



**Universidad
Andrés Bello**

Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MOLECULAR EN TEJIDO
BRANQUIAL DE *ONCORHYNCHUS MYKISS* INMUNOESTIMULADO
CON ZYMOSÁN A LIBERADO EN DIETA**

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

MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Luis Mercado Vianco

Institución: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

presentado por:

Sebastián Rodrigo Sariego Benítez

Viña del Mar, Chile

Julio, 2014

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	v
1. Introducción	1
El género <i>Oncorhynchus</i>	1
Situación actual en Chile	2
Sistema inmune en peces	3
Inmunoestimulantes	7
β -glucanos	8
2. Hipótesis	9
3. Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
4. Materiales y Métodos	11
Material Biológico y Bioensayo	11
Peces	11
Dieta	11
Parametros fisicoquimicos del ensayo	12
Anticuerpos	12
Desafío y Controles	13
Muestreo	13

ÍNDICE GENERAL

Extracción de RNA	14
Cuantificación e Integridad de RNA	14
Síntesis de cDNA	14
PCR en Tiempo Real (qPCR)	14
Partidores	15
Estandarización de partidores	15
Extracción de Proteínas	15
Cuantificación de Proteínas	17
ELISA Indirecto	17
Activación de la placa	17
Bloqueo de sitios inespecíficos	17
Incubación primer anticuerpo	18
Incubación segundo anticuerpo y revelado	18
Inmunofluorescencia	18
Desparafinización e Hidratación	18
Bloqueo	18
Incubación de anticuerpo primario	19
Incubación anticuerpo secundario y tinción de DNA (Núcleos)	19
Montaje	19
Microscopía Confocal	19
Análisis Estadístico	19
5. Resultados	20
Bioensayo	21
Extracción y Cuantificación de RNA	23
Estandarización de Partidores	23
EF-1 α	23
IL-12	24
TNF- α	24
IFN- γ	25

ÍNDICE GENERAL

IL-1 β	25
iNOS	25
PCR en tiempo real	26
Extracción y Cuantificación de Proteínas	28
Validación de anticuerpos	29
Anticuerpos producidos en conejo	30
Anticuerpos producidos en ratón	30
ELISAs Indirectos	30
TNF- α	30
IFN- γ	31
IL-1 β	31
iNOS	32
IL-12	32
6. Bibliografía	33

Índice de figuras

1.1. Ciclo productivo de la trucha arcoíris	2
1.2. Desembarques de Trucha arcoíris en Chile	3
4.1. Esquema general de trabajo	11
4.2. Diseño de placa para PCR en tiempo real	15
5.1. Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma	21
5.2. Crecimiento promedio de truchas en estudio	21
5.3. Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α	24
5.4. Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β	24
5.5. Curvas de estandarización del partidor para TNF- α	24
5.6. Curvas de estandarización del partidor para IFN- γ	25
5.7. Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β	25
5.8. Curvas de estandarización del partidor para iNOS	26
5.9. Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1a	26
5.10. Expresión relativa de los genes en estudio frente a EF-1 α	27
5.11. Curva de calibrado BCA	28
5.12. Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto	29
5.13. Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio	31

Índice de tablas

1.1. Estructuras de β -Glucanos según su origen	8
4.1. Lista de Anticuerpos Usados	12
4.2. Lista de Anticuerpos Comerciales Usados	12
4.3. Identificantes de muestras	13
4.4. Preparación de Master Mix para qPCR	15
4.5. Lista de Partidores	16
4.6. Programa Termociclador para estandarización de Partidores	16
4.7. Composición Buffer de Lisis	16
5.1. Concentraciones de RNA total extraído	23
5.2. Concentraciones de Proteínas totales extraídas	28

1 Introducción

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

El género *Oncorhynchus*

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

Algunas características principales de este genero son las siguientes

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

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

La trucha arcoiris, descrita inicialmente por Walbaum en 1972 tiene un cuerpo alargado fusiforme con 60 a 66 vertebras, con 3 a 4 espinas dorsales, 10 a 12 rayos dorsales blandos, 3 a 4 espinas anales, 8 a 12 rayos anales blandos y 19 rayos caudales. Presentan una aleta con gran tejido adiposo, la cual usualmente contiene un borde negro. Tienen como coloración principal tonalidades de azul

1 Introducción

a verde oliva, sobre una banda rosa a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella, configuración cromática que le da su nombre *arcoíris*.

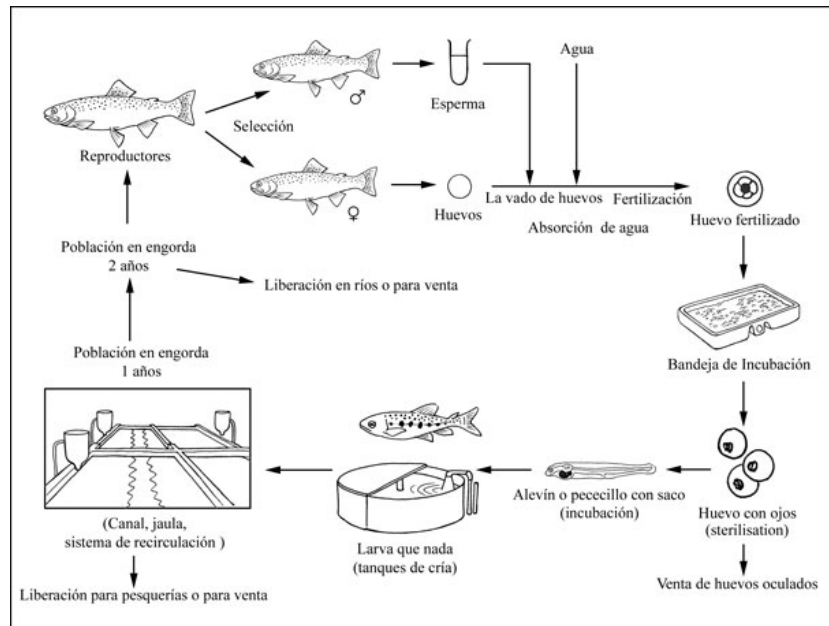


Figura 1.1: Ciclo productivo de la trucha arcoíris

Este pez es resistente, de crecimiento rápido y tolerante a una amplia gama de manipulaciones y ambientes, pudiendo así ocupar una variedad de hábitats y diferentes temperaturas. La temperatura ideal para el cultivo de la trucha arcoíris está por debajo de 21° C, aunque en etapa de desove y crecimiento la temperatura tiene que estar en el rango de 9 a 14°C (Figura 1.1).

Situación actual en Chile

Los desembarques de Trucha arcoíris 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).

