

Introducción

Las primeras truchas en Chile hacen su aparición a fines del siglo XIX, específicamente en 1880, fue en este año cuando en la recién hace 5 años fundada ciudad Lota, actual región del Bio-Bio se introdujeron las primeras ovas de la llamada “Trucha común”, actualmente conocida como Trucha Fario (*Salmo trutta*). No fue hasta en la primera década del siglo XX que el gobierno de esa época, respondiendo a las inquietudes de un naturalista alemán llamado Federico Albert, quien había realizado un catastro de las posibles especies de salmónidos que podrían ser introducidos en nuestro país, el cual reconoce el potencial poder económico de estos salmónidos e introduce, junto a la creación de la Piscicultura Río Blanco, tres especies traídas desde Francia, la Trucha Fario, la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el Salmón del atlántico (*Salmo salar*).

El género *Oncorhynchus*

Oncorhynchus corresponde a uno de los 10 generos de la familia Salmonidae y tiene alrededor de 12 especies, incluyendo *O. mykiss* (trucha arcoíris), *O. nerka* (salmón rojo), *O. gorbuscha* (salmón rosado), *O. tshawytscha* (salmón chinook), *O. kisutch* (salmón coho) , entre otros. Se distribuyen principal y naturalmente por una vasta zona que comprende desde California hasta el mar de Behring y el océano ártico (Groot et al., 1991).

Algunas características principales de este genero son las siguientes

- Son peces anádromos, es decir emigran al mar cuando son juveniles y luego vuelven al agua dulce para reproducirse.
- A su vez, en su mayoria solo se reproducen una vez, por lo tanto son semélparos.
- Tienen baja tasa de fecundidad (2 a 5mil ovas) y grandes huevos (5-8mm)

En Chile encontramos la Trucha arcoíris, el Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y el Salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) como representantes de este genero.

La trucha arcoiris, descrita inicialmente por Walbaum en 1972 tiene un cuerpo alargado fusiforme con 60 a 66 vertebras, con 3 a 4 espinas dorsales, 10 a 12 rayos dorsales blandos, 3 a 4 espinas anales, 8 a 12 rayos anales blandos y 19 rayos caudales. Presentan una aleta con gran tejido adiposo, la cual usualmente contiene un borde negro. Tienen como coloración principal tonalidades de azul a verde oliva, sobre una banda rosa a lo largo de la linea lateral y plateada por debajo de ella, configuración cromática que le da su nombre *arcoíris*.

Este pez es resistente, de crecimiento rápido y tolerante a una amplia gama de manipulaciones y ambientes, pudiendo así ocupar una variedad de hábitats y diferentes

