



Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

Modelo molecular en tejido branquial de *Oncorhynchus mykiss* inmunoestimulado con el β -glucano con Zymosán A liberado en dieta

Proyecto de tesis presentado como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA

presentado por:

Sebastián Rodrigo Sariego Benítez
Viña del Mar, Chile

Director de Tesis: Dr. Luis Mercado Vianco
Institución: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Agosto, 2014

Resumen

La perdida del equilibrio Ambiente↔Patógeno↔Hospedero es la causa de la mayoría de las enfermedades presentes en la acuicultura, y es por eso que es estrictamente necesario cimentar las bases de una comprensión íntegra del sistema inmune, para así, poder generar tecnología que pueda sobreponerse a estos paradigmas. Esto tiene suma importancia sobretodo en la industria acuícola, la cual produce anualmente, y con un crecimiento constante, 158 millones de toneladas de pescado, las cuales se traducen aproximadamente en 217.500 millones de dólares (USD), más aún, de toda esa producción, 136 millones de toneladas fueron exclusivamente destinadas a consumo humano. Esto demuestra el potencial presente en esta industria, industria que se ve año a año afectada por la mortalidad de las distintas especies por la perdida del equilibrio antes mencionado, generándose cuantiosas perdidas a nivel comercial y de capital humano.

Los inmunoestimulantes han surgido como una opción viable, escalable y económica para solventar parte de los problemas de la acuicultura, fortaleciendo la capacidad de respuesta inmune de los organismos cultivados en distintos estadíos de desarrollo. Dentro de las formas en las cuales se pueden desplegar estos inmunoestimulantes podemos encontrar vacunas, suspensión oral y liberación en el alimento, entre otras.

En este estudio se utilizó una dieta en base a harina de pescado y otros nutrientes con la cualidad de contener Zimosán A para ser liberado en la alimentación de especímenes de Trucha arcoiris. Durante 28 días de tratamiento se generaron muestras de branquias, para así, evaluar la capacidad de respuesta inmune que levanta el organismo frente a la suplementación de este inmunoestimulante en su dieta. La respuesta se midió en base a distintos marcadores, reguladores y efectores de la inmunidad, a nivel de expresión y de disponibilidad de estos. Por estar involucrados en la primera fase de respuesta inmune los marcadores seleccionados a estudiar fueron: El factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma, interleuquinas 1 beta y 12, y finalmente la enzima óxido nítrico sintasa de carácter inducible. Mediante ensayos de PCR en tiempo real se pudo evaluar que la respuesta frente a la inducción por este β -glucano empieza a levantarse pasado el día 14 del tratamiento, teniendo en común estas fechas para todos los marcadores evaluados.

Para evaluar la disponibilidad de estas moléculas se utilizaron dos alcances, uno a nivel de ELISA, ensayo en el cual pudimos obtener resultados de aumento de disponibilidad entre los días 21 y 28

de muestreo; y a nivel de inmunohistoquímica de fluorescencia, teniendo en cuenta los días elevados mostrados por el ensayo anterior, se pudieron observar marcas de las distintas moléculas estudiadas en muestras de tejido branquial.

Abstract

The loss of balance between Environment↔Pathogen↔Host is one of the main causes of the most of diseases presents in the global aquaculture, and that is why it's absolutely necessary to cement the foundation for a comprehensive understanding of the immune system, thus, to generate technology that can overcome these paradigms. This is especially important in the aquaculture industry, which produces annually, and with steady growth, 158 million tons of fish, which translates into approximately 217,500 million dollars, even more, of all that production, 136 million tons were used exclusively for human consumption. This demonstrates the potential in this industry, an industry that is affected by mortality of different species every year, by the loss of the aforementioned balance, generating substantial losses in commercial and human capital.

Immunostimulants have emerged as viable, scalable and economical option to solve in part the problems of aquaculture, strengthening the immune responsiveness of farmed species at different stages of development. Among the ways in which they can deploy these immunostimulants we find vaccines, oral suspension and food release, among others.

In this study we used a diet based on fish meal and other nutrients, supplemented with Zymosán A (0,3 %) to be released in the feeding of rainbow trout specimens. During 28 days of treatment, gills were taken in order to evaluate the ability of immune response that raises the organism facing this immunostimulant supplementation in their diet. The response was measured based on different markers, regulators and effectors of immunity, at expression and bioavailability levels.

Being involved at the first stage of immune response, selected markers studied were: tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 1-beta and 12, and finally the inducible nitric oxide synthase. Through real-time PCR assays could be assessed that the response to this induction with this β -glucan begins to rise past the 14th day of treatment, having in common these days for all the tested markers.

To evaluate the bioavailability of these molecules we've used two scopes, using ELISA assay in which we get results from increased bioavailability between 21 and 28 days, and, immunohistochemistry with fluorescence, considering the high days displayed by the ELISA results was possible to observe the different studied molecules in gills tissue samples.

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Índice general	IV
Lista de abreviaturas	VIII
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XII
1. Introducción	1
1.1. El género <i>Oncorhynchus</i>	1
1.1.1. Situación actual en Chile	2
1.2. Sistema inmune en peces	3
1.3. Inmunidad en mucosas	7
1.3.1. Inmunidad Branquial	8
1.4. Inmunoestimulantes	9
1.4.1. β -glucanos	9
2. Hipótesis	11
3. Objetivo General	12
3.1. Objetivos Específicos	12

4. Materiales y Métodos	13
4.1. Material Biológico y Bioensayo	13
4.1.1. Peces	13
4.1.2. Dieta	14
4.1.3. Parametros fisicoquímicos del ensayo	14
4.1.4. Anticuerpos	14
4.2. Desafío y Controles	15
4.3. Muestreo	15
4.4. Extracción de RNA	17
4.4.1. Cuantificación e Integridad de RNA	17
4.4.2. Sintesis de cDNA	17
4.5. PCR en Tiempo Real (qPCR)	17
4.5.1. Partidores	18
4.5.2. Estandarización de partidores	18
4.6. Extracción de Proteínas	19
4.6.1. Cuantificación de Proteínas	20
4.7. ELISA Indirecto	20
4.7.1. Activación de la placa	20
4.7.2. Bloqueo de sitios inespecíficos	21
4.7.3. Incubación primer anticuerpo	21
4.7.4. Incubación segundo anticuerpo y revelado	21
4.8. Cortes histológicos	21
4.8.1. Tinción Hematoxilina-eosina	22
4.9. Inmunofluorescencia	22
4.9.1. Desparafinización e Hidratación	22
4.9.2. Bloqueo	23
4.9.3. Incubación de anticuerpo primario	23
4.9.4. Incubación anticuerpo secundario y tinción de DNA (Núcleos)	23

4.9.5. Montaje	23
4.10. Microscopía Confocal	24
4.11. Análisis Estadístico	24
4.11.1. Coeficiente de correlación de Pearson (R)	24
5. Resultados	25
5.1. Bioensayo	26
5.2. Extracción y Cuantificación de RNA	28
5.3. Estandarización de Partidores	28
5.3.1. EF-1 α	29
5.3.2. IL-12	29
5.3.3. TNF- α	29
5.3.4. IFN- γ	30
5.3.5. IL-1 β	30
5.3.6. iNOS	30
5.4. PCR en tiempo real	31
5.4.1. TNF- α	32
5.4.2. IFN- γ	32
5.4.3. IL-1 β	32
5.4.4. iNOS	33
5.4.5. IL-12	34
5.5. Extracción y Cuantificación de Proteínas	35
5.6. Validación de anticuerpos	35
5.6.1. Anticuerpos producidos en conejo	36
5.6.2. Anticuerpos producidos en ratón	36
5.7. ELISAs Indirectos	36
5.7.1. TNF- α	36
5.7.2. IFN- γ	37

5.7.3. IL-1 β	37
5.7.4. iNOS	37
5.7.5. IL-12	37
5.8. Tinción Hematoxilina-eosina	40
5.9. Inmunofluorescencia	41
5.9.1. TNF- α	41
5.9.2. IFNg- γ	41
5.9.3. IL-1 β	42
5.9.4. iNOS	42
5.10. Correlación	44
6. Discusiones	45
6.1. Objetivo 1	45
6.2. Objetivo 2	46
6.3. Objetivo 3	47
7. Conclusiones	49
8. Bibliografía	51

Lista de abreviaturas

- FAO** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- CIAC** Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma
- BSA** *Bovine albumine serum*, Albúmina de suero bovino
- DNA** *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico
- cDNA** DNA complementario
- RNA** *Ribonucleic Acid*, Ácido ribonucleico
- PCR** *Polimerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa
- qPCR** (*semi*)Quantitative PCR, PCR Cuantitativa
- IFAT** *Immunofluorescence antibody test*, Prueba de inmunofluorescencia con anticuerpos
- ELISA** *Enzyme linked immuno-sorbent assay*, Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- SDS-PAGE** *SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis*
- MQ** *Milli-q*
- SDS** *Sodium dodecyl sulfate*, Dodecil sulfato de sodio
- TMB** 3,3'-5,5'-tetrametillbencidine
- GIALT** *Gill associated lymphoid tissue*, Tejido linfoide asociado a branquias
- RT** Retrotranscripción
- OM** *Oncorhynchus mykiss*
- IL** Interleuquina
- IL-1 β** Interleuquina 1-beta
- IL-12** Interleuquina 12
- IFN- γ** Interferón gama

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

PBS *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato salino

Índice de figuras

1.1.	Ciclo productivo de la trucha arcoiris	2
1.2.	Desembarques de Trucha arcoiris en Chile	3
1.3.	Representación esquemática de las similitudes y diferencias entre las superficies mucosas de teleósteos como piel, intestino y branquias y de mamíferos como piel y mucosa de tipo 1. Adaptado y traducido desde “The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens” por D. Gomez, I. Salinas y J. Sunyer, 2013, <i>Fish & Shellfish Immunology</i> , 35, p. 1730. ©2013, Elsevier Ltd.	8
4.1.	Esquema general de trabajo	13
4.2.	Diseño de placa para PCR en tiempo real	18
5.1.	Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma	26
5.2.	Crecimiento promedio de truchas en estudio	26
5.3.	Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α	29
5.4.	Curvas de estandarización del partidor para IL-12	29
5.5.	Curvas de estandarización del partidor para TNF- α	30
5.6.	Curvas de estandarización del partidor para IFN- γ	30
5.7.	Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β	31
5.8.	Curvas de estandarización del partidor para iNOS	31
5.9.	Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1a	32
5.10.	Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α	33
5.11.	Curva de calibrado BCA	35
5.12.	Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto	38

5.13. Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio	39
5.14. Microfotografías de branquias de trucha arcoiris	40
5.15. Microscopía Confocal para TNF- α	41
5.16. Microscopía Confocal para IFN- γ	42
5.17. Microscopía Confocal para IL-1 β	43
5.18. Microscopía Confocal para iNOS	43
7.1. Modelo molecular de respuesta inmune	50

Índice de tablas

1.1.	Estructuras de β -Glucanos según su origen	10
4.1.	Lista de Anticuerpos Usados	14
4.2.	Lista de Anticuerpos Comerciales Usados	15
4.3.	Identificantes de muestras	16
4.4.	Preparación de Master Mix para qPCR	18
4.5.	Lista de Partidores	19
4.6.	Programa Termociclador para estandarización de Partidores	19
4.7.	Composición Buffer de Lisis	20
5.1.	Concentraciones de RNA total extraído	28
5.2.	Concentraciones de Proteínas totales extraídas	36
5.3.	Matrices de correlación de las moléculas en estudio	44
5.5.	Correlación de Pearson para una misma molécula y distintos ensayos	44

1 Introducción

Las primeras truchas en Chile fueron introducidas a fines del siglo XIX, específicamente en 1880 en la actual región del Bío-Bío. Las primeras ovas introducidas fueron las 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 arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y el Salmón del atlántico (*Salmo salar*).

1.1. El género *Oncorhynchus*

Oncorhynchus corresponde a uno de los 10 géneros de la familia Salmonidae y tiene alrededor de 12 especies, incluyendo *O. mykiss* (trucha arcoiris), *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 (C. Groot y Margolis, 1991).

Algunas características principales de este género 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 mayoría solo se reproducen una vez, por lo tanto son semélparos.
- Tienen baja tasa de fecundidad (2 a 5 mil ovas) y grandes huevos (5-8mm)

En Chile encontramos la trucha arcoiris, el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) como representantes de este género.

La trucha arcoiris, descrita inicialmente por Walbaum en 1772 tiene un cuerpo alargado fusiforme con 60 a 66 vértebras, 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 *arcoiris*.

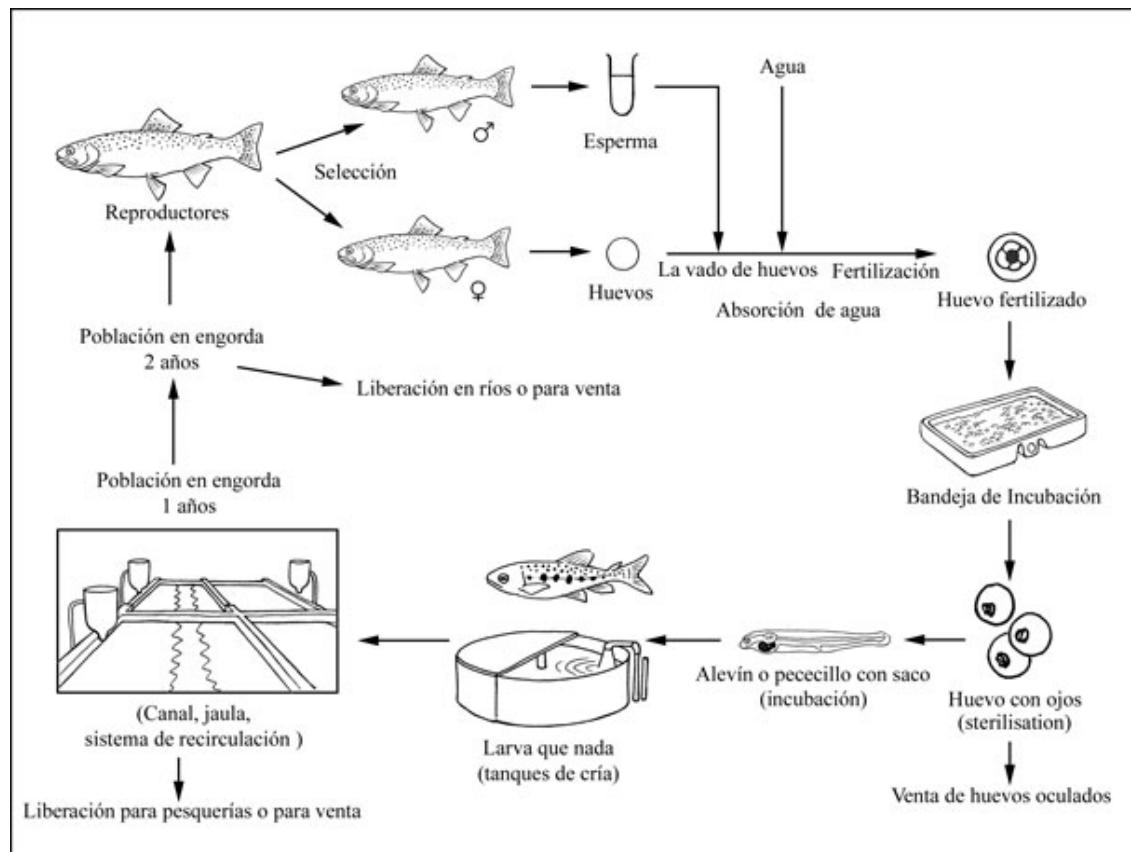


Figura 1.1: Ciclo productivo de la trucha arcoiris

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 temperaturas. La temperatura ideal para el cultivo de la trucha arcoiris 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 1.1).

1.1.1. Situación actual en Chile

Los desembarques de Trucha arcoiris han aumentado cercano al 1500 % en 20 años (Figura 1.2), con una tasa de crecimiento porcentual promedio del alrededor del 15 % (Sernapesca, 2012), en términos monetarios, el año 2013 la exportación de este producto generó 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).