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

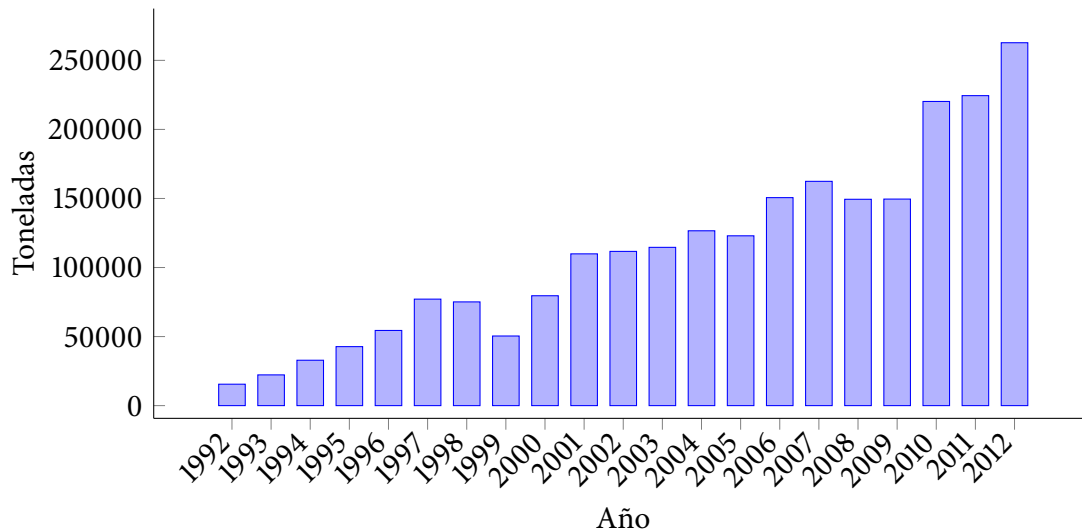


Figura 1.2: Desembarques de Trucha arcoíris en Chile

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

Sistema inmune en peces

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

La respuesta inmune innata o inespecífica en peces es muy importante, ya que constituye la primera y más importante línea de defensa del pez frente a un gran número de patógenos, en esta respuesta convergen factores humorales y celulares (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000; L.-Y. Zhu et al., 2012). Este tipo de inmunidad está basado en el reconocimiento no clonal de los componentes estructurales o secretados de los patógenos microbianos (Athman et al., 2004), los cuales son llamados patrones moleculares asociados a patógenos (o PAMPs, por sus siglas en inglés), estos a su vez son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (PRR, por sus siglas en inglés) (Gordon, 2002), entre los cuales se encuentran receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), el receptor de complemento tipo-3 (CR3), Dectina-1, proteína C-reactiva, entre otros (Rondon-Barragan, 2010). Entre los PAMPs más clásicos se puede encontrar a las secuencias de ADN CpG sin metilar, los lipopolisacáridos (LPS) y el RNA bicatenario viral. La interacción entre

los PRR (como los TLR) y los PAMP es la reacción que desencadenará e iniciará la transducción de señales intracelular que resultara en la expresión de genes involucrados en la inflamación, respuesta antiviral y maduración de células con fenotipo dendrítico (Aghaallaei et al., 2010); TLRs individuales activan factores de transcripción únicos y comunes a través de diferentes vías de señalización para generar una respuesta biológica específica ante microorganismos (N. C. Bols et al., 2001; A. E. Ellis, 2001; Kawai et al., 2005)

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

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

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

Dentro de la familia de las interleuquinas podemos encontrar la Interleuquina 1 β , la citoquina proinflamatoria mas estudiada, todo debido a su rol mediador de enfermedades autoinflamato-

rias. Es producida principalmente por macrófagos activados, células dendríticas y monocitos, y afecta a casi cualquier tipo celular, jugando un rol central en la generación de respuestas sistémicas y locales a la infección, así como también en respuesta a daños y desafíos inmunológicos (Reis et al., 2012). Esta citoquina potencialmente induce la proliferación, diferenciación y activación de células no específicas, como NK, macrófagos, etc..., así como también una respuesta inmune específica, activando linfocitos B y T (Hong et al., 2004; Taechavasonyoo et al., 2013). Junto con IL-1 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 (Teles et al., 2011; T. Wang et al., 2004; J. Zou et al., 2003). Promueve la necrosis hemorrágica de tumores, así como también mejora la fagocitosis y citotoxicidad de neutrófilos. Mejora la síntesis de prostaglandina E2 y óxido nítrico (NO), y modula la expresión de muchas citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6 y algunas quimioquinas. IL-1 β y TNF α son ampliamente usados como marcadores de respuesta inmune innata (Z. Zhang et al., 2009).

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

La interleucina 12 (IL-12) es una citoquina heterodimérica, compuesta por las subunidades p35 y p40, la primera miembro de la familia de la interleucina 6 con 4 α -hélices en su topología y p40 recuerda una forma asociada a un receptor de citoquinas solubles (Huisin et al., 2006; Yoshiura et al., 2003). Esta citoquina pro-inflamatoria es producida en las etapas iniciales de la respuesta inmune por monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, y una de sus principales funciones es inducir la síntesis de otras citoquinas, como el anteriormente nombrado IFN- γ , que sirve como orquestador en la maduración de un linfocito T *naive* a un fenotipo Th1 (Nascimento et al., 2007), y es gracias a esta función se considera como un medidor entre la respuesta innata y adaptativa de la inmunidad (Lu Zhang et al., 2014).

Dentro de las moléculas efectoras de la respuesta inmune la óxido nítrico sintasa de tipo inducible (iNOS), propia de fagocitos (Wu et al., 2008; Zhao et al., 2010), aumenta su expresión durante eventos de inflamación, y a su vez, es propia del estallido respiratorio de los macrófagos proveyendo así

a la célula de un ambiente citotóxico ideal para los eventos pro-inflamatorios por la producción de Óxido Nítrico (NO), catalizando la oxidación de L-arginina (Yang et al., 2013). Esta molécula, puede ser activada en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK ya sea por citoquinas, endotoxinas, o ambas (Bogdan, 2001; MacMicking et al., 1997). Estas características demuestran la importancia del rol de iNOS y su producto gaseoso NO en el sistema inmune, ya que a diferencia de las otras NOS, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) esta no tiene una síntesis basal ni constitutiva, haciendo de esta molécula un marcador inmunológico de importancia para estudiar procesos inmunológicos.

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

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

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





Una de las principales diferencias entre el sistema inmune de peces teleósteos con el de mamíferos es la carencia de médula ósea y ganglios linfáticos, por lo cual no se puede marcar una diferencia

entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides (Fernández et al., 2002; Olabuenaga, 2000). Entre los principales órganos pertenecientes al sistema inmune de peces podemos encontrar el timo, el riñón y el bazo. El riñón cefálico es el principal órgano en la diferenciación de linfocitos B, ya que es el primer órgano en el que aparecen estas células durante el desarrollo del pez, también es el órgano donde se produce la eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis y monocitopoyesis (Whyte, 2007), por lo que se le puede considerar a la vez un órgano análogo a la médula ósea de los mamíferos (Razquin et al., 1990). Los centros melanomacrofágicos son una agregación de macrófagos que contienen melanina, un pigmento de color oscuro, su tamaño y número está directamente relacionado con el estado del pez, ya que estas variables aumentan considerablemente en peces enfermos, donde el catabolismo ha sido excesivo. Algunos estudios ontogénicos realizados en salmónidos sugieren que la función del bazo no es esencial en la maduración del sistema inmunológico, ya que los linfocitos del timo y riñón cefálico estarían más involucrados que este órgano en esta maduración. Otros estudios sin embargo indican, que bajo un desafío antigénico aparecen linfocitos B en el bazo, teniendo parámetros similares a los presentados por estas células en otros órganos como el riñón cefálico.

