



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 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
Octubre, 2014

Resumen

La pérdida 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 de peces, para así, poder generar tecnología que pueda sobreponerse a estos paradigmas. Esto tiene suma importancia sobretodo en la industria acuícola, la cual produce anualmente, 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 son exclusivamente destinadas a consumo humano. Esto demuestra el potencial presente en esta industria, la que se ve año a año afectada por mortalidades debidas a la perdida del equilibrio antes mencionado, generándose cuantiosas pérdidas a nivel comercial.

Los inmunoestimulantes han surgido como una opción viable, escalable y económica para solventar parte de los problemas de la acuicultura, fortaleciendo, en distintos estadios de desarrollo, la capacidad de respuesta inmune de los organismos cultivados. No obstante existen distintas estrategias de inducción de la inmunomodulación, como por ejemplo vacunas, suspensión oral y liberación en el alimento, entre otras.

La liberación en dieta es una estrategia que ha demostrado ser una opción viable y no invasiva para la entrega de vacunas o inmunomoduladores. Un tema crucial es establecer la evaluación del efecto modulador de los inmunoestimulantes.

La inmunidad de mucosas en teleósteos ha sido recientemente objeto de investigación en los últimos años, debido a su diversidad y características. Las branquias de los peces son, en término de superficie expuesta, el mayor tejido en muchas especies de telósteos, 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. Existen antecedentes de la presencia células relacionadas con la respuesta inmune, como macrófagos, granulocitos, y linfocitos B y T, evidenciando el potencial de este órgano para evaluar el efecto de moléculas inmunomoduladoras y su efecto en la ingesta del pez.

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 arcoíris. Durante 28 días de tratamiento muestras de tejido branquial fueron obtenidas para evaluar la capacidad de respuesta inmune que refleja el organismo con este inmunoestimulante en su dieta. La capacidad

de respuesta inmune fue cuantificada y caracterizada considerando la expresión y disponibilidad de moléculas reguladoras y efectoras de inmunidad. Por su rol en la respuesta inmune los marcadores seleccionados a estudiar fueron: TNF- α , IL-1 β , IL-1 β , IL-12, IFN- γ e iNOS. Mediante ensayos de PCR en tiempo real se pudo evaluar que la respuesta reflejada a la inducción por este β -glucano empieza a levantarse con respecto a los controles con dieta sin inmunoestimulante pasado el día 14 del estudio y se mantiene hasta el día 28 en la mayoría de los casos. Teniendo en común estas fechas para todos los marcadores evaluados.

La disponibilidad de estas moléculas fue evaluada mediante ELISA indirecto, obteniendo resultados de aumento de esta a partir del día 21 de muestra. Mediante inmunohistoquímica de fluorescencia en el propio tejido, se comprobó que el incremento de la actividad transcripcional se corresponde posteriormente con la disponibilidad tisular de las moléculas.

De esta forma con los datos obtenidos se generó una matriz de correlación donde se pudo determinar que la inmunoestimulación vía dieta con *Zimosán A* puede ser evaluada a partir de la tercera semana de alimentación en base a parámetros de cuantificación, tanto a nivel transcripcional como de proteínas, especialmente en el pro-inflamatorio TNF- α y el activador de macrófagos IFN- γ .

Las herramientas generadas en esta tesis son un gran aporte para mejorar los análisis de campo, usando un método de entrega de inmunoestimulantes no invasivo y estableciendo los marcadores y los tiempos para evaluar la respuesta inmune de los peces en cultivo.

Abstract

Oncorhynchus mykiss gill tissue as a model to evaluate the immunomodulatory effect of β - glucan Zymosan supplemented diets.

The loss of balance between Environment \leftrightarrow Pathogen \leftrightarrow Host is one of the main causes of fish diseases in the global aquaculture. Because of this, a comprehensive understanding of the fish immune system is required to generate new approaches that can overcome this paradigm. This is especially important in the fish farming industry, which produces annually 158 million tons of fish equals to approximately 217,500 million dollars. Furthermore, 136 million tons of this global production is exclusively focused on human consumption. This demonstrates the importance of this industry and the need of controlling the massive losses of commercial and human capital because fish mortalities.

Immunostimulants have emerged as viable, scalable and economical option to solve in part the problems of aquaculture, strengthening the immune response of farmed species at different stages of development. . Several strategies for inducing immunomodulation, such as vaccines, exposure to immunostimulants baths, inclusion of immunostimulants in the food, among others, are currently available.

The inclusion of immunostimulants diets is a strategy that has been proven to be a viable option for non-invasive delivery. A crucial fact on this subject is to establish the proper evaluation of the immunomodulatory effect.

Mucosal immunity has recently been considered to be fundamental in teleost because its diversity and features. The gills of fish are the largest tissue in many teleost species in terms of exposed surface,. This organ has a central role in the maintenance of the homeostasis of the fish because the intake of nutrients and substances function and by forming an active barrier against pathogen entry. Several studies showed the existence of related immune cells, such as macrophages, granulocytes and lymphocytes B and T in the gills, showing the potential of this organ to assess the effect of immunomodulatory molecules and their intake effect on fish.

In this study we evaluated the immune response in the gill tissue of rainbow trout fed with 0.3 % zymosan-supplemented diet. Gills were dissected at 0, 7, 14, 21 and 28 days during the experimental trial to assessed the expression of different regulatory and effector immune molecules. Because their central role in the immune response, the regulators and effectors immune molecules were : TNF- α ,

IL-1 β , IL-12, IFN- γ and iNOS. Results on the gene expression by qPCR showed that the expression of several immune genes to the zymosan supplemented diet increase after 14 days of treatment, which is maintained until day 28 in most of the cases. The availability of these molecules at the protein level was observed from day 21 by indirect ELISA. Through immunohistochemical fluorescence analysis in the gill tissue, it was found that the increase in transcriptional activity of the pro-inflammatory TNF- α and the macrophage activator IFN- γ was correlated with the availability of the protein.

Finally, , a correlation matrix was generated with the obtained data. It was determined that the oral immunostimulation with a Zymosan A supplemented diet can be evaluated from the third week of feeding using quantification parameters, either at the transcriptional level as well as availability of proteins, for TNF- α and IFN- γ .

The tools generated in this study are a great contribution to improve the analysis of the immunostimulatory effects of supplemented diets in fish. We succeed in establishing a non-invasive method of delivery of immunostimulants determining immune response markers and the precise time points to evaluate the immunomodulation in the rainbow trout

Índice general

Resumen	I
Abstract	III
Índice general	v
Lista de abreviaturas	IX
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xiii
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 de mucosas	9
1.3.1. Inmunidad Branquial	10
1.4. Inmunomoduladores	11
1.4.1. β -glucanos	11
2. Hipótesis	14
3. Objetivo General	15
3.1. Objetivos Específicos	15

4. Materiales y Métodos	16
4.1. Material Biológico y Bioensayo	16
4.1.1. Peces	16
4.1.2. Dieta	17
4.1.3. Parametros fisicoquímicos del ensayo	17
4.1.4. Anticuerpos	17
4.2. Desafío y Controles	18
4.3. Muestreo	18
4.4. Extracción de RNA	20
4.4.1. Cuantificación e Integridad de RNA	20
4.4.2. Sintesis de cDNA	20
4.5. PCR en Tiempo Real (qPCR)	20
4.5.1. Estandarización de partidores	21
4.5.2. Master Mix para cada reacción	22
4.5.3. Cuantificación relativa	22
4.6. Extracción de Proteínas	24
4.6.1. Cuantificación de Proteínas	24
4.7. ELISA Indirecto	25
4.7.1. Activación de la placa	25
4.7.2. Bloqueo de sitios inespecíficos	25
4.7.3. Incubación primer anticuerpo	25
4.7.4. Incubación segundo anticuerpo y revelado	25
4.7.5. Validación de anticuerpos	26
4.8. Cortes histológicos	26
4.8.1. Tinción Hematoxilina-eosina	26
4.9. Inmunofluorescencia	27
4.9.1. Desparafinización e Hidratación	27
4.9.2. Bloqueo	27

4.9.3. Incubación de anticuerpo primario	27
4.9.4. Incubación anticuerpo secundario y tinción de DNA (Núcleos)	27
4.9.5. Montaje	28
4.10. Microscopía Confocal	28
4.11. Análisis Estadístico	28
4.11.1. Coeficiente de correlación de Pearson (R)	28
5. Resultados	29
5.1. Bioensayo	30
5.2. Extracción y Cuantificación de RNA	32
5.3. Estandarización de Partidores	32
5.3.1. EF-1 α	32
5.3.2. IL-12	32
5.3.3. TNF- α	33
5.3.4. IFN- γ	33
5.3.5. IL-1 β	34
5.3.6. iNOS	34
5.4. PCR en tiempo real	35
5.4.1. TNF- α	35
5.4.2. IFN- γ	36
5.4.3. IL-1 β	37
5.4.4. iNOS	37
5.4.5. IL-12	37
5.4.6. Síntesis comparada del estudio	37
5.5. Extracción y Cuantificación de Proteínas	38
5.6. Validación de anticuerpos	38
5.6.1. Anticuerpos producidos en conejo	38
5.6.2. Anticuerpos producidos en ratón	39

5.7. ELISAs Indirectos	39
5.7.1. TNF- α	39
5.7.2. IFN- γ	40
5.7.3. IL-1 β	41
5.7.4. iNOS	41
5.7.5. IL-12	41
5.7.6. Síntesis comparada del estudio	41
5.8. Tinción Hematoxilina-eosina	43
5.9. Inmunofluorescencia	44
5.9.1. TNF- α	44
5.9.2. IFN- γ	44
5.9.3. IL-1 β	45
5.9.4. iNOS	45
5.10. Correlación	47
6. Discusion	48
7. Conclusiones	51
8. Bibliografía	53

Lista de abreviaturas

BSA *Bovine albumine serum*, Albúmina de suero bovino

cDNA DNA complementario

CIAC Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma

DNA *Deoxyribonucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico

ELISA *Enzyme linked immuno-sorbent assay*, Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GIALT *Gill associated lymphoid tissue*, Tejido linfoide asociado a branquias

IFAT *Immunofluorescence antibody test*, Prueba de inmunofluorescencia con anticuerpos

IFN- γ Interferón gama

IL Interleuquina

IL-12 Interleuquina 12

IL-1 β Interleuquina 1-beta

MQ *Milli-q*

NK Natural Killer

NKEF *Natural-Killer Enhancing Factor*, Factor potenciador de células NK

OM *Oncorhynchus mykiss*

PBS *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato salino

PCR *Polimerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR (*semi*)Quantitative PCR, PCR Cuantitativa

RNA *Ribonucleic Acid*, Ácido ribonucleico

RT Retrotranscripción

SDS *Sodium dodecyl sulfate*, Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE *SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis*

TMB 3,3'-5,5'-tetrametillbencidine

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

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 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	6
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 Gomez et al., 2013	10
4.1.	Esquema general de trabajo	16
4.2.	Diseño de placa para PCR en tiempo real	21
5.1.	Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma	30
5.2.	Crecimiento promedio de truchas en estudio	31
5.3.	Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α	33
5.4.	Curvas de estandarización del partidor para IL-12	33
5.5.	Curvas de estandarización del partidor para TNF- α	33
5.6.	Curvas de estandarización del partidor para IFN- γ	34
5.7.	Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β	34
5.8.	Curvas de estandarización del partidor para iNOS	34
5.9.	Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1a	35
5.10.	Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α	36
5.11.	Curva de calibrado BCA	38

5.12. Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto	40
5.13. Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio	42
5.14. Microfotografías de branquias de trucha arcoiris	43
5.15. Microscopía Confocal para TNF- α	44
5.16. Microscopía Confocal para IFN- γ	45
5.17. Microscopía Confocal para IL-1 β	46
5.18. Microscopía Confocal para iNOS	46
7.1. Modelo molecular propuesto de respuesta inmune	52

Índice de tablas

1.1. Receptores de reconocimiento de patrones en Mamíferos y sus análogos en Teleósteos	4
1.2. PAMPs y los patógenos que los producen	5
1.3. Interleuquinas de peces	7
1.4. Estructuras de β -Glucanos según su origen	11
1.5. Efectos inmunomoduladores de β -glucanos en peces	12
4.1. Lista de Anticuerpos Usados	17
4.2. Lista de Anticuerpos Comerciales Usados	18
4.3. Identificantes de muestras	19
4.4. Lista de Partidores	21
4.5. Programa Termociclador para estandarización de Partidores	22
4.6. Preparación de Master Mix para qPCR	22
4.7. Composición Buffer de Lisis	24
5.1. Concentraciones de RNA total extraído	32
5.2. Síntesis: Temperaturas de annealing estandarizadas para cada partidor	35
5.3. Concentraciones de Proteínas totales extraídas	39
5.4. Matrices de correlación de las moléculas en estudio	47
5.6. Correlación de Pearson para una misma molécula y distintos ensayos	47

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*, *O. nerka* (salmón rojo), *O. gorbuscha* (salmón rosado), *O. tshawytscha* (salmón chinook), *O. kisutch* (salmón coho), entre otros. Se distribuyen principalmente por una vasta zona que comprende desde California hasta el mar de Behring y el océano ártico (Groot y Margolis, 1991; Lucas y Southgate, 2012).

