



**Universidad  
Andrés Bello**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MOLECULAR DE RESPUESTA  
INMUNE EN TEJIDO BRANQUIAL DE *Oncorhynchus mykiss*  
ALIMENTADO CON  $\beta$ -GLUCANOS**

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

**Director de Tesis:** Dr. Luis Mercado Vianco  
**Institución:** Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

presentado por:  
**Sebastián Rodrigo Sariego Benítez**

**Viña del Mar, Chile**

Julio, 2013

# Introducción

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

## El género *Oncorhynchus*

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

Algunas características principales de este genero son las siguientes

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

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

La trucha arcoiris, descrita inicialmente por Walbaum en 1792 tiene un cuerpo alargado fusiforme con 60 a 66 vertebras, con 3 a 4 espinas dorsales, 10 a 12 rayos dorsales blandos, 3 a 4 espinas anales, 8 a 12 rayos anales blandos y 19 rayos caudales. Presentan una aleta con gran tejido adiposo, la cual usualmente contiene un borde negro. Tienen como coloración principal tonalidades de azul a verde oliva, sobre una banda rosa a lo largo de la linea lateral y plateada por debajo de ella, configuración cromática que le da su nombre *arcoíris*.

Este pez es resistente, de crecimiento rápido y tolerante a una amplia gama de manipulaciones y ambientes, pudiendo así ocupar una variedad de hábitats y diferentes temperaturas. La temperatura ideal para el cultivo de la trucha arcoíris está por debajo de 21° C, aunque en etapa de desove y crecimiento la temperatura tiene que estar en el rango de 9 a 14°C (Figura 1).

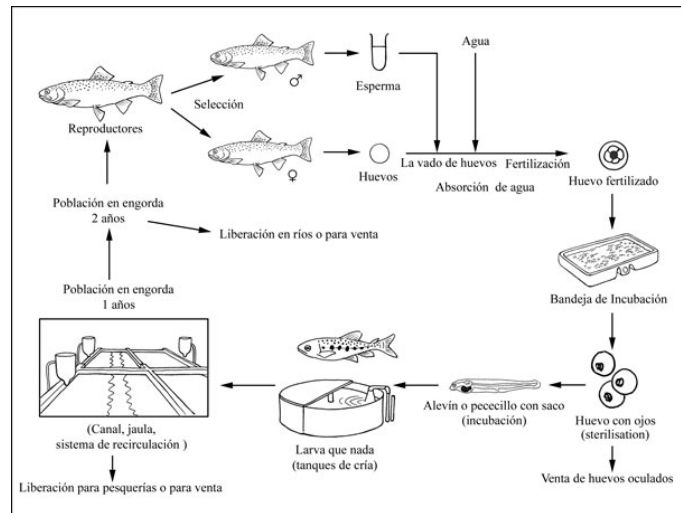


Figura 1: Ciclo productivo de la trucha arcoíris

## Situación actual en Chile

Los desembarques de Trucha arcoíris han aumentado cercano al 1500 % en 20 años (Figura 2), con una tasa de crecimiento porcentual promedio del alrededor del 15 % (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).