Inmunoestimulantes

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

β -glucanos**Tabla 1.1:** Estructuras de β -Glucanos según su origen

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

Estructuras de β -Glucanos según su origen

Los β -glucanos son carbohidratos que consisten en moléculas de glucosas enlazadas, los cuales son componentes estructurales de gran importancia en paredes celulares de levaduras, hongos, algas y algunas bacterias. Estos carbohidratos también forman parte de la pared celular endospermas de algunos cereales como la cebada y la avena. Dependiendo del origen del β -glucano encontraremos diferencias también en sus estructuras moleculares y sus posibles ramificaciones (Tabla 1.1) (Skov et al., 2012; Volman et al., 2008).

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

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

2 Hipótesis

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

3 Objetivo General

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

Objetivos Específicos

1. Implementar un sistema de alimentación para la liberación en dieta de Zymosán 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 Zymosán A liberado en dieta.
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.
4. Relacionar el nivel de expresión y detección de moléculas de respuesta inmune evaluadas en tejido branquial con el nivel de dosificación oral de zimosán.

4 Materiales y Métodos

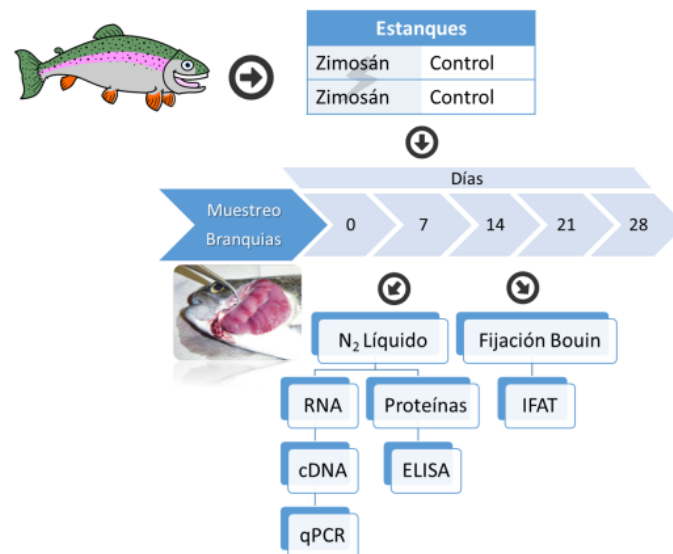


Figura 4.1: Esquema general de trabajo

Material Biológico y Bioensayo

Peces

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

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

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.

Anticuerpos

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

Tabla 4.1: Lista de Anticuerpos Usados

Molécula (Anti)	Huesped	Origen	Secuencia Inmunógeno	Dilución Anticuerpo		
				ELISA	WB	IFAT
TNF- α	Conejo	Suero	WRKDDGQAFSQQGGFE	1:2000	1:500	1:500
TNF- α	Ratón	Suero		-	1:500	-
IL-1 β	Conejo	Suero	DLLNFLLESAAVEEHI	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*

Desafío y Controles

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

Muestreo

Los peces se sacrificaron con sobredosis del sedante Kalmagin 20 % (Benzocaína 20 % CentroVet), se tomaron muestras los días 0, 7, 14, 21 y 28, 5 peces por condición, intercalando 3 peces de un estanque y 2 de su par respectivo en cada día de muestreo (Tabla 4.3). Las muestras se tomaron en dos grupos, primero se tomaron ejemplares de branquias y se fijaron con solución de Bouin (71 % solución saturada al 1,2 % de Ácido pícrico, 24 % formaldehído y 5 % ácido acético glacial) por 7 horas y luego se lavaron 3 veces con Etanol al 70 %, dejándolos en este alcohol hasta su posterior uso. Para el otro grupo se procedió a pulverizar con Nitrogeno Líquido usando un mortero, para ser usado en las extracciones de RNA y Proteínas.

Tabla 4.3: Identificantes de muestras

ID	Muestra	ID	Muestra	ID	Muestra	ID	Muestra	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)

Extracción de RNA

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

Cuantificación e Integridad de RNA

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

Síntesis de cDNA

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

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.

PCR en Tiempo Real (qPCR)

La cuantificación por PCR a tiempo real permite monitorizar la reacción de PCR al mismo tiempo que ésta tiene lugar. Se empleó como estrategia para realizar la cuantificación el uso de la sonda SYBR Green® del kit Brilliant III Ultra-Fast (Agilent) ((Wittwer et al., 1997)). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima “*Taq* DNA Polimerasa”, dNTPs, MgCl₂ y el tampón de PCR, e incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR Green I, que detecta DNA de doble hélice, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Hard-Shell de Bio-Rad) (Figura 4.2).

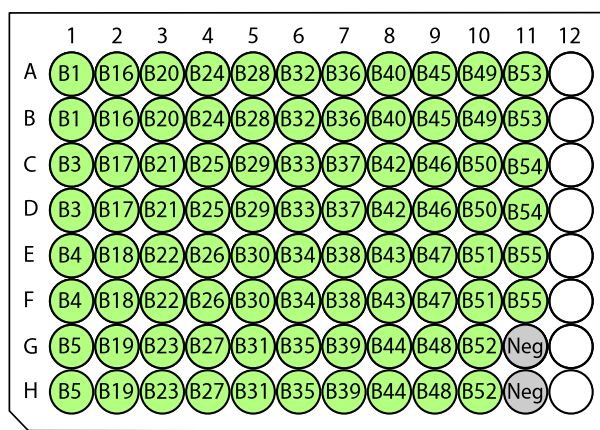


Figura 4.2: Diseño de placa para PCR en tiempo real

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

Tabla 4.4: Preparación de Master Mix para qPCR

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

Tabla de reactivos para 1 reacción de qPCR

Partidores

Estandarización de partidores

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

Extracción de Proteínas

Se agregó una pequeña cantidad de tejido pulverizado a 500µL de Buffer de Lisis (Tabla 4.7) y se homogenizó con el equipo FastPrep24 con un programa de 4,5 movimientos por segundo durante

4 Materiales y Métodos

Tabla 4.5: Lista de Partidores

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

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

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

Tabla 4.6: Programa Termociclador para estandarización de Partidores

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95 $^{\circ}$	03:00 min	1
Denaturación	95 $^{\circ}$	00:10 seg	39
Annealing en Gradiente	62 $^{\circ}$ \rightarrow 52 †	00:10 seg	39
Extensión	60 $^{\circ}$	00:10 seg	39

† El gradiente varía dentro de esas temperaturas según los partidores

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

Cuantificación de Proteínas

Para cuantificar las proteínas totales extraídas se usó el método del ácido bicinonínico (BCA, por sus siglas en inglés), el cual está basado en la capacidad de este compuesto por formar un intenso complejo purpura con el ion cuproso en un entorno básico, 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En una placa de cultivo de 96 pocillos se cargaron 25 μL de cada concentración de la curva de calibrado y 25 μL de cada extracto de proteínas en una dilución 1:50, todas las muestras incluyendo la curva se cargaron en duplicado. Luego se agregaron 200 μL del reactivo BCA en una relación 50:1 (A:B) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incubó la microplaca a 37°C. Para la lectura de la placa se usó un lector espectrofotométrico de microplacas (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices) a una longitud de onda de 562nm.

ELISA Indirecto

Para determinar la presencia de las moléculas en estudio se realizaron ensayos de ELISA -del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*- Indirecto.