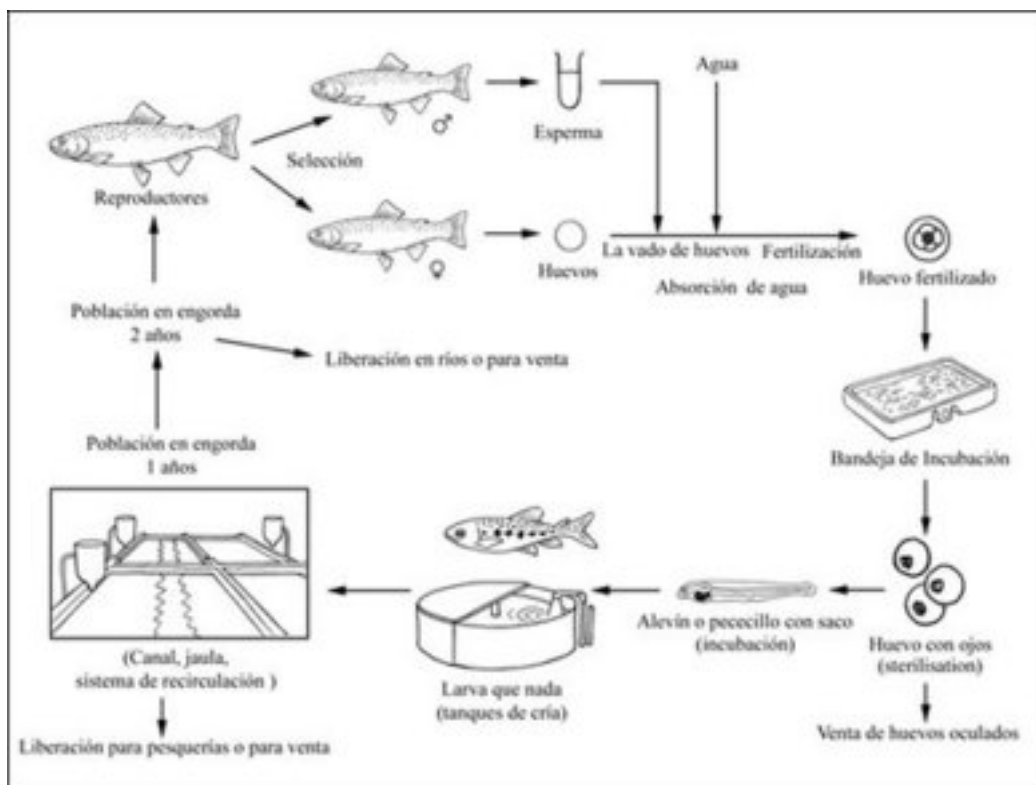


Figura 1: Ciclo de productivo de la trucha arcoíris

temperaturas. La temperatura ideal para el cultivo de la trucha arcoíris está por debajo de 21° C, aunque en etapa de desove y crecimiento la temperatura tiene que estar en el rango de 9 a 14°C (Figura 1).

Situación actual en Chile

Los desembarques de Trucha arcoíris han aumentado cercano al 1500 % en 20 años (Figura 2), con una tasa de crecimiento porcentual promedio del alrededor del 15 % (Ser-napesca, 2012), en términos monetarios, el año 2013 la exportación de este producto genero ventas alrededor de los 300 millones de dólares, lo que lo convierte en una de las 3 especies más cosechadas en Chile junto al Chorito y el Salmón del atlántico (Subpesca, 2013).

Uno de los principales aspectos a tener en cuenta con una especie con tal valor comercial es su respuesta inmune. Gran parte de la mortalidad de estas especies deriva de distintos tipos de infecciones, como por ejemplo las provocadas por *Flavobacterium psychrophilum* y *Piscirickettsia salmonis*, llegando a haber muertes en casos de hasta el 50 % y 34 % de la producción respectivamente. La explicación de esto radica en la pérdida del equilibrio ambiente-patógeno-hospedero, lo cual genera las condiciones que hacen aumentar la enfermedad y mortalidad en el cultivo. En el caso de la acuicultura (Industria que representa cerca de un 50 % de la oferta mundial de pescado) (FAO, 2012), un grave problema

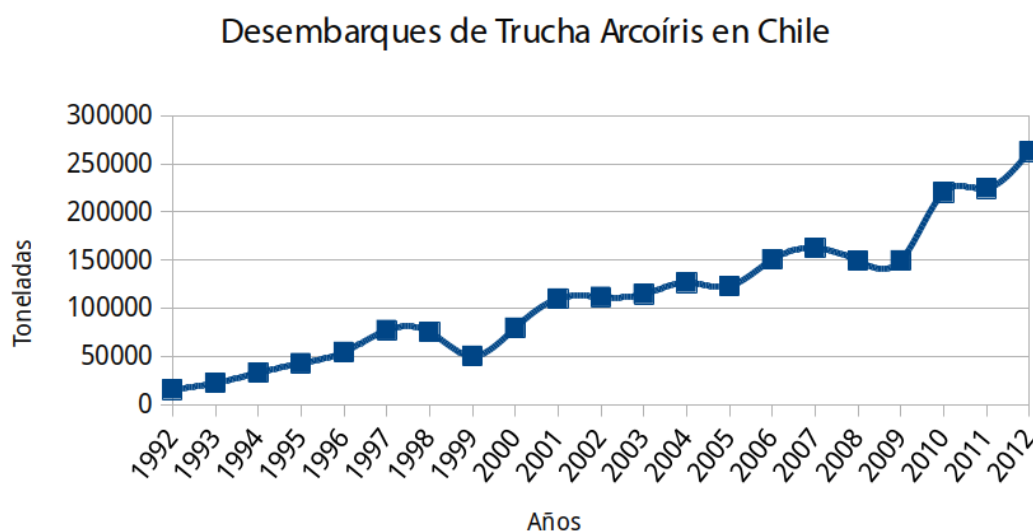


Figura 2: Desembarques de Trucha Arcoíris en Chile durante de los ultimos 20 años