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 sólo 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 y el salmón chinook como representantes de este género.

La trucha arcoiris, descrita inicialmente por Walbaum en 1792 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* (Fornshell, 2002; Pulcini et al., 2013).

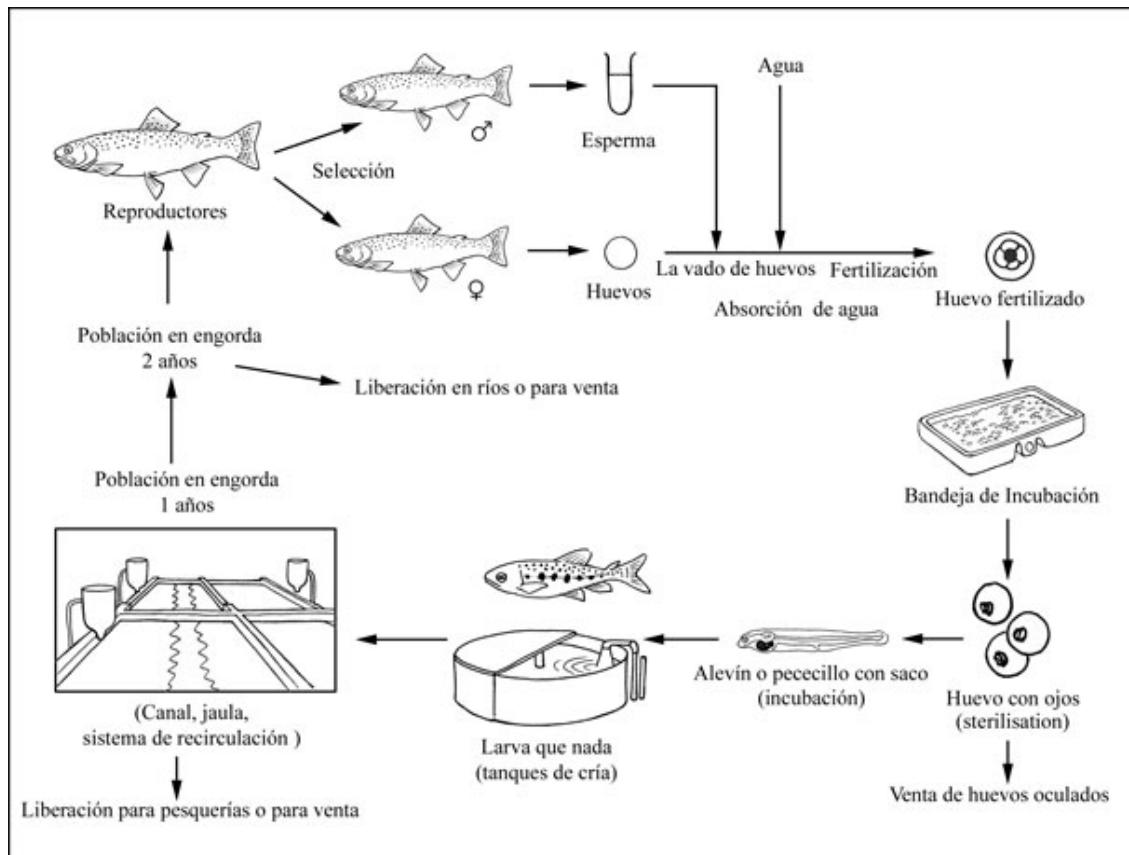


Figura 1.1: Ciclo productivo de la trucha arcoiris

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).

Los sistemas de cultivo, debido al crecimiento acelerado de la producción enfrentan diferentes proble-

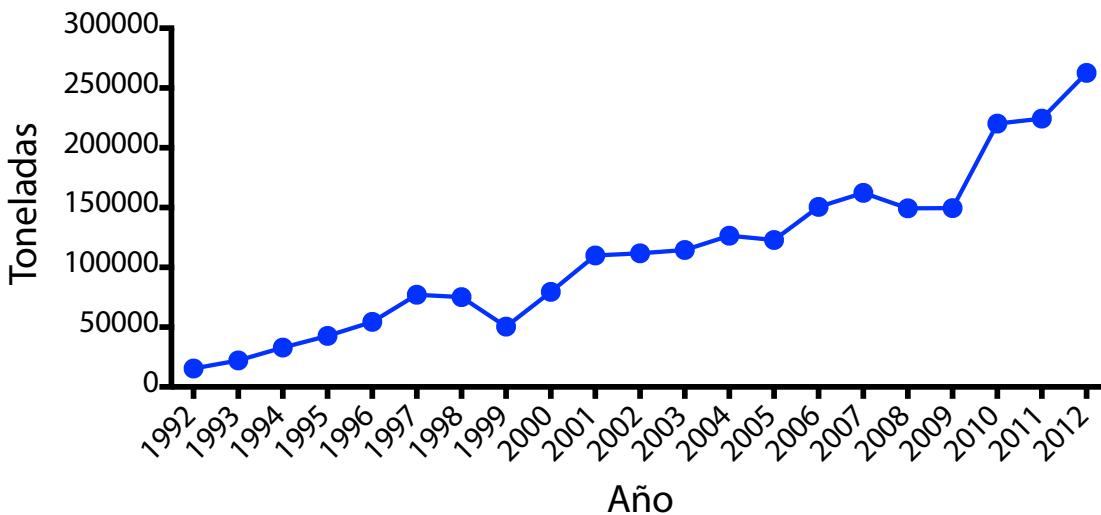


Figura 1.2: Desembarques de Trucha arcoiris en Chile

mas, 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, 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 (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 de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) de macrofagos, neutrofilos y células dendríticas reconocen moléculas simples y patrones regulares de estructuras moleculares conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés),

las cuales son moléculas exógenas producidos solo por patógenos potenciales (Medzhitov y Janeway, 2000; Gordon, 2002; Kawai y Akira, 2010). Estos PRR reconocen estructuras como oligosacáridos ricos en manosa, peptidoglicanos y lipopolisacaridos en la pared celular bacteriana, así como también DNA CpG no metilado, los que son comunes entre los patógenos y han sido conservados durante la evolución (Roach et al., 2005).

Los PRR tienen distintas funciones: estimular la ingestión y digestión de los patógenos que reconocen, guiar las células al sitio de infección e inducir la producción de moléculas efectoras, y se han encontrado varios análogos de PRR de mamíferos en teleósteos y podemos encontrar receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), lectinas que unen manosas (MBL, por sus siglas en inglés), receptores del complemento, proteína C-reactiva, Dectina-1, entre otros (Rondon-Barragan, 2010; Zhang et al., 2014a). (Tabla 1.1)

Tabla 1.1: Receptores de reconocimiento de patrones en Mamíferos y sus análogos en Teleósteos

Familia	Taxón	Miembros	Referencia
TLRs	Mamíferos	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12, TLR13	Jault et al., 2004 Roach et al., 2005 M. S. Lee y Kim, 2007
	Peces Teleósteos	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, sTLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TLR14, TLR21, TLR22, TLR23	
Lectinas	Mamíferos	MBL, Intelectina, Pentraxinas, Dectina-1	Russell y Lumsden, 2005 M. S. Lee y Kim, 2007
	Peces Teleósteos	MBL, Intelectina, Pentraxinas	
Receptores del complemento	Mamíferos	CR3 y CR4 (Integrinas), C5aR	Boshra et al., 2004 M. S. Lee y Kim, 2007
	Peces Teleósteos	CD18 (Cadena β de CR3 y CR4), C5aR	
NLRs	Mamíferos	NOD1, NOD2, NALPs, IPAF, NAIPS	M. S. Lee y Kim, 2007 Stein et al., 2007
	Peces Teleósteos	NOD1, NOD2	
Helicasas CARD	Mamíferos	RIG-1, MDA5	M. S. Lee y Kim, 2007
	Peces Teleósteos	RLR (RIG-1-Like receptor)	M. Chang et al., 2011

Entre los PAMPs más clásicos se puede encontrar a las secuencias de ADN CpG sin metilar, los lipopo-

lisacáridos (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 (Kawai y Akira, 2005; Boltaña et al., 2011)

Tabla 1.2: PAMPs y los patógenos que los producen

PAMP	Patógeno
Lipopolisacárido (LPS)	Bacteria gram-negativa
Peptidoglicano	
Ácido Lipoteicóico	
Lipopéptidos	Bacteria gram-positiva
Lipoarabinomanosa	
Quitina	
Glucanos	Hongos y Levaduras
DNA CpG no-metilado	Bacterias
DNA Doble y simple hebra	Virus
Flagelina	Bacterias flageladas

Entre las células involucradas la fase celular inespecífica de la respuesta inmune podemos encontrar las células citotóxicas no específicas (NCC, por sus siglas en inglés), además se ha encontrado evidencia que plantea la presencia de células tipo NK en peces, así también como el reclutamiento de estas mediante células fagocíticas, granulocitos y el factor NKEF (Athanasopoulou et al., 2009; Bethke et al., 2012; Gomez et al., 2013). 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 (Fischer et al., 2013; Gomez et al., 2013). 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 (Palić et al., 2011).

Dentro del sistema fagocítico mononuclear, podemos encontrar a los monocitos y a los macrófagos, los primeros son móviles y generalmente más grandes que los demás leucocitos, y en el caso de los

macrófagos, estos pueden fagocitar partículas mucho más grandes, y abundan en el bazo y riñóncefálico, aunque también se han encontrado en tejido linfoide asociado a mucosas (Olabuenaga, 2000; Castro et al., 2011; Gomez et al., 2013).

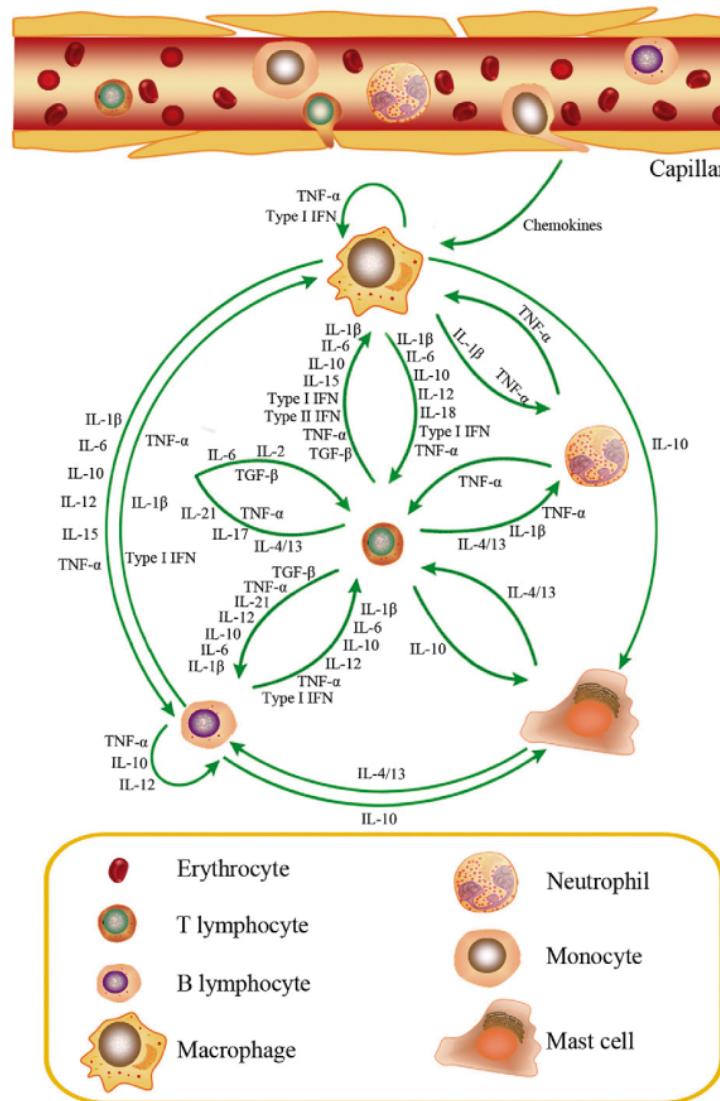


Figura 1.3: Representación esquemática de las redes de citoquinas conocidas, involucradas en la regulación de funciones celulares en los peces, incluyendo la diferenciación, proliferación, supervivencia o apoptosis celular, y numerosas expresiones génicas. Tomada de Zhu et al., 2012

Entre los componentes moleculares asociados a la respuesta innata del sistema inmune de peces se encuentran las citoquinas (Figura 1.3), moléculas de señalización celular particularmente importantes en orquestar y regular la respuesta inmune. 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 (Wang y Secombes, 2013). La respuesta inmune

innata en mamíferos y peces está iniciada por citoquinas de la familia de las interleuquinas (IL-1 β , IL-2, IL-6), TNF- α e IFN- γ (Uribe et al., 2011), siendo estas llamadas citoquinas pro-inflamatorias debido a su rol en la génesis de la respuesta inflamatoria (Savan y Sakai, 2006).

