuales fueron afectados únicamente por los tratamientos dietéticos.

4).- Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD's son una de las principales formas de defensa antioxidante en respuesta al estrés oxidativo (Fridovich, 1995). Los resultados de SOD hepática se presentan en el cuadro 2 y tienen un rango de 1.4 a 1.7 unidades/mg de proteína. Los niveles más altos de arginina en la dieta resultaron en un mayor estrés oxidativo, inducido éste por LPS. Dichos incrementos fueron altamente significativos $P = 0.03$. Estos niveles concuerdan con la actividad enzimática reportada para carpa dorada, *Carassius auratus* (Lushchak *et al.*, 2001), dorada, (Mourete *et al.*, 2002) y lenguado Senegalés, *Solea senegalensis* (Rueda-Jasso *et al.*, 2003). Bajo condiciones fisiológicas normales existe una producción continua de especies reactivas de oxígeno que tienen el potencial de causar daño oxidativo a los peces (Mourete *et al.*, 1999). En el presente estudio, se inyectó a los peces con 2 mg LPS/Kg de peso vivo para inducir una migración de macrófagos hacia la cavidad peritoneal. Dicha inyección constituye un reto inmunológico virtual y por lo tanto es posible que el LPS pudiera activar un aumento en la producción de ON; aumento apoyado por la presencia de la arginina, como se ha reportado previamente (Lancaster, 1992; MacMicking *et al.*, 1997; Buentello y Gatlin, 1999). Como consecuencia, las defensas antioxidantes tales como NADH/NADPH, glutatión y enzimas destructoras de radicales libres como las SOD, catalasas y glutatión peroxidasa, podrían aumentar – tanto en presencia como en actividad – para ayudar a remover los iones oxidativos (Winston y Di Giulio, 1991), mitigando así el deterioro oxidativo de células adyacentes del bagre. Más aún, la segunda dosis de LPS (administrada tres días después), podría favorecer fuertemente el incremento en la biosíntesis de un

grupo de enzimas colectivamente conocidas como SOD (Halliwell y Guttridge, 2000; Tocher *et al.*, 2002). Este efecto ha sido observado previamente en dorada (Mourente *et al.*, 2002), donde la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas fueron significativamente afectadas por el tiempo de exposición a aceite peroxidado de anchoveta en la dieta. Sin embargo, el aumento de la actividad de SOD en el bage no debe ser interpretado como un efecto antioxidante de la arginina, sino como una respuesta fisiológicamente normal de aumento en la producción de SOD como respuesta a la sobreabundancia de especies de oxígeno reactivo. Mourente *et al.*, (2002), encontraron que las actividades tanto de catalasa como de SOD aumentan al producirse un estado pro-oxidante en la dorada. El mecanismo fisiológico por el cual la arginina apoyó la producción de SOD en el presente experimento necesita analizarse más a fondo.

5).- Índice fagocítico

Los macrófagos y otras células especializadas (monocitos y neutrófilos) son capaces de ingerir y digerir antígenos exógenos y materia endógena siendo atraídos quimiotácticamente por una variedad de sustancias, incluyendo LPS (Goldsby *et al.*, 2003). La importancia de la fagocitosis en los peces es esencial para su resistencia a patógenos (Sakai, 1984). En el presente experimento, la habilidad de los fagocitos del bage de canal para ingerir partículas extrañas aumentó al incrementarse el nivel de arginina en la dieta. Tanto el índice fagocítico como la evaluación porcentual de fagocitosis aumentaron al elevarse la concentración molar de arginina en el medio de cultivo ($P < 0.001$). En contraste, no hubo diferencias significativas ($P = 0.918$) en ningún indicador fagocítico (Tabla 4) de los macrófagos obtenidos de peces alimentados con niveles escalonados de arginina. La mayor actividad fagocítica se llevó a cabo por macrófagos cultivados en 2 mM de arginina. Resultados convergentes fueron obtenidos por Buentello y Gatlin (2001) quienes demostraron máxima protección contra *Edwardsiella ictaluri* en peces alimentados con 2% de arginina dietaria. El nivel normal de arginina plasmática en el bage de canal va de 0.1 a 0.24 mM en peces alimentados con

