



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Tejido branquial de *Oncorhynchus mykiss* como modelo de evaluación del efecto
inmunomodulador del β -glucano *Zymosan* liberado en dieta**

Proyecto de tesis presentado como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAGÍSTER 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
Diciembre, 2014

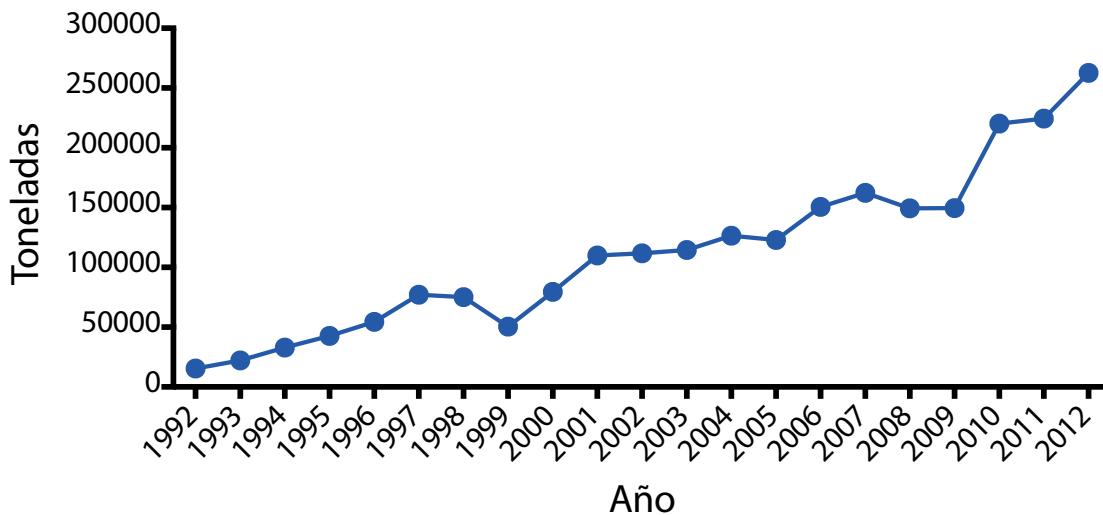


Figura 1.2: Desembarques de Trucha arcoíris en Chile

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; Zwollo et al., 2014). Estas enfermedades, cualquiera sea su origen, pueden tener un alto impacto negativo en la producción mundial, lo que equivale a grandes pérdidas económicas (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 y a diferencia de lo observado en vertebrados superiores, se puede entender como una inmunidad ancestral, en el cual el protagonismo lo tiene principalmente la respuesta innata o inespecífica y en menor grado una respuesta adaptativa o específica (Olabuenaga, 2000; Fernández et al., 2002; Buchmann, 2014). 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, al igual que en vertebrados superiores, en esta respuesta convergen factores humorales y celulares (Reyes Cerpa et al., 2012; Zhu et al., 2012). El sistema inmune tiene que ser efectivo en distinguir “lo propio” de lo “no propio” y así poder combatir los patógenos (Athman y Philpott, 2004). Los receptores de reconocimiento

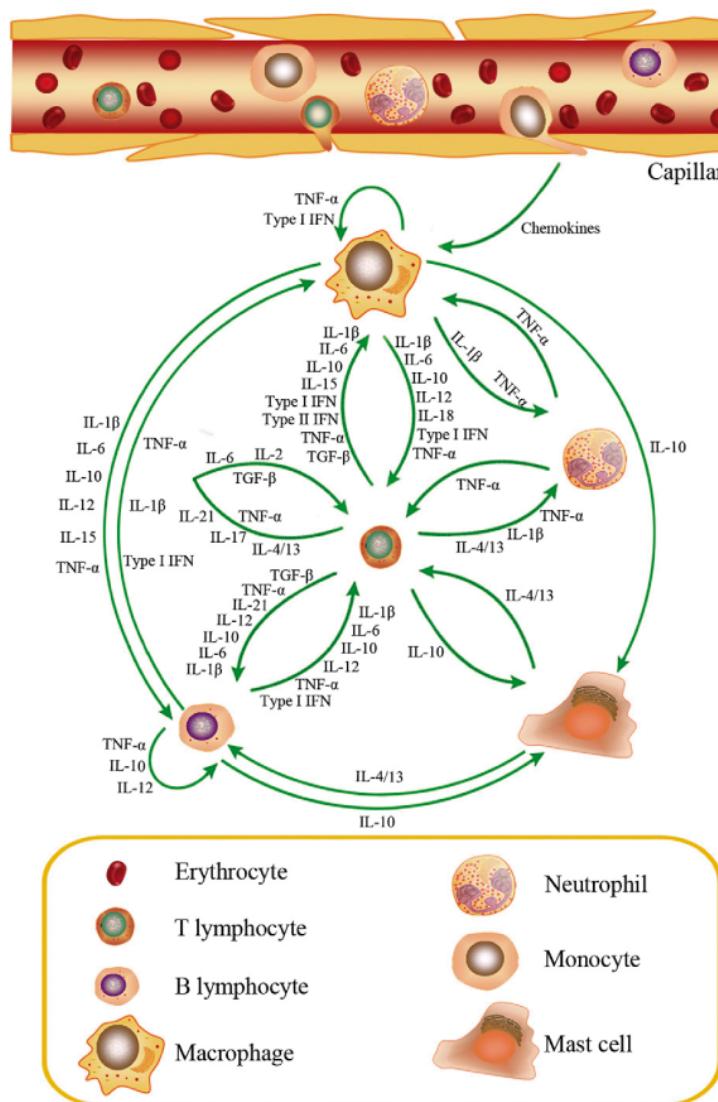


Figura 1.3: Representación esquemática de las redes de citoquinas conocidas, involucradas en la regulación de funciones celulares en los peces, incluyendo la diferenciación, proliferación, supervivencia o apoptosis celular, y numerosas expresiones génicas. Tomada de Zhu et al., 2012