Tabla 1.3: Interleuquinas de peces

Interleuquina	Organismo *	Referencia
IL-1 β	<i>O.mykiss</i>	Zou et al., 1999
IL-18	<i>T.rubripes</i>	Huisng et al., 2004
IL-6	<i>T.rubripes</i>	Bird et al., 2005a
IL-11	<i>O.mykiss</i>	Wang et al., 2005
IL-2	<i>T.rubripes</i>	Bird et al., 2005b
IL-4	<i>T.rubripes</i>	Li et al., 2007
IL-7	<i>T.rubripes</i>	Kono et al., 2008
IL-15	<i>T.rubripes</i>	Bei et al., 2006
IL-21	<i>T.rubripes</i>	Bird et al., 2005b
IL-10	<i>T.rubripes</i>	Zou et al., 2003
IL-22	<i>T.rubripes</i>	Zou et al., 2004
IL-17	<i>D.rerio</i>	Gunimaladevi et al., 2006
IL-12	<i>T.rubripes</i>	Yoshiura et al., 2003

* Se nombra el primer organismo donde fue reportada

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. En peces se ha descrito gran parte de las interleuquinas presentes en mamíferos (Tabla 1.3) (Secombes et al., 2011). 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 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 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, incluyen-

do IL-1, IL-6 y algunas quimioquinas. IL-1 β y TNF- α son ampliamente usados como marcadores de respuesta inmune innata (Zhang et al., 2009). 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 -hélices en su topología y p40 recuerda una forma asociada a un receptor de citoquinas solubles(Yoshiura et al., 2003b; Huisung et al., 2006). Esta citoquina pro-inflamatoria es producida en las etapas iniciales de la respuesta inmune por monocitos, macrófagos, celulas dendríticas y neutrófilos, y una de sus principales funciones es inducir la síntesis de otras citoquinas, como IFN- γ (Zhang et al., 2014b).

Interferón Gamma (IFN- γ), perteneciente a la familia de los Interferones de tipo II, importantes reguladores del sistema inmunitario innato y adaptativo (Savan y Sakai, 2006). El IFN- γ es producido en una primera etapa por celulas NK estimuladas por NKEF e interleuquinas 12 y 18, las cuales son producidas por fagocitos mononucleares y celulas 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 macrófagos y otras APCs (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 macrófagos para aumentar destrucción de patógenos bacterianos, protozoos y virales (Fields et al., 2007).

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, haciendo de esta molécula un marcador inmunológico de importancia para estudiar procesos inmunológicos.

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; Zhang et al., 2011; 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 de 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 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 linfoideos asociados a intestino, piel y branquias (GALT, SALT y GALT, 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, péptidos antimicrobianos, toxinas e inmunoglobulinas (Lazado y Caipang, 2014).

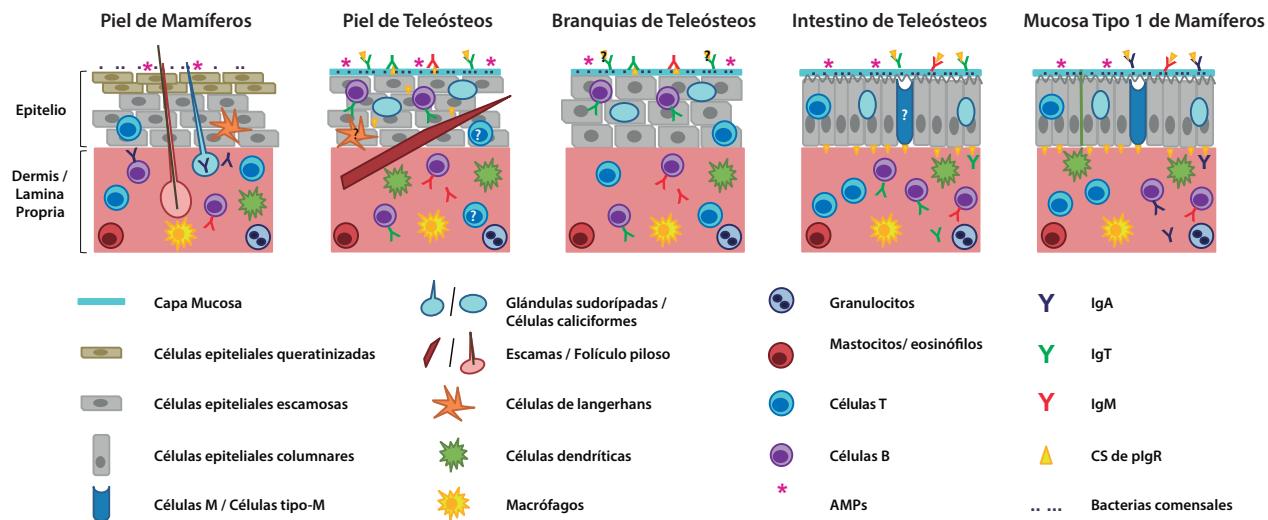


Figura 1.4: Representación esquemática de las similitudes y diferencias entre las superficies mucosas de teleósteos como piel, intestino y branquias y de mamíferos como piel y mucosa de tipo 1. Adaptado y traducido desde Gomez et al., 2013

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 (Fig. 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

relacionados con células T (Boschi et al., 2011).

1.4. Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores han sido descritos como componentes necesarios para la acuicultura, ya que mejoran la respuesta innata y proveen resistencia frente a diferentes patógenos. Estas sustancias, como los β -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; 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 β 1-3, β 1-6 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 neutrófilos, aumentan el grado de fagocitosis, la actividad del estallido respiratorio y la expresión de interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en leucocitos peritoneales de trucha arcoíris a 1 dia post inyección (Peddie et al., 2002).

1.4.1. β -glucanos

Tabla 1.4: Estructuras de β -Glucanos según su origen

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

Estructuras de β -Glucanos según su origen

Los β -glucanos son carbohidratos que consisten en moléculas de glucosas enlazadas, los cuales son componentes estructurales de gran importancia en paredes celulares de levaduras, hongos, algas y algunas bacterias. Estos carbohidratos también forman parte de la pared celular endospermas de algunos cereales como la cebada y la avena. Dependiendo del origen del β -glucano encontraremos diferencias también en sus estructuras moleculares y sus posibles ramificaciones (Tabla 1.4) (Volman et al., 2008; Skov et al., 2012).

Tabla 1.5: Efectos inmunomoduladores de β -glucanos en peces

β -Glucano	Entrega	Especie	Efecto	Referencia
Macrogard	Oral	<i>C.carpio</i>	\uparrow CRP \uparrow C3	Pionnier et al., 2014
Macrogard	IIP	<i>D.labrax</i>	\uparrow HSP \uparrow Lisozima \uparrow Complemento	Bagni et al., 2005
Laminarán	IIP	<i>O.mykiss</i>	\uparrow IL-1 β \uparrow IL-6 \uparrow C3-1 \uparrow C3-2 \uparrow C3-3	Løvoll et al., 2007
Paramylon	Baño	<i>O.mykiss</i>	\uparrow Hepcidina \uparrow Factor B \uparrow Preceberelina \uparrow C3	Chettri et al., 2013
β 1,3-Glucano <i>S.cerevisiae</i>	Baño, IIP Oral	<i>C.carpio</i>	\uparrow Leucocitos Sanguíneos \downarrow Mortalidad \uparrow IL-1 β mRNA \uparrow Producción anticuerpos	Selvaraj et al., 2005
Laminarán	Oral, IIP	<i>O.mykiss</i>	\uparrow TNF- α \uparrow IL-8 \uparrow AF \uparrow CF	Morales-Lange et al., 2014
β 1,3-Glucano <i>S.cerevisiae</i>	Oral	<i>L.crocea</i>	\downarrow Mortalidad \uparrow AF \uparrow Estallido Respiratorio	Ai et al., 2007
β -D-Glucano Cebada	IIP	<i>L.rohita</i>	\downarrow Mortalidad \uparrow Lisozima \uparrow AF \uparrow AB	Misra et al., 2006
Macrogard	Oral	<i>C.carpio</i>	\uparrow Gen MX \uparrow TLR3,1 \uparrow IL-1 β \uparrow TNF- α	Falco et al., 2014
β 1,3-Glucano <i>E.gracilis</i>	Baño	<i>O.mykiss</i>	\uparrow IFN- γ \uparrow TNF- α \uparrow Hepcidina	Skov et al., 2012

IIP: Inyección intra-peritoneal, AF: Actividad Fagocítica, CF: Capacidad Fagocítica

β -glucanos derivados de diferentes especies pueden variar en su estructura y su bioactividad (Akramiene et al., 2007). Las diferencias como el largo de su cadena de polisacáridos, la presencia o no de ramificaciones, y el largo de esas ramificaciones pueden influenciar finalmente en el método de extracción, los componentes insolubles e incluso en los pesos moleculares (Akramiene et al., 2007). Diferencias como el método de extracción o su solubilidad pueden afectar la bioactividad de estos com-

ponentes, sobretodo teniendo en cuenta que existen estudios que han demostrado que el β -(1,3/1,6)-glucano tiene mejor actividad biológica que su forma soluble (β -(1,3/1,6)-glucano) (Ooi y Liu, 2000).

En peces ha sido estudiado el uso de β -glucanos como inmunoestimulantes, en distintas especies, como en ciprínidos (*C.koi*, *C.carpio*) (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 (Wang et al., 2007; Lokesh et al., 2012), demostrando que estos inmunomoduladores pueden estimular la actividad fagocítica de macrófagos, promoviendo la producción de proteínas líticas como la lisozima y el complemento, generando un *boost* en la respuesta innata del pez.

En mamíferos el principal receptor de β -glucanos pertenece la familia de las Lectinas de tipo C y es llamado Dectina-1 (Brown y Gordon, 2001). En peces existe muy poca información relevante a los receptores específicos para β -glucanos. En macrófagos de *Salmo salar* estimulados con un β -1,3-glucano de levaduras sugieren la presencia de un receptor específico que podría reconocer cadenas de β -glucanos (Engstad y Robertsen, 1994). Finalmente, un estudio realizado en 2013, usando Zimosán y agonistas específicos para los receptores Dectina-1 demostraron que los macrófagos de la carpa son poco, pero no insensibles a los agonistas selectivos de Dectina-1, sugiriendo que el reconocimiento de β -glucanos puede ser efectuado por múltiples PRR, incluyendo receptores TLR y no-TLR (Pietretti et al., 2013).

Existen evidencias a nivel de GIALT de respuesta inmune sistémica (Bethke et al., 2012) y además se ha demostrado que el consumo en dieta o la suplementación por inyección de β -glucanos modifica la disponibilidad de TNF- α e IL-8 en trucha arcoíris (Morales-Lange et al., 2014).

La inmunoestimulación oral afecta distintos parámetros inmunológicos, y a su vez existen antecedentes de estos cambios a nivel de mucosas como la piel, los intestinos y las branquias.

No obstante no existe un modelo molecular que indique el espectro de moléculas reguladoras y efectoras de inmunidad a evaluar, ni existe un consenso con los tiempos asociados a la expresión y disponibilidad de éstas. Teniendo en cuenta que los estudios disponibles a la fecha solo usan una aproximación a nivel de transcripto, habiendo pocos estudios sobre disponibilidad de proteínas, es necesario que la evaluación de estos parámetros relacione su nivel de transcripción con la disponibilidad de proteínas, para saber qué, cuándo y con qué método evaluar al momento de suplementar la alimentación de estos organismos con β -glucanos como inmunomoduladores.

Se requiere un análisis que correlacione la cuantificación de ambos parámetros para establecer cual es el mejor indicador molecular del efecto inmunomodulador de β -glucanos.