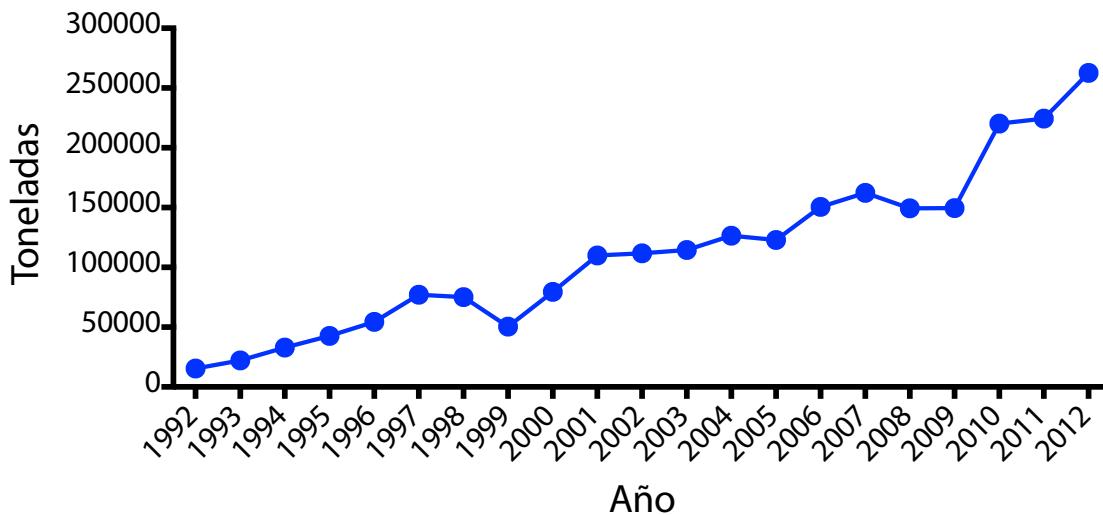


Figura 1.2: Desembarques de Trucha arcoiris en Chile

Los sistemas de cultivo, debido al crecimiento acelerado de la producción enfrentan diferentes problemas, por una parte patógenos como *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; y por otra parte el estrés en que se ven sometidos los organismos (Georgiadis et al., 2001; FAO, 2012). 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). Para comprender y crear soluciones se requiere conocer aspectos fundamentales de la defensa, especialmente del sistema inmune.

1.2. 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 (Olabuenaga, 2000; Fernández et al., 2002).

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 (Olabuenaga, 2000; Fernández et al., 2002; 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 y Philpott, 2004), los cuales son llamados patrones moleculares asociados a patógenos (o PAMPs, por sus siglas en inglés), estos a su vez son

reconocidos 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 (N. C. Bols et al., 2001; A. E. Ellis, 2001; Kawai y Akira, 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 (A. E. Ellis, 1977; Ainsworth, 1992). 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 (Olabuenaga, 2000; R Castro et al., 2011).

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 y Hokeness, 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 y Sakai, 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 estadíos tempranos de infección. Las citoquinas pueden dividirse en distintas familias según sea la organización de sus cisteínas.

Dentro de la familia de las interleuquinas podemos encontrar la Interleuquina 1 β , la citoquina proinflamatoria más estudiada, todo debido a su rol mediador de enfermedades autoinflamatorias. Es producida principalmente por macrófagos activados, células dendríticas y monocitos, y afecta a casi cualquier tipo celular, jugando un rol central en la generación de respuestas sistémicas y locales a la infección, así como también en respuesta a daños y desafíos immunológicos (Reis et al., 2012). Esta citoquina potencialmente induce la proliferación, diferenciación y activación de células no específicas, como NK, macrofagos, etc..., así como también una respuesta inmune específica, activando linfocitos B y T (Hong et al., 2004; Taechavasonyoo et al., 2013). Junto con IL-1 β existe otro marcador que sirve para evaluar si es que los inmunoestimulantes inducen o no una respuesta inflamatoria, este otro marcador es el Factor de necrosis tumoral (TNF- α). Este factor tiene una variedad de funciones immunológicas, regulando la inflamación y la respuesta inmune celular (J. Zou et al., 2003; T. Wang et al., 2004; Teles et al., 2011). Promueve la necrosis hemorrágica de tumores, así como también mejora la fagocitosis y citotoxicidad de neutrófilos. Mejora la síntesis de prostaglandina E2 y óxido nítrico (NO), y modula la expresión de muchas citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6 y algunas quimioquinas. IL-1 β y TNF- α son ampliamente usados como marcadores de respuesta inmune innata (Z. Zhang et al., 2009).

Otra citoquina importante en el proceso inmunitario es Interferón Gamma (IFN- γ), perteneciente a la familia de los Interferones, moléculas encargadas principalmente en la respuesta viral, aunque también son importantes reguladores del sistema inmunitario innato y adaptativo (Savan y Sakai, 2006). El IFN- γ es producido en una primera etapa por células NK estimuladas por las interleuquinas 12 y 18, las cuales son producidas por fagocitos mononucleares y células presentadoras de antígenos (APCs, por sus siglas en inglés). Al ser secretada esta molécula se une a su receptor y por la vía Jak/STAT promueve la activación de macrófagos aumentando la síntesis de la fagocito oxidasa dependiente de NADPH ($gp91^{phox}$ y $p67^{phox}$), la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), p47 GTP-asa y la proteína de unión a guanilato, así como también aumenta las moléculas de MHC de clase 2 en macrofagos y otras APCs (U. Boehm et al., 1997). Por lo tanto en contraste con los interferones de tipo I (IFN- α/β) el IFN- γ juega un rol clave en la activación de macrofagos para aumentar destrucción de patógenos bacterianos, protozoos y virales (Fields et al., 2007).

La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina heterodimérica, compuesta por la subunidades P35 y P40, la primera miembro de la familia de la interleuquina 6 con 4 α -helices en su topología y p40 recuerda una forma asociada a un receptor de citoquinas solubles (Yoshiura et al., 2003; Huisings et al., 2006). Esta citoquina pro-inflamatoria es producida en las etapas iniciales de la respuesta inmune por

monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, y una de sus principales funciones es inducir la síntesis de otras citoquinas, como el anteriormente nombrado IFN- γ , que sirve como orquestador en la maduración de un linfocito T *naive* a un fenotipo Th1 (Nascimento et al., 2007), y es gracias a esta función se considera como un medidor entre la respuesta innata y adaptativa de la inmunidad (Lu Zhang et al., 2014).

Dentro de las moléculas efectoras de la respuesta inmune la óxido nítrico sintasa de tipo inducible (iNOS), propia de fagocitos (Wu et al., 2008; Zhao et al., 2010), aumenta su expresión durante eventos de inflamación, y a su vez, es propia del estallido respiratorio de los macrófagos proveyendo así a la célula de un ambiente citotóxico ideal para los eventos pro-inflamatorios por la producción de Óxido Nítrico (NO), catalizando la oxidación de L-arginina (Yang et al., 2013). Esta molécula, puede ser activada en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK ya sea por citoquinas, endotoxinas, o ambas (MacMicking et al., 1997; Bogdan, 2001). Estas características demuestran la importancia del rol de iNOS y su producto gaseoso NO en el sistema inmune, ya que a diferencia de las otras NOS, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) esta no tiene una síntesis basal ni constitutiva, haciendo de esta molécula un marcador inmunológico de importancia para estudiar procesos inmunológicos.

Otras moléculas efectoras presentes en la respuesta innata frente a patógenos son los péptidos antimicrobianos (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 (Zasloff, 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 antimicrobianos 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 estructurada 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; Ling 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 linfoideos (Olabuenaga, 2000; Fernández et al., 2002). 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 melanomacrocíticos 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 salmones 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 antigenico aparecen linfocitos B en el bazo, teniendo parámetros similares a los presentados por estas células en otros órganos como el riñón cefálico.

1.3. Inmunidad en mucosas

La mayoría de las infecciones empiezan o afectan las mucosas epiteliales de los animales. El campo de la investigación en inmunología de mucosas ha crecido sin precedentes durante los últimos años, así como también nuestro conocimiento en la materia, específicamente como las superficies de las mucosas responden a los variados antígenos que constantemente invaden estos tejidos. En teleósteos los principales tejidos con mucosas, y por ende las primeras mas accesibles barreras inmunológicas son el intestino, la piel y las branquias (Gomez et al., 2013). El intestino, la piel y las branquias contienen tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, por sus siglas en inglés) que tiene un rol fundamental en el

mantenimiento de la homeostasis en la mucosa. Este tejido linfoide asociado a mucosa está dividido en tejidos linfoides asociados a intestino, piel y branquias (GALT, SALT y GIALT, respectivamente, por sus siglas en inglés). Estas superficies mucosas están cubiertas por una capa protectora de mucus rico en factores inmunológicos, como las lectinas, mucinas, peptidos antimicrobianos, toxinas e inmunoglobulinas (Lazado y Caipang, 2014).

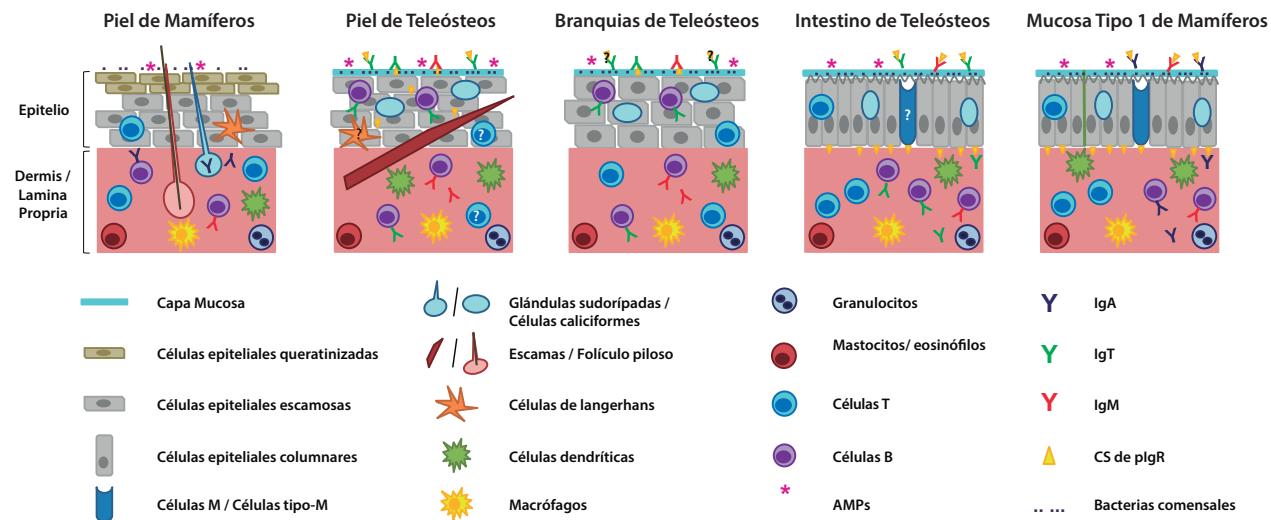


Figura 1.3: Representación esquemática de las similitudes y diferencias entre las superficies mucosas de teleósteos como piel, intestino y branquias y de mamíferos como piel y mucosa de tipo 1. Adaptado y traducido desde “The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens” por D. Gomez, I. Salinas y J. Sunyer, 2013, *Fish & Shellfish Immunology*, 35, p. 1730. ©2013, Elsevier Ltd.

Las principales diferencias estructurales y funcionales entre las superficies mucosas de mamíferos tipo 1 con las de teleósteos son la falta de tejido linfoide organizado como los parches de Peyer, así como también células M como tal o la inmunoglobulina A secretora (SIgA, por sus siglas en inglés) todavía no han sido descritas en peces (J. H. W. M. Rombout et al., 2011). A pesar de estas diferencias los intestinos, piel y branquias de los peces comparten muchas características con las superficies mucosas de tipo 1 en mamíferos (Fig. 1.3).

1.3.1. Inmunidad Branquial

Las branquias de los peces son, en términos de superficie expuesta, el mayor tejido en muchas especies de teleósteos ($1\text{m}^2/\text{kg}$ en carpa), siendo el órgano principal para mantener la homeostasis del pez por la ingesta de nutrientes y sustancias, así como también formando una barrera activa en contra de la entrada de patógenos (Oikawa y Itazawa, 1985). Morfológicamente, las branquias consisten en una laminilla, la cual comprende la principal superficie respiratoria del pez (J. M. Wilson y Laurent, 2002). El epitelio presente en las branquias contiene una a cuatro capas cúbicas o escamosas de células, a

su vez también presenta células caliciformes, encargadas de la producción de mucus. La ubicación morfológica de las branquias le confieren un lugar expuesto al ambiente acuático, por lo que es un sitio esencial para que bacterias y otros patógenos entren al organismo del pez, siendo un sitio con una sustancial exposición a distintos tipos de antígenos. El GIALT cuenta con macrófagos y granulocitos (I. Mulero et al., 2008), componentes de la respuesta adaptativa como células B y T (G. Scapigliati et al., 1999; N. M. dos Santos et al., 2001; Salinas et al., 2011), así como también e una alta expresión de los genes relacionados con células T (Boschi et al., 2011).

1.4. 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 y Dalmo, 2005; Kumari y Sahoo, 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 (Bricknell y Dalmo, 2005; Dalmo y Bøgwald, 2008; S. Bilen et al., 2011; Abarca et al., 2012; Chettri et al., 2013), 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 eutrofílos, 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) in leucocitos peritoneales de trucha arcoíris a 1 dia post inyección (S. Peddie et al., 2002).

1.4.1. β -glucanos

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 1.1) (Volman et al., 2008; Skov et al., 2012).

Tabla 1.1: 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

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

Dado que las branquias de los peces están constantemente siendo “lavadas” con agua, la cual puede contener patógenos, solo están cubiertas con una fina capa de mucus, y están construidas de modo que solo una simple capa de fragiles células separa el sistema vascular del pez del ambiente externo, es muy probable que sean un sitio importante en la entrada de patógenos. Es más, las células epiteliales de las branquias son capaces tomar distintas partículas como por ejemplo esferas de latex (Smith et al 1982) e incluso microorganismos como virus u otros patógenos.

2 Hipótesis

La respuesta inmune generada por la liberación en dieta del β -glucano zymosán A en *O.mykiss* es cuantificable en tejido branquial lo que permite establecer un modelo de la expresión de moléculas reguladoras y efectoras de la inmunidad.

3 Objetivo General

Establecer un modelo molecular basado en la cuantificación de diferentes parámetros de respuesta inmunológica expresada en tejido branquial *O.mykiss* en respuesta a la liberación en dieta del β -glucano Zymosan A.

3.1. Objetivos Específicos

1. Implementar un sistema de alimentación para la liberación en dieta de Zimosán A y sus respectivos controles de *O.mykiss*
2. Evaluar la expresión de moléculas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de *O.mykiss* tratados con Zimosán A liberado en dieta.
3. Detectar la disponibilidad de proteínas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de *O.mykiss* tratados con Zimosán A liberado en dieta.
4. Relacionar el nivel de expresión y detección de moléculas de respuesta inmune evaluadas en tejido branquial con el nivel de dosificación oral de zimosán.

4 Materiales y Métodos

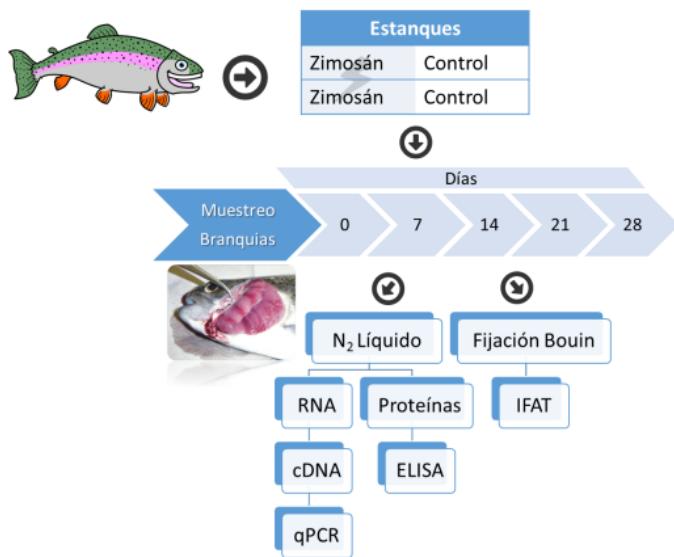


Figura 4.1: Esquema general de trabajo

4.1. Material Biológico y Bioensayo

4.1.1. Peces

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

4.1.2. Dieta

La dieta base de las truchas consistió en un pellet que contenía 65 % de harina de pescado, 16,3 % harina de trigo, 16 % aceite de pescado, 0.1 % vitamina C, 1 % Premix Vitamínico, 1 % Premix minerales traza, 0.6 % Colina + Gluten de Maiz

4.1.3. Parámetros fisicoquímicos del ensayo

Durante toda la experiencia se midió día a día la temperatura, pH, presión y saturación de oxígeno de cada estanque y módulo llenando una planilla dispuesta para ese fin por el CIAC.