dietas cuyo contenido de arginina va de 0.5 a 4% (Buentello y Gatlin, 2001). En el presente ensayo, se observó una disminución del índice fagocítico en macrófagos cultivados con 4 mM de arginina. Dicho valor es alrededor de 16 veces mayor que la concentración normal de arginina en el plasma de bagre. De forma similar, Li y Lovell (1985) encontraron que una megadosis de ácido ascórbico (3000 mg/Kg) no tuvo efecto positivo sobre la fagocitosis. Todo esto sugiere que, para infecciones moderadas, 2% de arginina en la dieta (0.16 mM en plasma) puede ser adecuado para proporcionar suficiente protección. Esta protección pudiera deberse a un aumento en la capacidad fagocítica del animal. Sin embargo, la intensidad de la actividad fagocítica está relacionada también con la severidad del reto inmunológico y su carácter crónico o agudo. Por tanto, bajo circunstancias extremas, mayores niveles de arginina pudieran resultar en mayor protección.

La falta de efecto dietario sobre los macrófagos aislados es acorde con la morfología y función de la mayoría de las células linfoides. Al desarrollarse el monocito, su talla se incrementa convirtiéndose en macrófago. El aumento en talla se debe a lisosomas, gránulos citoplasmáticos y enzimas digestivas (Guyton y Hall, 1996). Esas células tienen mínima capacidad de almacenaje de nutrientes, y cuando son aislados de su fuente (órganos linfoides, sangre, peritoneo, etc.), es el medio de cultivo quien determina en mayor medida el desempeño de los fagocitos bajo condiciones de cultivo. Buentello y Gatlin (1999), obtuvieron un aumento insignificante en la producción de NO en macrófagos extraídos de bagre de canal, cuando los peces fueron alimentados con niveles escalonados de arginina. Fue en el medio de cultivo donde la arginina demostró el mayor efecto. Los resultados obtenidos en el presente estudio validan la noción de que la actividad fagocítica mejora con la suplementación de arginina, sin embargo, es indispensable realizar ensayos bactericidas para poder discernir y entender el mecanismo fisiológico con el que la arginina afecta la ingestión y lisis celular.

IX).- CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se establecen las siguientes conclusiones:

- El sistema inmune del bagre de canal responde a cambios en la concentración de arginina, tanto en la dieta como en el medio de cultivo celular. Los resultados sugieren que el bagre de canal posee un sistema inmune relativamente desarrollado y eficiente.
- Se encontró que dosis moderadas de arginina parecen ser ideales para optimizar la fagocitosis, mientras que niveles más altos resultaron en un aumento en el nivel de hemoglobina, hematocrito, y número de eritrocitos.
- La suplementación de arginina en la dieta afecta la actividad de la enzima superóxido dismutasa SOD.
- Los beneficios de un nivel excesivo de arginina necesitan ser cuidadosamente probados ya que algunos de los parámetros analizados alcanzaron niveles máximos y la curva dosis – respuesta alcanzó un nivel estabilizado (meseta) por lo cual es posible que los niveles de arginina se vuelvan excesivos, pudiendo causar deficiencias en el desempeño de algunos mecanismos de la respuesta inmune.
- Es necesario hacer más evaluaciones de parámetros inmunológicos utilizando técnicas más sensibles para determinar los efectos reales y concluyentes de este aminoácido sobre el sistema inmune.

X).- ABREVIATURAS

ARG	Arginina
NO	Oxido nítrico
ROS	Especies de oxígeno reactivo
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
PC	Proteína cruda
HB	Hemoglobina
BSA	Albúmina de suero bovino
PBS	Buffer de fosfato salino
LPS	Lipopolisacárido
VCM	Volúmen corpuscular medio
SOD	Superóxido dismutasa
NBT	Nitroblue tetrazolium