son las enfermedades asociadas a cultivos masivos de peces, mayoritariamente relacionadas al stress en que se ven sometidos los organismos como también por el crecimiento acelerado de la producción y los sistemas de cultivo actuales (FAO, 2012; Georgiadis et al., 2001). Estas enfermedades, cualquiera sea su origen, pueden tener un alto impacto negativo en la producción mundial, lo que equivale a grandes pérdidas económicas (Z. J. Shao, 2001). Por lo tanto es necesario tener información del sistema inmune en peces, para así poder minimizar los efectos producidos por estas enfermedades y en algunos casos prevenirlos.

Sistema inmune en peces

La comprensión de la funcionalidad del sistema inmune de peces, especialmente en teleósteos, al igual que en vertebrados superiores se puede entender como una respuesta innata o inespecífica y una respuesta adaptativa o específica. La respuesta inmunológica presentada por los peces está bien desarrollada e integrada, aunque si, influenciada notoriamente por los cambios estacionales y la temperatura (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000)

La respuesta inmune innata o inespecífica en peces es muy importante, ya que constituye la primera y más importante línea de defensa del pez frente a un gran número de patógenos, en esta respuesta convergen factores humorales y celulares (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000; L.-Y. Zhu et al., 2012). Este tipo de inmunidad está basado en el reconocimiento no clonal de los componentes estructurales o secretados de los patógenos microbianos (Athman et al., 2004), los cuales son llamados patrones moleculares asociados a patógenos (o PAMPs, por sus siglas en inglés), estos a su vez son reconoci-

dos por receptores de reconocimiento de patrón (PRR, por sus siglas en inglés) (Gordon, 2002), entre los cuales se encuentran receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), el receptor de complemento tipo-3 (CR3), Dectina-1, proteína C-reactiva, entre otros (Rondon-Barragan, 2010). Entre los PAMPs más clásicos se puede encontrar a las secuencias de ADN CpG sin metilar, los lipopolisacáridos (LPS) y el RNA bicatenario viral. La interacción entre los PRR (como los TLR) y los PAMP es la reacción que desencadenará e iniciará la transducción de señales intracelular que resultara en la expresión de genes involucrados en la inflamación, respuesta antiviral y maduración de células con fenotipo dendrítico (Aghaallaei et al., 2010); TLRs individuales activan factores de transcripción únicos y comunes a través de diferentes vías de señalización para generar una respuesta biológica específica ante microorganismos (Bols et al., 2001; Ellis, 2001; Kawai et al., 2005)

Entre las células involucradas la fase celular inespecífica de la respuesta inmune están las células citotóxicas no específicas (NCC, por sus siglas en inglés), células fagocíticas, y granulocitos (Ainsworth, 1992; Ellis, 1977). Las células NCC en peces se encuentran principalmente en el riñón cefálico, el bazo, sangre periférica y el timo, son células citotóxicas inespecíficas, es decir ejercen su acción en diferentes células diana sin un reconocimiento previo, las cuales requieren un contacto célula-célula para poder efectuar la lisis celular (Graves et al., 1984). Dentro de las células fagocíticas los neutrófilos representan aproximadamente en promedio a un 11 % de los leucocitos en sangre, son también llamados polimorfonucleares o leucocitos específicos, su capacidad fagocítica es baja, ya que ingieren poco material extraño, aunque poseen la mayoría de la batería enzimática para este trabajo. Los eosinófilos y basófilos son los granulocitos con menor presencia en peces, aunque en el caso de los eosinófilos se han logrado encontrar en peritoneo u otros tejidos como el intestino, mientras que los basófilos tienen escasa presencia en estos organismos (D. Palić et al., 2011).