4.1.4. 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) (Narváez et al., 2010; J. Bethke et al., 2012; V. Rojas et al., 2012; Santana et al., 2012)

Tabla 4.1: Lista de Anticuerpos Usados

Molécula (Anti)	Huesped	Origen	Secuencia Inmunógeno	Dilución Anticuerpo		
				ELISA	WB	IFAT
TNF- α	Conejo	Suero	WRKDDGQAFSQGGFE	1:2000	1:500	1:500
TNF- α	Ratón	Suero		-	1:500	-
IL-1 β	Conejo	Suero	DLLNFLLESAVEEHI	1:2000	1:500	1:500
IL-1 β	Ratón	L.A.		-	1:250	-
IFN- γ	Conejo	Suero	ASKLALKIHLKKDN	1:2000	1:500	1:500
IFN- γ	Ratón	Suero		-	1:500	-
iNOS	Ratón	Suero	CFIYSSGGFHLPAEPSTPVI	1:1000	1:500	1:250
IL-12	Ratón	L.A.	TETQVPLLCGDSYQDTE	1:1000	1:500	1:250

*L.A. = Líquido Ascítico, WB = Western Blot, IFAT = *Immunofluorescence Antibody Test*

Tabla 4.2: Lista de Anticuerpos Comerciales Usados

Reactividad	Huesped	Conjugado	Dilución	Proveedor
IgG (H+L) Ratón	Cabra	HRP	1:7000	Thermo Pierce (31430)
IgG (H+L) Conejo	Cabra	HRP	1:5000	Thermo Pierce (31460)
IgG (H+L) Ratón	Cabra	Alexa Fluor 568	1:400	Life Technologies (A-11004)
IgG (H+L) Conejo	Cabra	Alexa Fluor 488	1:400	Life Technologies (A-31576)

*HRP = *Horse radish peroxidase*

4.2. 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.

4.3. Muestreo

Los peces se sacrificaron con sobredosis del sedante Kalmagin 20 % (Benzocaína 20 % 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 (Tabla 4.3). 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 % formaldehido 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.

Tabla 4.3: Identificantes de muestras

ID	Muestra								
B1	d0B1	B21	d7Bz3	B31	d14Bz3	B41	d21Bz3	B51	d28Bz3
B2	d0B2	B22	d7Bz3	B32	d14Bz3	B42	d21Bz3	B52	d28Bz3
B3	d0B3	B23	d7Bz3	B33	d14Bz4	B43	d21Bz3	B53	d28Bz4
B4	d0B4	B24	d7Bz4	B34	d14Bz4	B44	d21Bz4	B54	d28Bz4
B5	d0B5	B25	d7Bz4	B35	d14Bz4	B45	d21Bz4	B55	d28Bz4
B16	d7Bc1	B26	d14Bc1	B36	d21Bc1	B46	d28Bc1		
B17	d7Bc1	B27	d14Bc1	B37	d21Bc1	B47	d28Bc1		
B18	d7Bc1	B28	d14Bc2	B38	d21Bc1	B48	d28Bc2		
B19	d7Bc2	B29	d14Bc2	B39	d21Bc2	B49	d28Bc2		
B20	d7Bc2	B30	d14Bc2	B40	d21Bc2	B50	d28Bc2		

d = Día Muestreo (0,7,14,21,28); B = Branquia;

c = Estanques control (1,2); z = Estanques inducidos (3,4)

4.4. 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 sobre-mesa 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 diámetro.

4.4.1. Cuantificación e Integridad de RNA

El RNA se cuantificó usando el sistema espectrofotométrico ND-1000 de NanoDrop cargando 2 μ L 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.

4.4.2. Síntesis de cDNA

La transcripción inversa 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.

Para asegurar que las amplificaciones eran obtenidas a partir del cDNA y no de restos de DNA genómico no eliminado por el tratamiento con DNAsa I, previo a las reacciones de retrotranscripción, se realizaron reacciones de PCR control en las que como molde se utilizaron los RNAs extraídos. El tratamiento con DNAsa I se repetía, si era necesario, hasta que en todos los casos se obtenía una amplificación nula, de manera que el RNA molde para las reacciones de retrotranscripción estuviese totalmente libre de DNA genómico.

4.5. PCR en Tiempo Real (qPCR)

La cuantificación por PCR a tiempo real permite monitorizar la reacción de PCR al mismo tiempo que ésta tiene lugar. Se empleó como estrategia para realizar la cuantificación el uso de la sonda SYBR Green® del kit Brilliant III Ultra-Fast (Agilent) ((Wittwer et al., 1997)). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima “Taq DNA Polimerasa”, dNTPs, MgCl2 y el tampón de PCR, e incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR Green I, que detecta DNA de doble hélice,

por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Hard-Shell de Bio-Rad) (Figura 4.2).

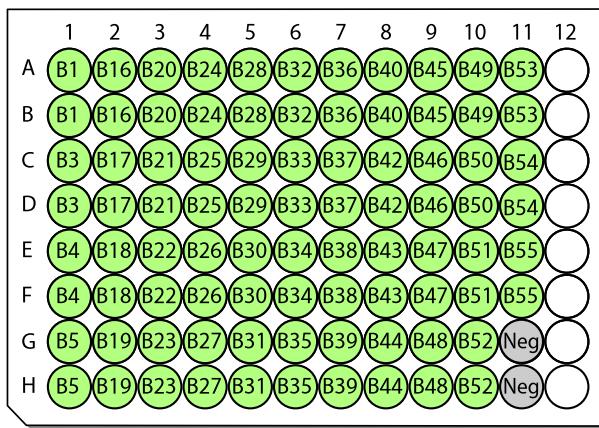


Figura 4.2: Diseño de placa para PCR en tiempo real

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L según la Tabla 4.4. Las condiciones térmicas de la amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de 3 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido por 39 ciclos de 5 segundos a 95°C, 5 segundos a 58° para todos los partidores exceptuando los partidores para IFN- γ que fue de 61,5° y 15 segundos a 72°C (desnaturalización, *annealing* y extensión respectivamente).

Tabla 4.4: 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

4.5.1. Partidores

4.5.2. Estandarización de partidores

Los partidores se estandarizaron con un mix de varios cDNA obtenidos en este estudio usando distintas diluciones y gradientes de temperatura dependiendo del partidor, seleccionando la mejor temperatura de *annealing* en base a su curva patrón y de fusión (Tabla 4.6).

Tabla 4.5: Lista de Partidores

Molécula	Partidor	Secuencia	Amplicón
EF-1 α	Fw	TGG AGA CTG GCA CCC TGA AG	127 pb
	Rev	CCA ACA TTG TCA CCA GGC ATG G	
IL-1 β	Fw	GTC ACA TTG CCA ACC TCA TCA TCG	95 pb
	Rev	GTT GAG CAG GTC CTT GTC CTT GA	
TNF- α	Fw	GTG TGG GGT CCT CTT AAT AGC AGG	88 pb
	Rev	CTG CAT CGT TGA CGG TCT TCC	
IFN- γ	Fw	GCT GTT CAA CGG AAA ACC TGT TT	51 pb
	Rev	TCA CTG TCC TCA AAC GTG	
iNOS	Fw	TAT GCT CTG CCT GCC GTG TC	158 pb
	Rev	ATC CTG CGA CCC ACT TCC TC	
IL-12	Fw	TTT AAT CAG CTG TCG GGC CAA GTC	123 pb
	Rev	GTG CAA GAT TCC TGG CTG TCA GTA	

Tabla de partidores usados para la amplificación de las moléculas en estudio, se indica el tamaño esperado en pares de bases del amplicón.

Fw = Forward, Rev= Reverse, pb = Pares de Bases

Tabla 4.6: Programa Termociclador para estandarización de Partidores

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95°	03:00 min	1
Denaturación	95°	00:10 seg	39
Annealing en Gradiente	62° → 52*	00:10 seg	39
Extensión	60°	00:10 seg	39

El gradiente varía dentro de esas temperaturas según los partidores

4.6. Extracción de Proteínas

Se agregó una pequeña cantidad de tejido pulverizado a 500 μ L de Buffer de Lisis (Tabla 4.7) y se homogenizó con el equipo FastPrep24 con un programa de 4,5 movimientos por segundo durante 30 segundos usando como matriz 8 esferas de óxido de zirconio, luego se dejaron las muestras en hielo durante 30 minutos para posteriormente centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C, se descartó el precipitado y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

Tabla 4.7: Composición Buffer de Lisis

Compuesto	Concentración
Tris pH: 7,5	0,02M
NaCl	0,1M
Tritón X-100	0,05 %
PMSF	5mM
Cocktail Inhibidor de Proteasas*	0,2 %

*Sigma Aldrich, P8340

4.6.1. Cuantificación de Proteínas

Para cuantificar las proteínas totales extraídas se usó el método del ácido bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés), el cual está basado en la capacidad de este compuesto por formar un intenso complejo púrpura con el ion cuproso en un entorno básico, producido al reaccionar las proteínas con cobre alcalino (método Biuret), y el BCA de cierta forma va censando esta formación (Smith et al., 1985). Se utilizará el Kit BCA (Thermo Pierce), como curva de calibrado se usó albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en diferentes concentraciones (1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 y 0,0125 µg/µL). En una placa de cultivo de 96 pocillos se cargaron 25µL de cada concentración de la curva de calibrado y 25µL de cada extracto de proteínas en una dilución 1:50, todas las muestras incluyendo la curva se cargaron en duplicado. Luego se agregaron 200 µL del reactivo BCA en una relación 50:1 (A:B) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incubó la microplaca a 37°C. Para la lectura de la placa se usó un lector espectrofotométrico de microplacas (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices) a una longitud de onda de 562nm.

4.7. ELISA Indirecto

Para validar los anticuerpos en estudio y ademas, determinar posteriormente la presencia de las moléculas en estudio se realizaron ensayos de ELISA -del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Indirecto*.

4.7.1. Activación de la placa

La placa de 96 pocillos PolySorp®(*nunc™*) se activó *overnight* en duplicado con 30ng de proteínas totales previamente extraídas de branquias usando PBS 1X para diluir según sea necesario. Todas las

muestras se sembraron en duplicado, y como blanco se utilizó PBS 1X. Luego se lavó 3 veces cada pocillo con 200µL de PBS 1X-Tween20 0,05 % (PBST 0,05 %).

4.7.1.1. Validación de anticuerpos

Para la validación de anticuerpos en vez de sembrar una muestra de proteínas totales, se sembró en concentración decreciente (8 diluciones seriadas 1:2 desde 3ng/µL) el péptido (inmunógeno) específico para cada anticuerpo.

4.7.2. Bloqueo de sitios inespecíficos

Para bloquear los sitios inespecíficos donde no se unió el antígeno se usó BSA diluida (200µL por pocillo) en PBS 1X al 1 % (PBSA 1 %) incubando la placa cubierta con parafilm por 2 horas a 37°C con agitación leve y luego lavando la placa 3 veces con 200µL PBST 0,05 % usando un lavador de microplacas.

4.7.3. Incubación primer anticuerpo

El anticuerpo primario se usó a una concentración de 1:2000 o 1:1000 según corresponda (Tabla 4.1) durante 1 hora a 37°C con agitación constante y luego se lavó nuevamente la placa 3 veces con PBST 0,05 %

4.7.4. Incubación segundo anticuerpo y revelado

Se incubaron 100µL del anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón según corresponda en una dilución 1:5000 y 1:7000 respectivamente por 1 hora a 37°C con agitación leve, posteriormente se lavó la placa 3 veces con PBST 0,05 % y se incubó con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Invitrogen) por 30 minutos en oscuridad. Luego se leyó la placa a 650nm y finalmente, deteniendo la reacción con 50µL de H₂SO₄ 1N se leyó a 450nm para aumentar la detección usando el software SoftMax 5.2 de Molecular Probes.

4.8. Cortes histológicos

Desde las branquias previamente aisladas y fijadas en reactivo de Bouin, se formaron bloques emparafinados, para posteriormente llevarlos a un micrótomo, con la finalidad de poder obtener cortes a

5 μ m.

Para evaluar la integridad de los cortes histológicos previamente preparados se procedió a realizar una tinción hematoxilina-eosina, tinción que nos permite distinguir nucleos y otros componentes celulares (Sharpey-Schäfer y Carleton, 1938).

4.8.1. Tinción Hematoxilina-eosina

Los cortes se desparafinaron con NeoClear®(Merck) como sustituto de xileno, luego, para hidratarlos se pasaron los portaobjetos por una batería de alcohol decreciente (100°-96°-70°) y finalmente se sumergieron en agua.

Luego se tiñeron con Hematoxilina de Mayer (Merck) por un minuto y se lavaron en agua por 5 minutos y se pasaron por agua desestilada.

Los cortes se deshidrataron usando una batería creciente de alcoholes (70°-96°) y luego se tiñeron con Eosina durante 1 minuto. Para terminar la deshidratación se pasaron 3 veces por alcohol 100° y finalmente la muestra se aclaró 3 veces con NeoClear®.

Finalmente, el montaje se realizó usando Entellán (Merck) y se obtuvieron microfotografías usando el Microscopio Leica DM4000B (Leica Microsystems).

4.9. Inmunofluorescencia

Para localizar las moléculas en estudio se realizó una prueba de inmuno fluorescencia con anticuerpos (IFAT).

4.9.1. Desparafinización e Hidratación

Los cortes previamente emparafinados se les quitó la parafina incubandolos 2 veces durante 5 minutos en NeoClear®como sustituto de xileno, para luego hidratar la muestra pasando por una batería de alcoholes de 100 %, 96 % y 50 % durante dos minutos cada uno, para finalizar lavando con Agua Milli-Q (MQ) durante 5 minutos.

4.9.2. Bloqueo

Los cortes fijados en el portaobjetos fueron delimitados en cuadrantes con un lapiz con tinta hidrofóbica (PAP PEN, Em sciences) para evitar la posible perdida de material en las sucesivas incubaciones. Para preparar la muestra para el bloqueo se incubó con PBS 1X y luego con PBST 0,05 % durante 5 minutos cada uno. Para bloquear los sitios de union inespecíficos en los tejidos se bloqueó durante 30 minutos con una solución compuesta de PBSA 5 % con 0,3 % de Triton-X100 como potenciador para la penetración del PBSA en el tejido. Luego de esto los cortes se lavaron por 5 minutos con PBS 1X y PBST 0,05 % cada uno.

4.9.3. Incubación de anticuerpo primario

El anticuerpo primario se diluyó en PBSA 1 % según corresponda (Tabla 4.1) y se agregaron aproximadamente 50 μ L por cada tejido. La incubación fue en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS 1X y PBST 0,05 % con agitación durante 5 minutos cada uno.

4.9.4. Incubación anticuerpo secundario y tinción de DNA (Núcleos)

El anticuerpo secundario conjugado con el fluoroforo Alexa 568 y 635 anti ratón y conejo respectivamente se diluyeron según corresponda en PBSA 1 % (Tabla 4.2) y se incubaron durante 1 hora las muestras con esta solución a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente se lavó 1 vez con PBS 1X y 2 veces con PBST 0,05 % durante 10 minutos. Para teñir el DNA se utilizó SYTO9 (Life Technologies) diluido en PBS 1X en una relación 1:1000 y se incubó por 5 segundos para finalmente lavar 3 veces con PBST 0,05 %

4.9.5. Montaje

El montaje fue realizado usando el medio de Montaje VECTASHIELD para Inmunofluorescencia (VectorLabs) agregando 25 μ L sobre el portaobjetos y luego superponiendo un cubre portaobjetos rectangular, con mucho cuidado se presionó para distribuir el medio en todas las muestras y se selló con esmalte para uñas. Finalmente los cortes se almacenaron a 4° en oscuridad hasta su uso en el microscopio confocal.