XI).- LITERATURA CITADA

- Albina, J.E., Mills, C.D., Henry, W.L., Caldwell, M.D. 1989. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J. Immunol.* 143, 3641-3660.
- Alcorn, L., Kazi, N., Pampee, Y., Mendelson, R. 2003. Glucocorticoid inhibition of surfactant protein A (*SP-A*) gene expression in lung type II cells is mediated via the TTF-1 binding element. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 21, L806-814.
- Alexander, J.B. 1985. Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. In: *Fish Immunology*. Manning, M.J., Tatner, M.F. Academic Press. Londres. 133-140
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P. Van Kooten, C., Liu, Y.L., Rousset, F.Y., Sealand, S. 1994. The CD40 and antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology* 12, 881-922.
- Barbul, A., Fishel, R.S., Shimazu, S., Wasserkrug, H.L., Yoshimura, N.N., Tao, R. C., Efron, G. 1985. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. *Journal of Surgical Research* 38, 328-334.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276-286.
- Bernstein, R.M., Schluter, S.F., Marchalonis, J.J. 1998. Immunity. In: *The physiology of fishes*. Evans, D.H. 2^a ed. CRC Press, USA. pp, 215-242.
- Bly, J.E., Clem, L.W. 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 159-171.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bransden, M.P., Carter, C.G., Nowak, B.F. 2001. Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr. *Animal Science* 73, 105-114.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M. III, Dale, B.E. 1997. Evaluation of coastal Bermuda grass protein isolate as a substitute for fishmeal in practical diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.* 28, 52-61.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., III. 1999. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*); influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture* 179, 513-521.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., III. 2000. The dietary arginine requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is influenced by endogenous synthesis of arginine from glutamic acid. *Aquaculture* 188, 311-321.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., III. 2001. Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquatic Anim. Health* 13, 194-201.

- Byrne, A., Reen, D.J. 2002. Lipopolysaccharide induces rapid production on IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.* 168, 1968-1977.
- Campbell, T., Murru, F. 1990. An introduction to fish hematology. *The compendium-Small Animal* 12, 525-533.
- Chandra, R.K. 1991. Nutrition and immunity : lesson from the past and new insight into the future. *Am. Journal Cli. Nutr.* 53, 1087-1101.
- Daly, J.M., Lieberman, M.D., Golfine, J. 1992. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic and clinical outcome. *Surgery* 112, 56-67.
- Drabkin, D.L., Austin, J.H. 1935. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 112, 51.
- Duncan, H.D., Silk, D.B. 1997. Diagnosis and treatment of malnutrition. *A Review Coll, J.R. Physicians Lond.* 31(5), 497-502.
- Ellis, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.* 11, 453-491.
- Enane, N.A., Frenkel, K., O'Connor, J.M., Squibb, K.S., Zelikoff, J.T. 1993. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, 80, 68-72.
- Erdal, J.I., Evensen, O., Kaurstad, O.K., Lillehaug, A., Solbakken, R., Thorud K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* 98, 363-379.
- Fahey, J.L. 1956. Toxicity and blood ammonia rise resulting from intravenous amino acid administration in man: the protective effect of L-arginine. *J. Clin. Invest.* 36, 647.
- Fernández, J.M., Arias, R.P., García, A.L. 2001. Nutrición en el paciente quirúrgico: inmunonutrición. *Nutrición hospitalaria.* 3, 66-77.
- Fernández, A., de Blas, I., Ruiz, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): células y órganos. *Aquatic No.* 16, 146-155
- Fevolden, S.E., Roed, K.H., Gjerde, B. 1994. Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon: correlation to disease and resistance. *Fish and Shellfish Immunology* 4, 507-519.
- Fournier, V., Gouillou, M.F., Metailler R., Vachot, C., Desbruyeres, E., Huelvan, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Kaushik, S.J. 2002. Dietary arginine degradation is a major pathway in ureagenesis in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Comp. Bioch. Physiol. A(2)*, 1-15.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 97-112.
- García de Lorenzo A, Montejo, J. C. 2000. Nutrición parenteral en el 2000. *Cedegraf-Artes Gráficas* pp, 805-811
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. Kuby, J. 2003. *Immunology.* 5th edition. Freeman, W. H. and Co., New York, 551 pp.