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 μL de PBS 1X-Tween20 0,05 % (PBST 0,05 %).

Bloqueo de sitios inespecíficos

Para bloquear los sitios inespecíficos donde no se unió el antígeno se usó BSA diluida (200 μL 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 μL PBST 0,05 % usando un lavador de microplacas.

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 %

Incubación segundo anticuerpo y revelado

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

Inmunofluorescencia

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

Desparafinización e Hidratación

Los cortes previamente emparafinados se les quitó la parafina incubándolos 2 veces durante 5 minutos en NeoClear®(Merck) 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.

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 pérdida 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.

Incubación de anticuerpo primario

El anticuerpo primario se diluyó en PBSA 1 % según corresponda (Tabla 4.1) y se agregaron aproximadamente 50µL 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.

Incubación anticuerpo secundario y tinción de DNA (Núcleos)

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

Montaje

El montaje fue realizado usando el medio de Montaje VECTASHIELD para Inmunofluorescencia (VectorLabs) agregando 25µL 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.

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).

Analisis 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 ($\alpha = 0.05$).

5 Resultados

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

5 Resultados

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

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 1 y 4) (Fig. 5.1).

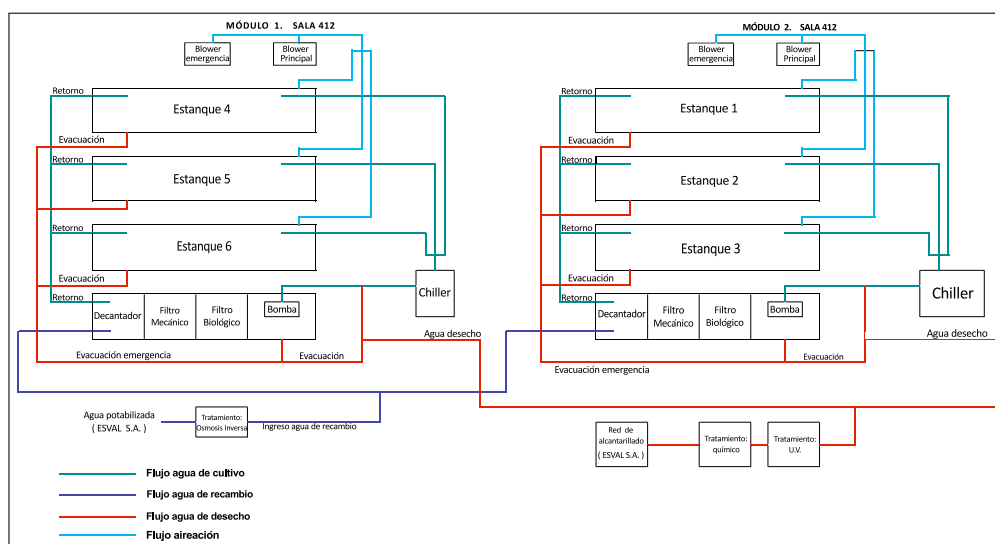


Figura 5.1: Diagrama de flujo Centro de Investigaciones en Acuicultura Curauma



Figura 5.2: Crecimiento promedio de truchas en estudio

Al momento de sacrificar las truchas por sobre-sedación se procedió a pesarlas, comparando la dieta control y la con β -glucanos para evaluar si la alimentación generaba algún cambio de peso

5 Resultados

comparando con el control, pero se demostró que los pesos de los peces controles y tratados se mantuvieron similares durante todo el bioensayo (Fig. 5.2), no apreciándose ninguna diferencia significativa entre ambos grupos. Tampoco hubo otra causa de muerte que no fuera el sacrificio en el bioensayo, demostrando que la dosis suministrada de zimosán no era letal.

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.”