2 Hipótesis

La inmunomodulación en tejido branquial de *O.mykiss* generada por la liberación en dieta del β -glucano *Zimosán A* es cuantificable, lo que permite establecer un modelo y relacionar los niveles de la expresión y disponibilidad de moléculas reguladoras y efectoras de la inmunidad.

3 Objetivo General

Establecer un modelo molecular basado en la magnitud de la expresión y disponibilidad de diferentes parámetros de respuesta inmunológica en tejido branquial de *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. Correlacionar el nivel de expresión y detección de moléculas de respuesta inmune evaluadas en tejido branquial.

4 Materiales y Métodos

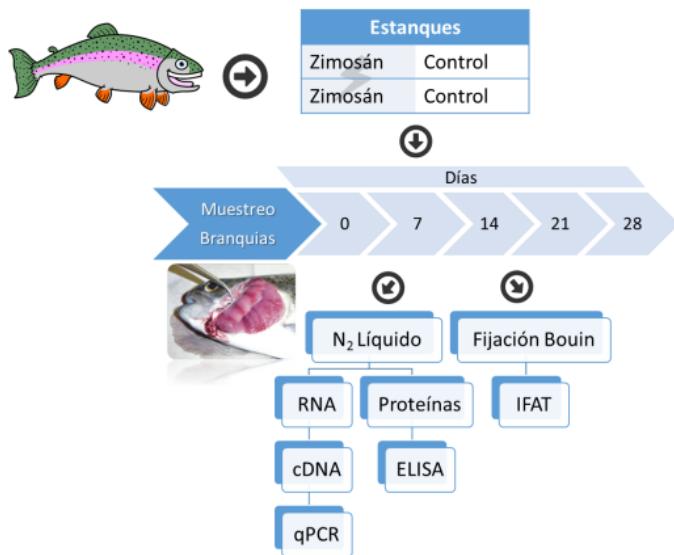


Figura 4.1: Esquema general de trabajo

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; Bethke et al., 2012; Rojas et al., 2012; Santana et al., 2012)

Tabla 4.1: Lista de Anticuerpos Usados

Molécula (Anti)	Huesped	Origen	Secuencia epítope	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 pesaron los peces y luego 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 % 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 Nitrógeno 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).

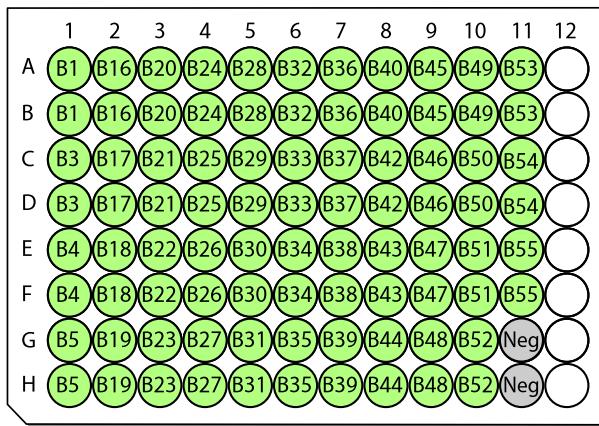


Figura 4.2: Diseño de placa para PCR en tiempo real

4.5.1. Estandarización de partidores

Tabla 4.4: 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

necesarias para determinar el uso o no de un partidor en base a un programa del termociclador y un gradiente de temperaturas (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: 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

4.5.2. Master Mix para cada reacción

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L según la Tabla 4.6. 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°C 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 4.6: 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

4.5.3. Cuantificación relativa

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 $\Delta\Delta C_T$ (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.

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:

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

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 μ g/ μ L). En una placa de cultivo de 96 pocillos se cargaron 25 μ L de cada concentración de la curva de calibrado y 25 μ L de cada extracto de proteínas en una dilución 1:50, todas las muestras incluyendo la curva se cargaron en duplicado. Luego se agregaron 200 μ L 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 200 μ L de PBS 1X-Tween20 0,05 % (PBST 0,05 %).

4.7.2. Bloqueo de sitios inespecíficos

Para bloquear los sitios inespecíficos donde no se unió el antígeno se usó BSA diluida (200 μ L 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 200 μ L 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 100 μ L 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 50 μ L de H₂SO₄ 1N se leyó a 450nm para aumentar la detección usando el software SoftMax 5.2 de Molecular Probes.

4.7.5. Validación de anticuerpos

Con el fin de validar cualitativamente los anticuerpos policlonales mono-específicos sintetizados por el grupo de marcadores inmunológicos en organismos acuáticos (Tabla 4.1), se sembró en concentración decreciente (8 diluciones seriadas 1:2 desde 3ng/ μ L) el péptido sintético con el cual fue inmunitizado el huésped, y posteriormente se realizó la técnica de ELISA indirecto, descrita en la sección 4.7, usando como curva de calibrado las IgG Normal de Conejo y Ratón (Sigma).

4.8. Cortes histológicos

Desde las branquias previamente aisladas y fijadas en reactivo de Bouin, se formaron bloques empaquetados, 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 Entellan (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 lápiz 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 unión 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) diluído 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 módulos 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 3 y 6) (Fig. 5.1).

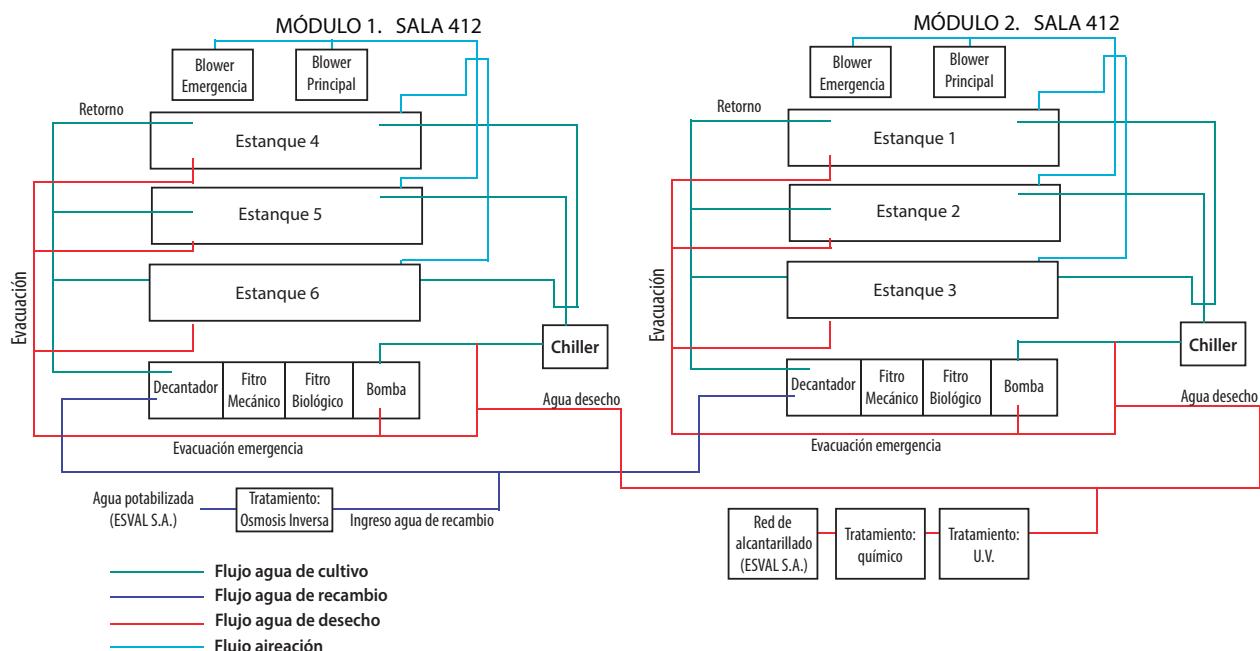


Figura 5.1: Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma

No se observó ningún cambio significativo entre los pesos registrados para la dieta control y la dieta suplementada con Zimosán (Figura 5.2), lo que indica que este β -glucano no genera un crecimiento a nivel de masa muscular comparado con el grupo sin tratamiento.

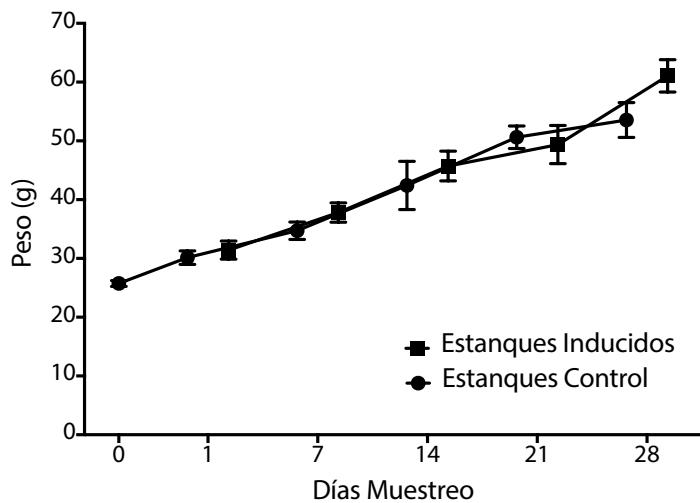


Figura 5.2: Crecimiento promedio de truchas en estudio

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

Para cada una de las muestras realizadas se obtuvo las siguientes cuantificaciones de RNA (Tabla 5.1).

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		

Las muestras dispuestas en la tabla 5.1 fueron llevadas para la obtención de cDNA.

5.3. Estandarización de Partidores

Para cada molécula en estudio se obtuvieron las siguientes estandarizaciones de partidores.

5.3.1. EF-1 α

Se obtuvo la mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.3).

5.3.2. IL-12

Se obtuvo la mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C. (Figura 5.4)

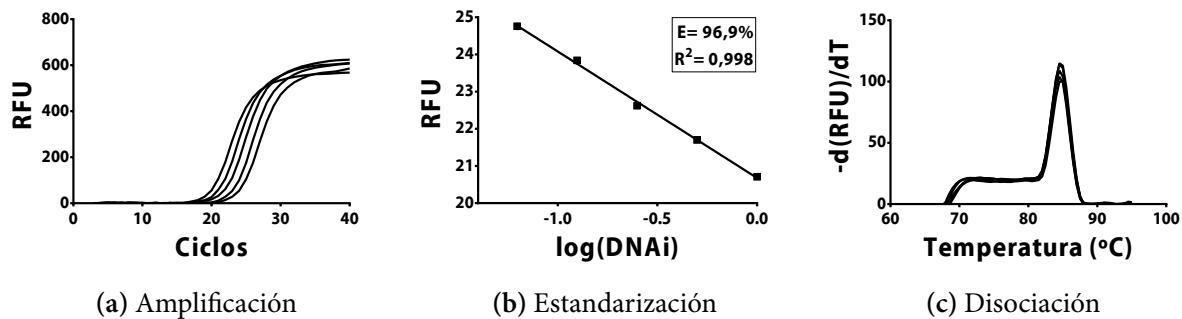
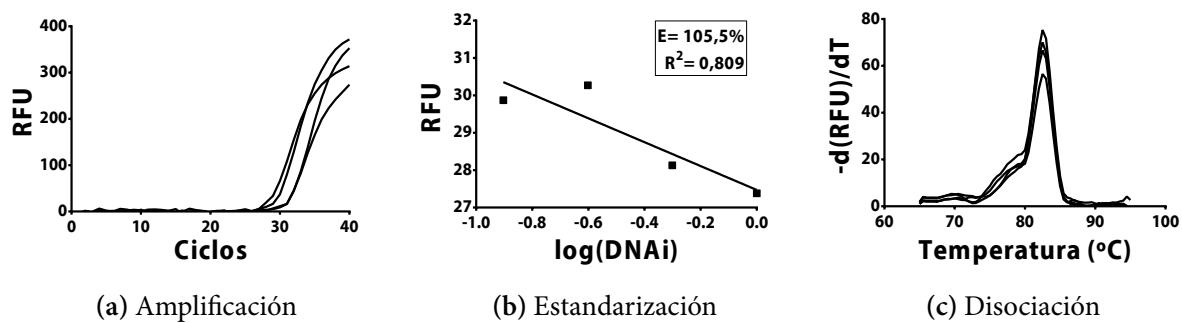
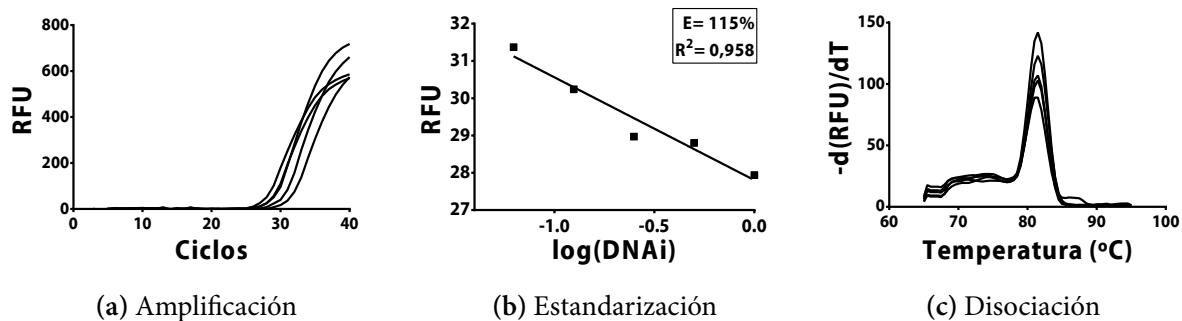
Figura 5.3: Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α 