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 y macrófagos, 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 inmunológicas, regulando la inflamación y la respuesta inmune celular (Zou et al., 2003b; Wang et al., 2004; Teles et al., 2011). Promueve la necrosis hemorrágica de tumores, así

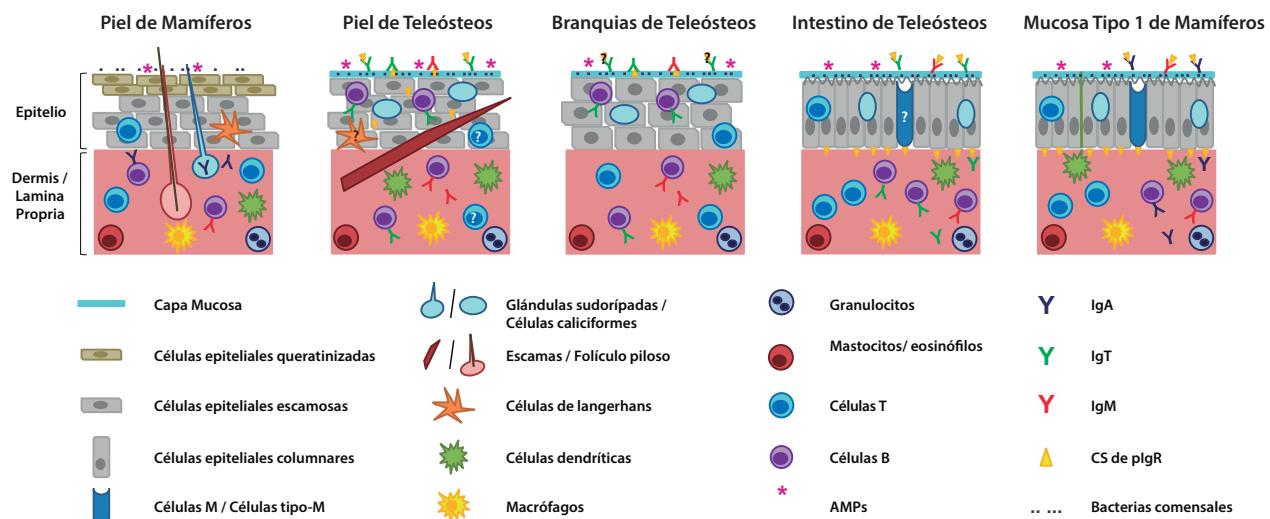


Figura 1.4: Representación esquemática de las similitudes y diferencias entre las superficies mucosas de teleósteos como piel, intestino y branquias y de mamíferos como piel y mucosa de tipo 1. Adaptado y traducido desde Gómez et al., 2013

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 placas de Peyer, así como también células M como tal o la inmunoglobulina A secretada ($_{\text{sec}}\text{IgA}$, por sus siglas en inglés) todavía no han sido descritas en peces (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 (Figura. 1.4).

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 (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 (Mulero et al., 2008), componentes de la respuesta adaptativa como células B y T (Scapigliati et al., 1999; Santos et al., 2001; Salinas et al., 2011), así como también e una alta expresión de los genes

4 Materiales y Métodos

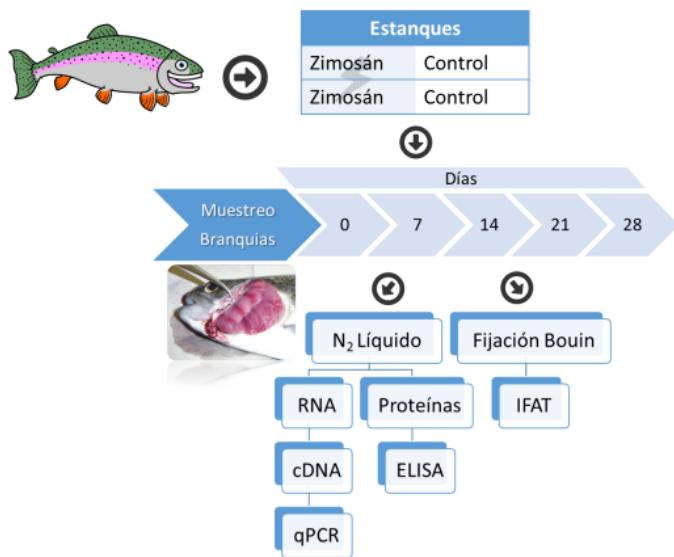


Figura 4.1: Esquema general de trabajo

4.1. Material Biológico y Bio-ensayo

4.1.1. Peces

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

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).