Extracción y Cuantificación de RNA

Se obtuvieron las siguientes cuantificaciones de RNA

Tabla 5.1: Concentraciones de RNA total extraído

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

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

Estandarización de Partidores

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

EF-1α

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

5 Resultados

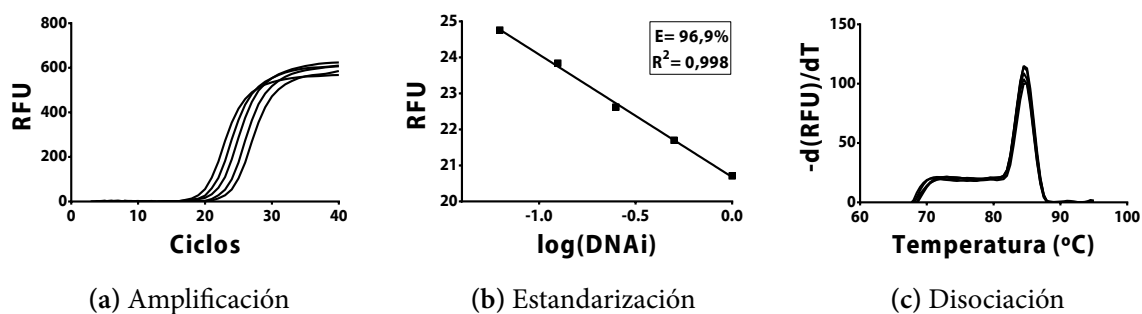


Figura 5.3: Curvas de estandarización del partidor para EF-1 α

IL-12

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

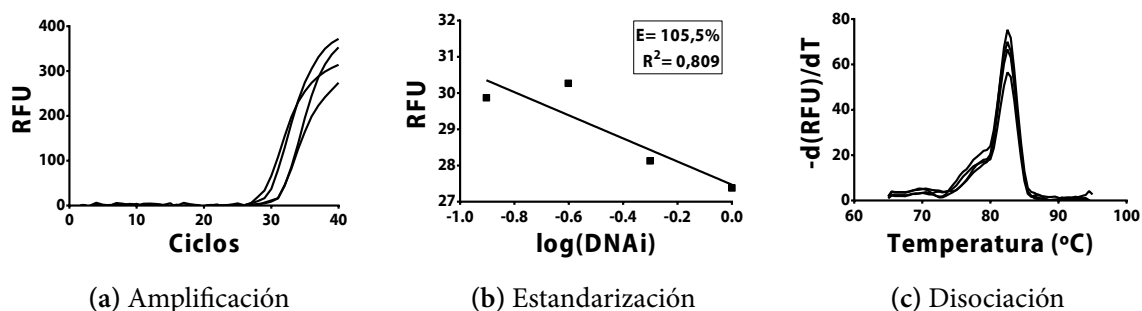


Figura 5.4: Curvas de estandarización del partidor para IL-12

TNF- α

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

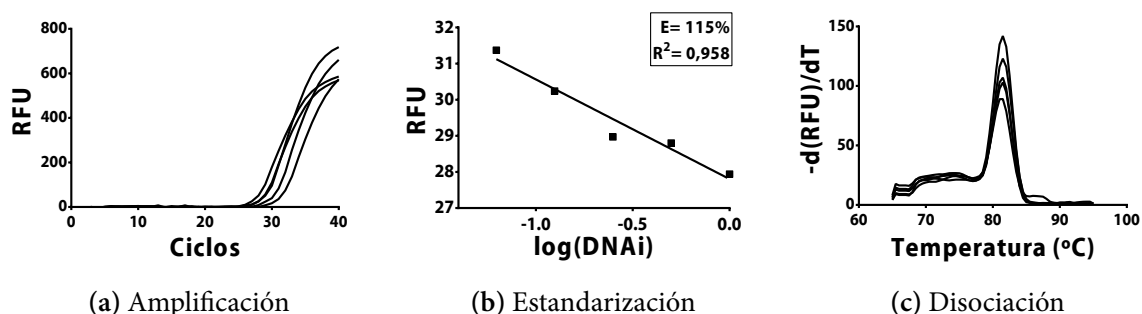


Figura 5.5: Curvas de estandarización del partidor para TNF- α

IFN- γ

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

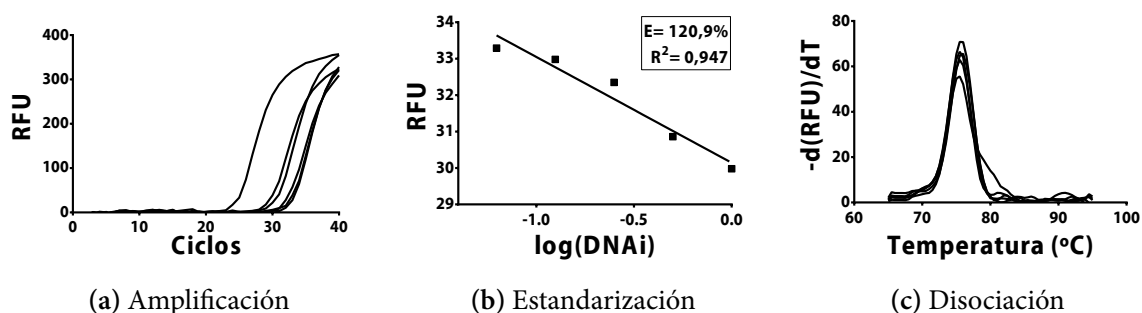


Figura 5.6: Curvas de estandarización del partidor para IFN- γ

IL-1 β

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

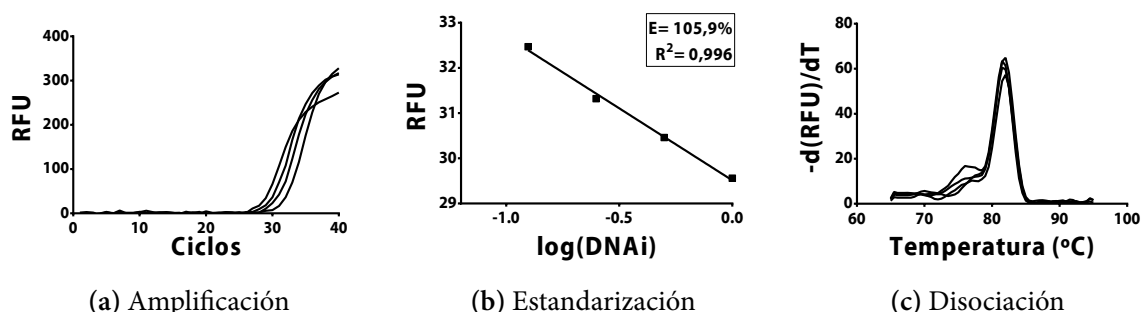


Figura 5.7: Curvas de estandarización del partidor para IL-1 β

iNOS

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

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

5 Resultados

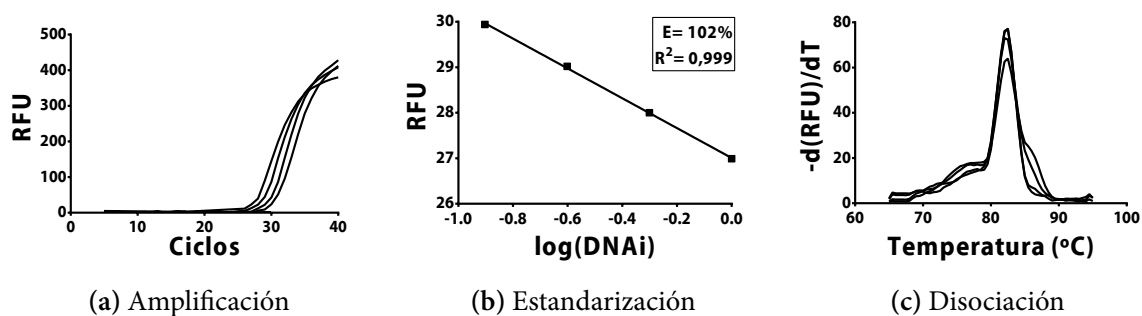


Figura 5.8: Curvas de estandarización del partidor para iNOS

PCR en tiempo real

Para evaluar la cuantificación relativa de cada gen en estudio frente al gen de referencia, en este caso el factor de elongación 1 alfa ($EF-1\alpha$), 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.

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

El cálculo del valor $\Delta\Delta C_T$ implica restar a cada ΔC_T el valor del ΔC_T de un calibrador, que es una muestra utilizada como base para los resultados relativos. Al ser una resta de un valor arbitrario, la desviación del $\Delta\Delta C_T$ es la misma que la del ΔC_T . Una vez obtenidos estos valores, la cantidad de un gen problema, normalizado a una referencia endógena y relativa a un calibrador, viene dada por la fórmula:

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

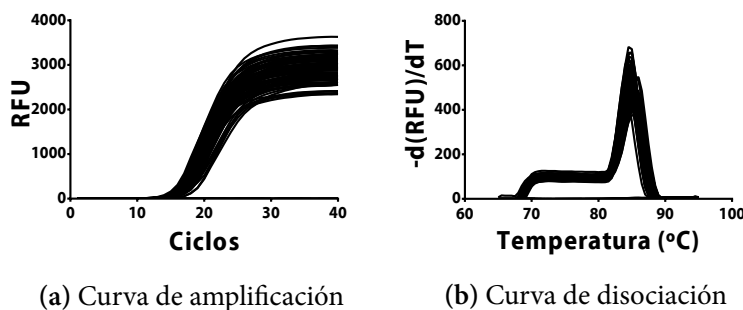
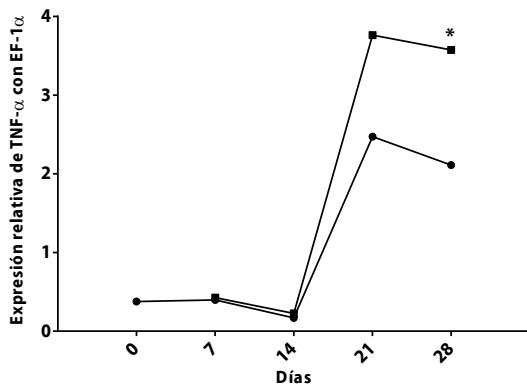


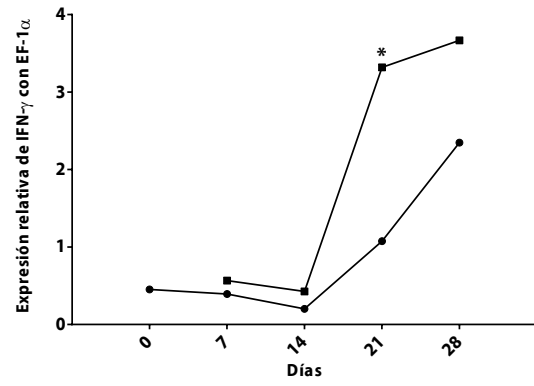
Figura 5.9: Reacción de PCR en Tiempo real para el gen de referencia EF-1a