- Greene, D.H.S., Selivonchick, D.P. 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 165-182.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 1996. Textbook of medical physiology, 9th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1148 pp.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2000. Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford Univ. Press. 936 pp.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 87, 1-13.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95, 201-214.
- Hemre, G., Sandnes, K., Lie, O., Waagbo, R. 1995. Blood chemistry and organ nutrient composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, fed graded amounts of wheat starch. *Aquaculture nutrition* 1, 37-42.
- Higashi, Y., Oshima, T., Ono, N., Hiraga, H., Yoshimura, M., Watanabe, M., Matsuura, H., Kambe, M., Kajiyama, G. 1995. Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2198-2202.
- Hine, P.M. 1992. The granulocytes of fish. *Fish and Shellfish Immunol.* 2, 79-88.
- Holloway, H.L. Jr., Shoemaker, C.A., Ottinger, C.A. 1993. Serum lysozyme levels in paddlefish and walleye. *Journal of Aquatic Animal Health* 5(4), 324-326
- Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to disease: a review. *Journal of Fish Biology* 16, 23-60.
- Janssens, B.J., Childress, J.J., Baguet, F., Rees, J.F. 2000. Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *Journal of Experimental Biology*, 203(24), 3717-3725.
- Ketola, H. G. 1983. Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. *J. Anim. Sci.* 56, 101-107.
- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T., Watanabe, T. 1993. Dietary protein related humoral immune response and disease resistance of rainbont trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Nutrition in Practice*, 119-126.
- Klinger, C. R., Blazer, S. V., Echevarria, C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 147, 225-233.
- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Røed, K.H., Baeverfjord, G. 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquac. Nutr.* 6, 77- 84.
- Lancaster Jr., J.R. 1992. Nitric oxide in cells. *Am. Scientist* 80, 249-259.
- Landolt, M.L. 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* 79, 193-206.
- Larsen, H.K. 1964. Comparison of various methods of hemoglobin determination of catfiah blood. *Prog. Fish Cult.* 25, 11-15.