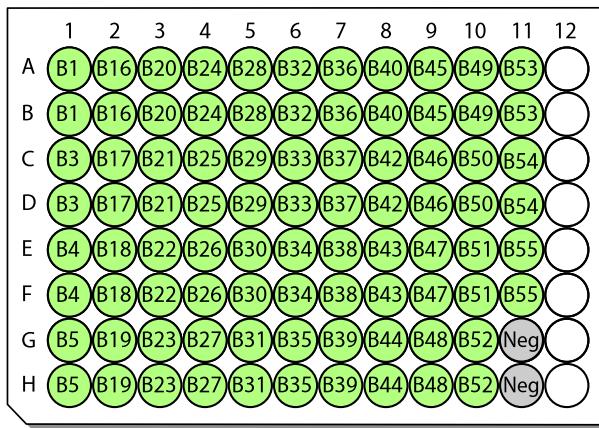


Figura 4.2: Diseño de placa para PCR en tiempo real

4.5.1. Estandarización de partidores

Tabla 4.3: 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

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 (1 μ L en total), por cada partidor, luego el software CFX Manager (Bio-Rad) entregó las informaciones

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

5.1. Bio-ensayo

Se implementó el sistema de alimentación para las truchas arcoíris en el CIAC, donde se contó con 2 módulos de 3 estanques cada uno, dos de los cuales fueron destinados a la alimentación con la dieta suplementada con Zymosan (estanques 2 y 5) y otros dos a la dieta control (estanques 3 y 6) (Figura A.1).

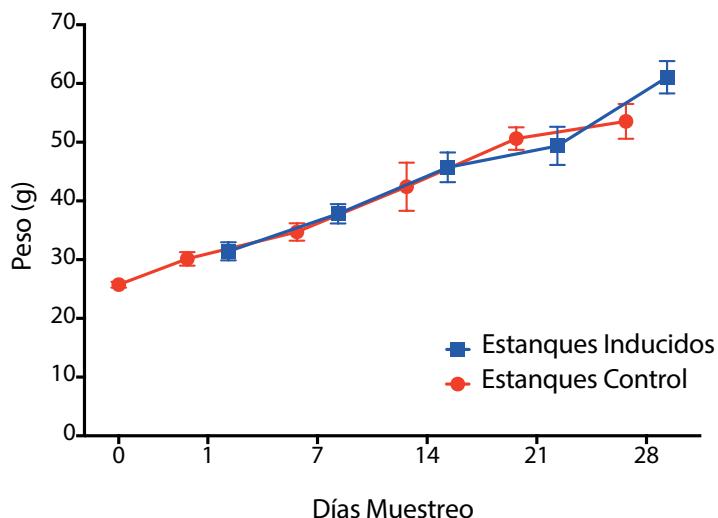
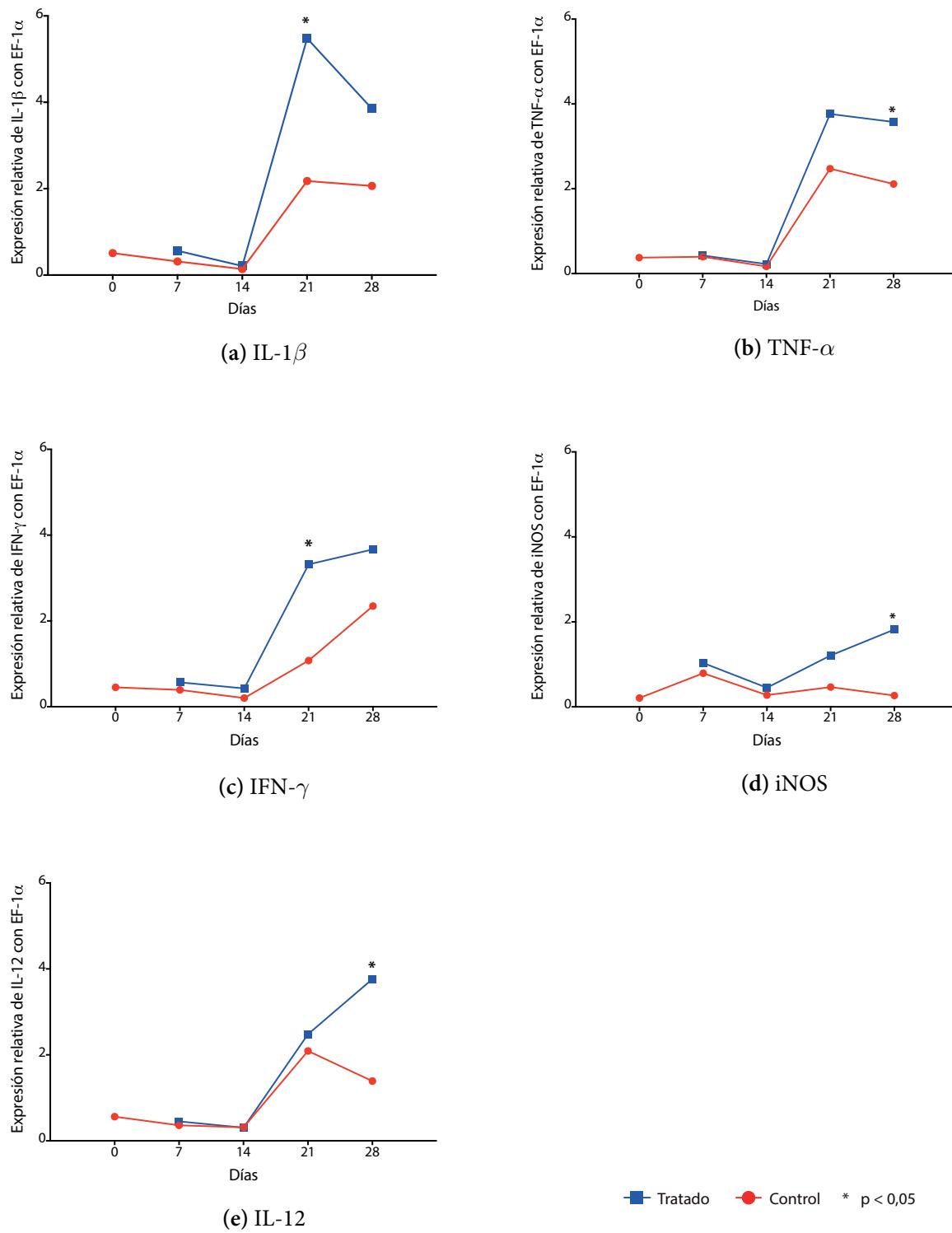