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

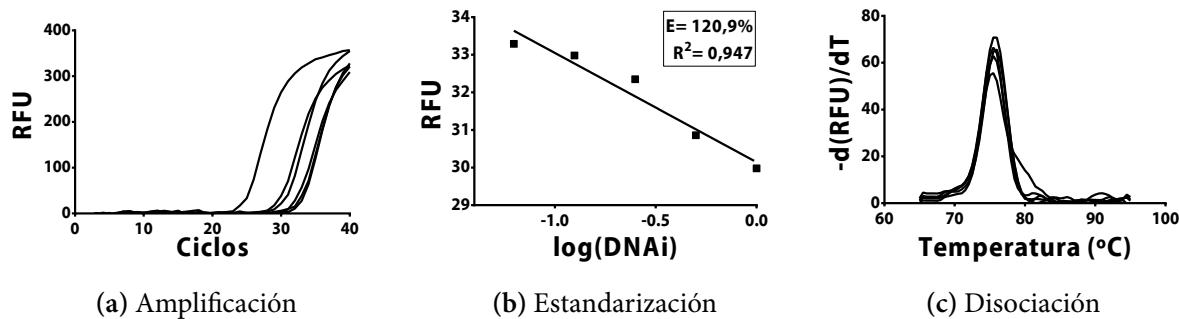
5.3.3. TNF- α

Se obtuvo la 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

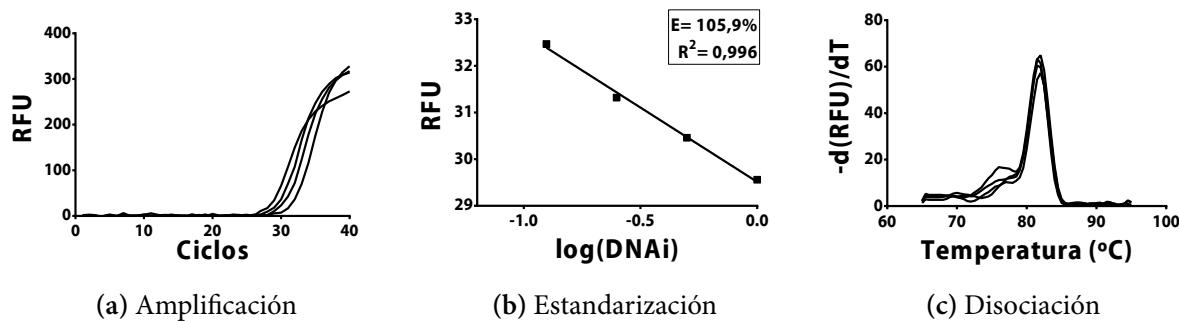
5.3.4. IFN- γ

Se obtuvo la 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 obtuvo la mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.7).

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

5.3.6. iNOS

Se obtuvo la mejor curva estándar, eficiencia y curva de fusión a los 58°C (Figura 5.8).

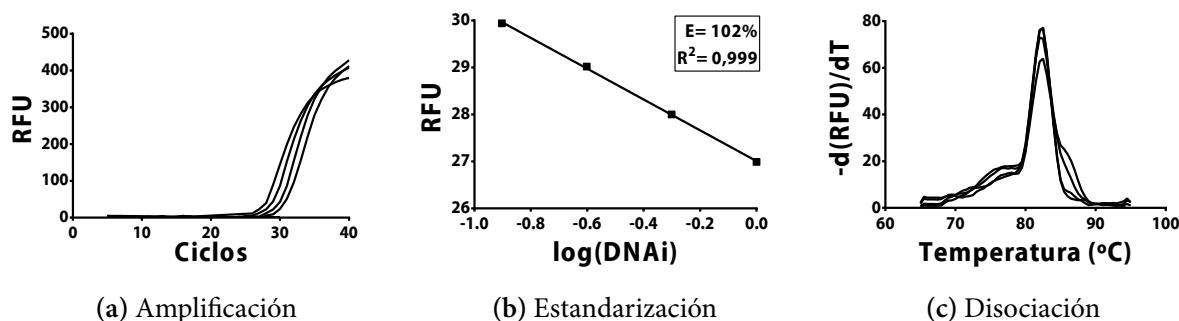


Figura 5.8: Curvas de estandarización del partidor para iNOS

Tabla 5.2: Síntesis: Temperaturas de annealing estandarizadas para cada partidor

Partidor	TA
EF-1 α	58°C
IL-1 β	58°C
TNF- α	58°C
IFN- γ	61,5°C
iNOS	58°C

T_A = Temperatura de annealing

5.4. PCR en tiempo real

Se procedió a realizar la PCR en tiempo real usando las temperaturas de annealing obtenidas en la Tabla 5.2.

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

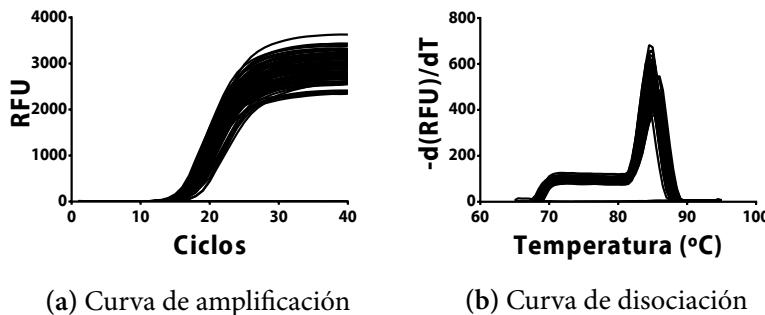


Figura 5.9: Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1 α

5.4.1. TNF- α

Para el gen del factor de necrosis tumoral alfa (Figura 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($p \leq 0,05$).

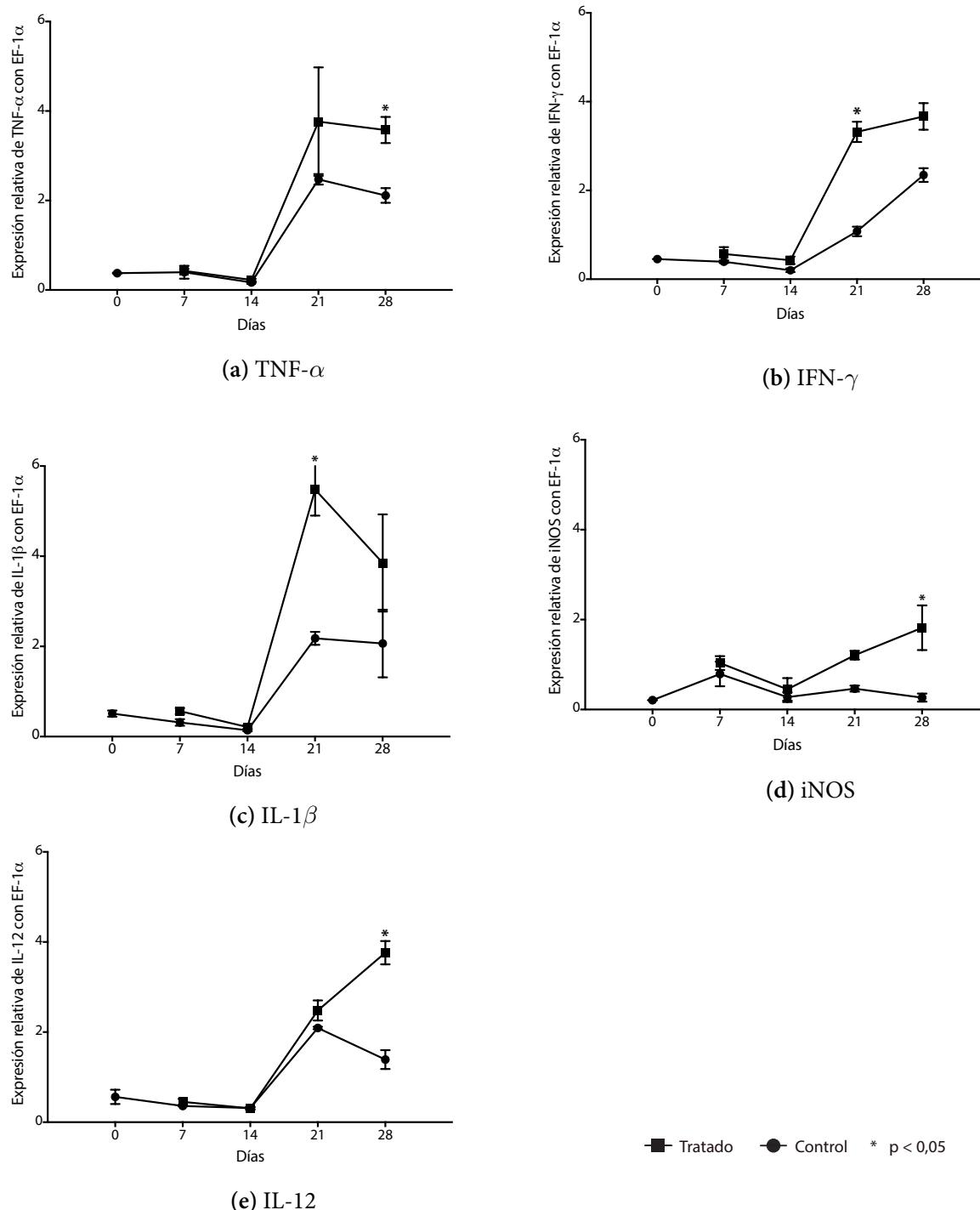


Figura 5.10: Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α

5.4.2. IFN- γ

La expresión relativa del transcripto de Interferón gamma (Figura 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 (Figura 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.

5.4.4. iNOS

El gen de iNOS (Figura 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 significativa 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 (Figura 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 ($p \leq 0,05$).

5.4.6. Síntesis comparada del estudio

Las 5 moléculas presentan sobre expresión entre los días 21 y 28.

La molécula que obtuvo una mayor up-regulación fue IL-1 β , llegando hasta casi 6 veces su cuantificación relativa frente al gen de referencia, la que obtuvo una menor up-regulación, aunque igualmente significativa fue iNOS llegando entre 1.5 a 2 veces de cambio con respecto al gen de referencia.

El día con mayor sobre-expresión de los genes que codifican para estas moléculas fue el 21, teniendo up-regulaciones significativas con respecto a su control para las moléculas: IFN- γ , IL-1 β e iNOS, mientras que el día 28 las moléculas que tuvieron una up-regulación significativa fueron TNF- α e IL-12.

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:

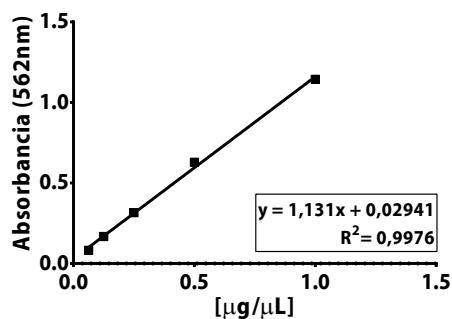


Figura 5.11: Curva de calibrado BCA

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

Las cuantificaciones interpoladas en la recta de calibrado (Figura 5.11) se muestran en la Tabla 5.3

5.6. Validación de anticuerpos

Los resultados de la validación de los anticuerpos por ELISA indirecto fueron graficados en la Figura 5.12

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)

Tabla 5.3: 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		

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 disponibilidad 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 TNF- α (Figura 5.13 a), respecto a su control inicial, evidenció un aumento paulatino de su bio-disponibilidad partiendo del día 7 al día 14, un aumento de aproximadamente 4 veces el día 21 y finalmente un leve aumento el día 28, este ultimo dia siendo significativo respecto a su control ($p \leq 0,05$).