Dentro del sistema fagocítico mononuclear, podemos encontrar a los monocitos y a los macrófagos (derivados de estas últimas), los primeros son móviles y generalmente más grandes que los demás leucocitos, en el caso de los macrófagos, pueden fagocitar partículas mucho más grandes, son abundantes en el bazo y riñón cefálico, aunque también se han encontrado en mucosa olfatoria (Castro et al., 2011; Olabuenaga, 2000).

Entre los componentes moleculares asociados a la respuesta innata del sistema inmune de peces podemos encontrar a las citoquinas, las cuales son una familia de proteínas de bajo peso molecular (comúnmente glicosiladas) y secretadas por células del sistema inmune activadas previamente frente a la exposición de diferentes componentes patógenos (Salazar-Mather et al., 2006). Estas citoquinas pueden dividirse en interferones (IFNs), interleuquinas (ILs), factores de necrosis tumorales (TNFs, por sus siglas en inglés), factores estimuladores de colonias y quimioquinas (Savan et al., 2006). Las interleuquinas son citoquinas producidas principalmente por linfocitos T CD4+, aunque

también son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, como por ejemplo los macrófagos/monocitos y las células endoteliales (C. J. Secombes et al., 2011), las quimioquinas, o también llamadas citoquinas quimiotácticas (o quimioattractantes) son una familia de citoquinas que son liberadas por la mayoría de tejidos infectados en los estadios tempranos de infección. Las citoquinas pueden dividirse en distintas familias según sea la organización de sus cisteínas.

Empezar a hablar de IL-1B, IFN-g, TNF α iNOS e IL-12

Otras moléculas efectoras presentes en la respuesta innata frente a patógenos son los péptidos anti-microbianos (AMP, por sus siglas en inglés), moléculas con la capacidad de destruir y/o neutralizar microorganismos patógenos directamente, son moléculas pequeñas, anfipáticas y catiónicas (L. Mercado et al., 2005), y están ampliamente extendidos por los reinos vegetal y animales (Zaslöff, 2002). Los mecanismos de acción anti-bacteriana de estos AMP pueden entenderse desde dos puntos de vista diferentes: 1. La estructura anfipática puede unirse selectivamente a la membrana bacteriana y generar poros transmembrana, los cuales destruyen a la bacteria desintegrando la membrana, y 2, los AMP pueden directamente entrar a la bacteria e interactuar específicamente con factores de crecimiento y metabolismo bacteriano eventualmente generando la muerte bacteriana (Wimley, 2010; L.-Y. Zhu et al., 2012). Entre los péptidos anti microbianos descritos en peces podemos encontrar cuatro grandes grupos, las defensinas, proteínas de macrófagos asociadas a resistencia natural (Pramps, por sus siglas en inglés), NK-lisina y hepcidinas.

Otra familia de péptidos antimicrobianos son las Catelicidinas, presentes generalmente en neutrófilos y superficies de mucosas, su actividad se centra principalmente en su interacción con la membrana plasmática de la bacteria para eventualmente destruirla, fueron primeramente descritas en mamíferos y luego se han encontrado en distintos peces teleósteos, algunos casos son los de trucha arcoíris (C.-i. Chang et al., 2005), bacalao (Maier et al., 2008), salmón del atlántico (C.-I. Chang et al., 2006), entre otras.

Además de poseer una robusta y bien desarrollada respuesta inmune innata como se explicaba anteriormente, los peces también cuentan con una respuesta adaptativa, con componentes celulares y humorales (Alvarez-Pellitero, 2008), en este último grupo se encuentran los anticuerpos, los cuales son proteínas pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig), en el caso de los peces producen inmunoglobulinas del tipo M, T y D (Bengtén et al., 2002; L. Zhang et al., 2011; L.-Y. Zhu et al., 2012), siendo la primera la más importante, estando presente en el suero, el mucus y la bilis. Los anticuerpos son producidos por linfocitos B activados al reconocer algún antígeno, ya sea en solución o presentado por alguna célula presentadora de antígeno, que en el caso de los peces principalmente son macrófagos, y tienen variadas funciones, pueden actuar como moléculas efectoras en el suero, o también como receptores de superficie de linfocitos B.