Figura 5.1: Crecimiento promedio de truchas en estudio

No se observó ningún cambio significativo entre los pesos registrados para la dieta control y la dieta suplementada con Zymosan (Figura 5.1), lo que indica que este β -glucano no genera un crecimiento a nivel de masa muscular comparado con el grupo sin tratamiento.

Figura 5.3: Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α

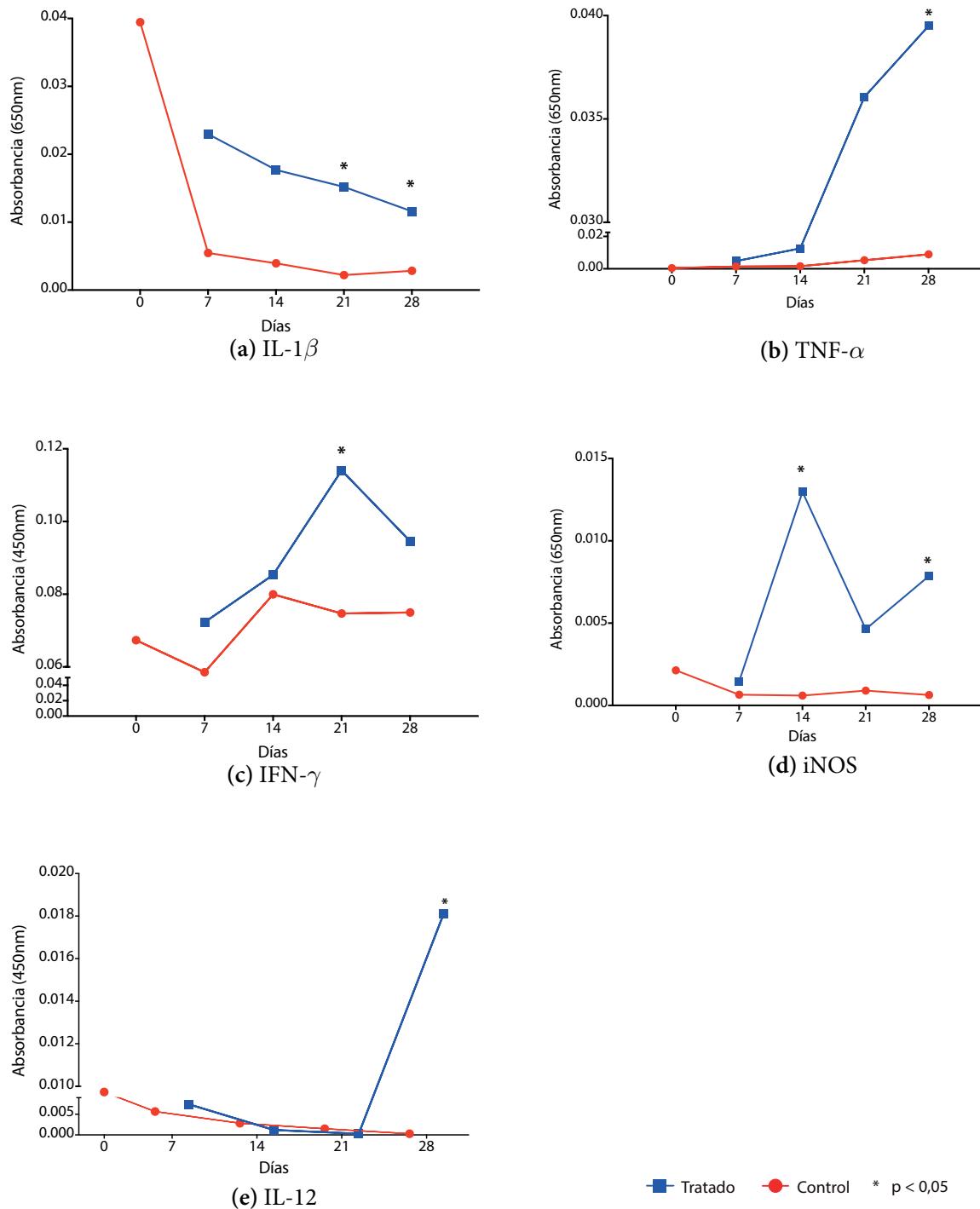


Figura 5.6: Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio

El día con mayor disponibilidad de las proteínas en estudio fue el día 28, donde TNF- α , IL-1 β , iNOS e IL-12 aumentaron su disponibilidad con respecto a sus controles sin tratamiento, mientras que el