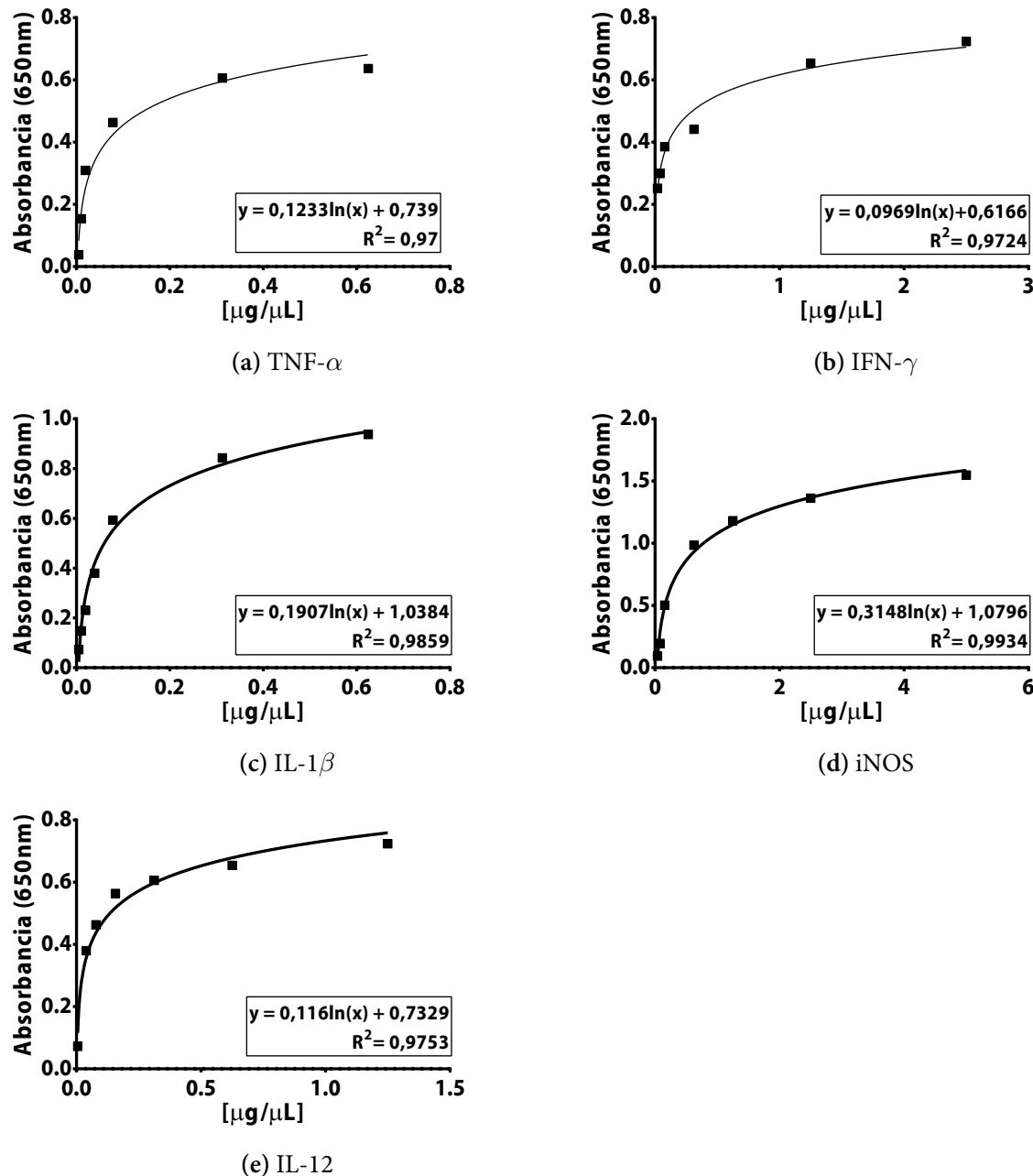


Figura 5.12: Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto

5.7.2. IFN- γ

Esta molécula (Figura 5.13 b) tuvo un leve aumento en los días 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 día 21 y 28 diferentes significativamente ($p \leq 0,05$).

5.7.4. iNOS

Para la enzima Oxido Nítrico Sintasa inducible (Figura 5.13 d) se obtuvo el día 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 ($p \leq 0,05$).

5.7.6. Síntesis comparada del estudio

Los anticuerpos reconocen sus respectivos epítopes (Figura 5.12).

Las 5 moléculas en estudio presentaron un aumento en su disponibilidad entre los días 21 y 28, incluso una presenta aumento el día 14.

La mayor disponibilidad de proteína se observó a nivel de IFN- γ el día 21 y la menor fue para el caso de iNOS el día 28, aún así ambas disponibilidades mayores que su control significativamente

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 día 21 fue el día con menor disponibilidad de las moléculas estudiadas, en las cuales encontramos a IFN- γ e IL-1 β

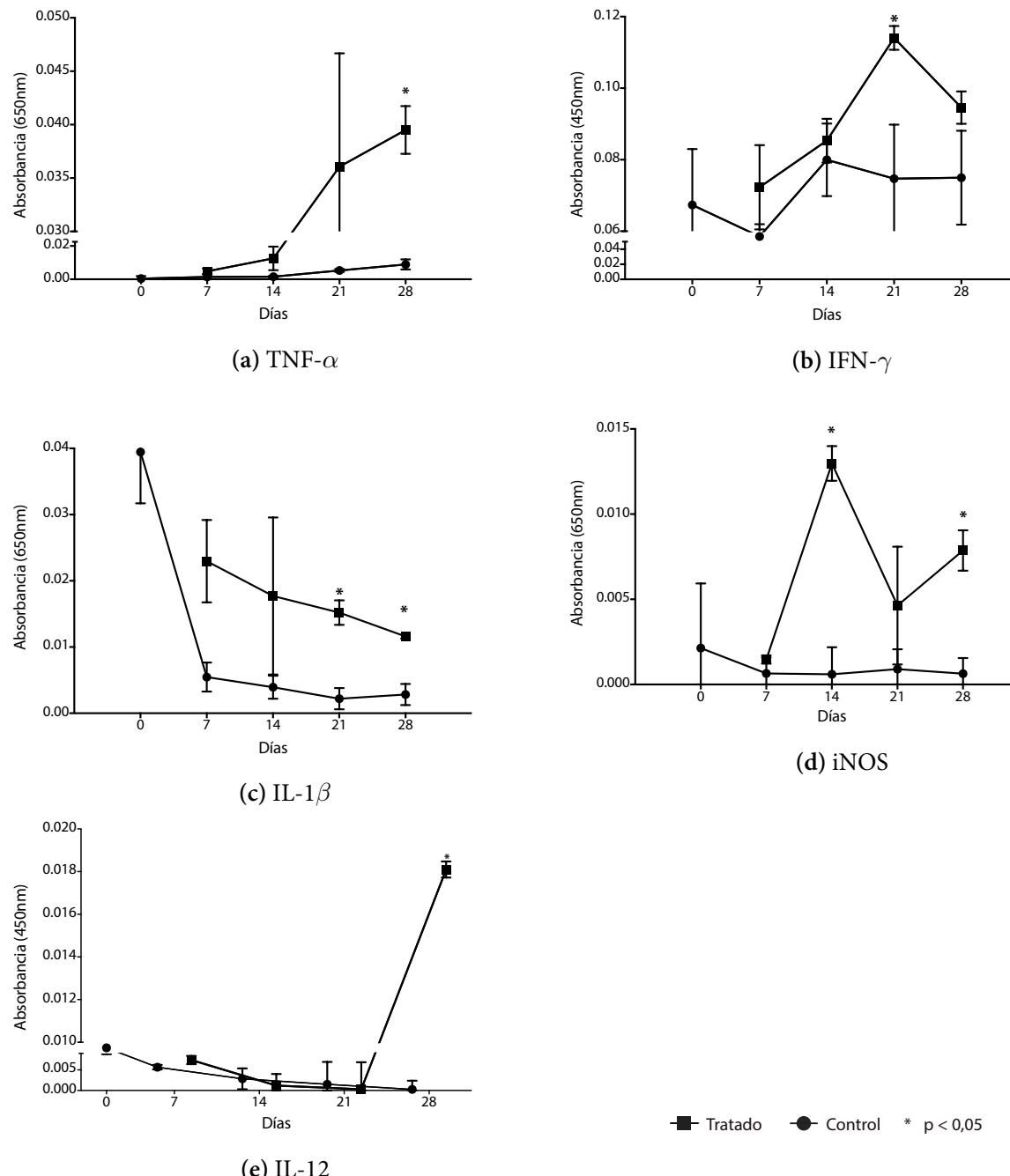


Figura 5.13: Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio

5.8. Tinción Hematoxilina-eosina

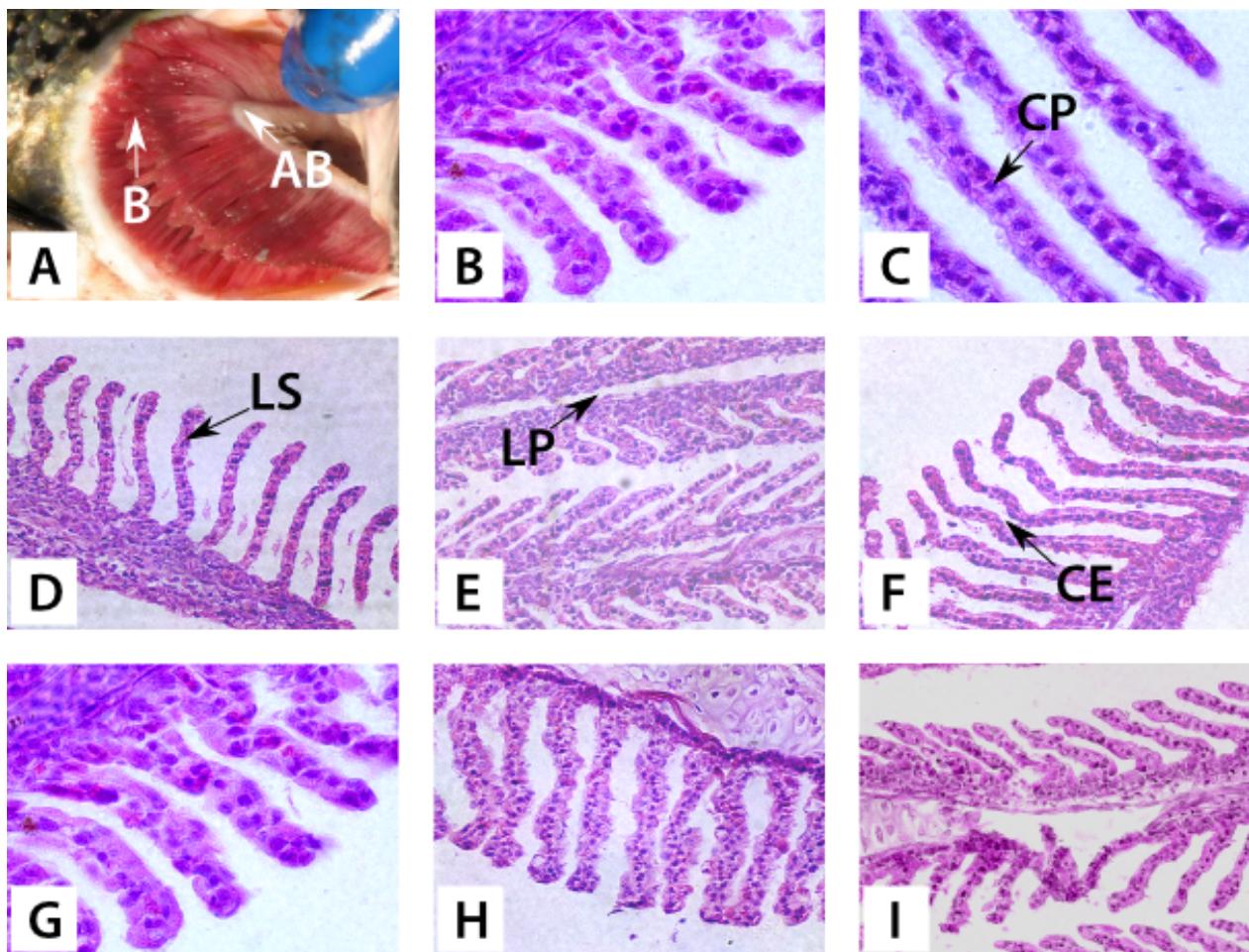


Figura 5.14: Microfotografías de branquias de trucha arcoíris con tinción Hematoxilina-eosina: A) Opérculo abierto exponiendo las branquias a extraer; B,C) Día 0; D) Día 14 Control; E) Día 14 Tratado; F) Día 21 Control; G) Día 21 Tratado; H) Día 28 Control; I) Día 28 Tratado. AB = Arco Branquial, B = 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 5.14). La branquia se observa completa, sin su arco branquial, demostrando una consistencia entre sus laminillas primarias y secundarias (Figura 5.14 D,E), así como también la presencia de células pilares (Figura 5.14 C) y células epiteliales (Figura 5.14 F).