Los resultados de expresión relativa obtenidos se pueden observar en la Figura 5.10

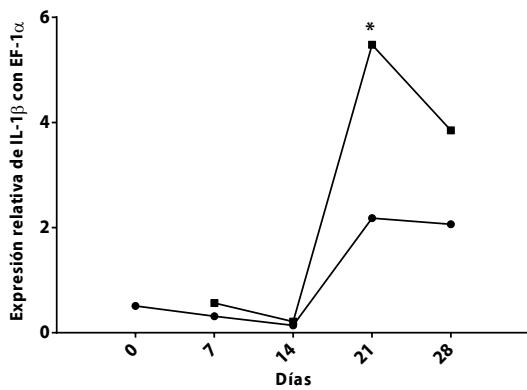
5 Resultados



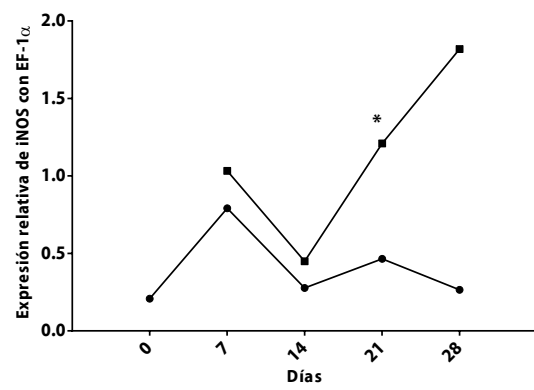
(a) TNF- α



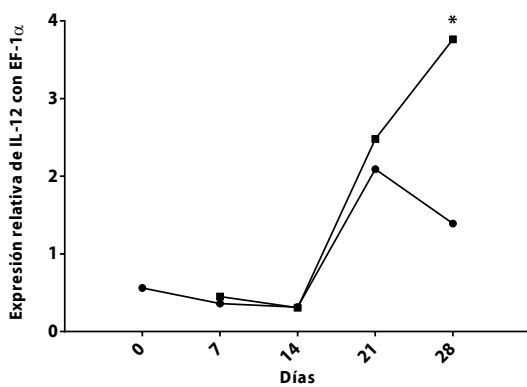
(b) IFN- γ



(c) IL-1 β



(d) iNOS



(e) IL-12

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

5 Resultados

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.”

Extracción y Cuantificación de Proteínas

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

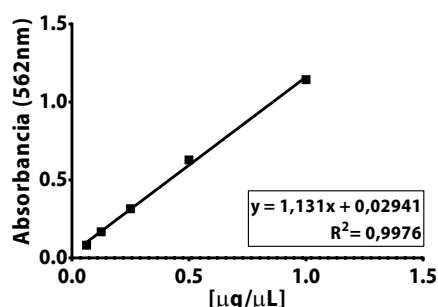


Figura 5.11: Curva de calibrado BCA

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

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

Tabla 5.2: Concentraciones de Proteínas totales extraídas

ID	µg/µL	ID	µL/µL	ID	µL/µL	ID	µL/µL	ID	µL/µL
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		

Validación de anticuerpos

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

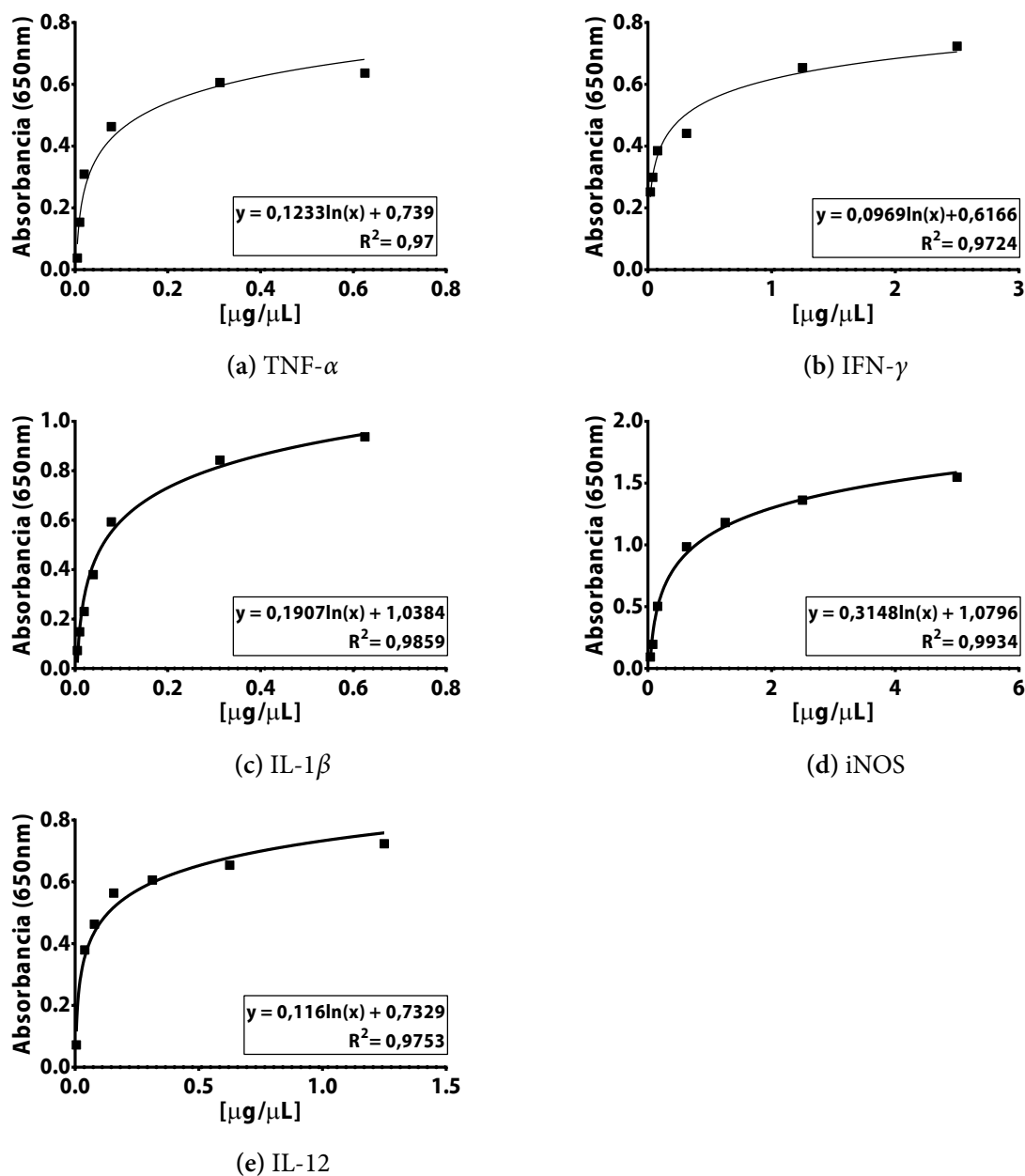


Figura 5.12: Evaluación cualitativa de los anticuerpos en estudio usando sus inmunógenos como antígenos, mediante ELISA Indirecto