5.8. Tinción Hematoxilina-eosina

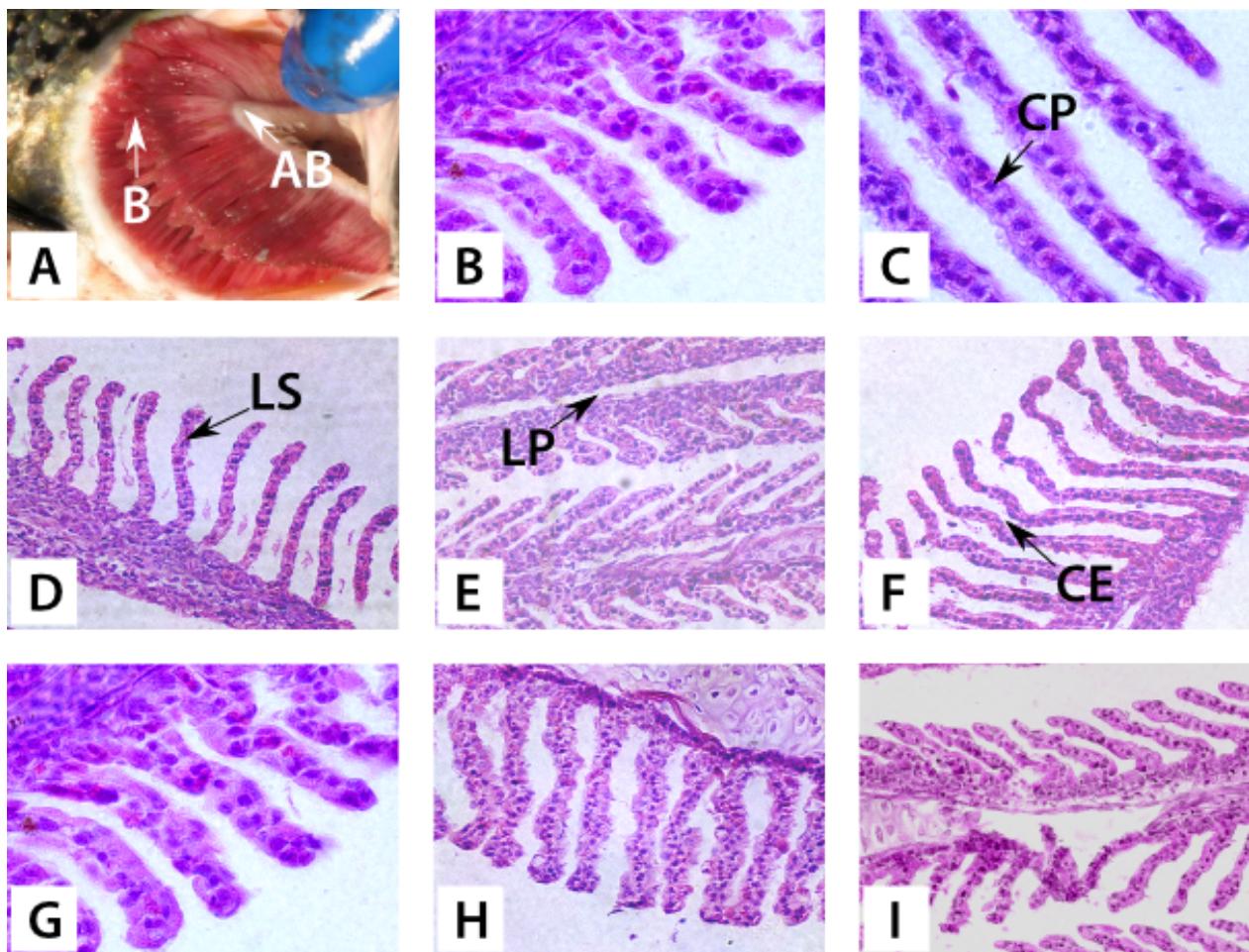


Figura 5.7: Microfotografías de branquias de trucha arcoíris con tinción Hematoxilina-eosina: A) Opérculo abierto exponiendo las branquias a extraer; B,C) Día 0; D) Día 14 Control; E) Día 14 Tratado; F) Día 21 Control; G) Día 21 Tratado; H) Día 28 Control; I) Día 28 Tratado. AB = Arco Branquial, B = 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 5.7). La branquia se observa completa, sin su arco branquial, demostrando una consistencia entre sus laminillas primarias y secundarias (Figura 5.7 D,E), así como también la presencia de células pilares (Figura 5.7 C) y células epiteliales (Figura 5.7 F).

5.9. Inmunofluorescencia

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

TNF- α

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria las cuales mostraban producción de TNF- α (Figura 5.8).