4.10. Microscopía Confocal

La toma de imágenes se realizó con el Microscopio Confocal TCS SP5 II de Leica Microsystems, cortesía del Nucleo Biotecnológico de Curauma (NBC).

4.11. Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software Prism 6.0 de GraphPad, la significancia fue obtenida usando la prueba pareada de t de student con un 95 % de confianza ($\alpha = 0.05$).

4.11.1. Coeficiente de correlación de Pearson (R)

Para poder interpretar mejor los resultados, y ver como se relacionan estos entre sí incluso entre técnicas diferentes, se realizaron duplas entre cada uno de estos datos. Con estas duplas finalmente se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (R), el cual puede ser calculado con la siguiente ecuación

$$R = \frac{\sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}} \quad (4.1)$$

5 Resultados

Los resultados se expresarán en base a su relación con los objetivos específicos.

Objetivo 1: “Implementar un sistema de alimentación que permita realizar la administración oral de zimosán y sus respectivos controles a O.mykiss.”

5.1. Bioensayo

Se implementó el sistema de alimentación para las truchas arcoiris en el CIAC, donde se contó con 2 modulos de 3 estanques cada uno, dos de los cuales fueron destinados a la alimentación con la dieta suplementada con zimosán (estanques 2 y 5) y otros dos a la dieta control (estanques 1 y 4) (Fig. 5.1).

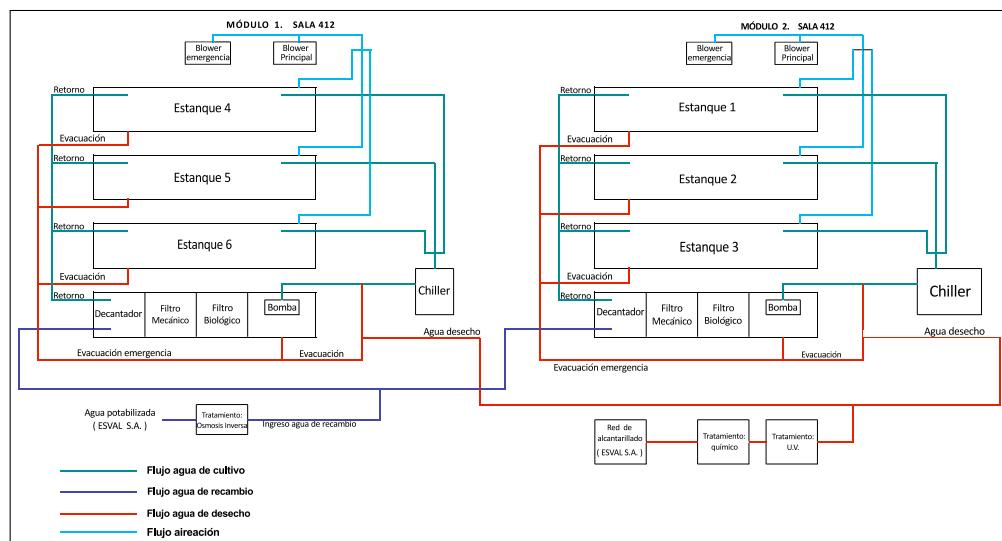


Figura 5.1: Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma

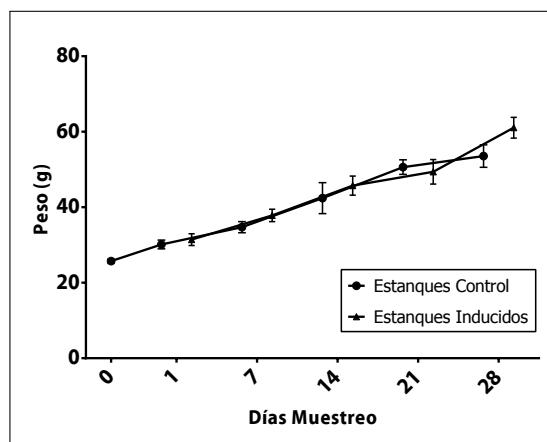


Figura 5.2: Crecimiento promedio de truchas en estudio

Al momento de sacrificar las truchas por sobre-sedación se procedió a pesarlas, comparando la dieta control y la con β -glucanos para evaluar si la alimentación generaba algun cambio de peso comparando con el control (Figura 5.2). Tampoco hubo otra causa de muerte que no fuera el sacrificio en el bioensayo.

Objetivo 2: “Evaluar la expresión de moléculas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de O.mykiss tratados con Zymosán A liberado en dieta.”

5.2. Extracción y Cuantificación de RNA

Se obtuvieron las siguientes cuantificaciones de RNA

Tabla 5.1: Concentraciones de RNA total extraído

ID	ng/ μ L								
B1	151,40	B21	257,00	B31	242,10	B41	40,20	B51	264,10
B2	63,30	B22	341,50	B32	250,40	B42	121,90	B52	183,00
B3	208,40	B23	145,10	B33	264,10	B43	105,20	B53	393,40
B4	178,30	B24	121,30	B34	295,10	B44	237,30	B54	292,80
B5	248,40	B25	151,70	B35	572,70	B45	116,40	B55	322,60
B16	165,10	B26	326,30	B36	115,60	B46	415,60		
B17	249,90	B27	149,30	B37	183,20	B47	220,80		
B18	138,40	B28	263,90	B38	171,60	B48	271,40		
B19	169,60	B29	357,30	B39	194,50	B49	173,80		
B20	690,70	B30	341,80	B40	192,40	B50	315,40		

Luego teniendo esas concentraciones se procedió a la síntesis del cDNA usando 1 μ g de RNA para poder realizar los ensayos de PCR en tiempo real.

5.3. Estandarización de Partidores

Usando un mix de varios cDNA al azar (controles e inducidos) se estandarizaron los distintos partidores usados en el ensayo, usando diluciones en agua DEPC 1:1 1:2 1:4 1:8 de este mix en cada placa, por cada partidor, luego el software CFX Manager (BioRad) entregará las informaciones necesarias para determinar el uso o no de un partidor, para los resultados de este tema se muestran las temperaturas de annealing para las cuales los partidores dieron solo un producto, como se demuestra en las curvas de disociación o de fusión, y hayan tenido una eficacia cercana al 100 %.

5.3.1. EF-1 α

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.3).

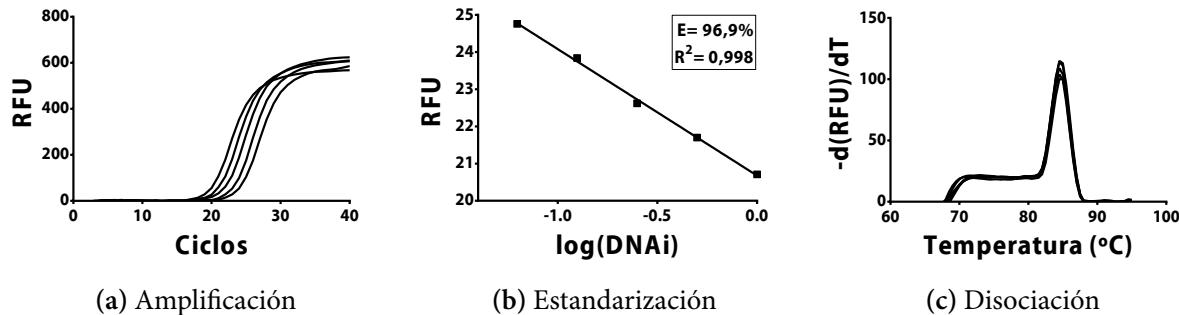


Figura 5.3: Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α

5.3.2. IL-12

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C. (Figura 5.4)

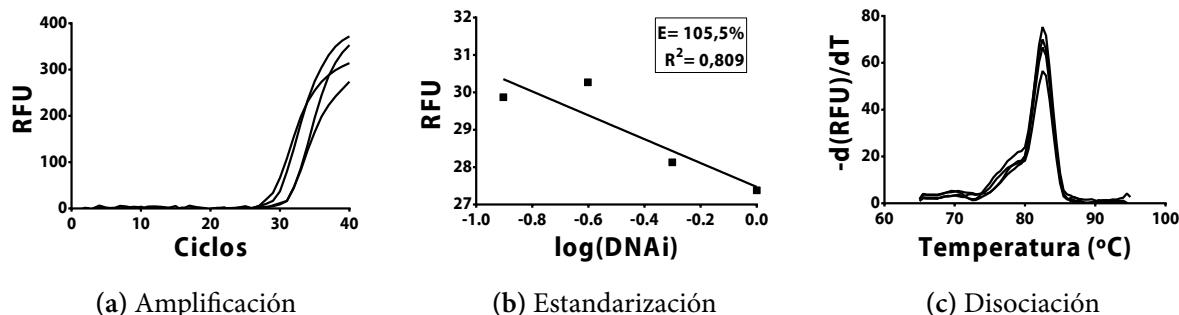
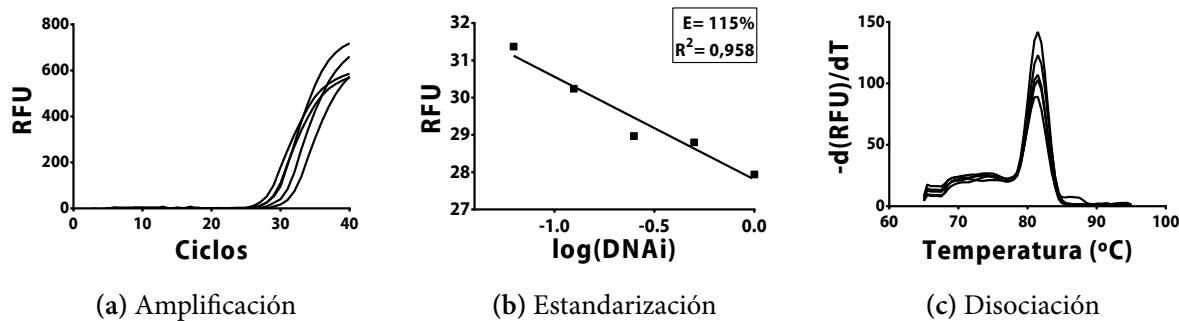


Figura 5.4: Curvas de estandarización del partidor para IL-12

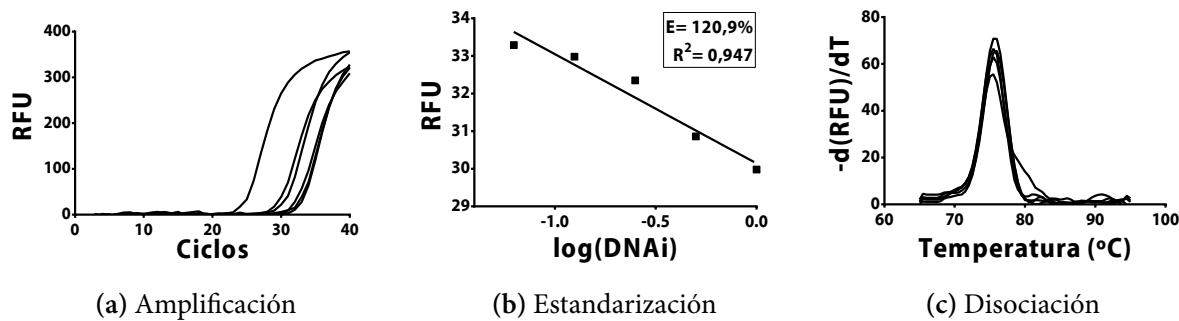
5.3.3. TNF- α

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.5).

Figura 5.5: Curvas de estandarización del partidor para TNF- α

5.3.4. IFN- γ

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 61.5°C (Figura 5.6).

Figura 5.6: Curvas de estandarización del partidor para IFN- γ

5.3.5. IL-1 β

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.7).

5.3.6. iNOS

Se cargó 1 μ L de cada dilución del mix de cDNA y usando el programa del termociclador correspondiente (Tabla 4.6), teniendo como mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.8).

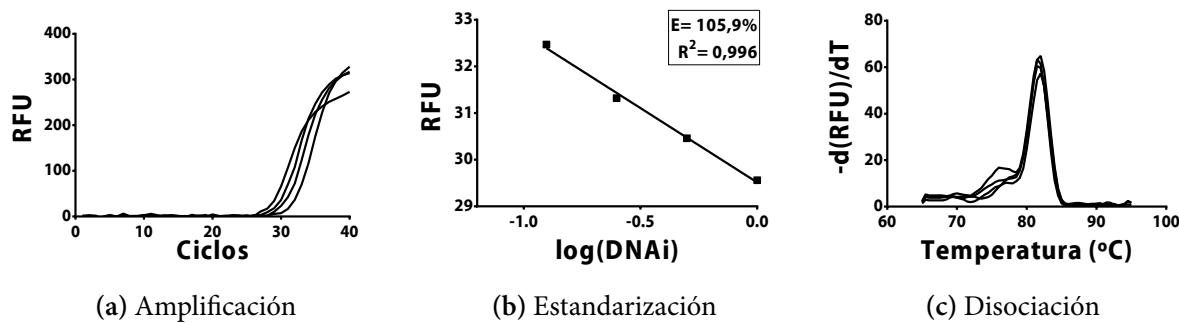
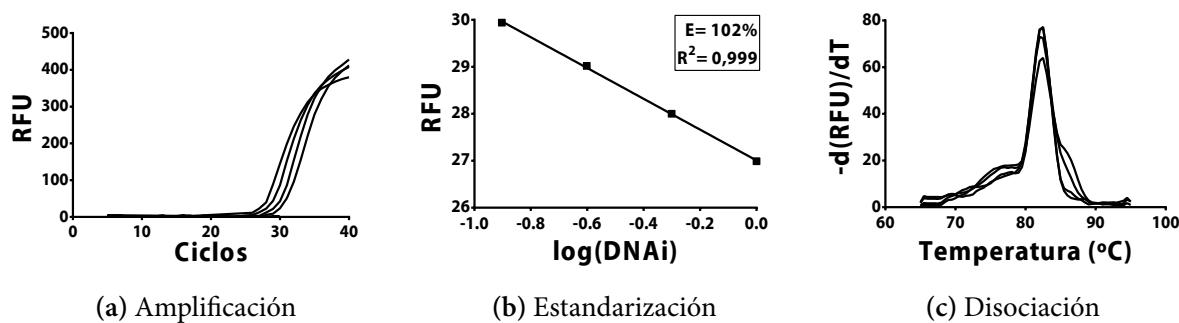
Figura 5.7: Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β 

Figura 5.8: Curvas de estandarización del partidor para iNOS

Al ya tener las temperaturas de *annealing* definidas para cada partidor se procedió a realizar el PCR en tiempo real para todas las muestras en estudio y posteriormente evaluar la expresión n relativa al gen de referencia.

5.4. PCR en tiempo real

Para evaluar la cuantificación relativa de cada gen en estudio frente al gen de referencia, en este caso el factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), se utilizó la metodología llamada $\Delta\Delta C_T$ (M. W. Pfaffl, 2001), la cual consiste en lo siguiente: el valor ΔC_T se determina restando la media de los valores C_T obtenidos para el gen de referencia de la media de los valores C_T del gen problema.

Por otra parte, en todas las muestras el valor de C_T obtenido para el gen EF-1 α fue similar, lo que indicaba que las amplificaciones se desarrollaron de forma correcta y que en todas las reacciones se partió de cantidades similares de cDNA (Figura 5.9).