Una de las principales diferencias entre el sistema inmune de peces teleósteos con el de mamíferos es la carencia de medula ósea y ganglios linfáticos, por lo cual no se puede marcar una diferencia entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000). Entre los principales órganos pertenecientes al sistema inmune de peces podemos encontrar el timo, el riñón y el bazo. El riñón cefálico es el principal órgano en la diferenciación de linfocitos B, ya que es el primer órgano en el que aparecen estas células durante el desarrollo del pez, también es el órgano donde se produce la eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis y monocitopoyesis (Whyte, 2007), por lo que se le puede considerar a la vez un órgano análogo a la medula ósea de los



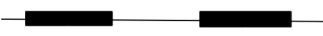

mamíferos (Razquin et al., 1990). Los centros melanomacrofágicos son una agregación de macrófagos que contienen melanina, un pigmento de color oscuro, su tamaño y número está directamente relacionado con el estado del pez, ya que estas variables aumentan considerablemente en peces enfermos, donde el catabolismo ha sido excesivo. Algunos estudios ontogénicos realizados en salmónidos sugieren que la función del bazo no es esencial en la maduración del sistema inmunológico, ya que los linfocitos del timo y riñón cefálico estarían más involucrados que este órgano en esta maduración. Otros estudios sin embargo indican, que bajo un desafío antigénico aparecen linfocitos B en el bazo, teniendo parámetros similares a los presentados por estas células en otros órganos como el riñón cefálico.

Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes han sido descritos como componentes necesarios para la acuicultura, ya que mejoran la respuesta innata y proveen resistencia a patógenos. Diferentes de estas sustancias, como los B-glucanos, productos bacterianos y constituyentes de las plantas pueden iniciar directamente la activación de mecanismos de defensa innata actuando en receptores y desencadenando la activación de distintos genes que puedan resultar en la producción de moléculas antimicrobianas (Bricknell et al., 2005; Kumari et al., 2006). A pesar de la evidencia demostrada sobre el uso benéfico de estas sustancias como potenciales inmunomoduladores de la respuesta frente a distintos patógenos en la acuicultura (Abarca et al., 2012; S. Bilen et al., 2011; Bricknell et al., 2005; Chettri et al., 2013; Dalmo et al., 2008), las actuales soluciones comerciales están de cierta manera restringidas por ser derivadas de algunas levaduras, como por ejemplo los B1-3, B1-6 glucanos que son vendidos bajo la marca MacroGard® y sus distintos derivados. Existe también un producto comercial llamado Ergosan, el cual está hecho de una mezcla de distintos componentes de un alga, la cual es rica en alginatos y polisacáridos. Una dosis individual de 1mg de Ergosan aumenta significativamente la proporción de eutrofilos, aumentan el grado de fagocitosis, la actividad del estallido respiratorio y la expresión de interleukina 1B (IL-1B), interleukina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en leucocitos peritoneales de trucha arcoíris a 1 día post inyección (Peddie et al., 2002).

β -glucanos

Tabla 1: Estructuras de β -Glucanos según su origen

Origen	Estructura	Función
Bacteriano		β 1,3-Glucano lineal con ramificaciones largas de β 1,6-Glucano
Levadura		β 1,3-Glucano Lineal
Cereal		β 1,3/ β 1,4-Glucano lineal
Hongo		β 1,3-Glucano lineal con ramificaciones cortas de β 1,6Glucano

Estructuras de β -Glucanos según su origen

Los β -glucanos son carbohidratos que consisten en moléculas de glucosas enlazadas, los cuales son componentes estructurales de gran importancia en paredes celulares de levaduras, hongos, algas y algunas bacterias. Estos carbohidratos también forman parte

de la pared celular endospermas de algunos cereales como la cebada y la avena. Dependiendo del origen del β -glucano encontraremos diferencias también en sus estructuras moleculares y sus posibles ramificaciones (Tabla 1) (Skov et al., 2012; Volman et al., 2008).

En peces es ampliamente demostrado el uso de beta-glucanos como inmunoestimulantes, en distintas especies, como en ciprinidos (*Cyprinus koi*, *Cyprinus carpio*) (Kühlwein et al., 2014; S. Lin et al., 2011), salmónidos (Abarca, 2011; Skov et al., 2012), pez cebra (*Danio rerio*) (Rodríguez et al., 2009), entre otros (Lokesh et al., 2012; W.-S. Wang et al., 2007), pero como se mencionó anteriormente todavía existe, a pesar de los antecedentes científicos, cierta desconfianza en estos inmunoestimulantes.