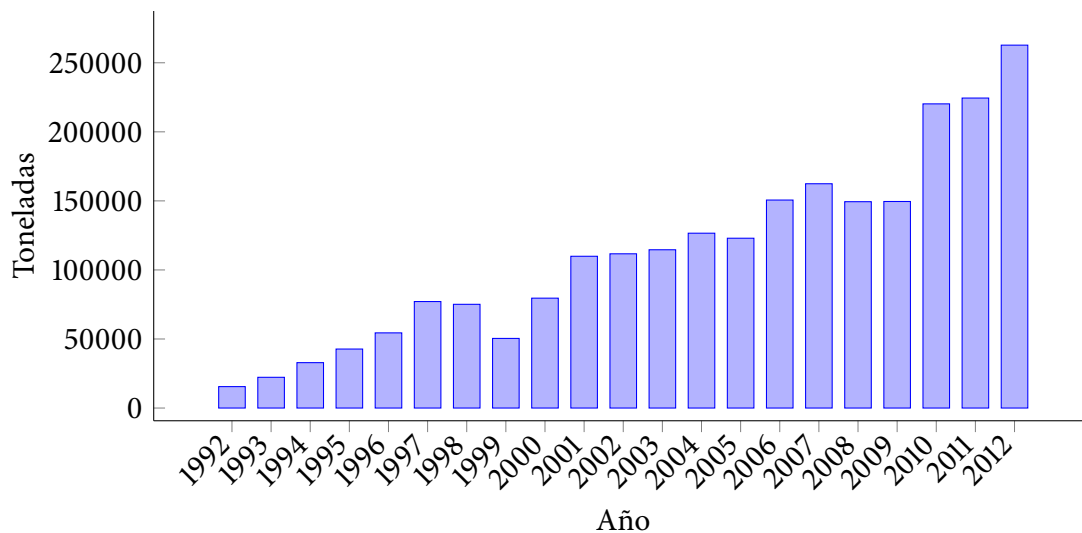


Figura 2: Desembarques de Trucha arcoíris en Chile

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

caso de la acuicultura (Industria que representa cerca de un 50 % de la oferta mundial de pescado) (FAO, 2012), un grave problema son las enfermedades asociadas a cultivos masivos de peces, mayoritariamente relacionadas al stress en que se ven sometidos los organismos como también por el crecimiento acelerado de la producción y los sistemas de cultivo actuales (FAO, 2012; Georgiadis et al., 2001). Estas enfermedades, cualquiera sea su origen, pueden tener un alto impacto negativo en la producción mundial, lo que equivale a grandes pérdidas económicas (Z. J. Shao, 2001). Por lo tanto es necesario tener información del sistema inmune en peces, para así poder minimizar los efectos producidos por estas enfermedades y en algunos casos prevenirlos.

## Sistema inmune en peces

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

La respuesta inmune innata o inespecífica en peces es muy importante, ya que constituye la primera y más importante línea de defensa del pez frente a un gran número de patógenos, en esta respuesta convergen factores humorales y celulares (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000; L.-Y. Zhu et al., 2012). Este tipo de inmunidad está basado en el reconocimiento no clonal de los componentes estructurales o secretados de los patógenos microbianos (Athman et al., 2004), los cuales son llamados patrones moleculares asociados a patógenos (o PAMPs, por sus siglas en inglés), estos a su vez son 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 et al., 2005)

Entre las células involucradas la fase celular inespecífica de la respuesta inmune están las células citotóxicas no específicas (NCC, por sus siglas en inglés), células fagocíticas, y granulocitos (Ainsworth, 1992; A. E. Ellis, 1977). Las células NCC en peces se encuentran principalmente en el riñón cefálico, el bazo, sangre periférica y el timo, son células citotóxicas inespecíficas, es decir ejercen su acción en diferentes células diana sin un reconocimiento previo, las cuales requieren un contacto

célula-célula para poder efectuar la lisis celular (Graves et al., 1984). Dentro de las células fagocíticas los neutrófilos representan aproximadamente en promedio a un 11 % de los leucocitos en sangre, son también llamados polimorfonucleares o leucocitos específicos, su capacidad fagocítica es baja, ya que ingieren poco material extraño, aunque poseen la mayoría de la batería enzimática para este trabajo. Los eosinófilos y basófilos son los granulocitos con menor presencia en peces, aunque en el caso de los eosinófilos se han logrado encontrar en peritoneo u otros tejidos como el intestino, mientras que los basófilos tienen escasa presencia en estos organismos (D. Palić et al., 2011).

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

Entre los componentes moleculares asociados a la respuesta innata del sistema inmune de peces podemos encontrar a las citoquinas, las cuales son una familia de proteínas de bajo peso molecular (comúnmente glicosiladas) y secretadas por células del sistema inmune activadas previamente frente a la exposición de diferentes componentes patógenos (Salazar-Mather et al., 2006). Estas citoquinas pueden dividirse en interferones (IFNs), interleuquinas (ILs), factores de necrosis tumorales (TNFs, por sus siglas en inglés), factores estimuladores de colonias y quimioquinas (Savan et al., 2006). Las interleuquinas son citoquinas producidas principalmente por linfocitos T CD4+, aunque también son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, como por ejemplo los macrófagos/monocitos y las células endoteliales (C. J. Secombes et al., 2011), las quimioquinas, o también llamadas citoquinas quimiotácticas (o quimioattractantes) son una familia de citoquinas que son liberadas por la mayoría de tejidos infectados en los estadios tempranos de infección. Las citoquinas pueden dividirse en distintas familias según sea la organización de sus cisteínas.