El cálculo del valor $\Delta\Delta C_T$ implica restar a cada ΔC_T el valor del ΔC_T de un calibrador, que es una muestra utilizada como base para los resultados relativos. Al ser una resta de un valor arbitrario, la desviación del $\Delta\Delta C_T$ es la misma que la del ΔC_T . Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de

un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, viene dada por la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

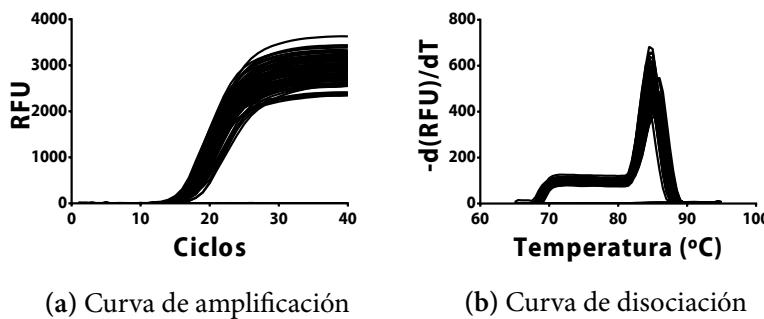


Figura 5.9: Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1a

5.4.1. TNF- α

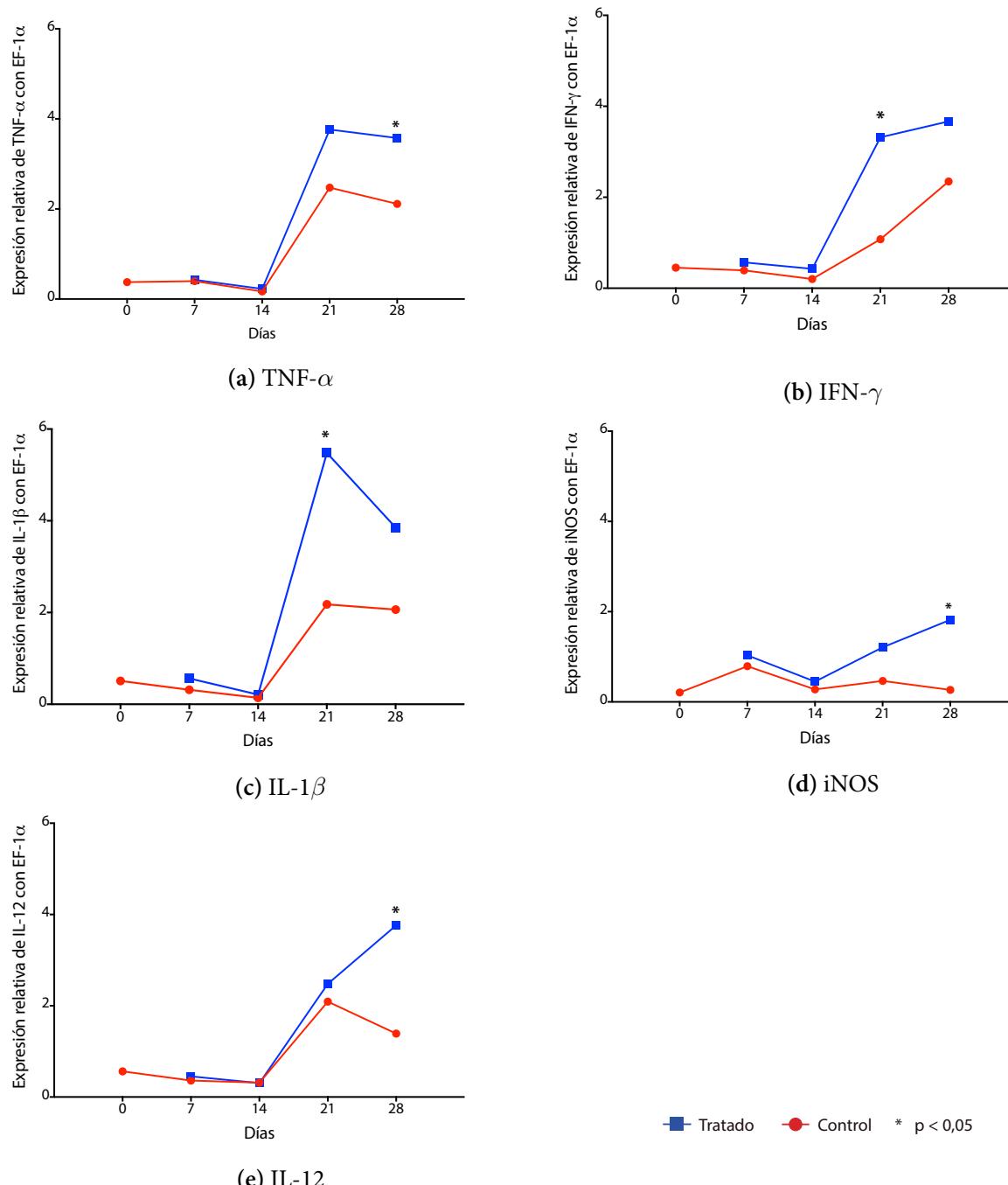
Para el gen del factor de necrosis tumoral alfa (5.10a) la expresión de transcripto se mantuvo constante en condiciones controles y tratadas hasta el día 14, donde aumentó súbitamente la cantidad relativa de mensajero en ambas circunstancias hasta llegar a su máximo *peak* el día 21, finalmente baja un poco su expresión el día 28, día en el cual hubo una diferencia significativa con su control ($p \leq 0,05$).

5.4.2. IFN- γ

La expresión relativa del transcripto de Interferón gamma (5.10b) frente al gen de referencia en condiciones control y tratadas se mantuvieron en bajas cantidades hasta el día 14, 7 días después hubo un *peak* significativo comparado con su control ($p \leq 0,05$), cabe destacar que los días 21 y 28 en situaciones control hubo un aumento de transcripto para este gen, aunque no significativo con sus pares tratados.

5.4.3. IL-1 β

Al igual que los dos genes anteriores, la expresión de interleuquina 1 beta (5.10c) se mantuvo baja los primeros 14 días con respecto al control inicial, para luego el día 21 aumentar súbita y significativamente ($p \leq 0,05$) en condiciones tratadas frente a su control del día, finalmente el día 28 baja la expresión del transcripto mientras que el control se mantiene estable.

Figura 5.10: Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α

5.4.4. iNOS

El gen de iNOS (5.10d) el día 7 se empezó a transcribir demostrando un aumento en ambas condiciones frente al control inicial, para luego bajar su expresión casi al nivel del día 0, luego, en condiciones tratadas, este gen experimenta una gran expresión frente al gen de referencia ($p \leq 0,05$), siendo sig-

nificativa el día 21, y subiendo hasta el día 28. En los peces controles, desde el día 14 al 28 se mantuvo prácticamente constante.

5.4.5. IL-12

El comportamiento de Interleuquina 12 (5.10d) tiene cierta tendencia comparado con la expresión del gen para IL-1 β , ya que también se gatilla su expresión el día 14, aunque para el caso de esta citoquina, el día 28 es su mayor *peak* siendo significativo este con respecto a su control ($p \leq 0,05$).

Objetivo 3: “Detectar la disponibilidad de proteínas efectoras y reguladoras de respuesta inmune en tejido branquial de O.mykiss tratados con Zymosán A liberado en dieta.”

5.5. Extracción y Cuantificación de Proteínas

Con los datos obtenidos por el lector espectrofotométrico de microplacas, usando las concentraciones sembradas de BSA, se construyó la curva de calibrado para la cuantificación de proteínas. Obteniendo el siguiente gráfico y ecuación de la recta:

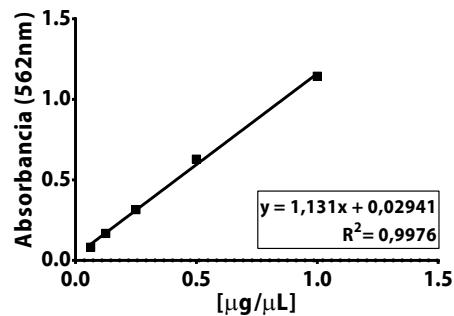


Figura 5.11: Curva de calibrado BCA

$$y = 1,131x + 0,02941$$

Interpolando en la recta de calibrado (Figura 5.11) las absorbancias obtenidas en el método BCA, se obtuvieron las siguientes concentraciones de proteínas.

5.6. Validación de anticuerpos

Se realizó la validación cualitativa de los anticuerpos policlonales mono-específicos sintetizados por el grupo (Tabla 4.1) usando como antígeno específico el péptido sintético (inmunógeno) con el cual fue inmunizado el huésped (conejo o ratón) al momento de producir el anticuerpo.

Tabla 5.2: Concentraciones de Proteínas totales extraídas

ID	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	ID	$\mu\text{L}/\mu\text{L}$	ID	$\mu\text{L}/\mu\text{L}$	ID	$\mu\text{L}/\mu\text{L}$	ID	$\mu\text{L}/\mu\text{L}$
B1	4,14	B21	3,79	B31	4,10	B41	3,35	B51	2,70
B2	3,83	B22	2,51	B32	3,02	B42	7,42	B52	5,65
B3	3,84	B23	3,20	B33	9,62	B43	5,20	B53	4,31
B4	3,64	B24	5,41	B34	5,02	B44	4,15	B54	5,54
B5	3,66	B25	6,43	B35	5,88	B45	6,62	B55	3,18
B16	3,22	B26	6,01	B36	7,69	B46	2,77		
B17	3,67	B27	3,05	B37	6,03	B47	6,65		
B18	2,67	B28	5,11	B38	3,35	B48	5,32		
B19	4,67	B29	5,50	B39	12,32	B49	4,05		
B20	2,94	B30	3,22	B40	2,45	B50	3,82		

5.6.1. Anticuerpos producidos en conejo

Para el caso de los anticuerpos producidos en conejo, anti-TNF- α se obtuvo una curva con un R^2 de 0,97 (Figura 5.12 a), el anticuerpo anti-IFN- γ obtuvo una curva con un R^2 de 0,9724(Figura 5.12 b) y finalmente el anticuerpo anti-IL-1 β producido en conejo se obtuvo una curva con un R^2 de 0,9859 (Figura 5.12 c).

5.6.2. Anticuerpos producidos en ratón

En el caso de los anticuerpos producidos en murinos, anti-iNOS obtuvo una curva con un R^2 de 0,9934 (Figura 5.12 d) y para el anticuerpo anti-IL-12 se obtuvo un R^2 de 0,9753 (Figura 5.12 e).

5.7. ELISAs Indirectos

Al evaluar mediante ELISA indirecto la presencia de las distintas moléculas en estudio en las branquias de las truchas arcoiris alimentadas con Zimosán A, se observó una clara diferencia entre los individuos control y los tratados (Figura 5.13).

5.7.1. TNF- α

Para TNFa (Figura 5.13 a), respecto a su control inicial, evidenció un aumento paulatino de su biodisponibilidad partiendo del día 7 al día 14, un aumento de aproximadamente 4 veces el día 21 y final-

mente un leve aumento el día 28, este ultimo dia siendo significativo respecto a su control ($p \leq 0,05$).

5.7.2. IFN- γ

Esta molécula (Figura 5.13 b) tuvo un leve aumento en los dias 7 y 14 con respecto a su control, evidenciándose el mayor aumento al día 21, el cual es significativo ($p \leq 0,05$) con respecto a su control, para finalmente disminuir su biodisponibilidad el día 28.

5.7.3. IL-1 β

Para Interleuquina 1- β (Figura 5.13 c) se observó una gran biodisponibilidad de esta molécula en el control al inicio del tratamiento, pero esta alta biodisponibilidad baja y se estabiliza rápidamente al día 7, en el caso de los peces alimentados con Zimosán A se observaron desde el día 7 biodisponibilidades mayores a sus controles del día, siendo el dia 21 y 28 diferentes significativamente ($p \leq 0,05$).

5.7.4. iNOS

Para la enzima Oxido Nitrico Sintasa inducible (Figura 5.13 d) se obtuvo el dia 14 un súbito y significativo aumento de su biodisponibilidad comparado con todo el grupo control ($p \leq 0,05$), bajó el día 21 para finalmente subir paulatina y significativamente el día 28 con respecto a su control ($p \leq 0,05$).

5.7.5. IL-12

La Interleuquina 12 (Figura 5.13 e) en los peces tratados como los inducidos se obtuvo una baja en la biodisponibilidad de esta molécula de los primeros 21 días, finalmente después de esta medición, al día 28, hubo un aumento significativo de aproximadamente 20 veces con respecto al control del día ($p \leq 0,05$).