Hipótesis

La administración oral del β -glucano zimosán en *O.mykiss* genera una respuesta inmune cuantificable en tejido branquial lo que permite establecer un modelo de la expresión de moléculas reguladoras y efectoras de la inmunidad.

Objetivo General

Establecer un modelo molecular basado en la cuantificación de diferentes parámetros de respuesta inmunológica expresada en tejido branquial *O.mykiss* y relacionada con la administración oral del β -glucano zimosán.

Objetivos Específicos

- Implementar un sistema de alimentación que permita realizar la administración oral de zimosán y sus respectivos controles a *O.mykiss*
- Evaluar la expresión de moléculas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de *O.mykiss* tratados con zimosán vía oral
- Detectar la disponibilidad de proteínas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de *O.mykiss* tratados con zimosán vía oral
- Relacionar el nivel de expresión y detección de moléculas de respuesta inmune evaluadas en tejido branquial con el nivel de dosificación oral de zimosán.

Materiales y Métodos

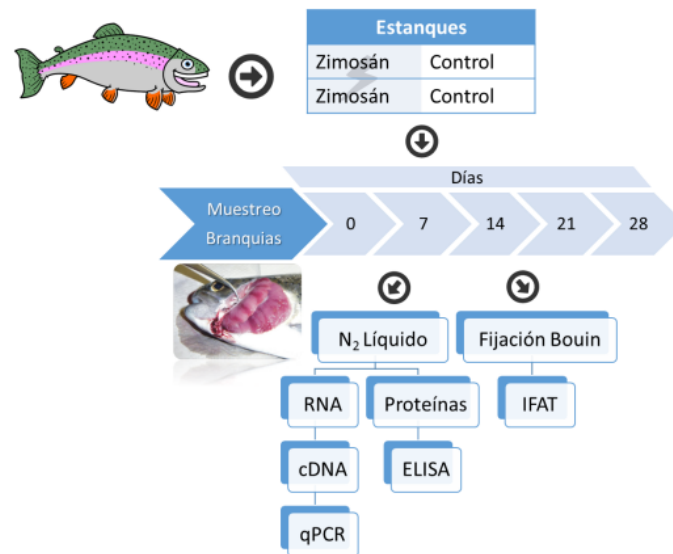


Figura 3: Esquema general de trabajo

Material Biológico

Peces

Ejemplares de truchas de aproximadamente x meses de edad, con un peso promedio de $22,26 \pm 1,7397\text{g}$ fueron obtenidas desde la piscicultura de Río Blanco, ubicada a 35km de Los Andes, en la Quinta región de Valparaíso y fueron trasladados hasta el Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma, ubicado en la provincia de Valparaíso. Fueron aclimatados durante 1 semana y se mantuvieron a 14°C durante toda la investigación.

Anticuerpos

Se utilizarán anticuerpos policlonales monoespecíficos, obtenidos en ratones y conejos, inmunizados con epítopes sintéticos de las moléculas de interés. Estas moléculas han sido validadas en salmónidos, mediante técnicas estandarizadas en el Grupo de Marcadores Inmunológicos del Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (GIM-PUCV) (J. Bethke et al., 2012; Narváez et al., 2010; V. Rojas et al., 2012; Santana et al., 2012)

Desafío y Controles

Los especímenes de trucha arcoíris se alimentaran en dos grupos, inducidos y controles, el primer grupo tendrá una dieta al 3 % de su peso con un agregado del 0,3 % de Zimosán, los controles tendrán la misma alimentación excepto por el Zimosán, el cual será reemplazado con PBS.