Dentro de la familia de las interleuquinas podemos encontrar la Interleuquina  $1\beta$ , la citoquina proinflamatoria mas 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 inmunológicos (Reis et al., 2012). Esta citoquina potencialmente induce la proliferación, diferenciación y activación de células no específicas, como NK, macrófagos, etc..., así como también una respuesta inmune específica, activando linfocitos B y T (Hong et al., 2004; Taechavasonyoo et al., 2013). Junto con IL- $1\beta$  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 $\alpha$ ). este factor tiene una variedad de funciones inmunológicas, regulando la inflamación y la respuesta inmune celular (Teles et al., 2011; T. Wang et al., 2004; J. Zou et al., 2003). 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 $\beta$  y TNF $\alpha$  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 $\gamma$ ), 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 et al., 2006). El IFN- $\gamma$  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<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>), la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), p47 GTPasa y la proteína de unión a guanilato, así como también aumenta las moléculas de MHC de clase 2 en macrófagos y otras APCs (U. Boehm et al., 1997). Por lo tanto en contraste con los interferones de tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) el IFN $\gamma$  juega un rol clave en la activación de macrófagos para aumentar destrucción de patógenos bacterianos, protozoos y virales (Fields et al., 2007).

La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina heterodimérica, compuesta por las subunidades P35 y P40, la primera miembro de la familia de la interleuquina 6 con 4  $\alpha$ -hélices en su topología y p40 recuerda una forma asociada a un receptor de citoquinas solubles (Huisin et al., 2006; Yoshiura et al., 2003). 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- $\gamma$ , 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 (Bogdan, 2001; MacMicking et al., 1997). 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 (Zaslhoff, 2002). Los mecanismos de acción anti-bacteriana de estos AMP pueden entenderse desde dos puntos de vista diferentes: 1. La estructura anfipática puede unirse selectivamente a la membrana bacteriana y generar poros transmembrana, los cuales destruyen a la bacteria desintegrando la membrana, y 2, los AMP pueden directamente entrar a la bacteria e interactuar específicamente con factores de crecimiento y metabolismo bacteriano eventualmente generando la muerte bacteriana (Wimley, 2010; L.-Y. Zhu et al., 2012). Entre los péptidos anti microbianos descritos en peces podemos encontrar cuatro grandes grupos, las defensinas, proteínas de macrófagos asociadas a resistencia natural (Pramps, por sus siglas en inglés), NK-lisina y hepcidinas.

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

Además de poseer una robusta y bien desarrollada respuesta inmune innata como se explicaba anteriormente, los peces también cuentan con una respuesta adaptativa, con componentes celulares y humorales (Alvarez-Pellitero, 2008), en este último grupo se encuentran los anticuerpos, los cuales son proteínas pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig), en el caso de los peces producen inmunoglobulinas del tipo M, T y D (Bengtén et al., 2002; 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 médula ósea y ganglios linfáticos, por lo cual no se puede marcar una diferencia entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000). Entre los principales órganos pertenecientes al sistema inmune de peces podemos encontrar el timo, el riñón y el bazo. El riñón cefálico es el principal órgano en la diferenciación de linfocitos B, ya que es el primer órgano en el que aparecen estas células durante el desarrollo del pez, también es el órgano donde se produce la eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis y monocitopoyesis (Whyte, 2007), por lo que se le puede considerar a la vez un órgano análogo a la médula ósea de los mamíferos (Razquin et al., 1990). Los centros melanomacrofágicos son una agregación de macrófagos que contienen melanina, un pigmento de color oscuro, su tamaño y número está directamente relacionado con el estado del pez, ya que estas variables aumentan considerablemente en peces enfermos, donde el catabolismo ha sido excesivo. Algunos estudios ontogénicos realizados en salmónidos sugieren que la función del bazo no es esencial en la maduración del sistema







inmunológico, ya que los linfocitos del timo y riñón cefálico estarían más involucrados que este órgano en esta maduración. Otros estudios sin embargo indican, que bajo un desafío antigénico aparecen linfocitos B en el bazo, teniendo parámetros similares a los presentados por estas células en otros órganos como el riñón cefálico.