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 la sección 4.9, se observaron los siguientes resultados.

5.9.1. TNF- α

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria las cuales mostraban producción de TNF- α (Figura 5.15).

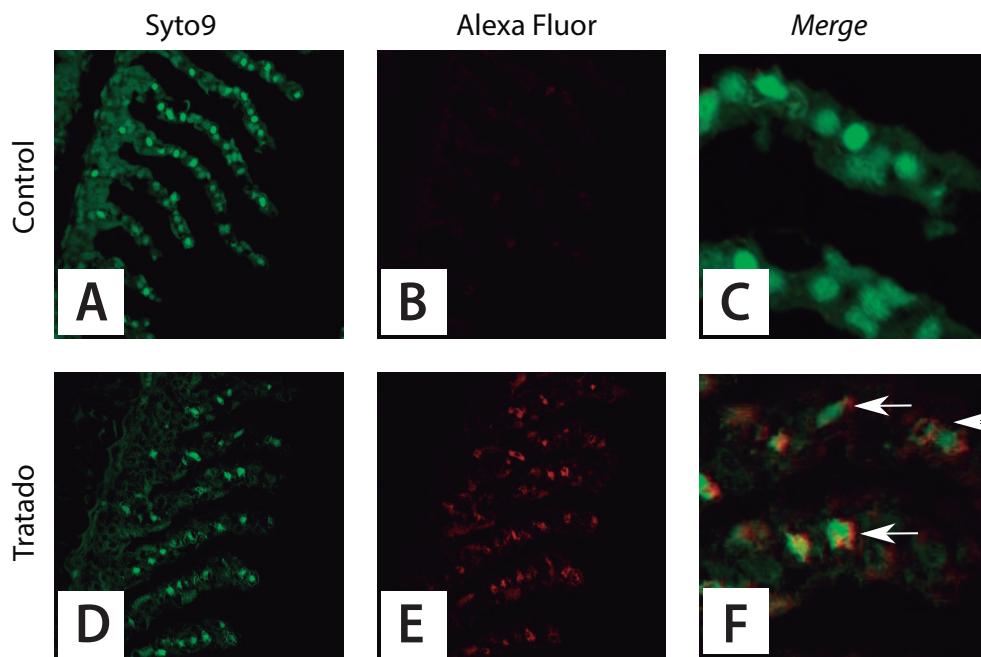


Figura 5.15: Microscopía confocal para TNF- α en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta: A) Control con tinción Syto9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción Syto9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor;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

5.9.2. IFN- γ

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria, las cuales mostraban producción de interferón gamma (Figura 5.16).

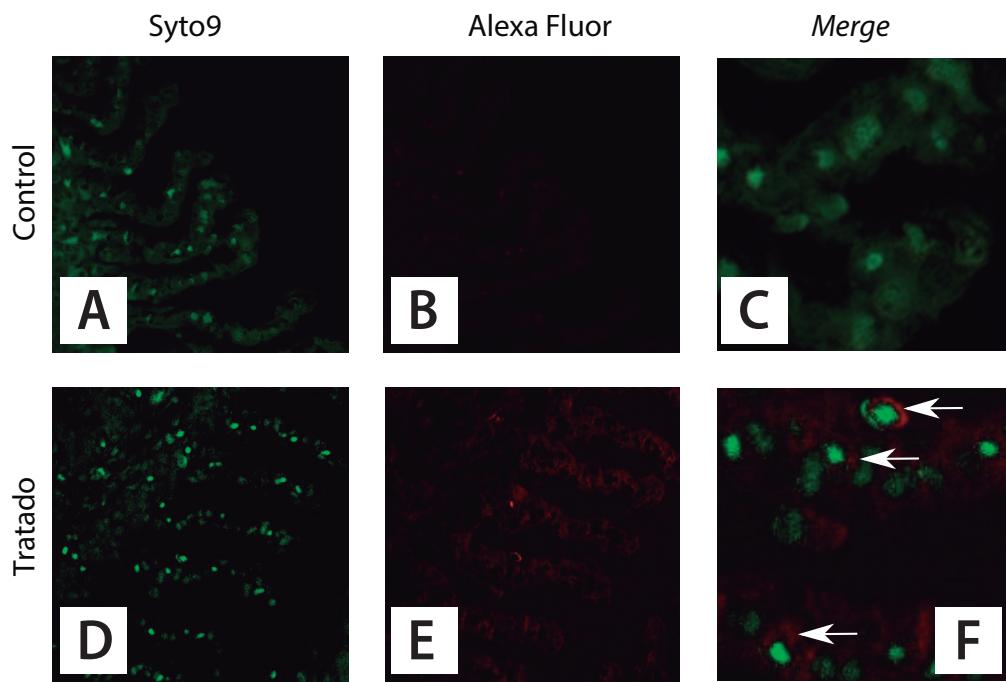


Figura 5.16: Microscopía confocal para IFN- γ en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta: A) Control con tinción Syto9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción Syto9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

5.9.3. IL-1 β

Se observa un marcaje positivo en células de la laminilla secundaria, las cuales mostraban producción de IL-1 β (Figura 5.17).

5.9.4. iNOS

Se observa un marcaje positivo para la producción de iNOS en células de la laminilla secundaria (Figura 5.18).

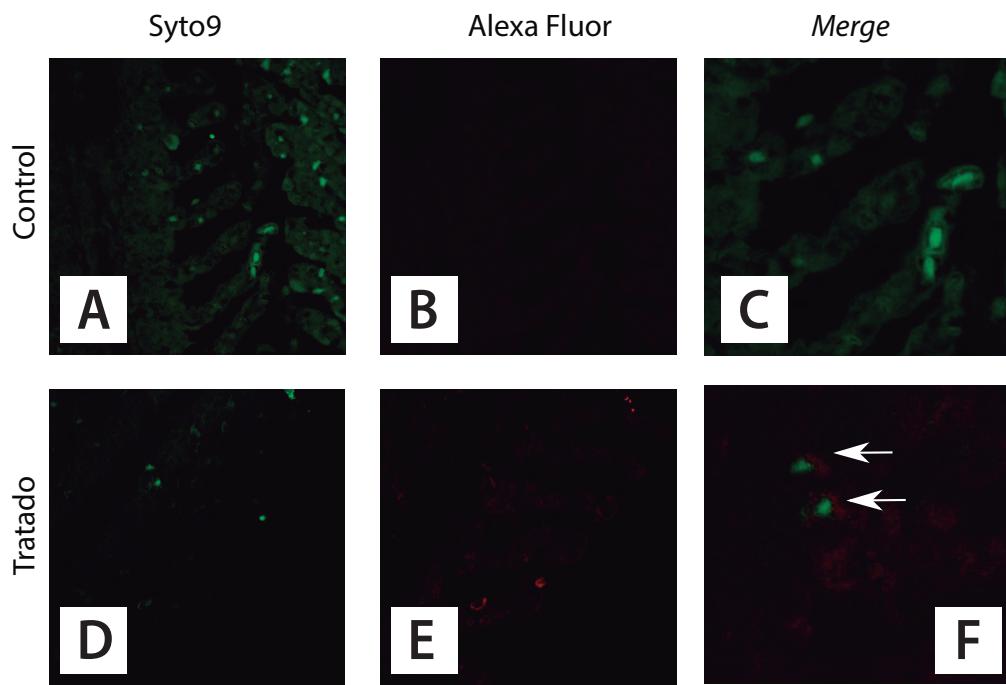


Figura 5.17: Microscopía confocal para IL-1 β en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta: A) Control con tinción Syto9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción Syto9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

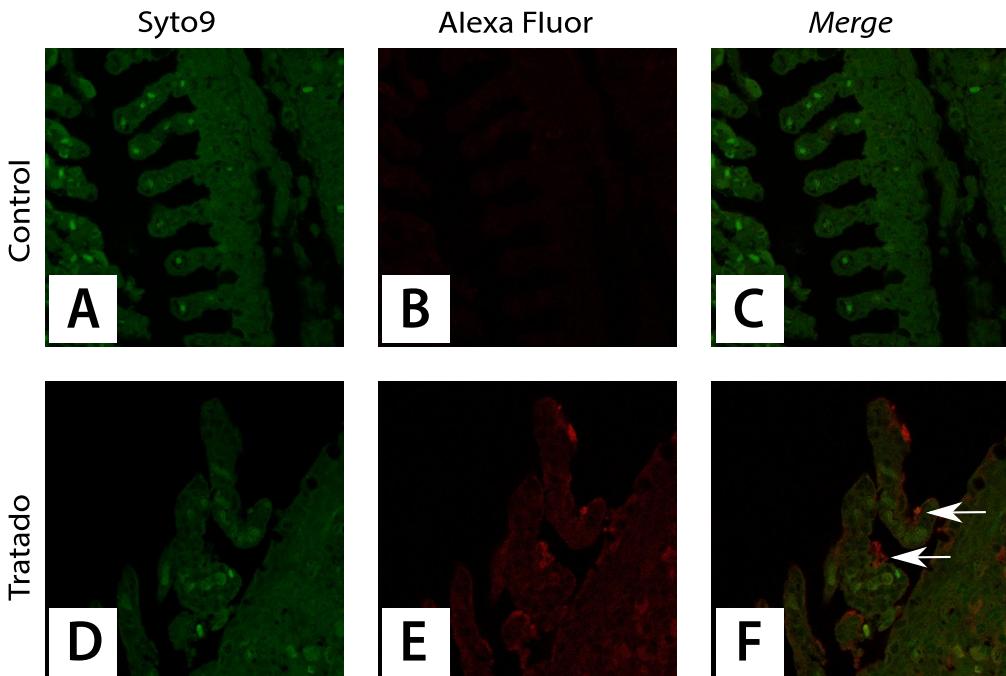


Figura 5.18: Microscopía confocal para iNOS en cortes histológicos de branquias de trucha arcoiris tratadas con Zimosán A liberado en dieta: A) Control con tinción Syto9; B) Control con tinción Alexa Fluor; C) Merge entre ambos canales; D) Tratado con tinción Syto9; E) Tratado con tinción Alexa Fluor; F) Merge entre ambos canales. Flechas (\leftarrow) = Marcaje del anticuerpo

5.10. Correlación

Tabla 5.4: 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 obtuvo una correlación muy alta (>0.8) para el caso de los ensayos de qPCR (Tabla 5.4A), siendo la mayor correlación positiva 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 5.4B).

Finalmente con el fin de saber qué 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 5.6: 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 5.6).

6 Discussion

La perdida del equilibrio Ambiente \leftrightarrow Patógeno \leftrightarrow 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, 148 millones de toneladas de pescado (FAO, 2012), las cuales se traducen aproximadamente en 217.500 millones de dólares (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 dólares, brotes que amenazan las año a año las operaciones acuícolas al rededor del mundo.

Varios autores describen un aumento en la transcripción de los genes evaluados en esta tesis, Lokesh et al (2012) observan esto en la expresión de IFN- γ en *G.morhua* usando una concentración de β -glucano al 1 % aunque este estudio fue evaluado en intestino. Skov et al (2012) demuestra la sobre-expresión de IFN- γ de hasta 111 veces de cambio con respecto a su control posterior a 59 días de tratamiento de inmersión con β -glucanos. En el caso de la expresión de la Interleukina 1- β Zhang et al. (2009) demostró en *O.mykiss* que se produce una sobre expresión de este gen a partir del dia 7 luego de tratar vía inmersión con β -glucanos. En *D.rerio* inyectados con β -glucanos Rodriguez et al. (2009) describe una sobreexpresión de IL-1 β de hasta 60 veces con respecto a su control sin tratar. Finalmente, Zhang et al (2009) demostró la sobre-expresión del gen que codifica para TNF- α luego de 14 días de inmersión con β -glucanos.

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 levemente 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 4.4) y está en el límite de lo recomendado para la cuantificación por el método $\Delta\Delta C_T$ (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 corrobora 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).

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 deducir 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.

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, observando una tendencia similar a lo demostrado por Morales-Lange et al (2014) en su estudio usando el β -glucano Laminarín. Chansue et al (2000) demostró en tilapia la disponibilidad luego del día 5 de tratamiento de TNF- α usando β -glucanos en una concentración al 2 % entregados por vía oral. Tomando 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 existe 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 (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 en este estudio tampoco se esperaba 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 sostenido 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 salmonídeos.