Anticuerpos producidos en conejo

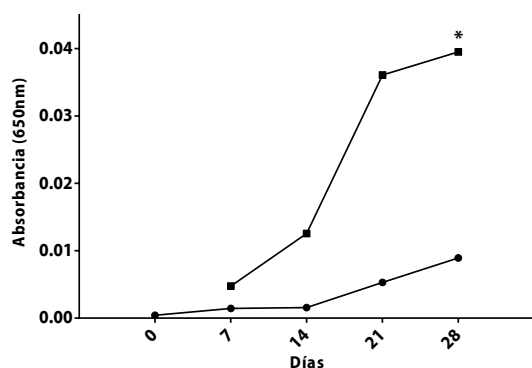
Para el caso de los anticuerpos producidos en conejo, anti-TNF- α se obtuvo una curva con un R^2 de 0,97 (Figura 5.12 a), el anticuerpo anti-IFN- γ obtuvo una curva con un R^2 de 0,9724 (Figura 5.12 b) y finalmente el anticuerpo anti-IL-1 β producido en conejo se obtuvo una curva con un R^2 de 0,9859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

Anticuerpos producidos en ratón

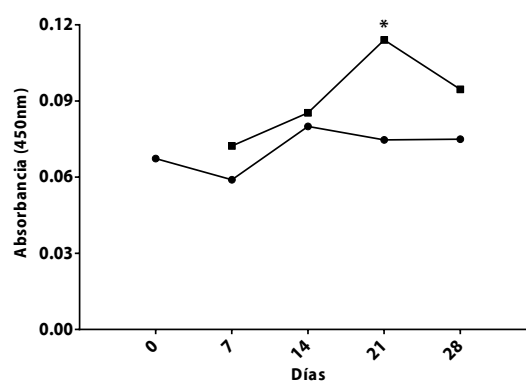
En el caso de los anticuerpos producidos en murinos, anti-iNOS obtuvo una curva con un R^2 de 0,9934 (Figura 5.12 d) y para el anticuerpo anti-IL-12 se obtuvo un R^2 de 0,9753 (Figura 5.12 e).

ELISAs Indirectos

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



(a) TNF- α



(b) IFN- γ

TNF- α

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

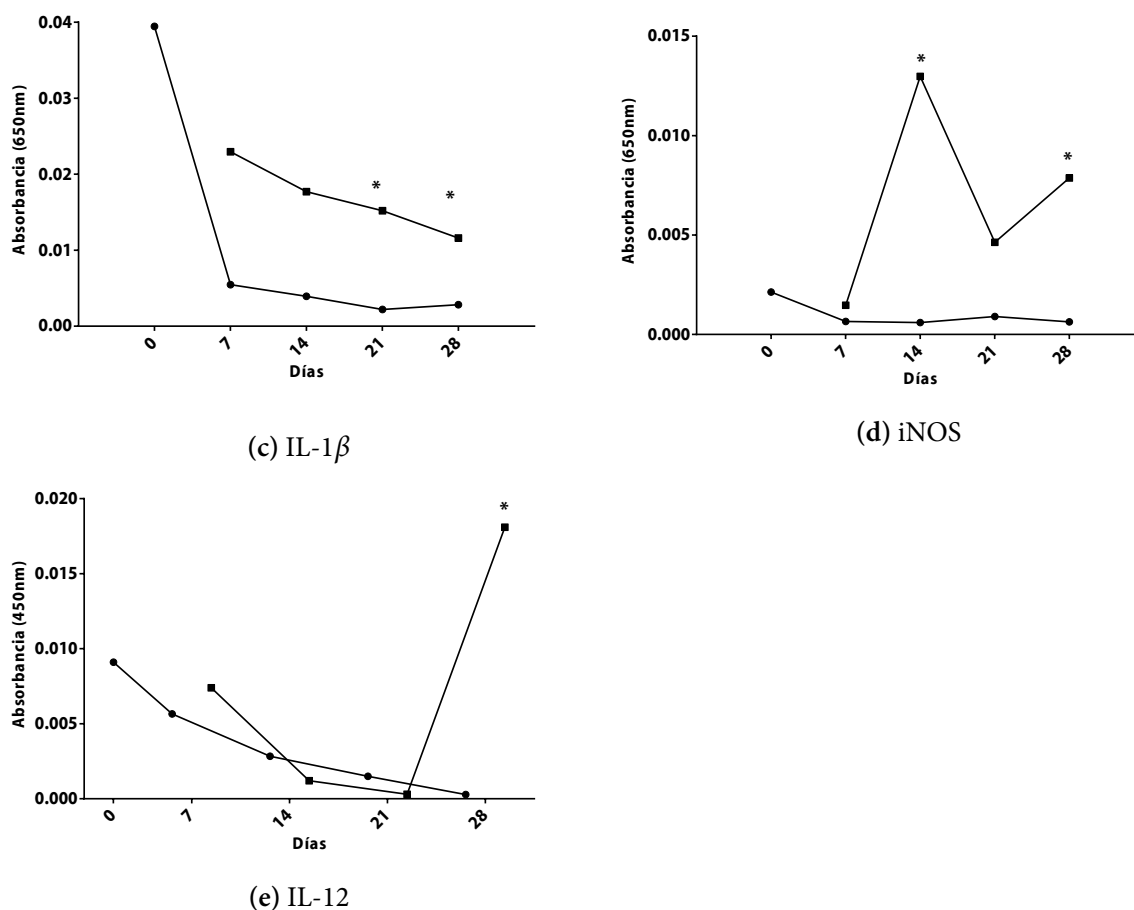


Figura 5.13: Detección mediante ELISA indirecto de las moléculas en estudio

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.

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 ($p \leq 0,05$).

iNOS

Para la enzima Oxido Nitrico 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 ($p \leq 0,05$).

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 ($p \leq 0,05$).

6 Bibliografía

- Abarca, A. (2011). *Implementación de un modelo in vitro para determinar el poder inmunoestimulante de b-glucanos en macrófagos de trucha arcoiris* (PhD thesis). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Abarca, A., Bethke, J., Narváez, E., Flores, R., & Mercado, L. (2012). Parameters to evaluate the immunostimulant effect of Zymosan A in head kidney leucocytes (HKL) of salmonids Parámetros para la evaluación del efecto de Zimosán A como inmunoestimulante sobre leucocitos de riñón cefálico (HKL) de salmónidos, 40(3), 545–552.
- Aghaallaei, N., Bajoghli, B., Schwarz, H., Schorpp, M., & Boehm, T. (2010). Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gfp reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(42), 18079–84.
- Ainsworth, A. (1992). Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 123–148.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126(3-4), 171–98.
- Athman, R., & Philpott, D. (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7(1), 25–32.
- Bengtén, E., Quiniou, S. M.-A., Stuge, T. B., Katagiri, T., Miller, N. W., Clem, L. W., ... Wilson, M. (2002). The IgH Locus of the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, Contains Multiple Constant Region Gene Sequences: Different Genes Encode Heavy Chains of Membrane and Secreted IgD. *J. Immunol.*, 169(5), 2488–2497.
- Bethke, J., Rojas, V., Berendsen, J., Cárdenas, C., Guzmán, F., Gallardo, J. A., & Mercado, L. (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *J. Fish Dis.*, 35(5), 379–88.
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A. M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 30(2), 451–5.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 749–95.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, 2(10), 907–16.

- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., & Lee, L. E. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9), 853–873.
- Bricknell, I., & Dalmo, R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 19(5), 457–72.
- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M. P., Six, a, Benmansour, a, & Boudinot, P. (2011). T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 31(5), 644–54.
- Chang, C.-i., Pleguezuelos, O., Zhang, Y.-a., Zou, J., & Secombes, C. J. (2005). Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infect. Immun.*, 73(8), 5053–64.
- Chang, C.-I., Zhang, Y.-A., Zou, J., Nie, P., & Secombes, C. J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1), 185–95.
- Chettri, J. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2013). Immunomodulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry by bath exposure to a β -glucan from *Euglena gracilis*. *Aquac. Res.*, 44(9), 1407–1415.
- Dalmo, R. a, & Bøgwald, J. (2008). Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.*, 25(4), 384–96.
- Ellis, A. E. (1977). The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11(5), 453–491.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9), 827–39.
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura - 2012* (p. 251).
- Fernández, A., Ruiz, I., & Blas, I. D. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Rev. Aquat.*, 16.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields' Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Georgiadis, M., Gardner, I., & Hedrick, R. (2001). The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev. Vet. Med.*, 48(4), 287–302.
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927–30.
- Graves, S. S., Evans, D. L., Cobb, D., & Dawe, D. L. (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). I. Optimum requirements for target cell lysis. *Dev. Comp. Immunol.*, 8(2), 293–302.
- Groot, C., & Margolis, L. (1991). *Pacific Salmon Life Histories*. University of British Columbia Press.

- Hong, S., Zou, J., Collet, B., Bols, N. C., & Secombes, C. J. (2004). Analysis and characterisation of IL-1 β processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.*, 16(3), 453–9.
- Huising, M. O., Schijndel, J. E. van, Kruiswijk, C. P., Nabuurs, S. B., Savelkoul, H. F. J., Flik, G., & Verburg-van Kemenade, B. M. L. (2006). The presence of multiple and differentially regulated interleukin-12p40 genes in bony fishes signifies an expansion of the vertebrate heterodimeric cytokine family. *Mol. Immunol.*, 43(10), 1519–33.
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(4), 338–44.
- Kumari, J., & Sahoo, P. K. (2006). Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 70(1-2), 63–70.
- Kühlwein, H., Merrifield, D. L., Rawling, M. D., Foey, a D., & Davies, S. J. (2014). Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 98(2), 279–89.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., & Luo, L. (2011). Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol.*, 31(6), 788–94.
- Lokesh, J., Fernandes, J. M. O., Korsnes, K., Bergh, O., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2012). Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(3), 626–31.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 323–50.
- Maier, V. H., Dorn, K. V., Gudmundsdottir, B. K., & Gudmundsson, G. H. (2008). Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Mol. Immunol.*, 45(14), 3723–30.
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S. H., & Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electron. J. Biotechnol.*, 8(3), 284–290.
- Narváez, E., Berendsen, J., Guzmán, F., Gallardo, J. a, & Mercado, L. (2010). An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(1), 235–9.
- Nascimento, D. S., Vale, A. do, Tomás, A. M., Zou, J., Secombes, C. J., & Santos, N. M. S. dos. (2007). Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Mol. Immunol.*, 44(9), 2277–91.
- Olabuenaga, S. E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2).

- Palić, D., Beck, L. S., Palić, J., & Andreassen, C. B. (2011). Use of rapid cytochemical staining to characterize fish blood granulocytes in species of special concern and determine potential for function testing. *Fish Shellfish Immunol.*, 30(2), 646–52.
- Peddie, S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86(1-2), 101–113.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9), e45.
- Razquin, B. E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., & Villena, A. J. (1990). Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, 36(2), 159–173.
- Reis, M. I. R., Vale, A. do, Pereira, P. J. B., Azevedo, J. E., & Dos Santos, N. M. S. (2012). Caspase-1 and IL-1 β processing in a teleost fish. *PLoS One*, 7(11), e50450.
- Rodríguez, I., Chamorro, R., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, 27(2), 369–73.
- Rojas, V., Guzman, F., & Morales-lange, B. (2012). Immunological strategy for detecting the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in salmonids. *Electron. J. Biotechnol.*, 15.
- Rondon-Barragan, I. (2010). Receptores similares a Toll en peces : el inicio de la divergencia. *Investig. Vet.*, 11(1), 15–30.
- Salazar-Mather, T., & Hokeness, K. (2006). Cytokine and Chemokine Networks: Pathways to Antiviral Defense. In T. E. Lane (ed.), *Chemokines Viral Infect.* (Vol. 303, pp. 29–46). Springer Berlin Heidelberg.
- Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., & Guzmán, F. (2012). Anti-peptide antibodies : A tool for detecting IL-8 in salmonids, 15.
- Savan, R., & Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics*, 1(1), 89–101.
- Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12), 1336–45.
- Sernapesca. (2012). Anuario desembarques. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50(3), 229–243.
- Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B., & Buchmann, K. (2012). Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(1), 111–20.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1), 76–85.
- Subpesca. (2013). Cuenta Pública de Estado de los Recursos. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- Taechavasonyoo, A., Kondo, H., Nozaki, R., Suzuki, Y., & Hirono, I. (2013). Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 34(1), 393–6.
- Teles, M., Mackenzie, S., Boltaña, S., Callol, a, & Tort, L. (2011). Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 30(1), 340–6.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol. Behav.*, 94(2), 276–84.
- Wang, T., Johnson, N., Zou, J., Bols, N., & Secombes, C. J. (2004). Sequencing and expression of the second allele of the interleukin-1beta1 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): identification of a novel SINE in the third intron. *Fish Shellfish Immunol.*, 16(3), 335–58.
- Wang, W.-S., Hung, S.-W., Lin, Y.-H., Tu, C.-Y., Wong, M.-L., Chiou, S.-H., & Shieh, M.-T. (2007). The effects of five different glycans on innate immune responses by phagocytes of hybrid tilapia and Japanese eels *Anguilla japonica*. *J. Aquat. Anim. Health*, 19(1), 49–59.
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(6), 1127–51.
- Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem. Biol.*, 5(10), 905–17.
- 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., Tyml, K., & Wilson, J. X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 217(1), 207–14.
- Yang, K., Zhang, S., Chen, D., Zhang, A., Wang, X., & Zhou, H. (2013). IFN- γ -activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(5), 1635–41.
- Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2003). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296–306.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–95.
- Zhang, L., Li, Y.-y., Chen, T., Xia, W., Zhou, Y., Wan, Y.-j., ... Xu, S.-q. (2011). Abnormal development of motor neurons in perfluorooctane sulphonate exposed zebrafish embryos. *Ecotoxicology*,

20(4), 643–52.

Zhang, L., Zhang, B.-C., & Hu, Y.-H. (2014). Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: identification, expression, and effect on bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.*

Zhang, Z., Swain, T., 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 Immunol.*, 26(5), 677–84.

Zhao, K., Huang, Z., Lu, H., Zhou, J., & Wei, T. (2010). Induction of inducible nitric oxide synthase increases the production of reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Biosci. Rep.*, 30(4), 233–41.

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

Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N., Ellis, & Secombes, C. (2003). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 27(9), 813–822.