## Inmunoestimulantes

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

### $\beta$ -glucanos

Tabla 1: Estructuras de  $\beta$ -Glucanos según su origen

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

Estructuras de  $\beta$ -Glucanos según su origen

Los  $\beta$ -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  $\beta$ -glucano encontraremos diferencias también en sus estructuras moleculares y sus posibles ramificaciones (Tabla 1) (Skov et al., 2012; Volman et al., 2008).

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

Dado que las branquias de los peces estan 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 celulas separa el sistema vascular del pez del ambiente externo, es muy probable que sean un sitio importante en la entrada de patógenos. Es mas, las celulas epiteliales de las branquias son capaces tomar distintas particulas como por ejemplo esferas de latex (Smith et al 1982) e incluso microorganismos como virus u otros patógenos.

# Hipótesis

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

## Objetivo General

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

## Objetivos Específicos

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

## Materiales y Métodos

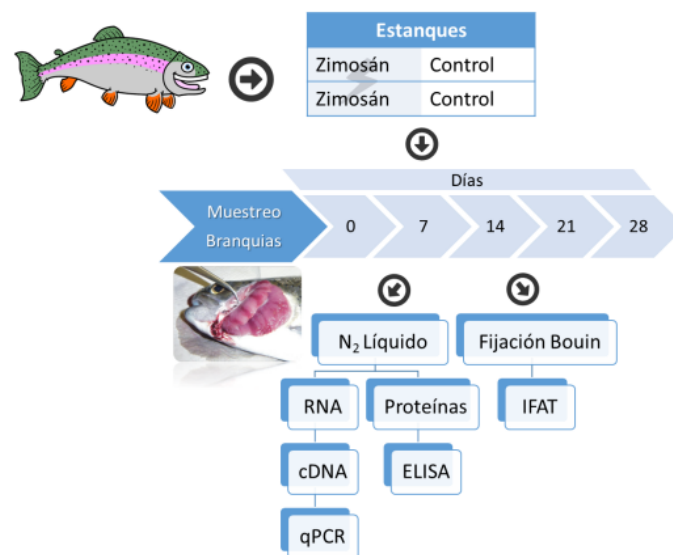


Figura 3: Esquema general de trabajo

## Material Biológico $\mu$ L

### Peces

Ejemplares de truchas de aproximadamente x meses de edad, con un peso promedio de  $22,26 \pm 1,7397$ 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, ubicado en la provincia de Valparaíso. Fueron aclimatados durante 1 semana y se mantuvieron a 14° C durante toda la investigación.

### Anticuerpos

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

## Desafío y Controles

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

## Muestreo

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

Tabla 2: Tabla de identificantes

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

d = Día Muestreo (0,7,14,21,28); B = Branquia;  
c = Estanque control (1,2); z = Estanques inducidos  
(3,4)

## Extracción de RNA

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

## Cuantificación e Integridad de RNA

El RNA se cuantificó usando el sistema espectrofotométrico ND-1000 de NanoDrop cargando 2µL 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 1µg de RNA por pocillo, el RNA se almacenó a -80°C.

## Síntesis de cDNA

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

## PCR en Tiempo Real (qPCR)

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

Tabla 3: Preparación de Master Mix para qPCR

|  | 1 Reacción  |
|--|-------------|
| Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green MM | 5µL         |
| Partidores (F+R) 1,5µM                 | 4µL         |
| Muestra (1:4)                          | 1µL         |
| <b>Total por reacción</b>              | <b>10mL</b> |

Tabla de reactivos para 1 reacción de qPCR

## Partidores

### Estandarización de partidores

Los partidores se estandarizaron con un mix de varios cDNA en distintas diluciones y usando distintos gradientes dependiendo del partidor, seleccionando la mejor temperatura en base a su

Tabla 4: Lista de Partidores

| Molécula      | Partidor | Secuencia                | Amplicón | T <sub>m</sub> |
|---------------|----------|--------------------------|----------|----------------|
| EF-1 $\alpha$ | Fw       | TGGAGACTGGCACCCTGAAG     |          | 58             |
|               | Rev      | CCAACATTGTCACCAGGCATGG   |          | 58             |
| IL-1 $\beta$  | Fw       | GTCACATTGCCAACCTCATCATCG |          |                |
|               | Rev      | GTTGAGCAGGTCCTTGTCTTGA   |          |                |
| TNF- $\alpha$ | Fw       | GTGTGGGGTCCTCTTAATAGCAGG |          |                |
|               | Rev      | CTGCATCGTTGACGGTCTTCC    |          |                |
| IFN- $\gamma$ | Fw       | GCTGTTCAACGGAAAACCTGTTT  |          |                |
|               | Rev      | TCACTGTCCTCAAACGTG       |          |                |
| iNOS          | Fw       | TATGCTCTGCCTGCCGTGTC     |          |                |
|               | Rev      | ATCCTGCGACCCACTTCCTC     |          |                |
| IL-12         | Fw       |                          |          |                |
|               | Rev      |                          |          |                |

Partidores utilizados para la amplificación de los genes en estudio.

curva patrón y de fusión.