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.

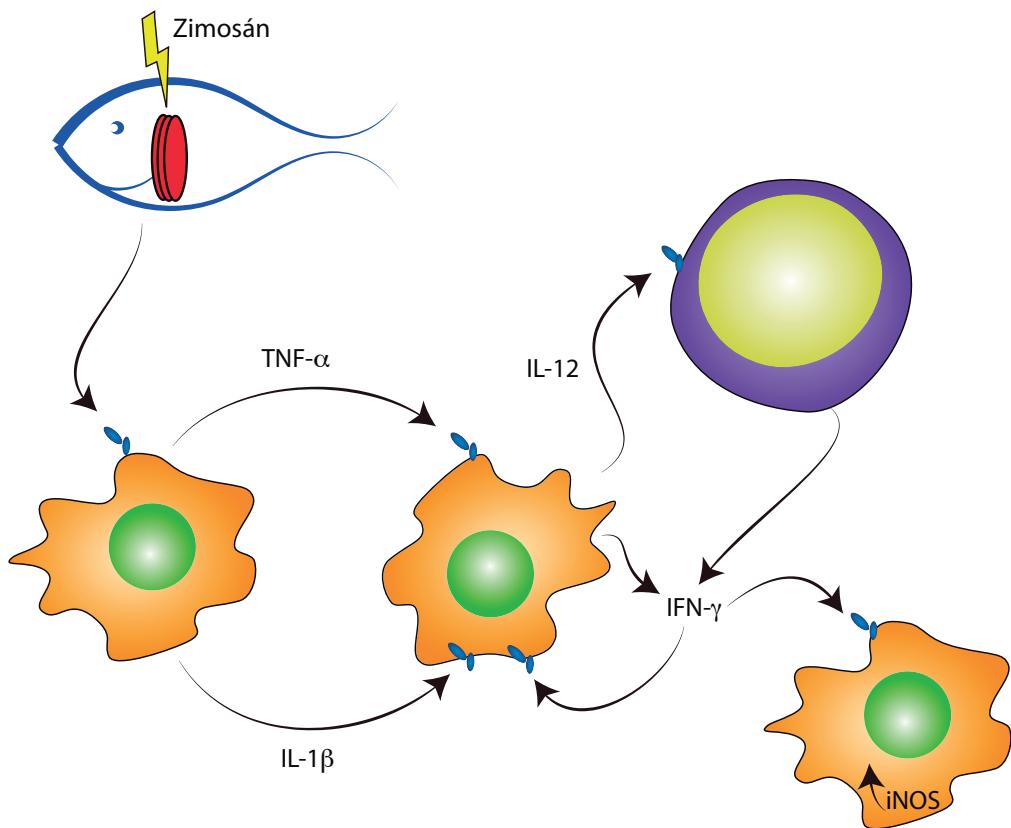


Figura 7.1: Modelo molecular propuesto de respuesta inmune: Generado a partir de los resultados obtenidos en tejido branquial de truchas arcoíris tratadas con *Zimosán A* liberado en dieta, inmunoestimulante que llegaría a su receptor (β -glucano?, Dectin-1 like?), el cual generaría la cascada de señalización para promover una respuesta inmune sintetizando citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IFN- γ 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 riñóncefálico (HKL) de salmonídeos, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18079–84.

Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., & Li, H. (2007). Effects of dietary beta-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & shellfish immunology*, 22(4), 394–402.

Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., & Kevelaitis, E. (2007). Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 43(8), 597–606.

Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3-4), 171–98.

Athanasopoulou, S., Marioli, D., Mikrou, A., Papanastasiou, A. D., & Zarkadis, I. K. (2009). Cloning and characterization of the trout perforin. *Fish & shellfish immunology*, 26(6), 908–12.

Athman, R., & Philpott, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Current opinion in microbiology*, 7(1), 25–32.

Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., ... Marino, G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & shellfish immunology*, 18(4), 311–25.

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.

- Bei, J.-X., Suetake, H., Araki, K., Kikuchi, K., Yoshiura, Y., Lin, H.-R., & Suzuki, Y. (2006). Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins. *Molecular immunology*, 43(7), 860–9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bird, S., Zou, J., Kono, T., Sakai, M., Dijkstra, J. M., & Secombes, C. (2005a). Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny. *Immunogenetics*, 56(12), 909–23.
- Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J., & Secombes, C. (2005b). Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Developmental and comparative immunology*, 29(9), 775–89.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*, 15, 749–95.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907–16.
- Boltaña, S., Roher, N., Goetz, F. W., & Mackenzie, S. A. (2011). PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Developmental and comparative immunology*, 35(12), 1195–203.
- 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.
- Boshra, H., Li, J., Peters, R., Hansen, J., Matlapudi, A., & Sunyer, J. O. (2004). Cloning, expression, cellular distribution, and role in chemotaxis of a C5a receptor in rainbow trout: the first identification of a C5a receptor in a nonmammalian species. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(7), 4381–90.
- Bowden, T. J. (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 373–83.
- Bricknell, I., & Dalmo, R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 457–72.

- Brown, G. D., & Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 413(6851), 36–7.
- 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.
- Casadei, E., Bird, S., González, J. L., Wadsworth, S., & Secombes, C. J. (2012). Fish & Shell fish Immunology The effect of peptidoglycan enriched diets on antimicrobial peptide gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, (December), 1–9.
- 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.
- 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.
- Chang, M., Collet, B., Nie, P., Lester, K., Campbell, S., Secombes, C. J., & Zou, J. (2011). Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of virology*, 85(16), 8403–12.
- Chansue, N., Endo, M., Kono, T., & Sakai, M. (2000). The Stimulation of Cytokine-like Proteins in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Orally Treated, 13, 271–278.
- 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.
- Dalmo, R. a, & Bøgwald, J. (2008). Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & shellfish immunology*, 25(4), 384–96.
- 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.
- Engstad, R. E., & Robertsen, B. (1994). Specificity of a beta-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental and comparative immunology*, 18(5), 397–408.
- Falco, A., Frost, P., Miest, J., Pionnier, N., Irnazarow, I., & Hoole, D. (2012). Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish & shellfish immunology*, 32(6), 1051–7.

- Falco, A., Miest, J. J., Pionnier, N., Pietretti, D., Forlenza, M., Wiegertjes, G. F., & Hoole, D. (2014). β -Glucan-supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & shellfish immunology*, 36(2), 494–502.
- 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.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields' Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fischer, U., Koppang, E. O., & Nakanishi, T. (2013). Teleost T and NK cell immunity. *Fish & shellfish immunology*, 35(2), 197–206.
- Fornshell, G. (2002). Rainbow Trout — Challenges and Solutions. *Reviews in Fisheries Science*, 10(3-4), 545–557.
- 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.
- 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.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–30.
- Groot, C., & Margolis, L. (1991). *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press.
- Gunimaladevi, I., Savan, R., & Sakai, M. (2006). Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish. *Fish & shellfish immunology*, 21(4), 393–403.
- 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.
- Huising, M. O., Meulen, T. van der, Flik, G., & Verburg-van Kemenade, B. M. L. (2004). Three novel carp CXC chemokines are expressed early in ontogeny and at nonimmune sites. *European journal of biochemistry / FEBS*, 271(20), 4094–106.
- 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.
- Jault, C., Pichon, L., & Chluba, J. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular immunology*, 40(11), 759–71.
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current opinion in immunology*, 17(4), 338–44.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373–84.
- Kono, T., Bird, S., Sonoda, K., Savan, R., Secombes, C. J., & Sakai, M. (2008). Characterization and expression analysis of an interleukin-7 homologue in the Japanese pufferfish, *Takifugu rubripes*. *The FEBS journal*, 275(6), 1213–26.
- 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.
- 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.
- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology*, 39(1), 78–89.
- Lee, M. S., & Kim, Y.-J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual review of biochemistry*, 76, 447–80.
- Li, J.-H., Shao, J.-Z., Xiang, L.-X., & Wen, Y. (2007). Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Molecular immunology*, 44(8), 2078–86.
- 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.
- 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.

- Lucas, J. S., & Southgate, P. C. (2012). *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants* (2^a ed.). Wiley-Blackwell.
- Løvoll, M., Fischer, U., Mathisen, G. S., Bøgwald, J., Ototake, M., & Dalmo, R. a. (2007). The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. *Veterinary immunology and immunopathology*, 117(3-4), 284–95.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15, 323–50.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137–51.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2000). How does the immune system distinguish self from nonself? *Seminars in immunology*, 12(3), 185–8; discussion 257–344.
- Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C., & Pattnaik, P. (2006). Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in Labeo rohita fingerlings. *Fish & shellfish immunology*, 20(3), 305–19.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- Ooi, V. E., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*, 7(7), 715–29.
- 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.
- 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.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Pietretti, D., Vera-Jimenez, N. I., Hoole, D., & Wiegertjes, G. F. (2013). Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard[®] and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. *Fish & shellfish immunology*, 35(3), 847–57.
- Pionnier, N., Falco, A., Miest, J. J., Shrive, A. K., & Hoole, D. (2014). Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β -glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. *Fish & shellfish immunology*.
- Pulcini, D., Wheeler, P. A., Cataudella, S., Russo, T., & Thorgaard, G. H. (2013). Domestication shapes morphology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of fish biology*, 82(2), 390–407.
- 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.
- 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.
- Reyes Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-Lopez, F., Toro-Ascuy, D., Sandino, A. M., Felipe Reyes-López, Daniela Toro-Ascuy, A. M., & Imarai, M. (2012). Fish Cytokines and Immune Response. En H. Turker (ed.), *New advances and contributions to fish biology* (pp. 3–58). InTech.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., ... Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9577–82.
- 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.
- 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.
- Rombout, J. H. W. M., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 616–26.

- Rondon-Barragan, I. (2010). Receptores similares a Toll en peces : el inicio de la divergencia. *Investigación Veterinaria*, 11(1), 15–30.
- Russell, S., & Lumsden, J. S. (2005). Function and heterogeneity of fish lectins. *Veterinary immunology and immunopathology*, 108(1-2), 111–20.
- 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.
- Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., & Guzmán, F. (2012). Anti-peptide antibodies : A tool for detecting IL-8 in salmonids, 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.
- Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics*, 1(1), 89–101.
- 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.
- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 293–306.
- Sernapesca. (2012). Anuario desembarques. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 229–243.
- 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.
- 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.
- 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.

- Stein, C., Caccamo, M., Laird, G., & Leptin, M. (2007). Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome biology*, 8(11), R251.
- 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 immunology*, 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 immunology*, 30(1), 340–6.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish : a review, 2011(10), 486–503.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiology & behavior*, 94(2), 276–84.
- Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1703–18.
- Wang, T., Holland, J. W., Bols, N., & Secombes, C. J. (2005). Cloning and expression of the first non-mammalian interleukin-11 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The FEBS journal*, 272(5), 1136–47.
- 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.
- 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.
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, 23(6), 1127–51.
- Wilson, J. M., & Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *The Journal of experimental zoology*, 293(3), 192–213.
- 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.
- 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.

- 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.
- Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2003a). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296–306.
- Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2003b). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296–306.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G., & Li, X. (2014a). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 380–388.
- 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.
- Zhang, L., Zhang, B.-C., & Hu, Y.-H. (2014b). Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: identification, expression, and effect on bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*.
- 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.
- 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.
- 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*.
- Zou, J., Clark, M. S., & Secombes, C. J. (2003a). Characterisation, expression and promoter analysis of an interleukin 10 homologue in the puffer fish, Fugu rubripes. *Immunogenetics*, 55(5), 325–35.
- Zou, J., Grabowski, P. S., Cunningham, C., & Secombes, C. J. (1999). Molecular cloning of interleukin 1beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine*, 11(8), 552–60.
- Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N., Ellis, & Secombes, C. (2003b). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(9), 813–822.

- Zou, J., Yoshiura, Y., Dijkstra, J. M., Sakai, M., Ototake, M., & Secombes, C. (2004). Identification of an interferon gamma homologue in Fugu, Takifugu rubripes. *Fish & shellfish immunology*, 17(4), 403–9.
- Zwollo, P., Ray, J. C., Sestito, M., Kiernan, E., Wiens, G. D., Kaattari, S., ... Epp, L. (2014). B cell signatures of BCWD-resistant and susceptible lines of rainbow trout: A shift towards more EBF-expressing progenitors and fewer mature B cells in resistant animals. *Developmental and comparative immunology*, 48(1), 1–12.