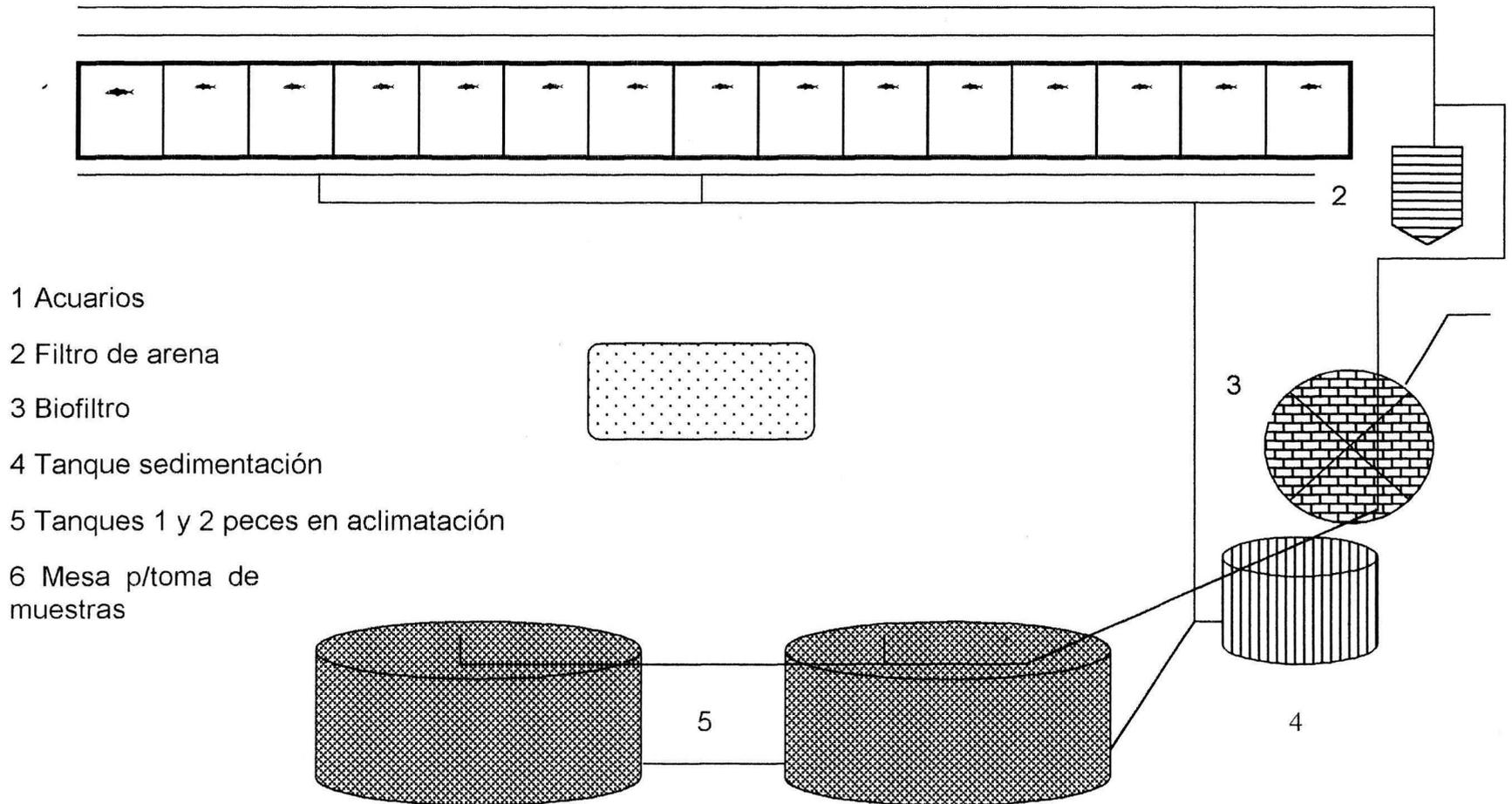
- Lee, J.S. 1991. Commercial catfish farmer. 3d edition. Interstate publishers, Danville, Illinois, USA. Pp. 337.
- Leray, C., Nonnotte, G., Roubaud, P., Leger, C. 1985. Incidence of (n-3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. *Reproduction Nutrition Development* 25(3), 567-581.
- Li, Y., Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *Journal of Nutrition* 115, 123-131
- Lim, C., Akiyama, D.M. 1991. Full-fat soybean meal utilization by fish. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. (Eds.), *Proc. Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailand and Indonesia*, pp. 188-198.
- Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H., Robinson, E.H. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185, 313-327.
- Loscalzo, J. 2001. An experiment of nature: genetic L-arginine deficiency and NO insufficiency. *Circ. Res.* 88, 756-762.
- Lumlertdacha, S., Lovell, R.T., Shelby, R.A.D., Lenz, S., Kemppainen, B.W. 1995. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquaculture* 130, 201-218
- Lushchak, V., Lushchak, P., Mota, A., Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish, *Carassius auratus*, during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, 100-107.
- MacMicking, J., Xie, Q., Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.* 15, 323-350.
- Merino, C.M. 1998. Evaluación de vacunas aplicadas por vía oral en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) *Osteichthyes; serranidae*. Tesis de Maestría en Ciencias, UABCS pp, 31-32.
- Moinard, C., Chauveau, B., Walrand, B., Felgines, C., Chassagne, J., Caldefie, F., Cynober, L.A., Vasson, M.P. 1999. Phagocyte functions in stressed rats: comparison of modulation by glutamine, arginine and ornithine 2-oxoglutarate. *Clinical Science* 97, 59-65.
- Morrison, D.C., Kline, L.F. 1977. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide (LPS). *J. Immunol.* 118, 362-368.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz, E., Grau, A., Pastor, E. 1999. Relationships between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae. *Aquaculture* 179, 309-324.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defense enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidized oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343-361.
- Murray, C.K., Fletcher, T.C. 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa*) tissues. *Journal of Fish Biology* 9, 329-337.