Muestreo

Los peces se sacrificaron con sobredosis del sedante Kalmagin 20 % (Benzocaína 20 %) de CENTROVET, Se tomaron muestras los días 0, 7, 14, 21 y 28, 5 peces por condición, intercalando 3 peces de un estanque y 2 de su par respectivo en cada día de muestreo. Las muestras se tomaron en dos grupos, primero se tomaron ejemplares de branquias y se fijaron con solución de Bouin (71 % solución saturada al 1,2 % de Ácido pícrico, 24 % formaldehído y 5 % ácido acético glacial) por 7 horas y luego se lavaron 3 veces con Etanol al 70 % , dejándolos en este alcohol hasta su posterior uso. Para el otro grupo se procedió a pulverizar con Nitrogeno Líquido usando un mortero, para ser usado en las extracciones de RNA y Proteínas.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó acabo usando el Kit de OmegaBiotek E.Z.N.A Total RNA Kit II usando las instrucciones del fabricante, para el homogenizado adicional se usó el homogenizador de sobremesa FastPrep24 de MP Biomedicals con un programa de 4,5 movimientos por segundo durante 40 segundos usando como matriz 4 esferas metálicas de 2,388mm de diametro.

Cuantificación e Integridad de RNA

El RNA se cuantificó usando el sistema espectrofotométrico ND-1000 de NanoDrop cargando 2uL del RNA previamente extraído, luego para verificar su integridad se corrió un gel de agarosa nativo al 0,8 % durante 1 hora a 80V cargando 1 μ g de RNA por pocillo, el RNA se almacenó a -80°C.

Síntesis de cDNA

La transcripción reversa para generar el DNA complementario al RNA previamente extraído se realizó usando el Kit M-MLV Reverse Transcriptase de Promega usando las instrucciones del fabricante con 1 μ g de RNA, la reacción se hizo en un Termociclador C1000 Touch de Bio-Rad.

PCR en Tiempo Real (qPCR)

Para todas las reacciones de qPCR se utilizaron el Kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix de Agilent Technologies y el sistema de detección para PCR en Tiempo Real de Bio-Rad CFX96.

Tabla 2: Preparación de Master Mix para qPCR

	1 Reacción
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green MM	5 μ L
Partidores (F+R) 1,5 μ M	4 μ L
Muestra (1:4)	1 μ L
Total por reacción	10mL

Tabla de reactivos para 1 reacción de qPCR

Bibliografía

- Abarca, A. (2011). *Implementación de un modelo in vitro para determinar el poder inmunoestimulante de b-glucanos en macrofagos de trucha arcoiris* (PhD thesis). Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso.
- Abarca, A., Bethke, J., Narváez, E., Flores, R., & Mercado, L. (2012). Parameters to evaluate the immunostimulant effect of Zymosan A in head kidney leucocytes (HKL) of salmonids Parámetros para la evaluación del efecto de Zimosán A como inmunoestimulante sobre leucocitos de riñón cefálico (HKL) de salmónidos, *40*(3), 545–552.
- Aghaallaei, N., Bajoghli, B., Schwarz, H., Schorpp, M., & Boehm, T. (2010). Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gfp reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *107*(42), 18079–84.
- Ainsworth, A. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, *2*, 123–148.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *126*(3-4), 171–98.
- Athman, R., & Philpott, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, *7*(1), 25–32.
- Bengtén, E., Quiniou, S. M.-A., Stuge, T. B., Katagiri, T., Miller, N. W., Clem, L. W., ... Wilson, M. (2002). The IgH Locus of the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Contains Multiple Constant Region Gene Sequences: Different Genes Encode Heavy Chains of Membrane and Secreted IgD. *J. Immunol.*, *169*(5), 2488–2497.
- Bethke, J., Rojas, V., Berendsen, J., Cárdenas, C., Guzmán, F., Gallardo, J. A., & Mercado, L. (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *J. Fish Dis.*, *35*(5), 379–88.
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A. M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, *30*(2), 451–5.
- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., & Lee, L. E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, *25*(8-9), 853–873.
- Bricknell, I., & Dalmo, R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, *19*(5), 457–72.
- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M. P., Six, a, Benmansour, a, & Boudinot, P. (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, *31*(5), 644–54.
- Chang, C.-i., Pleguezuelos, O., Zhang, Y.-a., Zou, J., & Secombes, C. J. (2005). Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect. Immun.*, *73*(8), 5053–64.