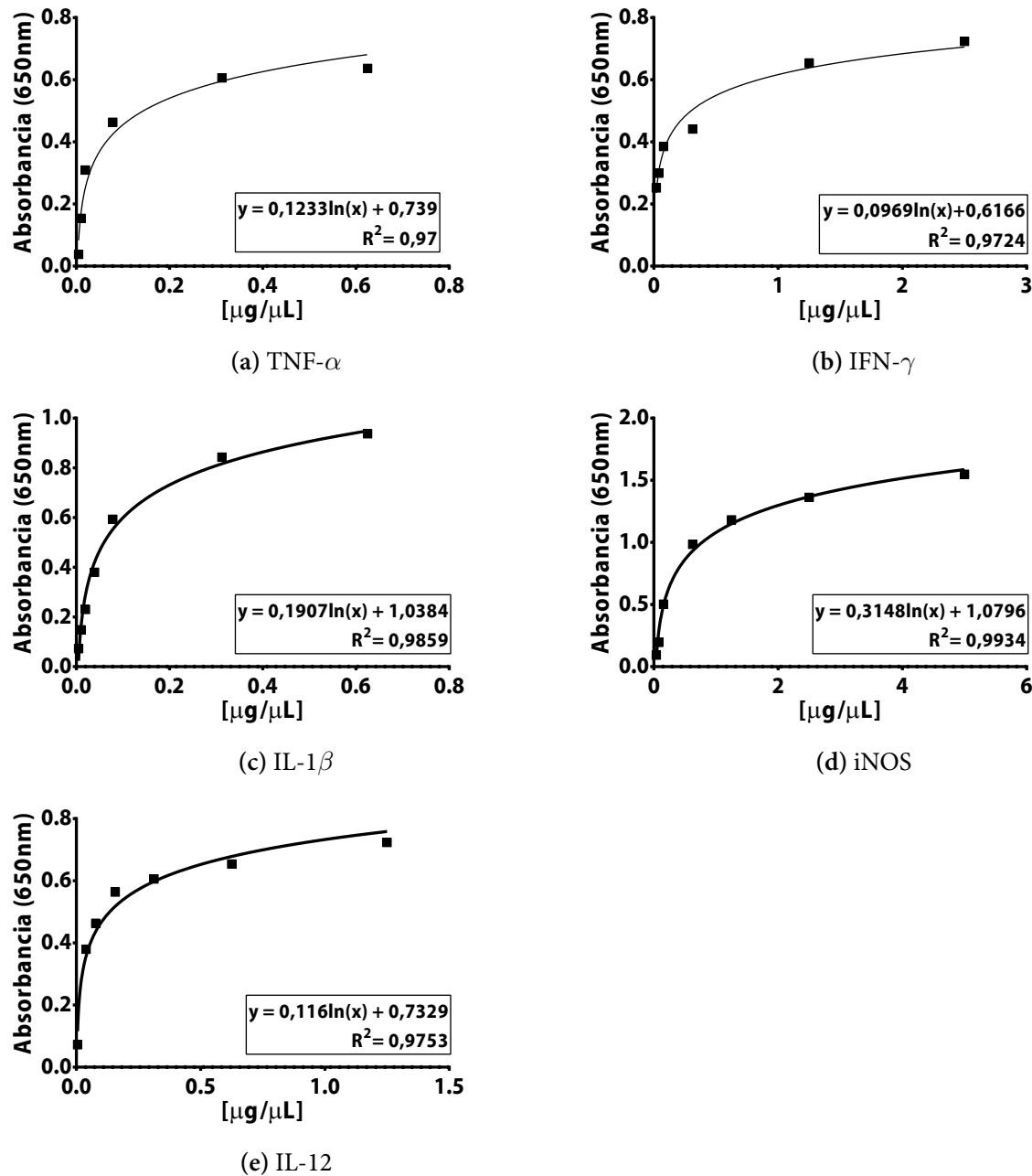


Figura 5.12: Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto

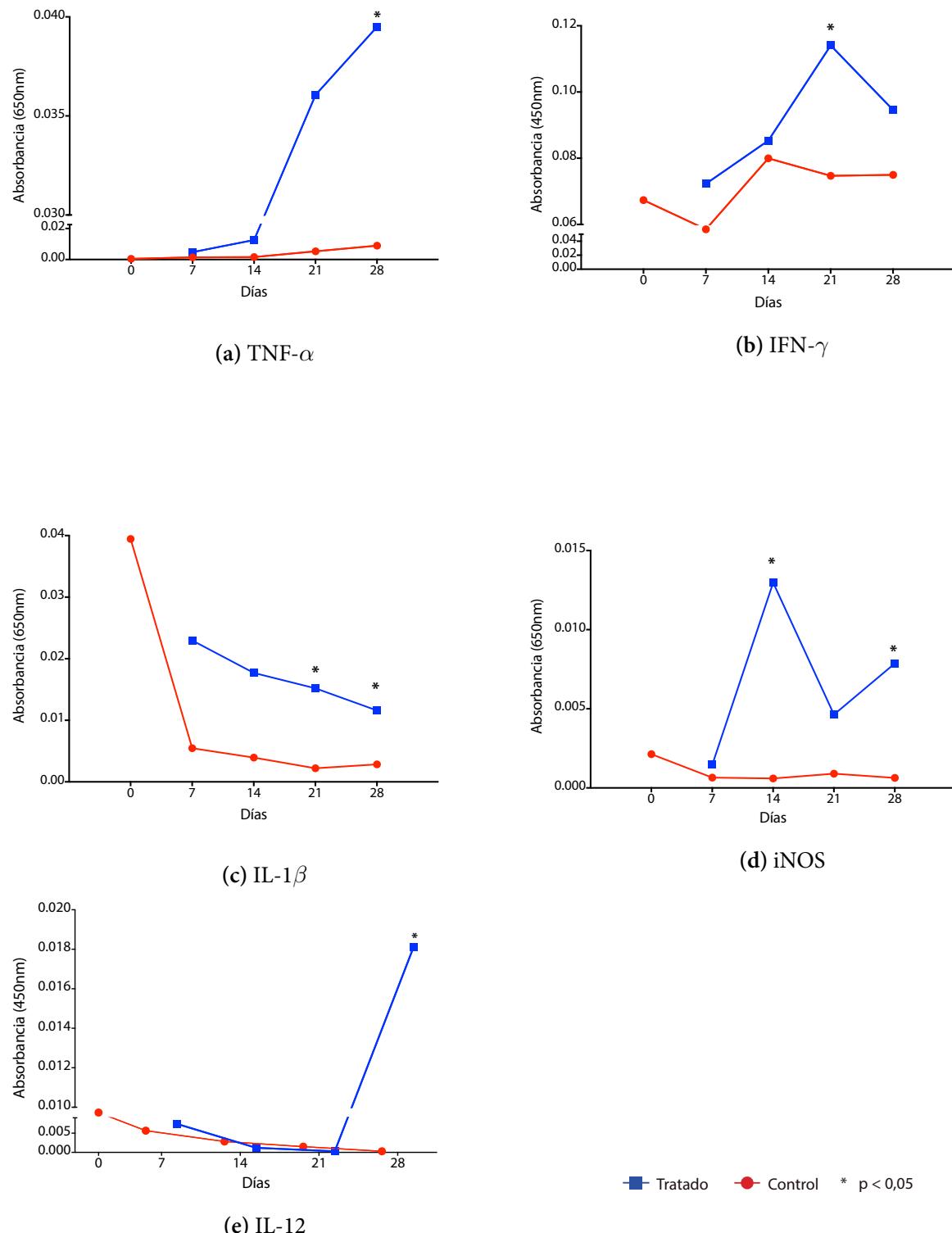


Figura 5.13: Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio

5.8. Tinción Hematoxilina-eosina

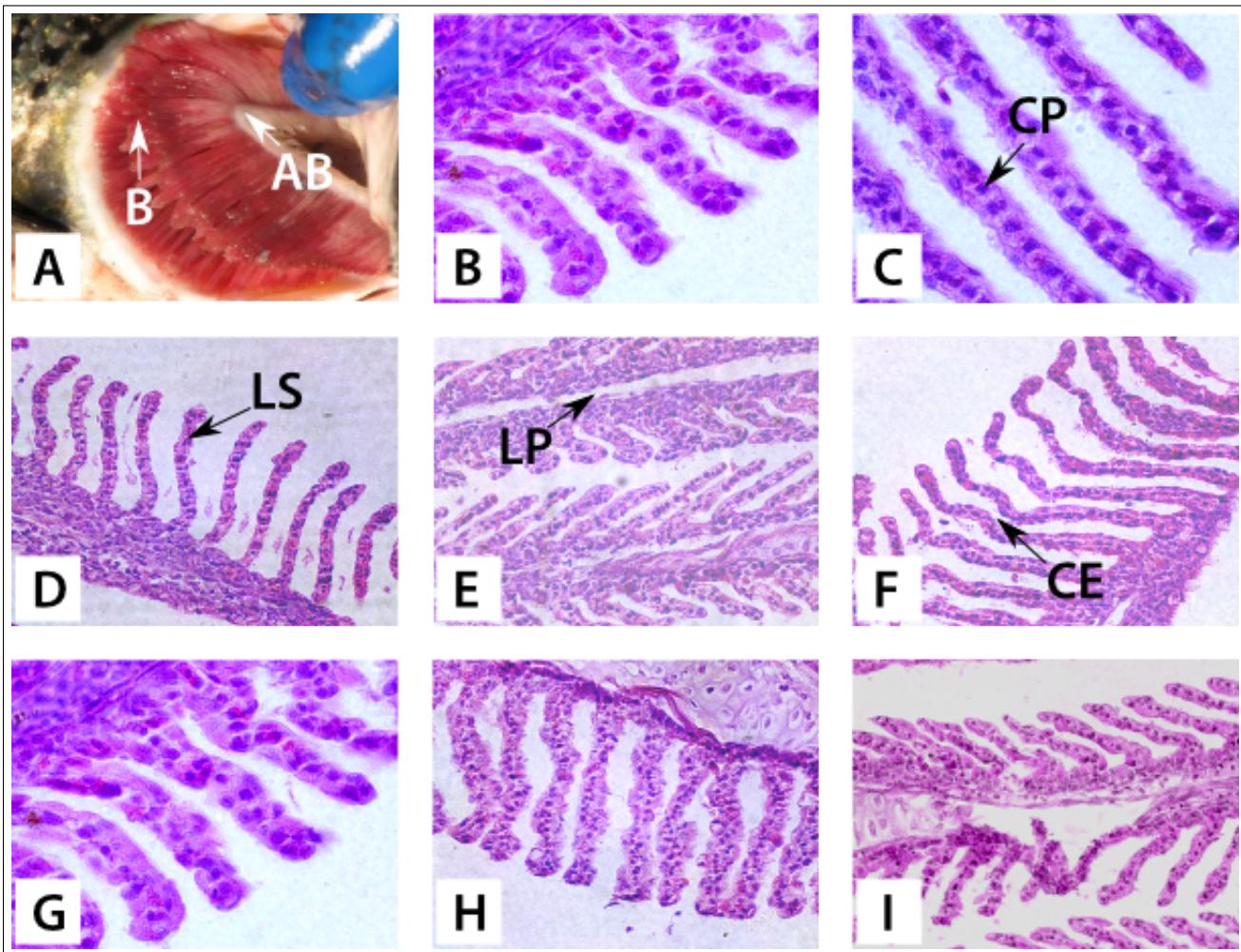


Figura 5.14: Microfotografías de branquias de trucha arcoiris con tinción Hematoxilina-eosina: A) Operculo abierto exponiendo las branquias a extraer; B,C) Día 0; D) Día 14 Control; E) Día 14 Tratado; F) Día 21 Control; G) Día 21 Tratado; H) Día 28 Control; I) Día 28 Tratado. AB = Arco Branquial, B = Branquias, LP = Laminilla primaria, LS = Laminilla secundaria, CE = Células epiteliales CP = Células pilares

Al realizar la tinción de Hematoxilina-eosina se pudo apreciar la integridad de los distintos cortes histológicos, los tejidos que los componen y así como también los distintos tipos celulares que se pudieron encontrar (Figura 5.14). La branquia se observa completa, sin su arco branquial, demostrando una consistencia entre sus laminillas primarias y secundarias (Figura 5.14D,E), así como también la presencia de células pilares (Figura 5.14C) y células epiteliales (Figura 5.14E).

5.9. Inmunofluorescencia

Habiendo comprobado la integridad de los tejidos muestreados se procedió a localizar las moléculas en estudio, usando los cortes histológicos y la técnica de inmunofluorescencia descrita en 4.9 se observaron los siguientes resultados.

5.9.1. TNF- α

Se pueden observar al menos 5 marcas correspondientes a células de la laminilla secundaria las cuales mostraban producción de TNF- α

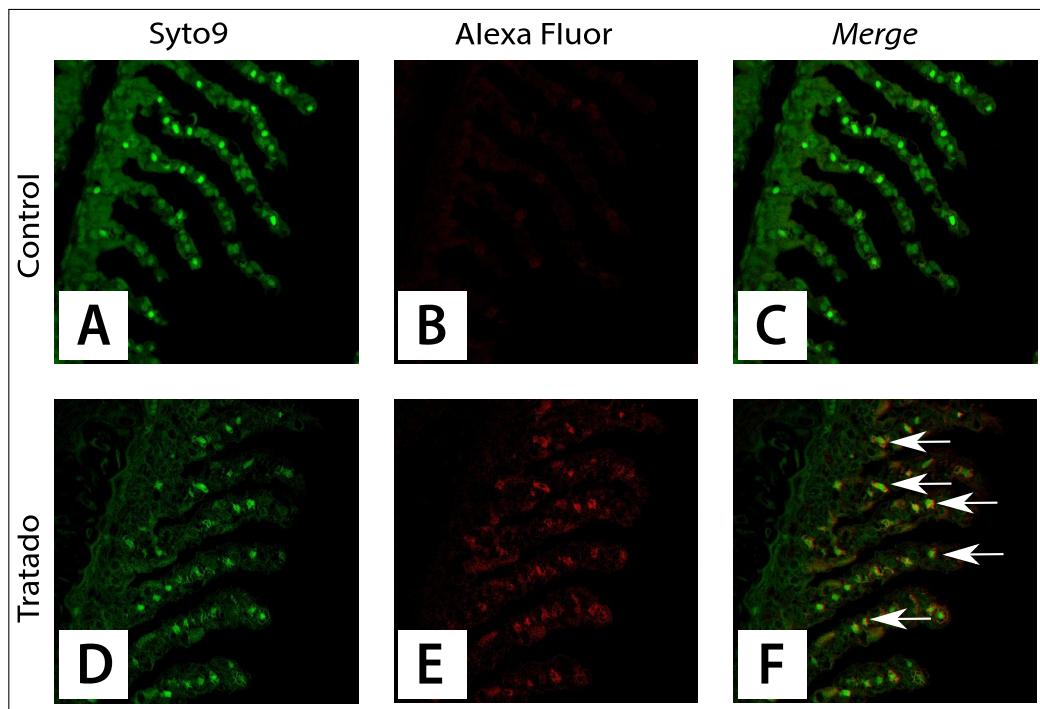


Figura 5.15: Microscopía confocal para TNF- α en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta: A) Control con tinción Syto9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción Syto9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

5.9.2. IFNg- γ

Se encontraron aproximadamente 4 marcas correspondientes a células de la laminilla secundaria, las cuales mostraban producción de interferón gamma.

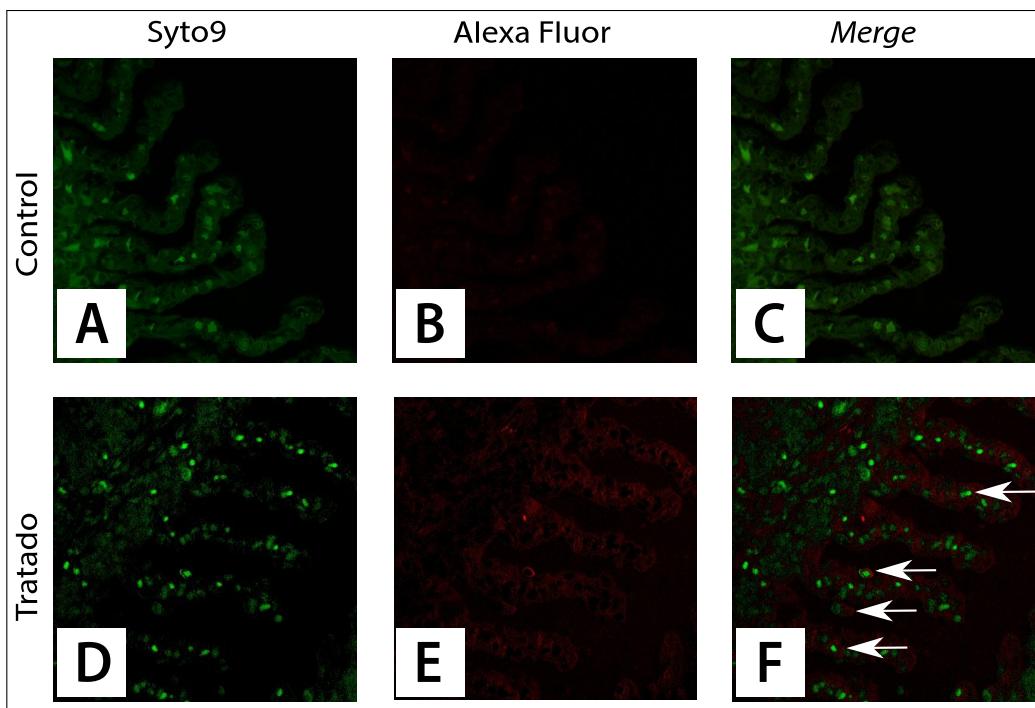


Figura 5.16: Microscopía confocal para IFN- γ en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

5.9.3. IL-1 β

Se encontraron aproximadamente 3 marcas correspondientes a células de la lámina secundaria, las cuales mostraban producción de IL-1 β .

5.9.4. iNOS

Al menos 2 marcas se consideran positivos para la producción de iNOS en células de la lámina secundaria.