Tabla 5: Programa Termociclador

| <b>Etap</b>            | <b>Temperatura</b>    | <b>Tiempo</b> | <b>Ciclos</b> |
|------------------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Denaturación Inicial   | 95°                   | 03:00 min     | 1             |
| Denaturación           | 95°                   | 00:10 seg     | 39            |
| Annealing en Gradiente | 62° → 52 <sup>†</sup> | 00:10 seg     | 39            |
| Extensión              | 60°                   | 00:10 seg     | 39            |

Programa termociclador usado para la estandarización de partidores. <sup>†</sup>*El gradiente varía dentro de esas temperaturas según los partidores*



## Extracción de Proteínas

Se agregó una pequeña cantidad de tejido pulverizado a 500 $\mu$ L de Buffer de Lisis (Tabla 6) 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 6: 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

## 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 purpura con el ion cuproso en un entorno básico, el cual se produce 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 (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  $\mu$ g/ $\mu$ L) y se leyeron en un lector espectrofotométrico de microplacas (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices) a 562nm.

## 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 mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gfp reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *107*(42), 18079–84.
- Ainsworth, A. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, *2*, 123–148.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *126*(3-4), 171–98.
- Athman, R., & Philpott, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, *7*(1), 25–32.
- Bengtén, E., Quiniou, S. M.-A., Stuge, T. B., Katagiri, T., Miller, N. W., Clem, L. W., ... Wilson, M. (2002). The IgH Locus of the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Contains Multiple Constant Region Gene Sequences: Different Genes Encode Heavy Chains of Membrane and Secreted IgD. *J. Immunol.*, *169*(5), 2488–2497.
- Bethke, J., Rojas, V., Berendsen, J., Cárdenas, C., Guzmán, F., Gallardo, J. A., & Mercado, L. (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *J. Fish Dis.*, *35*(5), 379–88.
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A. M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, *30*(2), 451–5.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.*, *15*, 749–95.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, *2*(10), 907–16.
- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., & Lee, L. E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, *25*(8-9), 853–873.
- Bricknell, I., & Dalmo, R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, *19*(5), 457–72.

- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M. P., Six, a, Benmansour, a, & Boudinot, P. (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 31(5), 644–54.
- Chang, C.-i., Pleguezuelos, O., Zhang, Y.-a., Zou, J., & Secombes, C. J. (2005). Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect. Immun.*, 73(8), 5053–64.
- Chang, C.-I., Zhang, Y.-A., Zou, J., Nie, P., & Secombes, C. J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1), 185–95.
- Chettri, J. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2013). Immunomodulation of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) fry by bath exposure to a  $\beta$ -glucan from *Euglena gracilis*. *Aquac. Res.*, 44(9), 1407–1415.
- Dalmo, R. a, & Bøgwald, J. (2008). Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.*, 25(4), 384–96.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11(5), 453–491.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9), 827–39.
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura - 2012* (p. 251).
- Fernández, A., Ruiz, I., & Blas, I. D. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Rev. Aquat.*, 16.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields' Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Georgiadis, M., Gardner, I., & Hedrick, R. (2001). The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev. Vet. Med.*, 48(4), 287–302.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–30.
- Graves, S. S., Evans, D. L., Cobb, D., & Dawe, D. L. (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 8(2), 293–302.
- Groot, C., & Margolis, L. (1991). *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press.
- Hong, S., Zou, J., Collet, B., Bols, N. C., & Secombes, C. J. (2004). Analysis and characterisation of IL-1beta processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.*, 16(3), 453–9.
- 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. *Mol. Immunol.*, 43(10), 1519–33.

- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(4), 338–44.
- Kumari, J., & Sahoo, P. K. (2006). Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 70(1-2), 63–70.
- Kühlwein, H., Merrifield, D. L., Rawling, M. D., Foey, a D., & Davies, S. J. (2014). Effects of dietary  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 98(2), 279–89.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., & Luo, L. (2011). Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). *Fish Shellfish Immunol.*, 31(6), 788–94.
- Lokesh, J., Fernandes, J. M. O., Korsnes, K., Bergh, O., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2012). Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or  $\beta$ -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(3), 626–31.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 323–50.
- Maier, V. H., Dorn, K. V., Gudmundsdottir, B. K., & Gudmundsson, G. H. (2008). Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Mol. Immunol.*, 45(14), 3723–30.
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S. H., & Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electron. J. Biotechnol.*, 8(3), 284–290.
- Narváez, E., Berendsen, J., Guzmán, F., Gallardo, J. a, & Mercado, L. (2010). An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(1), 235–9.
- 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. *Mol. Immunol.*, 44(9), 2277–91.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2).
- Palić, D., Beck, L. S., Palić, J., & Andreassen, C. B. (2011). Use of rapid cytochemical staining to characterize fish blood granulocytes in species of special concern and determine potential for function testing. *Fish Shellfish Immunol.*, 30(2), 646–52.
- Peddie, S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86(1-2), 101–113.

- Razquin, B. E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., & Villena, A. J. (1990). Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, 36(2), 159–173.
- 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 $\beta$  processing in a teleost fish. *PLoS One*, 7(11), e50450.
- Rodríguez, I., Chamorro, R., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, 27(2), 369–73.
- Rojas, V., Guzman, F., & Morales-lange, B. (2012). Immunological strategy for detecting the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in salmonids. *Electron. J. Biotechnol.*, 15.
- Rondon-Barragan, I. (2010). Receptores similares a Toll en peces : el inicio de la divergencia. *Investig. Vet.*, 11(1), 15–30.
- Salazar-Mather, T., & Hokeness, K. (2006). Cytokine and Chemokine Networks: Pathways to Antiviral Defense. In T. E. Lane (ed.), *Chemokines Viral Infect.* (Vol. 303, pp. 29–46). Springer Berlin Heidelberg.
- Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., & Guzmán, F. (2012). Anti-peptide antibodies : A tool for detecting IL-8 in salmonids, 15.
- Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*, 1(1), 89–101.
- Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12), 1336–45.
- Sernapesca. (2012). Anuario desembarques. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50(3), 229–243.
- Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., & Buchmann, K. (2012). Immunomodulatory effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(1), 111–20.
- 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. *Anal. Biochem.*, 150(1), 76–85.
- Subpesca. (2013). Cuenta Pública de Estado de los Recursos. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- 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 Immunol.*, 34(1), 393–6.

- 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 Immunol.*, 30(1), 340–6.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol. Behav.*, 94(2), 276–84.
- 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 Immunol.*, 16(3), 335–58.
- Wang, W.-S., Hung, S.-W., Lin, Y.-H., Tu, C.-Y., Wong, M.-L., Chiou, S.-H., & Shieh, M.-T. (2007). The effects of five different glycans on innate immune responses by phagocytes of hybrid tilapia and Japanese eels *Anguilla japonica*. *J. Aquat. Anim. Health*, 19(1), 49–59.
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(6), 1127–51.
- Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol.*, 5(10), 905–17.
- Wu, F., Tyml, K., & Wilson, J. X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 217(1), 207–14.
- Yang, K., Zhang, S., Chen, D., Zhang, A., Wang, X., & Zhou, H. (2013). IFN- $\gamma$ -activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(5), 1635–41.
- 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.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–95.
- Zhang, L., Li, Y.-y., Chen, T., Xia, W., Zhou, Y., Wan, Y.-j., ... Xu, S.-q. (2011). Abnormal development of motor neurons in perfluorooctane sulphonate exposed zebrafish embryos. *Ecotoxicology*, 20(4), 643–52.
- Zhang, L., Zhang, B.-C., & Hu, Y.-H. (2014). Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: identification, expression, and effect on bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.*
- Zhang, Z., Swain, T., Børgwald, 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 Immunol.*, 26(5), 677–84.
- Zhao, K., Huang, Z., Lu, H., Zhou, J., & Wei, T. (2010). Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Biosci. Rep.*, 30(4), 233–41.

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

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*. *Dev. Comp. Immunol.*, 27(9), 813–822.