- Neves, C.A., Santos, E.A., Bainy, A.C. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palaemonidae), infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). *Disease of Aquatic Organisms* 39, 155-158.
- NRC. 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press, Washington, D.C. 114 p.
- Osserman, E.F. 1966. Serum and urinary lysozyme in monocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 124, 921-951.
- Panush, R.S., De la fuente, J.C. 1985. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet* 45, 97-123.
- Parry, R.M., Chandau, R.C., Shahani, R.M. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 384-386.
- Pérez, H., Lim, C., Klesius, P.H. 2003. Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 225: 67-82
- Plyzycz, B., Flory, C.M., Galvan, I., Bayne, C.J. 1989. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. *Dev. Comp. Immunol.* 13, 217-224.
- Poston, H.A. 1964. Effect of dietary vitamin K and sulfaguanidine on blood coagulation time, microhematocrit and growth of immature brook trout. *Progressive Fish Culturist* 26, 59-64.
- Powell, M.D., Wright, G.M., Burka, J.F. 1991. Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Cell Tissue Res.* 266, 469-474.
- Reynolds, J., Daly, J., Zhang, S. 1988. Immunomodulatory mechanism of arginine. *Surgery* 104, 142-151.
- Robinson, H.E., Wilson, R.P., Poe, W.E. 1981. Arginine requirement and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling catfish. *J. Nutr.* 111, 46-52.
- Roed, K.H., Fjalestad, Y.K., Stromsheim, A. 1993. Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 114, 19-31.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T., Sorgeloos, P. 2003. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* (in press).
- Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth and protein utilization in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 323-339.
- Sakai, D.K. 1984. Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. *Journal of Fish Disease* 7, 29-38.
- SAS Institute, Inc. 1999. SAS System for Windows, version 8th. Cary, NC.