- Chang, C.-I., Zhang, Y.-A., Zou, J., Nie, P., & Secombes, C. J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1), 185–95.
- Chettri, J. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2013). Immunomodulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry by bath exposure to a β -glucan from *Euglena gracilis*. *Aquac. Res.*, 44(9), 1407–1415.
- Dalmo, R. a, & Bøgwald, J. (2008). Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.*, 25(4), 384–96.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11(5), 453–491.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9), 827–39.
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura - 2012* (p. 251).
- Fernández, A., Ruiz, I., & Blas, I. D. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Rev. Aquat.*, 16.
- Georgiadis, M., Gardner, I., & Hedrick, R. (2001). The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev. Vet. Med.*, 48(4), 287–302.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–30.
- Graves, S. S., Evans, D. L., Cobb, D., & Dawe, D. L. (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 8(2), 293–302.
- Groot, C., & Margolis, L. (1991). *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press.
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(4), 338–44.
- Kumari, J., & Sahoo, P. K. (2006). Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 70(1-2), 63–70.
- Kühlwein, H., Merrifield, D. L., Rawling, M. D., Foey, a D., & Davies, S. J. (2014). Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 98(2), 279–89.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., & Luo, L. (2011). Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31(6), 788–94.

- Lokesh, J., Fernandes, J. M. O., Korsnes, K., Bergh, O., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2012). Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, *33*(3), 626–31.
- Maier, V. H., Dorn, K. V., Gudmundsdottir, B. K., & Gudmundsson, G. H. (2008). Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Mol. Immunol.*, *45*(14), 3723–30.
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S. H., & Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electron. J. Biotechnol.*, *8*(3), 284–290.
- Narváez, E., Berendsen, J., Guzmán, F., Gallardo, J. a., & Mercado, L. (2010). An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish Shellfish Immunol.*, *28*(1), 235–9.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, *64*(2).
- Palić, D., Beck, L. S., Palić, J., & Andreassen, C. B. (2011). Use of rapid cytochemical staining to characterize fish blood granulocytes in species of special concern and determine potential for function testing. *Fish Shellfish Immunol.*, *30*(2), 646–52.
- Peddie, S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *86*(1-2), 101–13.
- Razquin, B. E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., & Villena, A. J. (1990). Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, *36*(2), 159–173.
- Rodríguez, I., Chamorro, R., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, *27*(2), 369–73.
- Rojas, V., Guzman, F., & Morales-lange, B. (2012). Immunological strategy for detecting the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in salmonids. *Electron. J. Biotechnol.*, *15*.
- Rondon-Barragan, I. (2010). Receptores similares a Toll en peces : el inicio de la divergencia. *Investig. Vet.*, *11*(1), 15–30.
- Salazar-Mather, T., & Hokeness, K. (2006). Cytokine and Chemokine Networks: Pathways to Antiviral Defense. In T. E. Lane (ed.), *Chemokines Viral Infect.* (Vol. 303, pp. 29–46). Springer Berlin Heidelberg.
- Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., Guzmán, F., Gallardo, J. a., & Mercado, L. (2012). Anti-peptide antibodies: A tool for detecting IL-8 in salmonids. *Electron. J. Biotechnol.*,

15(5).

Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*, 1(1), 89–101.

Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12), 1336–45.

Sernapesca. (2012). Anuario desembarques. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.

Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50(3), 229–243.

Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., & Buchmann, K. (2012). Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(1), 111–20.

Subpesca. (2013). Cuenta Pública de Estado de los Recursos. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.

Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol. Behav.*, 94(2), 276–84.

Wang, W.-S., Hung, S.-W., Lin, Y.-H., Tu, C.-Y., Wong, M.-L., Chiou, S.-H., & Shieh, M.-T. (2007). The effects of five different glycans on innate immune responses by phagocytes of hybrid tilapia and Japanese eels *Anguilla japonica*. *J. Aquat. Anim. Health*, 19(1), 49–59.

Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(6), 1127–51.

Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol.*, 5(10), 905–17.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–95.

Zhang, L., Li, Y.-y., Chen, T., Xia, W., Zhou, Y., Wan, Y.-j., ... Xu, S.-q. (2011). Abnormal development of motor neurons in perfluorooctane sulphonate exposed zebrafish embryos. *Ecotoxicology*, 20(4), 643–52.

Zhu, L.-Y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.-X., & Shao, J.-Z. (2012). Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.*