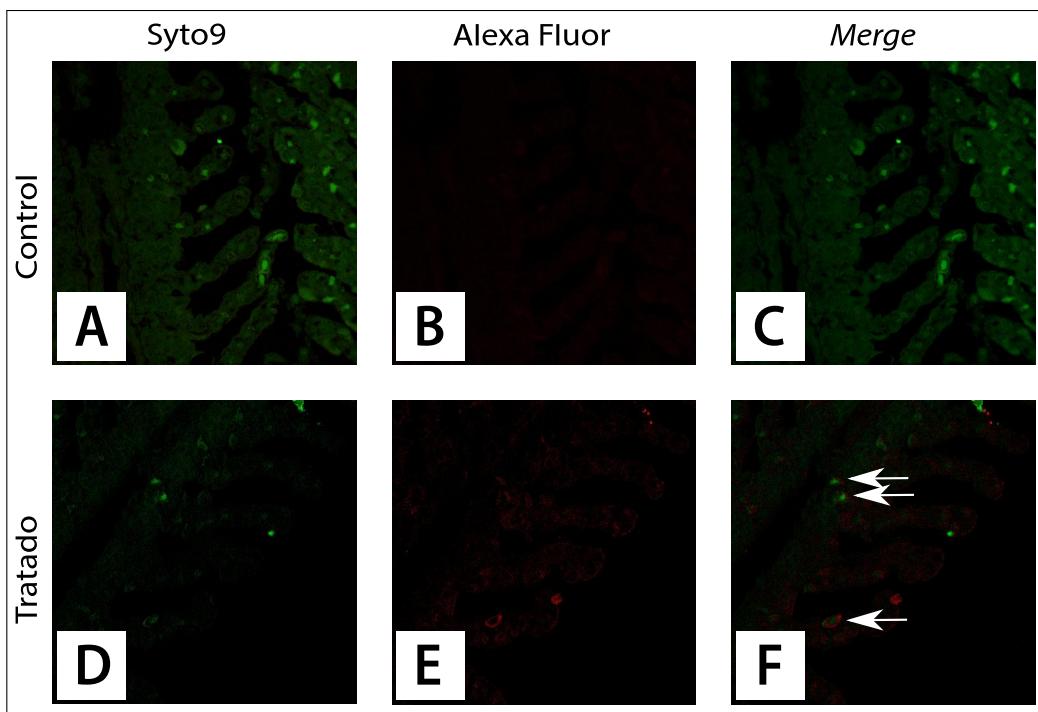


Figura 5.17: Microscopía confocal para IL-1 β en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

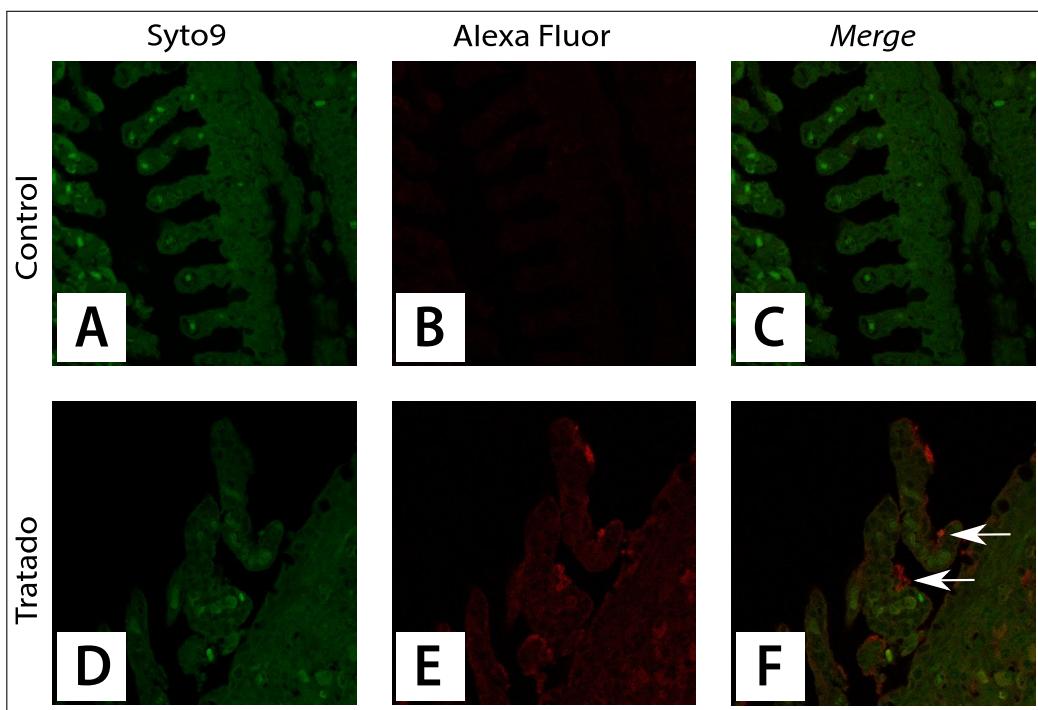


Figura 5.18: Microscopía confocal para iNOS en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

5.10. Correlación

Tabla 5.3: Matrices de correlación de las moléculas en estudio, para qPCR y ELISA

	TNF- α	iNOS	IL-1 β	IL-12		TNF- α	iNOS	IL-1 β	IL-12
TNF α					TNF- α				
iNOS	0,81				iNOS	0,31			
IL-1 β	0,98	0,72			IL-1 β	-0,81	-0,55		
IL-12	0,94	0,87	0,86		IL-12	0,20	-0,15	-0,02	
IFN- γ	0,99	0,85	0,95	0,97	IFN- γ	0,89	0,30	-0,75	-0,25

(a) qPCR

(b) ELISA

Se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson, en los cuales se obtuvo una correlación muy alta (>0.8) para el caso de los ensayos de qPCR (Tabla 5.3A), siendo el mas alto la correlación positiva para la dupla IFN- γ /TNF- α con un $R=0,99$ y por el contrario, la dupla con menor correlación positiva fue IL-1 β /iNOS.

En el caso de los ensayos de ELISA indirecto la dupla que obtuvo mayor correlación positiva fue IFN- γ /TNF- α con un $R=0,89$ mientras que para el caso de la dupla IL-1 β /TNF- α se obtuvo una correlación negativa con un $R=-0,82$ (Tabla 5.3B).

Finalmente con el fin de saber que marcadores se pueden usar indistintamente del ensayo que se ocupe (en este caso qPCR y ELISA) se correlacionaron los datos obtenidos por cada molécula en cada ensayo.

Tabla 5.5: Correlación de Pearson para una misma molécula y distintos ensayos

Dupla	R
qTNF- α /eTNF- α	0,96
qIFN- γ /eIFN- γ	0,83
qIL-12/eIL-12	0,52
qiNOS/eiNOS	0,02
qIL-1 β /eIL-1 β	0,6

q = qPCR; e = ELISA

Para los casos de las moléculas TNF- α e IFN- γ se obtuvieron correlaciones positivas $>$ a 0,8 (Tabla 5.5).

6 Discusiones

La perdida del equilibrio Ambiente \leftrightarrow Patógeno \leftrightarrow Hospedero es la causa de la mayoria de las enfermedades presentes en la acuicultura, y es por eso que es estrictamente necesario cimentar las bases de una comprensión íntegra del sistema inmune, para así, poder generar tecnología que pueda sobreponerse a estos paradigmas. Esto tiene suma importancia sobretodo en la industria acuícola, la cual produce anualmente, y con un crecimiento constante, 148 millones de toneladas de pescado (FAO, 2012), las cuales se traducen aproximadamente en 217.500 millones de dolares (USD), mas aún, de toda esa producción, 128 millones de toneladas fueron exclusivamente destinados a consumo humano, por lo que las perdidas por un brote de alguna enfermedad ascienden a millones de dolares, brotes que amenazan las año a año las operaciones acuicolas al rededor del mundo.

6.1. Objetivo 1

Los inmunoestimulantes han surgido como una opción viable, escalable y económica para solventar parte de los problemas de la acuicultura, fortaleciendo su capacidad de respuesta inmune en distintos estadíos de desarrollo. Dentro de las formas en las cuales se pueden desplegar estos inmunoestimulantes podemos encontrar vacunas, suspensión oral y liberación en el alimento, entre otras.

Para este proyecto se describió una dieta en base a *pellets* de harina de pescado, los cuales contenían como inmunoestimulante el β -glucano *Zimosán A*, proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en una razón del 0,3 %.

Los peces se mantuvieron el CIAC alimentandose en dos grupos, control y tratado, el totalidad de la mortalidad fue del 100 %, ya que todos los peces se sacrificaron en los días determinado para ese fin dentro de la linea de tiempo del ensayo.

Previo al desangramiento de cada pez se obtuvo el peso de cada organismo, con el fin de confeccionar un grafico para evaluar si la diferentes dietas generaban algun cambio en la masa del pez (Figura 5.2). Esto no fue así ya que el peso de ambos grupos se mantuvo constante, los datos al ser correlacionados mediante el coeficiente de Pearson obtuvieron un $R = 0,962$, lo que indica una correlación positiva de casi un 100 %.

6.2. Objetivo 2

La extracción de RNA y su posterior cuantificación se mantuvo constante (Tabla 5.1), demostrando que en la mayoría de los casos se trabajó prolíjamente y sin mucha diferencia entre los distintos días de muestreo. Los dos únicos casos en que se obtuvo una concentración muy baja fue en las muestras B2 y B41, con 63,3 y 40,20 ng/ μ L respectivamente. Esto puede haberse debido a una mala manipulación del mortero, el cual alcanzaba temperaturas cercanas a los -150°C al mantenerse constantemente con nitrógeno líquido, por lo tanto cuando se tomaba tejido pulverizado para agregar al tubo de homogeneización se podría haber perdido algo de muestra.

Con el RNA extraído y cuantificado se procedió a sintetizar su DNA complementario, al haberse hecho esto con Kit y Termociclador salió todo bien sin ninguna complicación, con lo que finalmente se pudo empezar a realizar la estandarización de partidores.

El primer par de partidores en estandarizar fue el de referencia, el cual tuvo una eficiencia de 96,9 % y solo un peak en la curva de disociación lo que nos corrobora que el primer, a 58°C como temperatura de annealing, genera un solo producto y que cada ciclo dobla su cantidad inicial de templado (Figura 5.3). Para las demás parejas de partidores correspondientes a los genes en estudio se observó la misma tendencia, generándose eficiencias de 105,5 % para el par de partidores que amplifican para IL-12 a 58°C (Figura 5.4), 115 % para el par de partidores que amplifican para TNF- α a 58°C (Figura 5.5), 120,9 % para el par de partidores que amplifican para IFN- γ a 61,5°C (Figura 5.6), 105,9 % para el par de partidores que amplifican para IL-1 β a 58°C (Figura 5.7) y finalmente 102 % para la pareja de partidores que amplifican para iNOS a 58°C (Figura 5.8).

Todas las eficiencias son similares, la única que se escapa un poco del promedio es la eficiencia del par de partidores que amplifican para IFN- γ , esto puede deberse a que el producto o amplicón que producen es muy pequeño (~51pb) (Tabla 4.5) y está en el límite de lo recomendado para la cuantificación por el método $\Delta\Delta C_T$ (M. W. Pfaffl, 2001; Bustin et al., 2009).

Teniendo ya estandarizados todos los partidores se procedió a evaluar las muestras biológicas del ensayo, en las cuales la tendencia demostró que la respuesta inmune empieza a aumentar pasado el día 14, ya que todos los peak de expresión se observaron en los días 21 y 28 según corresponda. (Figura 5.10), esto se condice con varios estudios donde los tiempos de respuesta frente a β -glucanos en tratamientos *in vivo* rondan dentro o después de los 21 días (Casadei et al., 2012; Skov et al., 2012; Dobšíková et al., 2013; Morales-Lange et al., 2014).

Para el caso de varios controles en distintas moléculas también se observó un aumento pasado este día, esto puede deberse a un estrés en los peces, el cual haya gatillado un aumento en la respuesta inmune como se ha demostrado en estudios anteriores (Bricknell y Dalmo, 2005; Magnadóttir, 2006; Barandica

y Tort, 2008; Bowden, 2008), pero aún teniendo controles altos en los ensayos de transcripción, por ejemplo para TNF- α (Figura 5.10A), IFN- γ (Figura 5.10B) e IL-1 β (Figura 5.10C) estas diferencias entre tratamientos siguen siendo estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Teniendo estos datos en cuenta se puede inferir que el suplementar la alimentación de los peces con *Zimosán A* liberado en dieta promovería la expresión de los genes que codifican para distintas citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras de inmunidad.

6.3. Objetivo 3

Para cuantificar las proteínas extraídas se utilizó el método BCA, en el cual se obtuvo como resultado una curva de calibrado con un coeficiente $R^2 = 0,9976$ lo que indica que la recta es lineal y las interpolaciones fueron válidas, esto así generando una cuantificación de proteínas estable en todas las muestras (Tabla 5.2), demostrando a su vez la estandarización previa de los métodos usados en el Laboratorio.

Los anticuerpos fueron a su vez validados usando ELISA indirecto, obteniendo distintas curvas evaluando su reacción con su antígeno correspondiente (Mason y Williams, 1980).

Para los 5 anticuerpos usados en el estudio se obtuvieron curvas logarítmicas con un coeficiente $R^2 > 0,97$, esto significa que a mayor concentración de inmunógeno (péptido sintético) el anticuerpo se va saturando, mientras que al inicio de la curva hay una linealidad en la reacción. Con estos resultados se aprobó el uso de estos anticuerpos en ensayos de ELISA indirectos con muestra biológica como antígeno.

Todas las moléculas en estudio aumentaron su biodisponibilidad con respecto a sus controles. Toman-do en cuenta el dogma de la biología molecular debiese haber obtenido los peak de biodisponibilidad de Proteínas posteriormente a los de transcripto, y hubieron casos, en que hubo peaks al mismo día que en lo visto por PCR en tiempo real (Figuras 5.13 y 5.10). Esto se puede deber a que exista un intervalo de tiempo anterior al medido en que se pueda apreciar la diferencia entre ambas condiciones y la biodisponibilidad de proteínas que estamos observando corresponde a una traducción de transcripto de algún día anterior no evaluado, y finalmente, otra razón de este fenómeno sería la documentada presencia de leucocitos circulantes en las branquias (Rosario Castro et al., 2014) los cuales estarían produciendo estas distintas moléculas reguladoras y efectoras de inmunidad.

Cabe destacar que la baja absorbancia obtenida en los ensayos se debe a que el efecto del *Zimosán A* a esa concentración produce solo un leve aumento en la respuesta inmune, lo cual está diseñado de esa forma, ya que con este estudio tampoco se espera que haya un estallido inflamatorio a nivel sistémico en el pez.

Sin embargo, a pesar de lo anteriormente mencionado, en los muestreos posteriores al día 14 se aprecia un aumento notable en la biodisponibilidad de todas las moléculas, con diferencias significativas frente a sus controles, lo que corrobora lo visto a nivel de transcripto, la liberación de Zimosán A en dieta genera una respuesta inmune detectable a nivel de mRNA y proteínas.

Los resultados planteados en esta tesis sentarían las bases para plantear que el receptor de β -glucanos descrito para *Salmo salar* (Guselle et al., 2006; Morales-Lange et al., 2014) podría estar conservado dentro de la familia de los salmonidos.

7 Conclusiones

Los análisis desarrollados en esta tesis demuestran que al tratar a *O.mykiss* con *Zimosan A* liberado en dieta, hay una respuesta inmune en su tejido branquial, detectable y cuantificable a nivel de transcripto y proteína, lo cual permite generar un modelo molecular preliminar asociado a estos eventos (Figura 7.1), por lo cual se da por aceptada la hipótesis planteada en este trabajo.

Sintetizando:

- Se observa una respuesta inmune en tejido branquial de *O.mykiss* al ser tratados con *Zimosán A* liberado en dieta.
- Esta respuesta es cuantificable y detectable a nivel de transcripto y proteínas.
- Usando una concentración de 0,3 % de *Zimosán A* esta respuesta puede ser detectada desde el día 21 de su tratamiento
- Si bien los 5 marcadores propuestos en este ensayo, se sugiere utilizar específicamente (por su coeficiente de correlación de Pearson) TNF- α e IFN- γ , ya sea a nivel de transcripto o proteína
- Los anticuerpos policlonales mono-específicos producidos por el Grupo de Marcadores Inmunológicos en Organismos Acuáticos del GIM-PUCV son una alternativa viable y económica para medir estos marcadores usando una pequeña cantidad de tejido.

El aumento de moléculas efectoras y reguladoras de inmunidad deben dotar al pez de una mejor respuesta inmune frente a los distintos patógenos a los que podrían estar enfrentados en el cultivo de esta especie.

Este trabajo sienta las bases concretas para que futuras investigaciones se puedan centrar en el uso de β -glucanos, en especial *Zimosán A*, como inmunoestimulantes en distintas etapas de crecimiento del pez, así como también la prueba de distintas concentraciones y vías de liberación de estos compuestos.