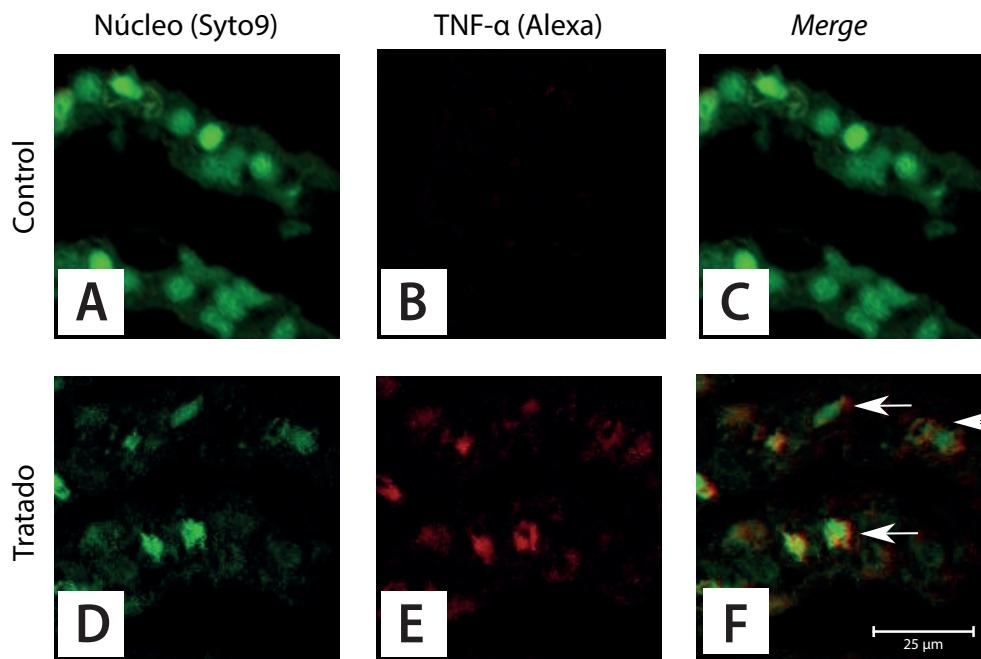


Figura 5.8: Microscopía confocal para TNF- α en cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris tratadas con Zymosan A liberado en dieta: A) Control con tinción SYTO9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción SYTO9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

IFN- γ

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria, las cuales mostraban producción de interferón gamma (Figura 5.9).

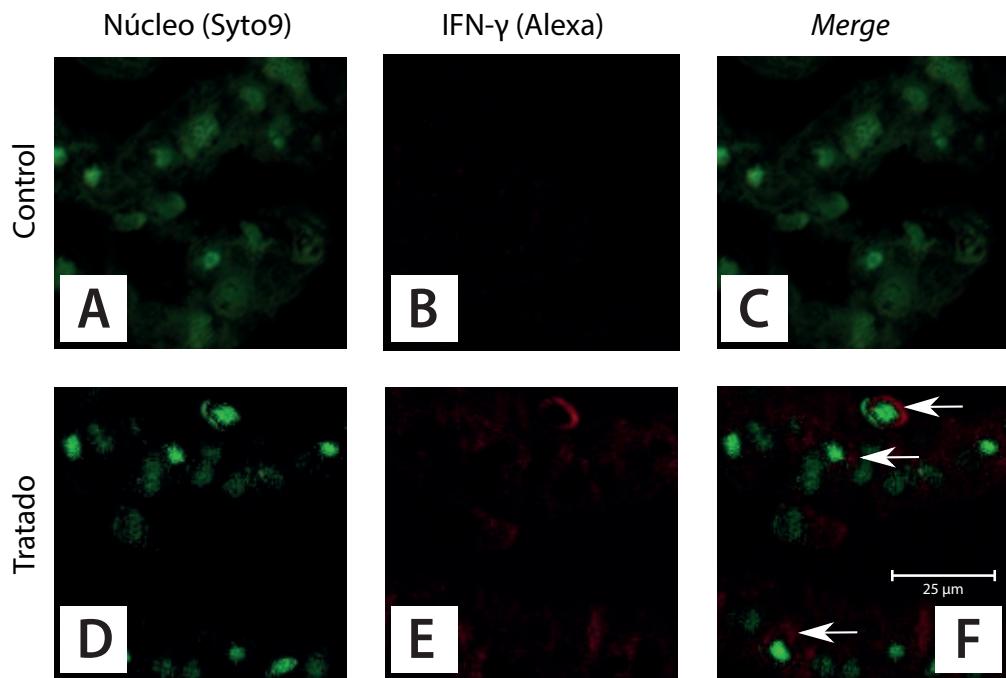


Figura 5.9: Microscopía confocal para IFN- γ en cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris tratadas con Zymosan A liberado en dieta: A) Control con tinción SYTO9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción SYTO9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

IL-1 β

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria, las cuales mostraban producción de IL-1 β (Figura 5.10).

iNOS

Se observa un marcaje positivo para la producción de iNOS en células de la laminilla secundaria (Figura 5.11).