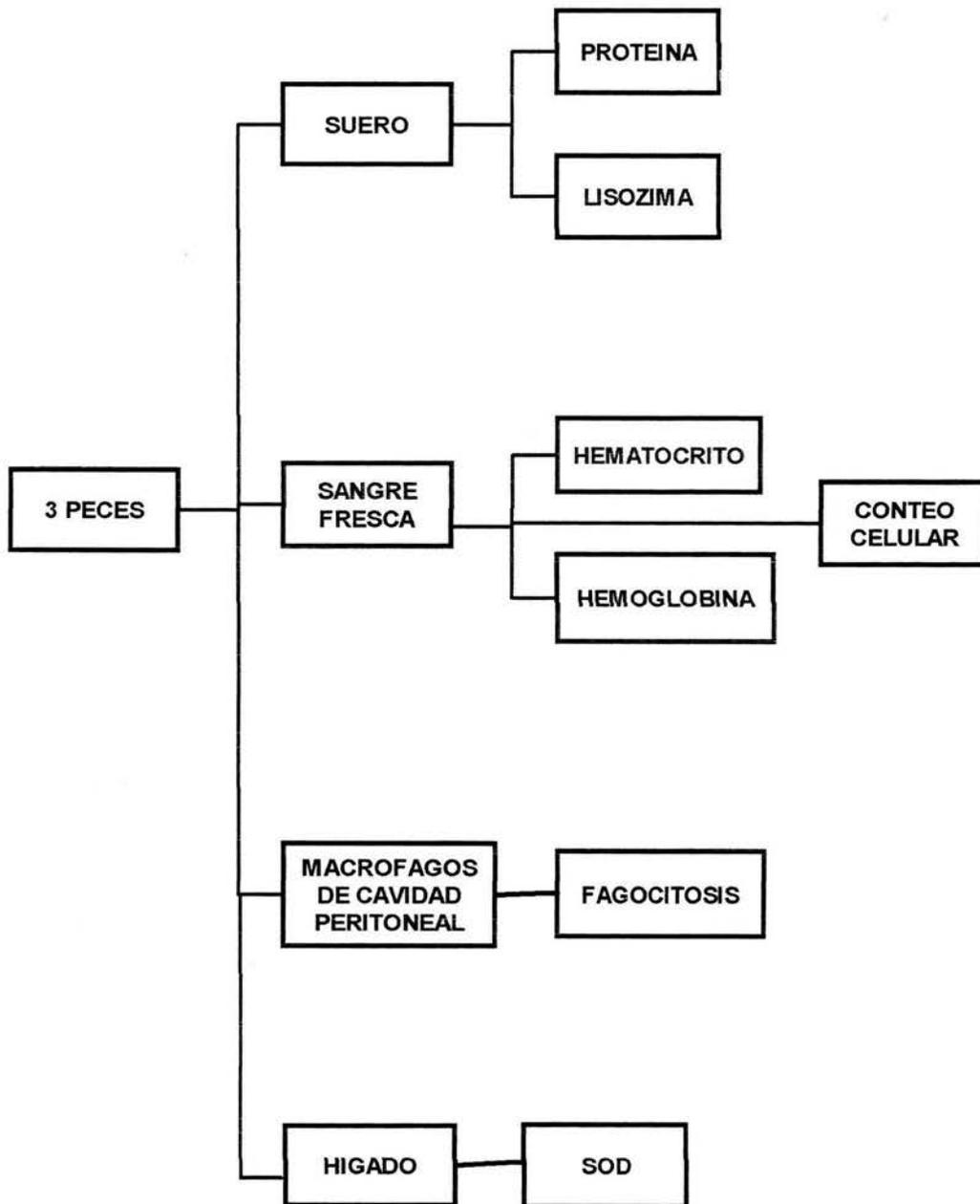
- Schifferli, J.A., Ng, Y.C., Peters, D.K. 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* 315, 488-495.
- Schoort, W.P., Plumb, J.A. 1994. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Org.* 19, 153-155.
- Secombes, C.J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 421-436.
- Secombes, C.J., Chung, S., Jeffries, A.H. 1988. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 201-206.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J., Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an up date. *Fish and Shellfish Immunol.* 6, 291-304.
- Shah, A., Shin-ichi, T., Shunsuke, K. 2002. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture* 205, 127-140.
- Soberanes, F.F., Cortés, S.E. 2001. Oxido Nítrico: Un nuevo concepto en veterinaria. *AMMVEPE* 12(1), 21-23.
- Thompson, K.D., Tatner, M.F., Henderson, R.J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 2, 21-31.
- Tischler, M.J., Fagan, J.M. 1983. Response to trauma of protein, amino acid, and carbohydrate metabolism in injured rat skeletal muscle. *Metabolism Clinical and Experimental* 32, 853-868.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* 8, 195– 203.
- Vargas-Albores, F., Latchford, J., Scholz, V., Garcia, D. G., Ricque, D., Cruz, S. L. 1998. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* 76, 271-283.
- Vazquez, J., Vargas, A.R., Ochoa, J.L. 1993. A computer program to calculate superoxide dismutase activity in crude extracts. *J. Microbiol. Methods* 17, 239-244.
- Wang, R., Neuman, N.F., Shen, Q., Belosevic, M. 1995. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish and Shellfish Immunol.* 5, 329–346.
- Warner, H.R. 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free radical Biology and Medicine* 3, 249-258.
- Wilhelm, F. D., Boveris, A. 1993. Anti-oxidant defenses in marine fish I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106C, 409-413.
- Wilhelm, F.D. 1996. Antioxidant defenses in fish: a comparative approach. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 1735-1742.

- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19, 137– 161.
- Wise, D.J., Tomasso, J.R., Gatlin III, D.M, Bai, S.C., Blazer, V.S. 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 5, 177-182.
- Wu, G., Brosnan, J.T. 1992. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem. J.* 281, 45-48.
- Wu, G., Flynn, N.E., Jolly, C.A., Davis, P.K. 1999. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *Journal of Nutrition* 129, 1347-1354.
- Wu, G., Knabe, A. 2001. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269, 621-629.
- Wu, G., Morris, S.M. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336, 1-17.
- Yano, T., Ando, H., Nakao, M. 1984. Optimum conditions for the assay of haemolytic complement titer of carp and seasonal variation of the titers. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 29, 91–101.
- Yousif, A.N., Albright, L.J., Evelyn, T.P. 1991. Occurrence of lysozyme in the eggs of Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.* 10, 45-49.
- Zapata, A., Chiba, A., Varas, A. 1990. Cells and tissues of the immune system of fish. *In: Iwama, Q., Nakanishiet, T. (Eds.). The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment.* Acad Press 1-62.

Apéndice No. 1 SISTEMA EXPERIMENTAL



Apéndice II. Diagrama de flujo de las metodologías



Apéndice III. Fotografías peces y sistema