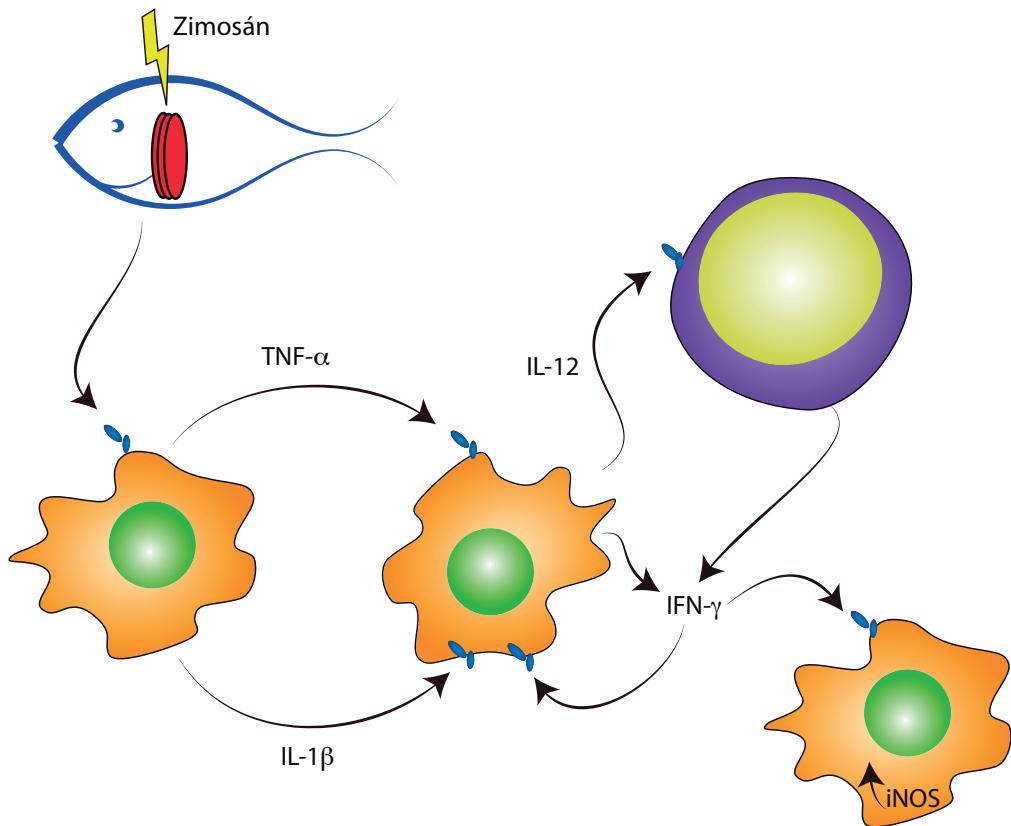


Figura 7.1: Modelo molecular de respuesta inmune: Generado a partir de los resultados obtenidos en tejido branquial de truchas arcoiris tratadas con *Zimosán A* liberado en dieta, inmunoestimulante que llegaría a su receptor (β -glucano?, *Dectin-1 like?*), el cual generaría la cascada de señalización para promover una respuesta inmune sintetizando citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-12 y a su vez promover un ambiente oxidativo con la síntesis de iNOS en células tipo NK

8 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 Católica de Valparaíso.

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 mono-nuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gfp reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18079-84. doi:[10.1073/pnas.1000467107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000467107)

Ainsworth, A. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 123-148. doi:[10.1016/0959-8030\(92\)90060-B](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90060-B)

Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3-4), 171-98. doi:[10.1016/j.vetimm.2008.07.013](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013)

Athman, R., & Philpott, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Current opinion in microbiology*, 7(1), 25-32. doi:[10.1016/j.mib.2003.12.013](https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.013)

Barandica, L., & Tort, L. (2008). Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 32(123), 267-284. Recuperado a partir de http://www.accefyn.org.co/revista/Vol/_32/123/267-284.pdf

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. *The Journal of Immunology*, 169(5), 2488-2497. Recuperado a partir de <http://jimmunol.org/content/169/5/2488.abstract>

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. *Journal of fish diseases*, 35(5), 379-88. doi:[10.1111/j.1365-2761.2012.01354.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01354.x)
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A. M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 30(2), 451-5. doi:[10.1016/j.fsi.2010.12.013](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.013)
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*, 15, 749-95. doi:[10.1146/annurev.immunol.15.1.749](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749)
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907-16. doi:[10.1038/ni1001-907](https://doi.org/10.1038/ni1001-907)
- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., & Lee, L. E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 853-873. doi:[10.1016/S0145-305X\(01\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00040-4)
- Boschi, I., Randelli, E., Buonocore, F., Casani, D., Bernini, C., Fausto, a M., & Scapigliati, G. (2011). Transcription of T cell-related genes in teleost fish, and the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 655-62. doi:[10.1016/j.fsi.2010.10.001](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.001)
- Bowden, T. J. (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 373-83. doi:[10.1016/j.fsi.2008.03.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017)
- Bricknell, I., & Dalmo, R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 457-72. doi:[10.1016/j.fsi.2005.03.008](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.008)
- Bustin, S. a, Benes, V., Garson, J. a, Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-22. doi:[10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797)
- Casadei, E., Bird, S., González, J. L., Wadsworth, S., & Secombes, C. J. (2012). Fish & Shellfish Immunology The effect of peptidoglycan enriched diets on antimicrobial peptide gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, (December), 1-9. doi:[10.1016/j.fsi.2012.11.027](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.027)
- 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 immunology*, 31(5), 644-54. doi:[10.1016/j.fsi.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.016)
- Castro, R., Bromage, E., Abós, B., Pignatelli, J., González Granja, A., Luque, A., & Tafalla, C. (2014). CCR7 is mainly expressed in teleost gills, where it defines an IgD+IgM- B lymphocyte subset. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(3), 1257-66. doi:[10.4049/jimmunol.1302471](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302471)
- 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*. *Infection and immunity*, 73(8), 5053-64. doi:[10.1128/IAI.73.8.5053-5064.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5053-5064.2005)

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*). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(1), 185-95. doi:[10.1128/AAC.50.1.185-195.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.185-195.2006)

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*. *Aquaculture Research*, 44(9), 1407-1415. doi:[10.1111/j.1365-2109.2012.03145.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03145.x)

Dalmo, R. a, & Bøgwald, J. (2008). Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 384-96. doi:[10.1016/j.fsi.2008.04.008](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008)

Dobšíková, R., Blahová, J., Mikulíková, I., Modrá, H., Prášková, E., Svobodová, Z., ... Siwicki, A.-K. (2013). The effect of oyster mushroom β -1.3/1.6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1813-23. doi:[10.1016/j.fsi.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.006)

Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*, 11(5), 453-491. doi:[10.1111/j.1095-8649.1977.tb04140.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04140.x)

Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and comparative immunology*, 25(8-9), 827-39. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602198>

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. *Revista AquaTIC*, 16. Recuperado a partir de <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1605/inmune.htm>

Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields' Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Recuperado a partir de <http://books.google.es/books?id=5O0somr0w18C>

Georgiadis, M., Gardner, I., & Hedrick, R. (2001). The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Preventive Veterinary Medicine*, 48(4), 287-302. doi:[10.1016/S0167-5877\(00\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00202-6)

Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729-39. doi:[10.1016/j.fsi.2013.09.032](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032)

Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927-30. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507420>

- 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. *Developmental and comparative immunology*, 8(2), 293-302. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6734870>
- Groot, C., & Margolis, L. (1991). *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press. Recuperado a partir de http://books.google.es/books?id=I/_S0xCME0CYC
- Guselle, N. J., Markham, R. J. F., & Speare, D. J. (2006). Short communication to rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), protects against *Loma salmonae*, 375-381.
- Hong, S., Zou, J., Collet, B., Bols, N. C., & Secombes, C. J. (2004). Analysis and characterisation of IL-1 β processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & shellfish immunology*, 16(3), 453-9. doi:[10.1016/j.fsi.2003.08.002](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.002)
- Huising, M. O., Schijndel, J. E. van, Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Savelkoul, H. F. J., Flik, G., & Verburg-van Kemenade, B. M. L. (2006). The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family. *Molecular immunology*, 43(10), 1519-33. doi:[10.1016/j.molimm.2005.10.010](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.10.010)
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*, 17(4), 338-44. doi:[10.1016/j.co.2005.02.007](https://doi.org/10.1016/j.co.2005.02.007)
- 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. *Diseases of aquatic organisms*, 70(1-2), 63-70. doi:[10.3354/dao070063](https://doi.org/10.3354/dao070063)
- 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 haematological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 98(2), 279-89. doi:[10.1111/jpn.12078](https://doi.org/10.1111/jpn.12078)
- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), 78-89. doi:[10.1016/j.fsi.2014.04.015](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015)
- 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 immunology*, 31(6), 788-94. doi:[10.1016/j.fsi.2011.07.013](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.013)
- 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 immunology*, 33(3), 626-31. doi:[10.1016/j.fsi.2012.06.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.017)

- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15, 323-50. doi:[10.1146/annurev.immunol.15.1.323](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323)
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137-51. doi:[10.1016/j.fsi.2004.09.006](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006)
- Maier, V. H., Dorn, K. V., Gudmundsdottir, B. K., & Gudmundsson, G. H. (2008). Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular immunology*, 45(14), 3723-30. doi:[10.1016/j.molimm.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.002)
- Mason, D. W., & Williams, A. F. (1980). The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface. *The Biochemical journal*, 187(1), 1-20. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1162489/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S. H., & Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3), 284-290. doi:[10.2225/vol8-issue3-fulltext-2](https://doi.org/10.2225/vol8-issue3-fulltext-2)
- Morales-Lange, B., Bethke, J., Schmitt, P., & Mercado, L. (2014). Phenotypical parameters as a tool to evaluate the immunostimulatory effects of laminarin in *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, n/a-n/a. doi:[10.1111/are.12426](https://doi.org/10.1111/are.12426)
- Mulero, I., Pilar Sepulcre, M., Roca, F. J., Meseguer, J., García-Ayala, A., & Mulero, V. (2008). Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Developmental and comparative immunology*, 32(10), 1151-9. doi:[10.1016/j.dci.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.03.005)
- 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 immunology*, 28(1), 235-9. doi:[10.1016/j.fsi.2009.10.004](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.004)
- Nascimento, D. S., Vale, A. do, Tomás, A. M., Zou, J., Secombes, C. J., & Santos, N. M. S. dos. (2007). Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Molecular immunology*, 44(9), 2277-91. doi:[10.1016/j.molimm.2006.11.006](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.11.006)
- Oikawa, B. Y. S., & Itazawa, Y. (1985). Gill and Body Surface Areas of the Carp in relation to Body Mass, With Special Reference To The Metabolism-Size Relationship. *The Journal of experimental biology*, 14(117), 1-14.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2). doi:[10.4067/S0717-6538200000200010](https://doi.org/10.4067/S0717-6538200000200010)

- Palić, D., Beck, L. S., Palić, J., & Andreasen, 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 immunology*, 30(2), 646-52. doi:[10.1016/j.fsi.2010.12.024](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.024)
- Peddie, S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(1-2), 101-113. doi:[10.1016/S0165-2427\(02\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00019-3)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/55695> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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. *Journal of Fish Biology*, 36(2), 159-173. doi:[10.1111/j.1095-8649.1990.tb05592.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05592.x)
- Reis, M. I. R., Vale, A. do, Pereira, P. J. B., Azevedo, J. E., & Dos Santos, N. M. S. (2012). Caspase-1 and IL-1 β processing in a teleost fish. *PLoS one*, 7(11), e50450. doi:[10.1371/journal.pone.0050450](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050450)
- 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 immunology*, 27(2), 369-73. doi:[10.1016/j.fsi.2009.02.007](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.007)
- Rojas, V., Guzman, F., & Morales-lange, B. (2012). Immunological strategy for detecting the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in salmonids. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15. doi:[10.2225/vol15-issue5-fulltext-19](https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-19)
- Rombout, J. H. W. M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 616-26. doi:[10.1016/j.fsi.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001)
- Rondon-Barragan, I. (2010). Receptores similares a Toll en peces : el inicio de la divergencia. *Investigación Veterinaria*, 11(1), 15-30.
- Salazar-Mather, T., & Hokeness, K. (2006). Cytokine and Chemokine Networks: Pathways to Antiviral Defense. En T. E. Lane (ed.), *Chemokines and viral infection* (Vol. 303, pp. 29-46). Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-33397-5/_2
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental and comparative immunology*, 35(12), 1346-65. doi:[10.1016/j.dci.2011.11.009](https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009)
- Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., & Guzmán, F. (2012). Anti-peptide antibodies : A tool for detecting IL-8 in salmonids, 15. doi:[10.2225/vol15-issue5-fulltext-15](https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-15)

- Santos, N. M. dos, Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A. C., Muiswinkel, W. B. van, Ellis, A. E., & Rombout, J. H. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish & shellfish immunology*, 11(1), 65-74. doi:[10.1006/fsim.2000.0295](https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0295)
- Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics*, 1(1), 89-101. doi:[10.1016/j.cbd.2005.08.005](https://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.08.005)
- Scapigliati, G., Romano, N., & Abelli, L. (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology : identification , ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture*, 172, 3-28.
- Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Developmental and comparative immunology*, 35(12), 1336-45. doi:[10.1016/j.dci.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001)
- Sernapesca. (2012). Anuario desembarques. Santiago de Chile: Gobierno de Chile. Recuperado a partir de <http://www.sernapesca.cl>
- Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 229-243. doi:[10.1016/S0169-409X\(01\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00159-4)
- Sharpey-Schäfer, E. A., & Carleton, H. M. (1938). Schafer's essentials of histology: descriptive and practical for the use of students. London ; New York: Longmans, Green. Recuperado a partir de <http://catalog.hathitrust.org/Record/009241076> [http://hdl.handle.net/2027/uc1.\\\$b439719](http://hdl.handle.net/2027/uc1.\$b439719)
- 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 immunology*, 33(1), 111-20. doi:[10.1016/j.fsi.2012.04.009](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.04.009)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843705>
- Subpesca. (2013). Cuenta Pública de Estado de los Recursos. Santiago de Chile: Gobierno de Chile. Recuperado a partir de <http://www.subpesca.cl>
- Taechavasonyoo, A., Kondo, H., Nozaki, R., Suzuki, Y., & Hirono, I. (2013). Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish & shellfish immunology*, 34(1), 393-6. doi:[10.1016/j.fsi.2012.10.001](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.001)
- Teles, M., Mackenzie, S., Boltaña, S., Callol, a, & Tort, L. (2011). Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 340-6. doi:[10.1016/j.fsi.2010.11.006](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.006)

- Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiology & behavior*, 94(2), 276-84. doi:[10.1016/j.physbeh.2007.11.045](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.045)
- Wang, T., Johnson, N., Zou, J., Bols, N., & Secombes, C. J. (2004). Sequencing and expression of the second allele of the interleukin-1beta1 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): identification of a novel SINE in the third intron. *Fish & shellfish immunology*, 16(3), 335-58. doi:[10.1016/S1050-4648\(03\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00114-1)
- 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*. *Journal of aquatic animal health*, 19(1), 49-59. doi:[10.1577/H06-020.1](https://doi.org/10.1577/H06-020.1)
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, 23(6), 1127-51. doi:[10.1016/j.fsi.2007.06.005](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005)
- Wilson, J. M., & Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *The Journal of experimental zoology*, 293(3), 192-213. doi:[10.1002/jez.10124](https://doi.org/10.1002/jez.10124)
- Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, 5(10), 905-17. doi:[10.1021/cb1001558](https://doi.org/10.1021/cb1001558)
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. a., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. 1997. *BioTechniques*, 54(6), 314-20. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23905170>
- Wu, F., Tymly, K., & Wilson, J. X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, 217(1), 207-14. doi:[10.1002/jcp.21495](https://doi.org/10.1002/jcp.21495)
- Yang, K., Zhang, S., Chen, D., Zhang, A., Wang, X., & Zhou, H. (2013). IFN- γ -activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages. *Fish & shellfish immunology*, 35(5), 1635-41. doi:[10.1016/j.fsi.2013.09.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.017)
- Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2003). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296-306. doi:[10.1007/s00251-003-0582-9](https://doi.org/10.1007/s00251-003-0582-9)
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-95. doi:[10.1038/415389a](https://doi.org/10.1038/415389a)
- 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 (London, England)*, 20(4), 643-52. doi:[10.1007/s10646-011-0604-6](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0604-6)

- Zhang, L., Zhang, B.-C., & Hu, Y.-H. (2014). Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: identification, expression, and effect on bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*. doi:[10.1016/j.fsi.2014.05.026](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.026)
- Zhang, Z., Swain, T., Bøgwald, J., Dalmo, R. a, & Kumari, J. (2009). Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish & shellfish immunology*, 26(5), 677-84. doi:[10.1016/j.fsi.2009.02.014](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.014)
- Zhao, K., Huang, Z., Lu, H., Zhou, J., & Wei, T. (2010). Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Bioscience reports*, 30(4), 233-41. doi:[10.1042/BSR20090048](https://doi.org/10.1042/BSR20090048)
- 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. *Developmental and comparative immunology*. doi:[10.1016/j.dci.2012.04.001](https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.001)
- Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N., Ellis, & Secombes, C. (2003). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(9), 813-822. doi:[10.1016/S0145-305X\(03\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00077-6)