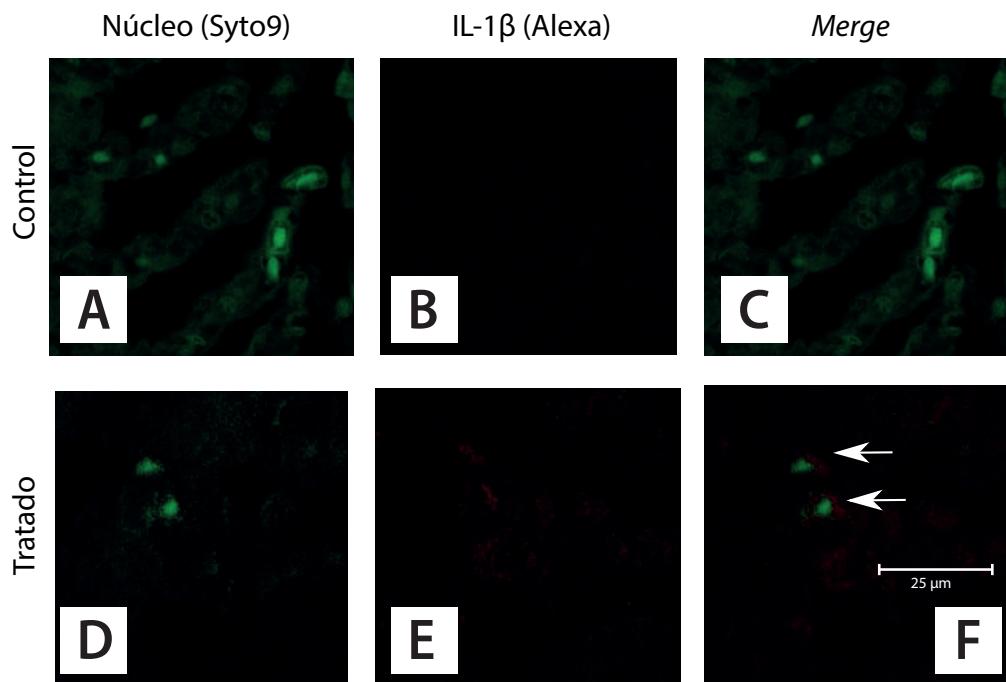


Figura 5.10: Microscopía confocal para IL-1 β en cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris tratadas con Zymosan A liberado en dieta: A) Control con tinción SYTO9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción SYTO9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

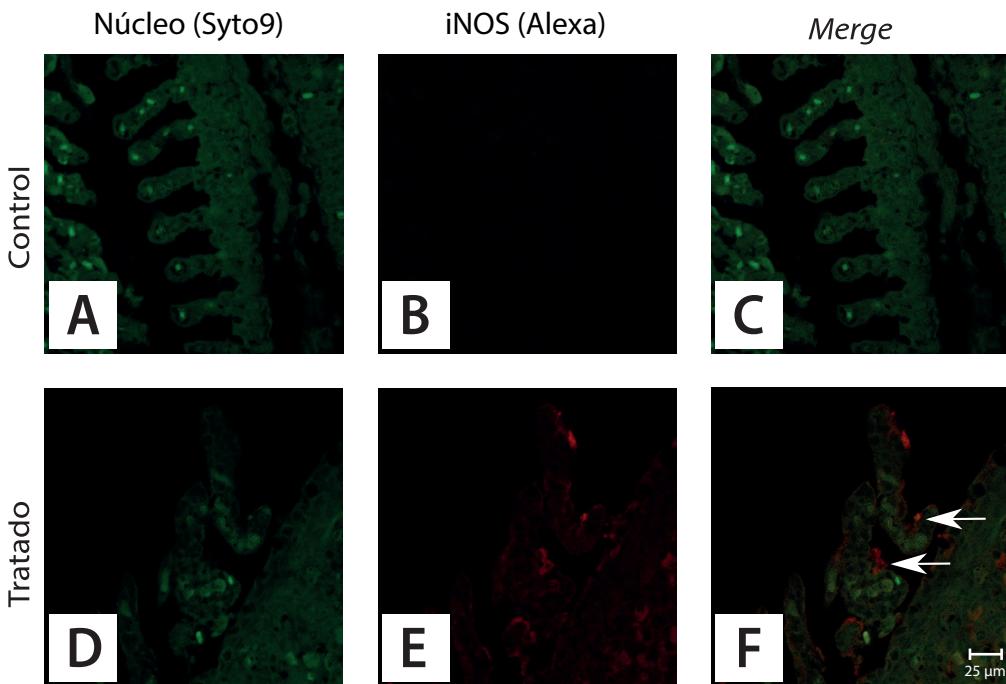


Figura 5.11: Microscopía confocal para iNOS en cortes histológicos de branquias de trucha arcoíris tratadas con Zymosan A liberado en dieta: A) Control con tinción SYTO9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción SYTO9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

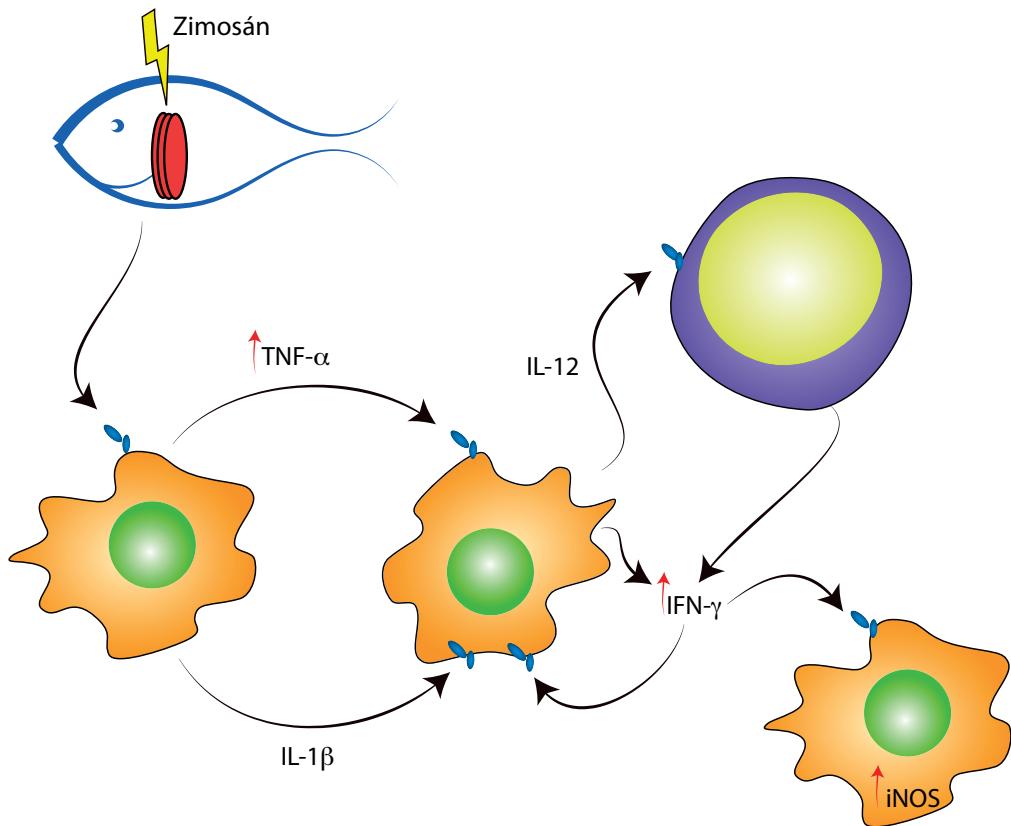


Figura 7.1: Modelo molecular propuesto de respuesta inmune: Generado a partir de los resultados obtenidos en tejido branquial de truchas arcoíris tratadas con *Zymosan A* liberado en dieta, inmunoestimulante que llegaría a su receptor (β -glucano?, Dectin-1 like?), el cual generaría la cascada de señalización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

A Centro de investigaciones en acuicultura Curauma

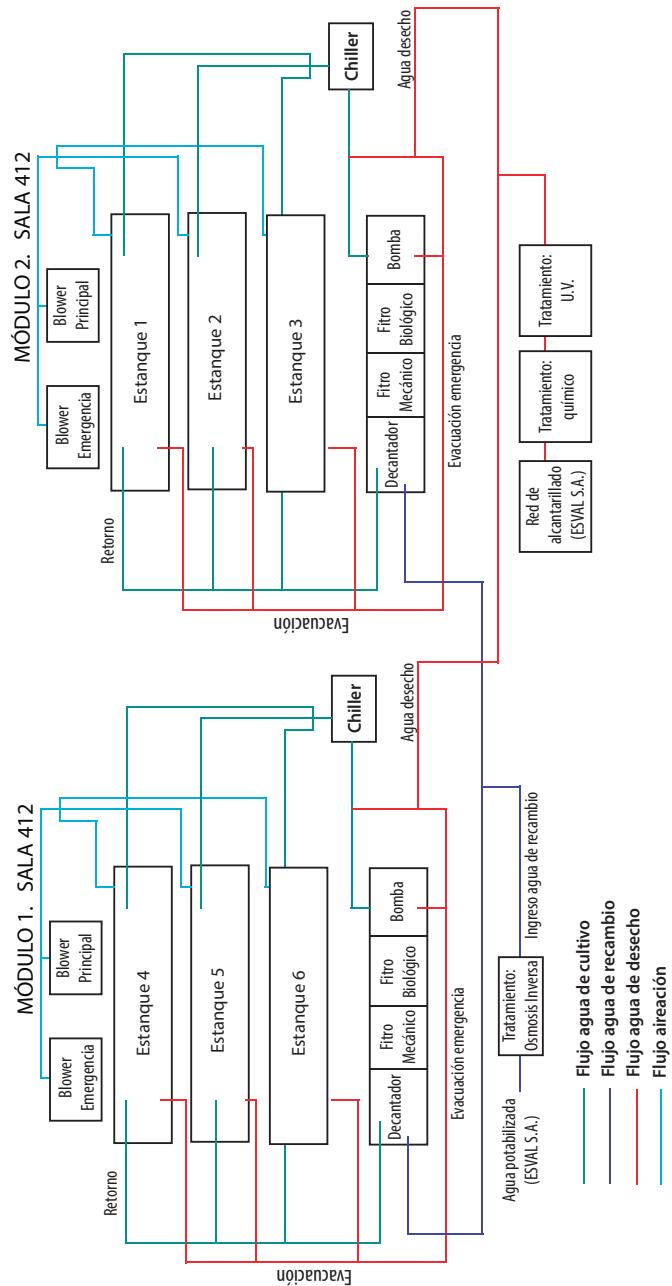


Figura A.1: Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma