CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

La levadura probiótica *Yarrowia lipolytica* modula la ruta de señalización del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en huachinango (*Lutjanus peru*)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Erika Zuleyma Alamillo Mendoza

La Paz, Baja California Sur, diciembre 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **8** horas del día **30** del Mes de **Noviembre** del 20**18**, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"La levadura probiótica *Yarrowia lipolytica* modula la ruta de señalización del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en huachinango (*Lutjanus peru*)"

Presentada por el alumno:

Erika Zuleyma Alamillo Mendoza

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Co-Tutor

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel
Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres
Co-tutora
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel
Co-tutor
Universidad de Murcia

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. Luvia Enid Sánchez Torres

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

Suplente

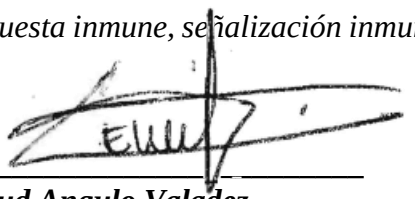
Dr. Dariel Tovar Ramírez

Resumen

El uso de levaduras probióticas en la dieta ha demostrado tener efectos benéficos en la salud de diversas especies de peces de interés acuícola. Particularmente las levaduras aisladas de ambientes extremos han mostrado potencial probiótico e inmunoestimulante; sin embargo, se ha estudiado poco sobre la(s) cascada(s) de señalización y la modulación de la respuesta inmune de peces asociada al reconocimiento de levaduras, en especial las aisladas de ambientes extremos. Curiosamente, el factor de transcripción nuclear de células T activadas (NFAT) está asociado a la regulación de la respuesta inmune por el reconocimiento de β-glucanos presentes en la pared celular de levaduras y se ha descrito en mamíferos ampliamente. En base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el potencial de la levadura *Yarrowia lipolytica* aislada de un ambiente extremo como probiótico e inmunoestimulante y analizar el papel que juega el NFAT y su cascada de señalización en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). Para ello, el potencial probiótico e inmunoestimulante de dos aislados, posteriormente identificadas como cepas de *Y. lipolytica*, obtenidos de la salinera de Guerrero Negro, B.C.S. se evaluaron usando experimentos *in vitro* e *in vivo* en huachinango. Adicionalmente, el factor de transcripción NFAT se caracterizó *in silico* y se analizó la expresión de genes asociados a la posible(s) ruta(s) de señalización. La evaluación *in vitro* de las cepas de levaduras demostró que tienen propiedades probióticas como tolerancia a diferentes salinidades, a bajo pH, a la presencia de bilis, y que poseen la capacidad de adherirse al intestino de huachinango. También en leucocitos aislados de huachinango que fueron estimulados con las levaduras y expuestos al patógeno *Vibrio parahaemolyticus* estas cepas mostraron potencial inmunoestimulante a través de la modulación en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y la respuesta antioxidante asociada. La evaluación *in vivo* mostró mayores niveles de IgM en los huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras, además de la no presencia de daño histológico en bazo e intestino. La evaluación de la expresión de genes relacionados con el factor de transcripción NFAT y respuesta inmune, mostró un aumento de la expresión de las interleucinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 e IL-8 que regulan la activación y reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. Finalmente, la caracterización *in silico* de NFAT mostró la estructura típica de esta familia de proteínas, así como la presencia de regiones específicas para exportación nuclear y reconocimiento de ADN, altamente conservadas y necesarias para la función de este factor de transcripción. Los resultados de este trabajo muestran el potencial probiótico e inmunoestimulante de dos cepas *Y. lipolytica* y se demostró que el factor de transcripción NFAT probablemente tiene una función similar a la descrita en mamíferos.

Palabras clave: *levaduras probióticas, respuesta inmune, señalización inmunológica, peces, Vibrio parahaemolyticus.*

Vo. Bo.



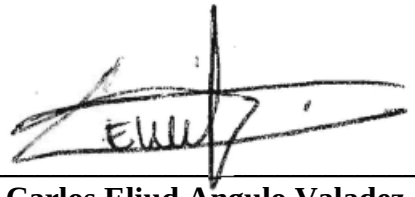
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de tesis

Summary

Probiotics diets have demonstrated benefic effects on health of diverse aquaculture fish species. Different extreme environment isolated microorganism species, yeast among them, have demonstrated probiotic and immunostimulant potential; however, the signaling pathway and immune response modulation associated to the recognition of this microorganism have been poorly studied. The objective of the present work is to analyze *Yarrowia lipolytica* probiotic and immunostimulant potential, and analyze the modulation of T cell activated nuclear factor (NFAT), a transcription factor associated to immune response regulation by yeast β-glucan, and it's signaling pathway in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). We evaluated probiotic and immunostimulant potential *in vitro* and *in vivo* of two marine yeast strains of *Y. lipolytica,* isolated from the solar saltern saline in Guerrero Negro, B.C.S., in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) an aquaculture potential fish species. The NFAT sequence from *L. peru* was in silico characterized. The *in vitro* evaluation of Y. lipolytica strains showed probiotic properties as salt, pH and bile tolerance, and intestine adhesion ability. The yeast strains showed immunostimulant potential as they modulated antioxidant response and gene expression in the Pacific red snapper leukocytes stimulated with the yeast strains and exposed to *V. parahaemolyticus.* The *in vivo* evaluation showed higher IgM levels on the fish feed with the yeast supplemented diets and also no histopathological damage on spleen and intestine. The gene expression evaluation of the NFAT signaling pathway and immune-related genes, showed a higher expression of proinflammatory interleukins such as IL-1β, IL-6 and IL-8 involved on neutrophil and macrophage activation and recruitment. The NFAT *in silico* characterization exhibited the typical structure of this protein family, highly conserved nuclear exportation and DNA recognition specific regions needed for this transcription factor function. These results probed probiotic and immunostimulant potential of the *Y. lipolytica* strains and allowed to hypothesize NFAT function similarity to the mammal's models of this transcription factor and its implication in the fish immune response.

Keywords: *immune response, glucans, Lutjanus peru, Vibrio parahaemolyticus, NFAT.*

Vo. Bo.



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de tesis

Dedicatoria

A ti, el ángel de la familia

Siempre vivirás en nuestros corazones

Karla Elizabeth Alamillo Mendoza

23 de octubre de 1988†

A mi nana, mi viejita loca

Ciria Ojeda Morales

"So, I'm following the science 'cause
I just want to make crazy science.
Totally crazy science"

"Science is what scientists do.
You know, nobody's got any idea.
We're just poking at things with sticks"

- *The Geek Monkey (OB)*

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada No. 608585 (CVU: 658913).

Al CONACYT por el financiamiento mediante el proyecto de Problemas Nacionales PDCPN2014-01/248033: Conservación y aprovechamiento de la biodiversidad de microrganismos marinos

Al CONACYT por el financiamiento mediante el proyecto INFR-2014-01/225924: Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia Una Sola Salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones.

Al Departamento de Posgrado de CIBNOR, bajo la dirección de la Dra. Norma Hernández Saavedra: Tania Núñez, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González e Ing. Horacio Sandoval.

A mi comité tutorial, Dr. Carlos Angulo Valadez, Dra. Luvia Enid Sánchez, y Dr. Alberto Cuesta, por toda su confianza y enseñanzas durante estos dos años. Al Dr. Carlos, por sus enseñanzas, el apoyo y los momentos dentro y fuera del laboratorio. A la Dra. Luvia, que me enseñó tantas cosas y me recibió en su laboratorio. Al Dr. Alberto Cuesta, por su voto de confianza y el apoyo a pesar de la distancia.

A la Dra. Martha Reyes-Becerril, por toda la ayuda y apoyo siempre, tanto en el laboratorio como fuera de él.

Al Dr. Felipe Ascencio Valle, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana de CIBNOR.

A la Dra. Minerva Maldonado y al Tec. Francisco Encarnación, por su apoyo con los peces utilizados en este trabajo.

Al Dr. Roberto Civera y al MC. Ernesto Goytortúa del Laboratorio en Nutrición Acuícola de CIBNOR, por su apoyo en el proceso de elaboración de las dietas utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Carmen Jaramillo y a la Tec. Eulalia Meza del Laboratorio de Histología e Histoquímica de CIBNOR, por su apoyo en el procesamiento de las muestras para histología utilizadas en este trabajo.

A la Biol. Sandra de la Paz Reyes, del Laboratorio de Nutrición Experimental de CIBNOR, por su apoyo con el experimento in vivo realizado en este trabajo.

Al Laboratorio de Análisis Químicos Proximales de CIBNOR, que analizó las dietas evaluadas en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Miriam, Crystal, Carolina, Anais, Verónica, Karen, Kevyn, Perla, Daniela, Alicia, Rodolfo, Abel, Marlene y Asdrúbal (y quien se me haya pasado), por el apoyo y los buenos momentos fuera y dentro del laboratorio

A mis compañeros de maestría: Mariana, Karla, Judith, Jorge, Salwa, Nicole, Mónica, Camila y Omar, gracias por todos los momentos juntos.

A mis compañeros de laboratorio durante mi estancia en el Laboratorio de Inmunología de los Microorganismos en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional en Ciudad de México a cargo de la Dra. Luvia Sánchez: Jacky, Faby, Adrián, Vane y Sergio, gracias por recibirme, sus enseñanzas y los buenos momentos.

A mi mejor amiga, Lic. Cecilia Mendoza, que siempre está ahí para mí.

A mi madre, Lic. Eufemia Mendoza, que ha sido el pilar de la familia y me apoyo a lo largo de este proyecto.

Contenido

Resumen ..... **i**
Summary ..... **ii**
Dedicatoria ..... **iii**
Agradecimientos ..... **v**
Contenido ..... **vii**
Lista de figuras ..... **xi**
Lista de tablas ..... **xiv**
Abreviaturas ..... **xv**
1. INTRODUCCIÓN **1**
2. ANTECEDENTES **3**
2.1 Acuacultura 3
2.1.1 Huachinango 4
2.2 Infecciones 4
2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus* 5
2.3 Medidas de control 7
2.3.1 Probióticos 8
2.4 Levaduras 10
2.4.1 Levaduras marinas 11
2.4.1.1 *Yarrowia lipolytica* 12
2.5 Sistema inmune en peces 16
2.5.1 Generalidades 16
2.5.2 Órganos asociados a la respuesta inmune 17
2.5.3 Sistema inmune innato 19
2.5.4 Sistema inmune adaptativo 19
2.6 Factor nuclear de células T activadas (NFAT) 20
2.6.1 Características de las proteínas de la familia NFAT 21
2.6.2 Cascada de señalización de NFAT: Interacciones del sistema inmune 23
2.6.3 NFAT en peces 25
3. JUSTIFICACIÓN **27**

4. HIPÓTESIS **28**
5. OBJETIVOS **29**
5.1 Objetivo general 29
5.2 Objetivos particulares 29
6. MATERIAL Y MÉTODOS **30**
6.1 Peces 30
6.2 Levaduras 30
6.2.1 Identificación molecular 30
6.3 *Vibrio parahaemolyticus* 31
6.4 Caracterización de las propiedades probióticas de las levaduras *in vitro* 32
6.4.1 Resistencia a salinidad 32
6.4.2 Resistencia a pH 32
6.4.3 Resistencia a bilis 32
6.4.4 Adhesión a intestino 33
6.5 Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de las levaduras *in vitro* 33
6.5.1 Aislamiento de leucocitos de riñón cefálico y bazo 33
6.5.2 Estimulación con levaduras y reto bacteriano 33
6.5.3 Carga bacteriana 34
6.5.4 Explosión respiratoria 35
6.5.5 Óxido nítrico 35
6.5.6 Superóxido dismutasa 36
6.5.7 Catalasa 36
6.5.8 Mieloperoxidasa 36
6.5.9 Citometría de flujo 37
6.5.9.1 Fagocitosis 37
6.5.9.2 Apoptosis 38
6.6 Expresión génica 38
6.7 Evaluación de las levaduras *in vivo* 39
6.7.1 Elaboración de dietas 39
6.7.1.1 Análisis químico proximal de las dietas 39
6.7.2 Peces 40
6.7.3 Diseño experimental 40
6.7.4 Muestras 40

6.7.5 Reto bacteriano *in vitro* 41
6.7.5.1 Aislamiento de leucocitos 41
6.7.5.2 Reto con *Vibrio parahaemolyticus* 41
6.7.6 Parámetros inmunes *in vivo* 41
6.7.7 IgM 42
6.7.8 Histología 42
6.7.9 Expresión génica 42
6.8 Diseño de primers 43
6.9 Caracterización *in silico* de NFAT 43
6.10 Análisis estadístico 44
7. RESULTADOS 45
7.1 Identificación molecular de levaduras 45
7.2 Caracterización de las propiedades probióticas de las levaduras *in vitro* 46
7.2.1 Resistencia a salinidad 46
7.2.2 Resistencia a pH 47
7.2.3 Resistencia a bilis 48
7.2.4 Adhesión a intestino 49
7.3 Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de las levaduras *in vitro* 50
7.3.1 Carga bacteriana 50
7.3.2 Fagocitosis 51
7.3.3 Explosión respiratoria 52
7.3.4 Óxido nítrico 53
7.3.5 SOD 54
7.3.6 CAT 55
7.3.7 MPO 56
7.3.8 Apoptosis 57
7.3.9 Expresión génica 58
7.4 Evaluación de las levaduras *in vivo* 63
7.4.1 Análisis químico proximal de las dietas 64
7.4.1 Parámetros inmunes in vivo 65
7.4.1.1 SOD 65
7.4.1.2 CAT 66
7.4.1.3 MPO 67

7.4.1.4 IgM 68
7.4.1.5 Histología 69
7.4.1.6 Expresión génica 71
7.4.2 Reto bacteriano *in vitro* 84
7.4.2.1 SOD 84
7.4.2.2 CAT 85
7.4.2.3 MPO 86
7.4.2.4 NO 87
8. DISCUSIÓN 93
9. CONCLUSIONES 111
10. LITERATURA CITADA 112
11. ANEXOS 132

Lista de figuras

Figura 1. Órganos y tejidos asociados a respuesta inmune en peces. 17
Figura 2. Organización de las proteínas de la familia de NFAT 22
Figura 3. Cascada de señalización de NFAT y elementos implicados en el reconocimiento de *V. parahaemolyticus* en células del sistema inmune (Células dendríticas, y macrófagos) 24
Figura 4. Cascada de señalización de NFAT en células T y activación y proliferación de otras células del sistema inmune 26
Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de 18S rRNA de los aislados de *Y. lipolytica*. 46
Figura 6. Resistencia a la salinidad de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio ... 47
Figura 7. Resistencia a pH ácidos de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio 48
Figura 8. Resistencia a bilis de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio 49
Figura 9. Adhesión a intestino de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio 50
Figura 10. Carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* (Vp) en leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 51
Figura 11. Habilidad fagocítica de leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 52
Figura 12. Explosión respiratoria de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 53
Figura 13. Producción de óxido nítrico (ON) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 54
Figura 14. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 55
Figura 15. Actividad de catalasa (CAT) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 56
Figura 16. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 57
Figura 17. Viabilidad de los de los leucocitos aislados de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 58
Figura 18. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de IL-1β en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 60
Figura 19. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de NFATc3 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras ... 61
Figura 20. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de ILF2 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 62
Figura 21. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de ILF3 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras 63
Figura 22. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 66
Figura 23. Actividad de catalasa (CAT) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras. 67

Figura. 24. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras.....68
Figura 25. Niveles de IgM en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 69
Figura 26. Cortes transversales de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras.....70
Figura 27. Cortes transversales de intestino de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras.....71
Figura 28. Expresión basal de NFATc3 de huachinango en distintos tejidos respecto a la expresión del gen endógeno EF-1α.....72
Figura 29. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de NFATc3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 73
Figura 30. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de ILF2 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 74
Figura 31. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de ILF3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 75
Figura 32. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de NF-κβ en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 76
Figura 33. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de CaN en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 77
Figura 34. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-1β en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 78
Figura 35. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-6 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 79
Figura 36. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-8 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 80
Figura 37. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-12 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 81
Figura 38. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de TNF-α en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 82
Figura 39. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de TCRβ en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 83

Figura 40. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de CD3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 84
Figura 41. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras. 85
Figura 42. Actividad de catalasa (CAT) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 86
Figura 43. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 87
Figura 44. Producción de óxido nítrico (ON) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras 88
Figura 45. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de NFATc3 de *Lutjanus peru.* 89
Figura 46. Alineamiento múltiple y estructura de LpNFATc3. 90
Figura 47. Árbol filogenético de LpNFATc3. 92

Lista de tablas

Tabla I. Agentes infecciosos de las enfermedades con importancia económica en pesquerías y acuacultura de organismos marinos. 6
Tabla II. Métodos alternativos de control de agentes infecciosos en acuacultura..... 8
Tabla III. Criterios de selección de probióticos 9
Tabla IV. Microorganismos utilizados como probióticos en la acuacultura. 10
Tabla V. Estudios realizados con *Y. lipolytica* en los últimos años..... 13
Tabla VI. Diferencias inmunológicas relevantes entre peces y mamíferos..... 18
Tabla VII. Proteínas de la familia de NFAT 21
Tabla VIII. Citocinas producidas en respuesta a la activación de NFAT. 25
Tabla IX. Análisis de homología de los aislados de *Y. lipolytica* utilizados en este estudio comparados con otras secuencias reportadas. 45
Tabla X. Primers específicos para PCR en tiempo real. 59
Tabla XI. Tallas y pesos de los peces alimentados con las diferentes dietas durante los diferentes muestreos. 64
Tabla XII. Análisis químico proximal de las dietas experimentales. 65
Tabla XIII. Análisis de homología de LpNFATc3 con otras secuencias de NFATc3 reportadas. 91

Abreviaturas

BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (siglas en inglés)
ºC	Grados centígrados (Celsius)
CaN	Calcineurina
CAT	Catalasa
CD3	Clúster de diferenciación 3
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (siglas en inglés)
cel/mL	Células por mililitro
cm	Centímetros
CO2	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (siglas en inglés)
DTAF	Diclorotriazinilamino fluoresceína
EF-α	Factor de elongación alfa (siglas en inglés)
ELISA	Ensayo inmunoadsorbente ligado a enzima (siglas en inglés)
et al	y colaboradores (abreviación en latín)
FSC	Forward Scatter (Patrón de tamaño en citometría)
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
ILF2	Factor de unión potenciador de interleucina 2
ILF3	Factor de unión potenciador de interleucina 3
km	Kilómetros
L	Litros
LpNFATc3	Factor nuclear de células T activadas citoplasmático 3 de huachinango
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
MPO	Mieloperoxidasa
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
ND	No detectado
NFAT	Factor nuclear de células T activadas (siglas en inglés)
NFATc3	Factor nuclear de células T activadas citoplasmático 3 (siglas en inglés)
NFκβ	Factor nuclear kappa beta (siglas en inglés)
NHR	Región homologa de las proteínas de la familia NFAT
nm	Nanómetros
NLS	Región de localización nuclear (siglas en inglés)
ON	Óxido nítrico
PBS	Buffer de fosfatos salino (siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Ioduro de propidio (siglas en inglés)
PXIXIT	Sitio de unión a calcineurina
RHR	Región homologa a las proteínas de la familia Rel (siglas en inglés)
RNA	Ácido ribonucleico (siglas en inglés)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal (siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
SP	Motivos ricos en serina y prolina
SRR	Regiones ricas en serina
SSC	Side scatter (Patrón de granularidad en citometría)
TAD-N	Región de transactivación en el amino terminal (siglas en inglés)
TCR-β	Receptor de células T subunidad beta (siglas en inglés)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (siglas en inglés)
Vp	*Vibrio parahaemolyticus*
v/v	Volumen por volumen
%	Porciento

1. INTRODUCCIÓN

Existen diversos trabajos de investigación sobre el potencial de levaduras marinas como probióticos en peces. De todos ellos, *Debaryomyces hansenii* es la levadura más estudiada que ha demostrado modular parámetros inmunes y la expresión de genes relacionados al sistema inmune y aumentar la resistencia hacia patógenos, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Angulo *et al.*, 2017; Reyes-Becerril *et al.*, 2008a, 2008b; 2011; 2012a;).

Por otra parte, el potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de levaduras aisladas de ambientes extremos, como *Pichia kudriavzekii* o *Sterigmatomyces halophilus*, se ha demostrado en otros estudios (Chelliah *et al.*, 2016; Reyes-Becerril *et al.*, 2017), lo que ha sugerido el estudio de otras levaduras aisladas de estos ambientes. Los ambientes extremos son ambientes con condiciones diferentes (temperatura, pH, presión, salinidad, disponibilidad de agua, etc.) a las normales para la vida humana. Estas condiciones han resultado en adaptaciones estructurales y químicas que permiten a los microorganismos sobrevivir y crecer (Satyanarayana *et al.*, 2005). Las levaduras de ambientes extremos han mostrado adaptaciones como la capacidad de sobrevivir y crecer en una amplia fuente de carbono y nitrógeno, alta producción y acumulación de lípidos, producción de polisacáridos (ej. quitina, glucanos) y producción de metabolitos secundarios (ej. poliaminas, nanopartículas) (Breuer *et al.*, 2006; Sekova *et al.*, 2015). Estas adaptaciones los convierten en objeto de estudio con diversos usos biotecnológicos, industriales y médicos.

El uso de levaduras de ambientes extremos puede tener un efecto modulador en la respuesta inmune. En mamíferos, este efecto se debe principalmente al reconocimiento de β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras por receptores de membrana como Dectin-1 que, a través de una cascada de señalización, puede activar al factor nuclear de células T activadas (NFAT) y promover la transcripción de citocinas efectoras (Fric *et al.*, 2012; Goodridge *et al.*, 2007; Pietretti *et al.*, 2013). Al respecto se han realizado diversos estudios

sobre la regulación de la respuesta inmune mediada por el reconocimiento de β-glucanos y la activación de NFAT (Ding *et al.,* 2015; Gagliardi *et al.*, 2010; Khalkhane *et al.,* 2013; Sahasrabudhe *et al.,* 2016). Sin embargo, en peces se han realizado pocos estudios sobre la identificación y expresión de NFAT (Cui *et al.*, 2011; Lin *et al.,* 2006; Wang *et al.*, 2006) y menos aún sobre el efecto de levaduras o β-glucanos sobre su cascada de señalización (Lokesh *et al.,*2012; Pietretti *et al.,* 2013). Por lo anterior, el estudio del NFAT en el contexto de la administración levaduras probióticas en peces permitiría entender mejor los mecanismos de señalización inmunológica involucrados en esta posible interacción.

El huachinango (*Lutjanus peru*) es considerado una especie de alto potencial acuícola y también un modelo de estudio debido a su tasa de crecimiento, capacidad de producir desoves parciales a lo largo del año, y su alto valor económico (CONAPESCA, 2006; DOF, 2013; Garduño-Dionate *et al.,* 2010). A pesar de ello, en la actualidad se han realizado pocos estudios sobre la respuesta inmune de esta especie (Angulo *et al.*, 2017; Cárdenas-Reyna *et al.,* 2016; Reyes-Becerril *et al.,* 2014).

Por lo anterior, este estudio se enfoca en la evaluación del potencial probiótico e inmunoestimulante de la levadura *Yarrowia lipolytica* en huachinango y en elucidar la posible implicación de NFAT en la respuesta inmune de peces mediante el análisis de la expresión de genes asociados a la ruta de señalización de este factor de transcripción.

2. ANTECEDENTES

2.1 Acuacultura

La acuacultura consiste en el cultivo controlado de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (Bondad-Reantaso, 2005; FAO, 1995). La acuacultura es una de las actividades económicas con mayor crecimiento en los últimos 50 años, aportando cerca del 50% de la producción pesquera mundial (FAO, 2016). En este contexto, Asia aporta el 88.9% de la producción total mundial, seguido de América que aporta el 4.6% y Europa el 4.4% (Subasinghe, 2005). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) registró un total de 310 especies cultivadas (excluyendo plantas acuáticas) que principalmente son especies de peces de agua dulce (~64%) (Bostock *et al.,* 2010). A diferencia del cultivo de peces de agua dulce, las especies marinas han tenido un crecimiento menor debido a: altos costos, áreas limitadas que estén protegidas del oleaje, y los riesgos asociados a la tecnología acuícola; aunque se sigue proyectando la expansión de estos cultivos (Gjedrem *et al.,* 2012).

Desde los años 70s en México, se han cultivado numerosas especies de organismos acuáticos a escala experimental y comercial, entre las que destacan: camarón, mojarra, atún, ostión, carpa, trucha, tilapia, bagre, entre otras (Aldana-Aranda, 2002). México cuenta con el mayor litoral de América Latina (11,500 km de línea de costa); una Zona Económica Exclusiva Marina (3 millones de km^2) y aguas interiores (2.9 millones de hectáreas) que representa un alto potencial para el desarrollo de actividades acuícolas (Arredondo-Figueroa, 1996; CONAPESCA, 2006; Campos *et al.* 2012). Sin embargo, el cultivo de especies marinas tiene pocos avances probablemente debido a las condiciones ambientales, biodiversidad y la riqueza de especies (Arredondo-Figueroa, 1996; Campos *et al.* 2012). Entre las especies susceptibles a cultivo se encuentra la familia de los pargos o huachinangos que representa un importante recurso en la región noroeste del país. El huachinango (*Lutjanus peru)* es una especie perteneciente al Océano Pacífico con alto potencial acuícola que ha generado líneas de investigación sobre su cultivo y financiamiento para su cultivo en jaulas (CONAPESCA, 2006, DOF, 2013).

2.1.1 Huachinango

El huachinango (*Lutjanus peru*) es una especie distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del Océano Pacífico, desde la península de Baja California hasta el Caribe (Rocha-Olivares, 1998). Esta especie habita en los fondos rocosos y arrecifes, de los 30 a 100 m de profundidad, con una alta actividad en el atardecer debido a sus hábitos alimenticios que consisten en una dieta carnívora y oportunista basada en cangrejos, camarones, calamares, medusas y peces pequeños (Garduño-Dionate *et al.,* 2010). Se ha reportado que el huachinango alcanza la madurez sexual al llegar a una talla aproximada de 25 a 33 cm, presentando una reproducción asincrónica, por lo que es capaz de producir desoves parciales y presentar actividad reproductiva a lo largo del año (DOF, 2013). Esta especie es una de las más importantes tanto por su volumen de captura como por su valor comercial. A pesar de esto, los estudios sobre esta especie son escasos y el estatus de su pesquería es confuso, teniendo evidencias de bajo rendimiento o de sobreexplotación (Monte-Luna *et al.*, 2001). Interesantemente esta especie presenta una alta tasa de crecimiento pudiendo alcanzar la talla comercial en 2 a 3 meses cultivo a partir de juveniles. Por lo anterior, el desarrollo del cultivo de huachinango se ha vuelto de especial interés a nivel nacional (Díaz-Uribe *et al.*, 2004). Dentro del desarrollo de cultivos, la sanidad acuícola ocupa un lugar de interés para la prevención y control de enfermedades que podrían limitar la producción (DOF, 2013). Sin embargo, los estudios relacionados al sistema inmunológico de este pez han sido escasos (Angulo *et al.*, 2017; Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016; Reyes-Becerril *et al.*, 2014).

2.2 Infecciones

A pesar del progreso en las técnicas de cultivo, uno de los principales problemas en la acuacultura es la aparición frecuente de brotes infecciosos que limita la expansión de esta actividad (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005; Lafferty *et al.*, 2015). En la tabla I se presentan los principales agentes infecciosos en pesquerías y acuacultura marina a nivel mundial.

Los brotes infecciosos en los cultivos acuícolas pueden iniciar mediante la contaminación de agua, comida o el contacto directo con animales infectados. Además, las enfermedades

infecciosas que no afectan normalmente a los organismos de vida salvaje pueden volverse problemáticas en la acuacultura. Debido a las condiciones de cultivo, los peces son susceptibles a bacterias oportunistas ubicuas del género *Pseudomona* y *Vibrio*, entre otras (Lafferty *et al.*, 2015).

2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

El género de *Vibrio* está caracterizado por bacterias móviles, halófilas y Gram negativas. Las bacterias de este género se encuentran ampliamente distribuidas en los ambientes marinos. Estos microorganismos son capaces de infectar a un amplio rango de especies de peces, crustáceos y moluscos, y se han reportado grandes pérdidas económicas debido a la infección causada por estos patógenos (vibriosis). Las principales especies asociadas a estas infecciones en acuacultura son: *V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. anguillarum, V. vulfinicus, V. salmonicida*, entre otros (Chatterjee y Haldar, 2012; Novriadi, 2016). Algunos signos clínicos asociados a las vibriosis son: necrosis intestinal, anemias, líquido ascítico, hemorragias petequiales en la pared del músculo, líquido en la vejiga natatoria, oscurecimiento de la piel, lesiones ulcerosas y necrosis en piel, e incluso la muerte repentina (Chatterjee y Haldar, 2012; Haenen *et al.*, 2014; Hendrikson y Zenoble, 1983).

Vibrio parahaemolyticus es un patógeno frecuentemente aislado de organismos marinos como anguilas, cangrejos, almejas, ostras, sardinas, camarones, entre otros. Este patógeno es el principal agente causal de gastroenteritis en humanos, que se caracterizada por diarrea, vómito y malestar abdominal (Alaboudi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Nelapati *et al.*, 2012; Odeyemi, 2016). Por ello se han desarrollado diversos métodos de detección para determinar contaminación o brotes infecciosos, entre ellos: PCR convencional, LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucles, en español), PCR en tiempo real e Hibridación *in situ*; entre otros (Chatterjee y Haldar, 2012; Nordstrom *et al.*, 2007; Yamazaki *et al.*, 2008).

Tabla I. Agentes infecciosos de las enfermedades con importancia económica en pesquerías y acuacultura de organismos marinos (Modificado de Lafferty *et al.*, 2015).

Hospedero	Agente infeccioso	Impacto
Moluscos	Virus: Virus de la ganglioneuritis del abalón, Herpesvirus de ostra I, Iridovirus de *Crassostrea angulata*	Mortalidad
	Bacterias: Síndrome de marchitez tipo rickettsia, *Vibrio spp.* (*V. harveyi, V. tubiashii, V. tapetis*), *Nocardia crassostreae*	Mortalidad, Crecimiento
	Protistas: *Perkinsus spp.* (*P. olseni, P. marinus*), *Bonamia spp*. (*B. exitiosa, B. ostreae*), *Martelia refringens*, *Haplosporidium spp.* (*H. costale, H. nelsoni*)	Mortalidad
	Otros*: Terebrasabella heterouncinata*, QPX	Crecimiento, Mortalidad
Crustáceos	Virus: *Baculovirus penaei*, virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética, Baculovirus de *Penaeus monodon*, *Whispovirus spp*., *Aparavirus spp*., *Okavirus spp*., Virus de *Panulirus argus* I	Crecimiento, Mortalidad
	Bacterias: *Aerococcus viridans* var. *bomari*, Bacteria de la hepatopancreatitis necrotizante, *Vibrio parahaemolyticus*	Mortalidad
	Protistas: *Hematodinium spp.*	Comercialización, Mortalidad
	Otros: *Rhizocephalan barnacles*, *Carcinonemertes spp.* (*C. errrans, C. regicides*), *Ovicides paralithodis*	Comercialización, Reclutamiento
Equinodermos	Protistas: *Paramoeba invadens*	Mortalidad
Peces	Virus: Nodavirus, Virus de la septicemia hemorrágica, Iridovirus de dorada, Herpesvirus de sardina, Virus de la anemia infecciosa en salmón, Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, *Aquabirnavirus*	Mortalidad
	Bacterias: *Edwarsiella tarda, Vibrio spp*., *Mycobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio anguillarum*, *Moritella viscosa*, *Photobacterium damselae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Renibacterium salmoninarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Nocardia seriolae*, Bacteria tipo Clamidia, *Lactococcus garvieae*	Crecimiento, Mortalidad, Salud
	Protistas*: Ichthyophonus hoferi*, *Cryptocaryon irritans*, *Amyloodinium ocellatum*	Mortalidad
	Otros*: Kudoa spp., Parvicapsula spp., Enteromyxum spp,* Nematodos anisakis, *Cryptocotyle lingua*, Monogeneos, *Eubothrium spp., Lepeophtheirus spp., Caligus spp.*	Crecimiento, Comercialización, Mortalidad

En el noroeste de México se ha identificado la presencia de diversas especies de Vibrio en pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) tanto en especímenes de pesca como en cultivos acuícolas (Gómez-Gil *et al.*, 2007). Sin embargo, no existen estudios sobre la presencia de bacterias

no patogénicas y patogénicas en huachinangos y otros pargos (Gómez-Gil *et al.*, 2008). No obstante, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado los efectos patogénicos de *V. parahaemolyticus* en huachinango (*Lutjanus peru),* sugiriendo que existe pueden representar un riesgo para la acuacultura de peces (Angulo *et al.*, 2017; Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016).

2.3 Medidas de control

Al igual que otros sistemas de producción animal de alta densidad, la acuacultura se enfrenta a retos asociados con agentes infecciosos que son fácilmente transmisibles y pueden ocasionar grandes pérdidas económicas (Caruffo *et al.*, 2015; Sommerset *et al.*, 2005). Se han utilizado diferentes métodos para solucionar este tipo de problemas, principalmente las Buenas Prácticas de Manejo (BMPs) y el uso de antibióticos (Ringø *et al.*, 2014). Aunque necesarias, las BMPs pueden resultar ineficientes para evitar la aparición de un brote epidemiológico debido principalmente a un descuido humano que frecuentemente ocurre. Por otra parte, el amplio y frecuente uso inadecuado de los antibióticos ha ocasionado la aparición de bacterias resistentes, las cuales son consideradas una amenaza para la salud animal y humana (Defoirdt *et al.*, 2011; Magnadottir, 2010). El alto costo de los antibióticos y su posible impacto ecológico ha llevado a la búsqueda y desarrollo de métodos alternativos (tabla II). Se ha sugerido que estas estrategias de control deben ser amigables con el ambiente, sustentables y capaces de mitigar el efecto de patógenos en los cultivos acuícolas con una efectividad igual o similar a los antibióticos (Lazado *et al.*, 2015; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Van Hai, 2015).

Tabla II. Métodos alternativos de control de agentes infecciosos en acuacultura (Modificado de Newaj-Fyzul *et al.*, 2014)

Método	Comentario
Suplementos alimenticios	Efectivo con compuestos como la Vitamina C
Inmunoestimulantes	Exitoso con algunos productos, como β-1,3-glucanos
Vacunas	Disponible comercialmente para pocas enfermedades
Probióticos	Diversas especies de bacterias y levaduras tienen potencial probiótico en la acuacultura.
Prebióticos	Compuestos que ayudan al crecimiento de los probióticos, con un interés creciente en la acuacultura.
Productos de plantas medicinales	Un amplio rango de plantas consideradas, particularmente en China e India. Podrían actuar como inmunoestimulantes.
Compuestos antimicrobianos	Controversia sobre el uso no médico de compuestos medicinales.

Entre las alternativas, los probióticos son uno de los métodos de control ampliamente utilizados en los países en desarrollo como México (Zorriehzahra *et al.*, 2016)

2.3.1 Probióticos

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son definidos como "microorganismos vivos que, suplementados en la dieta y administrados en la dosis adecuada, proporcionan beneficios a la salud del hospedero" (FAO, 2001). Los probióticos deben poseer ciertas características para su aplicación en la acuacultura (tabla III) (Kesarcordi-Watson *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). Entre estas características destacan: no ser patógeno para el hospedero, capacidad de sobrevivir al tracto gastrointestinal, capacidad de adherirse y colonizar el tracto digestivo, capacidad de actuar como inmunomoduladores, poseer actividad antimicrobiana, entre otras (Banerjee y Ray, 2017; Ringø *et al.*, 2014). Cabe señalar que algunos microorganismos presentan una o más características probióticas.

Tabla III. Criterios de selección de probióticos (Adaptado de Merrifield *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2014).

Esenciales	Deseables
No patogénico	Capacidad para adherirse y/o crecer en la mucosa intestinal
Libre de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos	Registrado para ser utilizado como aditivo en el alimento
Resistente a sales biliares	Capacidad de colonizar el epitelio intestinal
Resistente a pH bajos	Tener propiedad antagónica contra uno o más patógenos
	Tener características de crecimiento ventajosas
	Producción de compuestos extracelulares (ej. enzimas, vitaminas)
	Aislada del hospedero o de su medio ambiente
	Viable en condiciones de almacenamiento
	Robusto para sobrevivir procesos industriales

Los probióticos pueden ser administrados de diversas maneras, sin embargo, la manera más práctica es por vía oral mediante su adición al alimento (Hai, 2015; Huang *et al.*, 2006). Una vez administrados, los probióticos pueden actuar de diferentes maneras como: colonizar el tracto intestinal y competir por espacios con los patógenos, estimular el sistema inmune (ej. estimulación del sistema inmune innato como: complemento, explosión respiratoria, fagocitosis, entre otras), mejorar la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso (Banerjee y Ray, 2017; Newaj-Fyzul *et al.*, 2015; Pandiyan *et al.*, 2013).

Diversos microorganismos han sido utilizados cómo probióticos como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como levaduras (Lamari *et al.*, 2016; Newaj-Fyzul *et al.*, 2015; Reyes-Becerril *et al.*, 2012a; 2012b; 2014). En la tabla IV se encuentran listados algunos ejemplos de microorganismos utilizados como probióticos.

Tabla IV. Microorganismos utilizados como probióticos en la acuacultura (Modificado de Newaj-Fyzul *et al.*, 2015).

Grupo de organismos	Género/Grupo
Bacterias Gram-negativas	*Aeromonas, Agarivorans, Alteromonas, Bdellovibrio, Burkholderia, Citrobacter, Enterobacter, Neptumonas, Phaeobacter, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Phodobacter, Phodopseudomonas, Roseobacter, Shewanella, Synechococcus, Thalassobacter, Vibrio, Zooshikella*
Bacterias Gram-positivas	*Arthrobacter, Bacillus, Brevibacillus, Brochothrix, Clostridium, Carnobacterium, Enterococcus, Kocuria, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Microbacterium, Micrococcus, Pediococcus, Rhodococcus, Streptococcus, Streptomyces, Vagococcus, Weissella*
Levaduras	*Debaryomyces hansenii, Phaffia rhodozyma, Saccharomyces cerevisiae, S. exiguous, Yarrowia lipolytica*

Las bacterias ácido lácticas (*Lactobacilli y Bifidobacteria)* han sido las más ampliamente estudiadas y utilizadas como probióticos tanto en humanos como animales (Pandiyan *et al.*, 2013). Interesantemente en años recientes las levaduras han sido propuestas como probióticos de gran interés en acuacultura (Hai, 2015; Navarrete y Tovar-Ramírez, 2014; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

2.4 Levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares taxonómicamente asignados en el reino Fungi que se reproducen por gemación o fisión (Kreger-van Rij, 2013). Se han reconocido 1500 especies de levaduras que se encuentran distribuidas en tres grandes grupos: ascomicetos, basidiomicetos y levaduras imperfectas (Kurtzman y Piškur, 2006). Algunas de sus características generales son una forma elipsoidal, tamaño variable (1-20 μm), pared celular rica en quitina y β-glucanos, y se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente desde suelos hasta agua de mar (Kurtzman, 1994; Libkind *et al.*, 2003; Navarrete y Tovar-Ramírez, 2014).

Las levaduras presentan un alto potencial como probióticos debido a que poseen ciertas propiedades como la resistencia a los tratamientos antibacteriales, producen compuestos inmunoestimulantes (ej. β-glucanos, poliaminas), tienen actividad antagónica contra patógenos, la modulación del sistema inmune y de la capacidad antioxidante, así como promover el crecimiento y elevar la supervivencia (Adel *et al.*, 2017; Ogunremi *et al.*, 2015; Reyes-Becerril *et al.,* 2008a; 2008b). A diferencia de las bacterias ácido lácticas, las levaduras han sido poco estudiadas como probióticos en acuacultura a pesar de que los estudios realizados han mostrado su gran potencial (Hai, 2015). *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la principal levadura probiótica modelo estudiada (Didari *et al.*, 2014), aunque se han identificado levaduras pertenecientes a otros géneros como *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Debaryomyces* con propiedades probióticas (Ochangco *et al.,* 2016).

La búsqueda de nuevas especies con potencial probiótico ha generado interés en especies aisladas de ambientes extremos, incluidos los ambientes marinos donde *Debaryomyces hansenii* ha sido una de las especies de interés (Angulo *et al.*, 2017; Breuer y Harms, 2006; Reyes-Becerril *et al.,* 2008a, 2008b).

2.4.1 Levaduras marinas

Las levaduras se encuentran distribuidas en casi cualquier ambiente acuático desde ríos y estuarios hasta los mares (Kutty y Philip, 2008). Sin embargo, las poblaciones son más escasas en agua de marina que en agua dulce, y disminuyen conforme aumenta la profundidad y la distancia a tierra (Butinar *et al.,* 2005). Estos organismos, que poseen la capacidad de vivir en estos ambientes pueden ser considerados extremos, ya sea porque requieran o toleren las condiciones de los ambientes marinos (baja actividad de agua, altas concentraciones de sal) son considerados extremófilos o extremotolerantes, respectivamente (Gupta *et al.*, 2014; Rosa y Peter, 2006). En años recientes, los extremófilos han sido objeto de estudio por su potencial biotecnológico y además por presentar una oportunidad de investigación en la astrobiología (Rampelotto, 2013; Rothschild y Mancinelli, 2001).

En la literatura se ha reportado el estudio de especies de levaduras extremófilas/extremotolerantes como probióticos. Por ejemplo, *Debaryomyces hansenii* aislada a nivel del mar en la Península de Baja California ha sido estudiada por sus propiedades probióticas e inmunoestimulantes en peces (Angulo *et al.,* 2017; Ochangco *et al.,* 2016; Reyes-Becerril *et al.,* 2008a, 2008b, 2011, 2012a; Tovar *et al.*, 2002).

Otra levadura aislada de ambientes marinos es *Yarrowia lipolytica* y es considerada un organismo poli-extremófilo por ser capaz de adaptarse a diversas condiciones ambientales (Sekova *et al.*, 2015). Sin embargo, los estudios sobre su potencial como probiótico y capacidad inmunoestimulante han sido escasos (Aguilar-Macías *et al.*, 2010; Hatlen *et al.*, 2012; Merska *et al.,* 2015). A continuación, se describen las características microbiológicas y los avances sobre el estudio de las propiedades probióticas de *Y. lipolytica* en peces y otras especies animales.

2.4.1.1 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica es una levadura ascomiceta, aerobia, productora de ácidos orgánicos y proteínas de alta calidad, capaz de hidrolizar y almacenar altas concentraciones de lípidos (Barth y Gaillardin, 1997; Groenewald *et al.,* 2014; Hatlen *et al.,* 2012). Esta última característica ha sido altamente estudiada por su potencial biotecnológico e industrial en la producción de biodiesel (Sekova *et al.,* 2015; Thevenieau *et al.,* 2009). Además, se ha observado que las cepas de esta especie pueden presentar morfologías coloniales diversas, las cuales dependen de las condiciones de crecimiento y su material genético (Nicaud, 2012; Zinjarde *et al.,* 2008). Debido a que *Y. lipolytica* presenta una relación genética y composición química similar a *Saccharomyces cerevisiae* se ha propuesto que posee propiedades similares para estimular el sistema inmune (Bankar *et al*., 2009; Merska *et al.,* 2015).

Se han realizado pocos estudios relacionados al potencial probiótico y efecto en el sistema inmune de *Y. lipolytica* (tabla V). Actualmente solo se han realizado estudios con reportes de su efecto en pavo, cerdos, madre perla y salmón, donde se ha visto una modulación del

sistema antioxidante, mejorar en la tasa de crecimiento y supervivencia (Aguilar-Macías *et al.*, 2010; Czech *et al.*, 2014; Hatlen *et al.*, 2012; 2016; Merska *et al.*, 2015).

Tabla V. Estudios realizados con *Y. lipolytica* en los últimos años.

Especie estudiada		Cepa	Objetivo	Resultados	Referencia
Mamíferos	Ensayo *in vitro* con la línea celular Caco-2 (Humano)	*Y. lipolytica* S8 y S12+G9D4B3: F8B3: G10B3:G12B3: G11B3:G12	Evaluar cepas de levaduras como posibles probióticos	Cepas de *Y. lipolytica* mostraron resistencia a bilis y bajo pH. Baja adhesión.	Kumura *et al*. (2004)
	Células mononucleares de sangre periférica (Humano)	*Y. lipolytica* 1E07, CLIB 632 y CLIB 791	Evaluar cepas de microorganismos (21 bacterias, 12 levaduras, 3 hongos) como posibles probióticos	Mayor producción de IL-10 y TNF-α (comparado con el control sin estimular). Alto porcentaje de viabilidad en condiciones gastrointestinales in vitro.	Adouard *et al.* (2015)
	Sus scrofa domesticus (Cerdos)	*Y. lipolytica* A-101	Evaluar la inclusión de *Y. lipolytica* en la dieta	Mayor ganancia de peso y peso total en los cerdos alimentados con 3% de *Y. lipolytica*. Disminución en las diarreas comparadas a los otros grupos.	Czech *et al*. (2016)
	Mus musculus (Ratón)	*Y. lipolytica* IL3, Polf (modificada genéticamente)	Evaluar la respuesta inmune después de la inmunización oral de *Y. lipolytica* modificada genéticamente para expresar partículas virales	Se obtuvieron diferentes construcciones de *Y. lipolytica* expresando la secuencia completa o parcial de las partículas virales. La inmunización con *Y. lipolytica* incremento los niveles de IgG comparada con los controles, aunque fue menor a los obtenidos por el control con *S. cerevisiae*.	Luu *et al*. (2017)
Aves	*Meleagris gallopavo* (Pavo salvaje)	*Y. lipolytica* (cepa no especificada)	Evaluar la inclusión de *Y. lipolytica* en la dieta	Efectos positivos en las dietas con *Y. lipolytica*. Dieta con 3%, mostró mejores efectos en la modulación de los parámetros hematológicos.	Merska *et al*. (2013)

Especie estudiada		Cepa	Objetivo	Resultados	Referencia
	Meleagris gallopavo (Pavo salvaje)	*Y. lipolytica* (cepa no especificada)	Evaluar la inclusión de *Y. lipolytica* en la dieta	Diferencias entre las dietas (3% y 6%) respecto al control. Dieta con 6%, mostró un mayor efecto positivo sobre el sistema inmune.	Czech *et al*. (2014)
	Meleagris gallopavo (Pavo salvaje)	*Y. lipolytica* (cepa no especificada)	Evaluar la inclusión de *Y. lipolytica* en la dieta	Se observó una disminución en LOOH-MDA, aumento en la actividad CAT y un aumento en el contenido de Ca, Cu, y Fe en los grupos alimentados con las dietas con *Y. lipolytica*.	Merska *et al*. (2015)
Moluscos	*Crassostrea corteziensis* (Ostión de Cortés)	*Y. lipolytica* 020	Evaluar el uso de diferentes probióticos	El grupo tratado con *Y. lipolytica* no mostró diferencias significativas respecto al grupo control	Campa-Córdova *et al*. (2009)
	Pinctada mazatlanica (Madre perla)	*Y. lipolytica* 020	Evaluar el uso de diferentes probióticos	El grupo tratado con *Y. lipolytica* mostro resultados similares al tratamiento con *Lactobacillus sp.*, con los valores más altos de supervivencia, crecimiento y altura de la concha.	Aguilar-Macías *et al*. (2010)
Crustáceos	*Litopenaeus vannamei* (Camarón)	*Y. lipolytica*-VP28 (modificada genéticamente)	Evaluar el uso de diferentes inmunoestimulantes	Se observó una reducción en la mortalidad, cuantificación de copias virales de WSSV e inducción de la respuesta inmune (actividad fenoloxidasa, producción de ON, actividad de caspasa-3 y expresión génica), obteniendo resultados similares en ambas dietas experimentales.	Yi *et al*. (2014)
	Litopenaeus vannamei (Camarón)	*Y. lipolytica* Y1BCS033	Evaluar la digestibilidad de *Y. lipolytica*, tanto *in vitro* como *in vivo*.	Se observo una mayor digestibilidad de los lisados de *Y. lipolytica* comparado a la levadura sin lisar. Además, se observó una mayor digestibilidad con las enzimas aisladas de glándula digestiva, estomago e intestino anterior. Los resultados de viabilidad fueron inversamente proporcionales, observándose menor viabilidad en dichos órganos. Se observaron diferencias significativas respecto a la ganancia de peso y tasa de crecimiento de los camarones alimentados con la	Álvarez-Sánchez *et al*. (2016)

Especie estudiada		Cepa	Objetivo	Resultados	Referencia
				dieta 2% *Y. lipolytica* comparado al control.	
	Artemia salina (Artemia)	*Y. lipolytica* NCIM 3589	Evaluar la tolerancia de *Y. lipolytica* a selenio, capacidad de sintetizar nanopartículas (SNPs), y efecto nutricional y de protección frente a un reto.	Se observo una alta tolerancia de *Y. lipolytica* a selenio (arriba de 8mM). La caracterización de las nanopartículas mostró propiedades similares a otras SNPs ya caracterizadas. En cuanto supervivencia, se observó mayor supervivencia en las larvas de artemia salina alimentadas con *Y. lipolytica* con SNPs., y un mayor porcentaje de supervivencia en el reto con *V. harveyi.*	Hamza *et al*. (2017)
Peces	*Salmo salar L.* (Salmón del Atlántico)	*Y. lipolytica* 4305 (modificada genéticamente)	Evaluar la inclusión de *Y. lipolytica* en dietas	No hubo diferencias significativas en la supervivencia, tasa especifica de crecimiento, coeficiente de crecimiento térmico y consumo de alimento en peso. El consumo de alimento (porcentaje) mostró diferencias significativas a partir de los 57 días en la dieta al 30%. El radio de conversión de alimento mostró diferencias significativas en todos los tiempos en la dieta de 30%.	Hatlen *et al.* (2012)
	Danio rerio (Pez cebra)	*Y. lipolytica* Yl242	Evaluar el uso de levaduras como control biológico en acuacultura	Se observó un mayor porcentaje de supervivencia en las larvas tratadas con *Yarrowia lipolytica* Yl242 con respecto al control sin tratar. Además, se observó presencia de la levadura hasta 5 días después de la inoculación, manteniéndose el conteo celular.	Caruffo *et al.* (2015)

Especie estudiada	Cepa	Objetivo	Resultados	Referencia
Ensayo in vitro con leucocitos de *Lutjanus peru* (Huachinango)	*Y. lipolytica* N6	Evaluar *Y. lipolytica* como inmunoestimulante *in vitro*	Se observó una disminución en la carga bacteriana por efecto de la estimulación con *Y. lipolytica* N6, así como un aumento de la viabilidad comparado con los leucocitos solo expuestos a *V. parahaemolyticus.* Se observó un aumento en la habilidad fagocítica, explosión respiratoria, nivel de nitritos y actividad de SOD y MPO. Se observó una regulación de los genes IL-1β, MnSOD, IcCu/ZnSOD y CAT, principalmente por la presencia de *V. parahaemolyticus.*	Alamillo *et al.* (2017)
Ensayo in vitro con leucocitos de *Lutjanus peru* (Huachinango)	*Y. lipolytica* N6	Caracterizar de NFATc3 y evaluar su respuesta a la estimulación con *Y. lipolytica.*	Se observo una mayor expresión de NFATc3 en leucocitos por efecto de *Y. lipolytica* y Zymosan a las 12 y 24h, mientras que en linfocitos. Se observó una mayor expresión a las 24h por efecto de *V. parahaemolyticus*. Se observó una mayor expresión de ILF2, ILF3 y CAN a las 24h en los leucocitos y linfocitos estimulados con Y. lipolytica N6 y Zymosan. Mientras que CD3, TCRβ, IL-6 e IL-12 se observó una mayor expresión a las 12h tanto en leucocitos como linfocitos estimulados con *Y. lipolytica* como Zymosan.	Angulo *et al.* (2017)

2.5 Sistema inmune en peces

2.5.1 Generalidades

El sistema inmune comprende células, tejidos y órganos que se encargan de defender al organismo de agentes extraños, tales como microorganismos patógenos, toxinas o células malignas (ej. células tumorales) (Biller-Takahashi y Urbinati, 2014, Poynter y Dixon, 2017). El sistema inmune de peces, al igual que los mamíferos, se compone de sistema inmune

innato y adaptativo, ambos integrados por células y factores humorales (Tort *et al.*, 2003). A pesar de su alta similitud, los peces presentan ciertas diferencias inmunológicas que serán abordadas en las secciones siguientes (tabla VI).

El entendimiento del sistema inmune de peces, sus similitudes y diferencias con mamíferos, es esencial por dos razones principales: 1) los peces son un grupo atractivo para estudios de inmunidad comparada, esto debido a su posición filogenética, siendo el primer grupo de vertebrados en desarrollar inmunidad adaptativa (Rauta *et al.*, 2012), y 2) los peces son un buen modelo de estudio para obtener nueva información de los mecanismos moleculares, celulares y genéticos de la respuesta inmune (Sullivan y Kim; 2001, Sunyer, 2013).

2.5.2 Órganos asociados a la respuesta inmune

Una de las diferencias más notorias entre peces y mamíferos es la morfología de su sistema inmune (Press y Evensen, 1999). En peces se ha descrito riñón, timo, bazo, hígado y tejido asociado a mucosas (piel, branquias e intestino), como los principales órganos y tejidos asociados a respuesta inmune (Fig. 1) (Secombes y Wang, 2012).

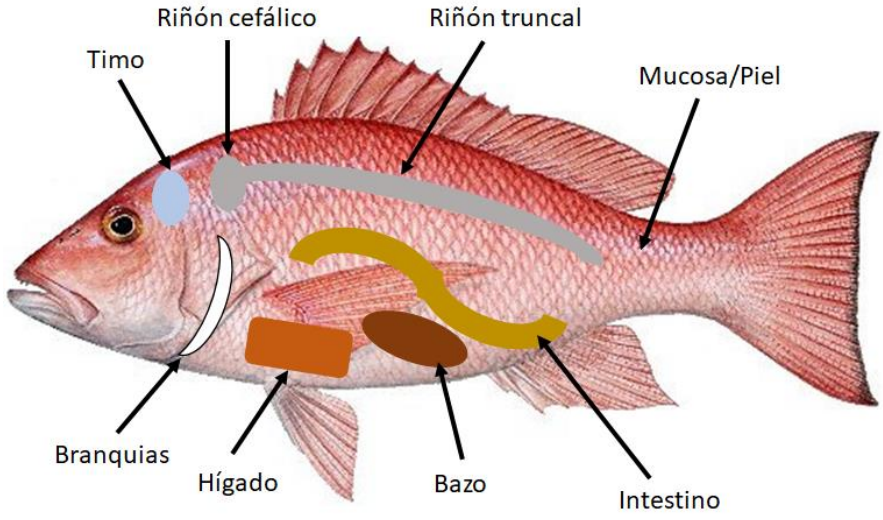


Figura 1. Órganos y tejidos asociados a respuesta inmune en peces.

Tabla VI. Diferencias inmunológicas relevantes entre peces y mamíferos (Modificado de Tort *et al.*, 2003 y Sunyer, 2013).

	Peces	**Mamíferos**
Restricciones bióticas		
Rango de temperatura	- 2 a 35°C	36.5 a 37.5°C
Ambiente primario	Agua	Aire
Metabolismo	Poiquilotermos, endotermos	Homeotermos
Interfaces externas	Piel mucosa, branquias	Sistema respiratorio
Diversidad Humoral		
Isotipos de inmunoglobulinas (Ig)	IgM, IgD, IgT (IgZ), IgM rédox	IgM, IgA, IgD, IgE, IgG
Arreglo de los genes de Ig	Multiclúster	Translocación
Diversidad no especifica	Varias isoformas de C3	No hay isoformas de C3
Rendimiento global		
Afinidad de anticuerpos	Baja	Alta
Respuesta de anticuerpos	Lenta	Rápida
Respuesta de memoria	Débil	Fuerte
Maduración de afinidad	Baja o ausente	Alta
Bajas temperaturas	Alta dependencia, respuesta inmunosupresora	Baja dependencia
MHC clase I y clase II	Presente	Presente
Órganos linfoides		
Tejido hematopoyético	Riñón cefálico	Medula ósea
Timo	Involución dependiente de la especie, influenciado por cambios estacionales y ciclos hormonales	Involución con la edad
Bazo	Presente	Presente
Tejido linfoide asociado a mucosa	Presente, piel, intestino, branquias	Presente, intestino, bronquios, nariz
Tejido linfoide asociado a intestino	No organizado, agregados linfoides	Organizado, placas de Peyer
Nódulos linfáticos	Ausentes	Presentes
Centros germinales	Ausentes	Presentes

2.5.3 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato podría clasificarse en base a tres componentes fundamentales: físico-químico, celular y humoral (Magnadóttir, 2006). Los parámetros físicos son la primera barrera de defensa y se componen por las escamas, branquias, mucosas y piel que evitan físicamente la entrada de patógenos; además los factores químicos incluyen el pH ácido del estómago.

El componente celular involucra un grupo de células específicas, las cuales realizan funciones específicas para el reconocimiento y la eliminación de patógenos (Rubio-Godoy, 2010). Participan células como los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos que detectan y eliminan patógenos mediante fagocitosis; y las células citotóxicas no específicas, las cuales eliminan patógenos mediante daño a su membrana celular (Rauta *et al.*, 2012; Uribe *et al.*, 2011).

Los factores humorales comprenden moléculas como el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN) e interleucinas (ILs). Estas moléculas participan en la activación de macrófagos, defensa contra virus, respuesta inflamatoria, y activación y reclutamiento de células del sistema inmune (Rubio-Godoy, 2010; Secombes y Wang, 2012). Otras moléculas son las lectinas, péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas (IgM), enzimas antioxidantes, que participan en la degradación o eliminación de patógenos (Uribe *et al.*, 2011). Un factor humoral importante es el complemento, un grupo de proteínas, que entre sus funciones están: el recubrimiento de microorganismos/partículas para facilitar su reconocimiento, la iniciación de la respuesta inflamatoria y la lisis de microorganismos, además de ser considerado un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Rubio-Godoy, 2010; Uribe *et al.,* 2011).

2.5.4 Sistema inmune adaptativo

Los peces poseen un sistema inmune adaptativo muy similar al de los mamíferos. De manera similar al sistema inmune innato, pueden distinguirse dos componentes fundamentales: celular y humoral (Poynter y Dixon, 2016).

El componente celular involucra a dos células específicas: los linfocitos T, los cuales pueden eliminar directamente células con material antigénico y modular la activación y proliferación de diversas células del sistema inmune mediante la producción de diferentes citocinas; y los linfocitos B, los cuales producen citocinas e inmunoglobulinas (anticuerpos) (Secombes y Wang, 2012; Uribe *et al.*, 2011).

El componente humoral se compone de las citocinas e inmunoglobulinas (Ig) producidas por los linfocitos T y B respectivamente, estas moléculas actúan como mediadores de la respuesta inmune y ayudan a la rápida y eficiente eliminación de patógenos específicos (Rauta *et al.*, 2012; Secombes y Wang, 2012).

La activación y reclutamiento de las diferentes células del sistema inmune esta mediada por la comunicación celular utilizando diferentes citocinas (Secombes y Wang, 2012). La producción de estas citocinas está mediada por diversos factores de transcripción, entre ellos el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (Fric *et al.*, 2012; Goodringe *et al.*, 2007). Este factor de trasncripción puede ser activado mediante el reconocimiento de β-glucanos presentes en la pared celular de levaduras a traves de receptores de membrana especificos como Dectin-1, un receptor descrito en mamiferos (Brown, 2006; Fric *et al.*, 2016). Sin embargo, en peces no se ha descrito la presencia de este receptor ni como se modula la cascada de señalización relacionada a este factor de transcripción.

2.6 Factor nuclear de células T activadas (NFAT)

El factor nuclear de células T activadas (NFAT) es un factor de transcripción que fue descrito inicialmente en la línea celular Jurkat de células T, sin embargo, se ha demostrado que está presente en otras células relacionadas al sistema inmune (ej. macrófagos, células dendríticas, neutrófilos), así como células no relacionadas (ej. células cardiacas) (Graef *et al.*, 2001; Macian, 2005; Serfling *et al.*, 2000).

Se han descrito cinco tipos de NFAT, cuatro localizados en citoplasma (NFATc1-c4) y uno localizado en núcleo (NFATn5), dependientes de calcio y estrés osmótico, respectivamente

(Macian, 2005). Este factor de transcripción presenta dominios de unión a DNA que permiten la unión a DNA y regular la expresión de citocinas involucradas en la señalización, activación y proliferación de células del sistema inmune asociadas tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa (Macian, 2016; Mancini y Toket, 2009).

La activación de este factor de transcripción se ha asociado al reconocimiento de los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras por parte del receptor Dectin-1, lo que inicia la cascada de señalización intracelular (Batbayar *et al.,* 2012). Esta cascada tiene como producto final citocinas efectoras que transducen señales de célula a célula, tales como interleucina 2, 4, 6, 8, 10, interferón gamma y el factor de necrosis tumoral alfa (Fric *et al.,* 2012; Goodringe *et al.,* 2007).

2.6.1 Características de las proteínas de la familia NFAT

Las proteínas pertenecientes a la familia de NFAT pueden distinguirse en 5 tipos, dependiendo de su localización celular, su regulación y su expresión en las células del sistema inmune (tabla VII) (Macian, 2005).

Tabla VII. Proteínas de la familia de NFAT (Modificada de Macian, 2005).

Miembro de la familia de NFAT	Nombres alternativos	Ubicación celular	Regulación	Expresión en células del sistema inmune
NFAT1	NFATc2/NFATp	Citoplasma	Calcio/Calcineurina	Si
NFAT2	NFATc1/NFATc	Citoplasma	Calcio/Calcineurina	Si
NFAT3	NFATc4	Citoplasma	Calcio/Calcineurina	No
NFAT4	NFATc3/NFATx	Citoplasma	Calcio/Calcineurina	Si
NFAT5	TonEBP/OREBP	Núcleo	Estrés osmótico	Si

Todas las proteínas pertenecientes a la familia de NFAT presentan tres regiones: una región homologa de las proteínas de la familia NFAT (NHR), una región homologa a las proteínas de la familia Rel (RHR), y una región carboxilo terminal (C-Terminal) (Fig. 2) (Macian, 2016; Mancini *et al.*, 2009).

La región homóloga de las proteínas de la familia NFAT (NHR) está conformada por una región de transactivación en el amino terminal (TAD-N) y una región de regulación, la cual a su vez se encuentra conformada por el sitio de unión a calcineurina (PXIXIT), regiones ricas en serina (SRR), motivos ricos en serina y prolina (SP), así como una secuencia de localización celular (NLS) (Macian, 2005; Mancini *et al.*, 2009).

La región homologa a las proteínas de la familia Rel (RHR) comprende una región rica en motivos de unión a DNA y otros factores transcripcionales, como Fos y Jun (Hogan *et al.*, 2017; Mancini *et al.*, 2009).

La región carboxilo terminal (C-Terminal) no presenta una función específica, sin embargo, se ha observado que las diferentes proteínas pertenecientes a la familia NFAT presentan regiones C-Terminales de diferente longitud y la presencia de regiones de transactivación (Mancini *et al.*, 2009).

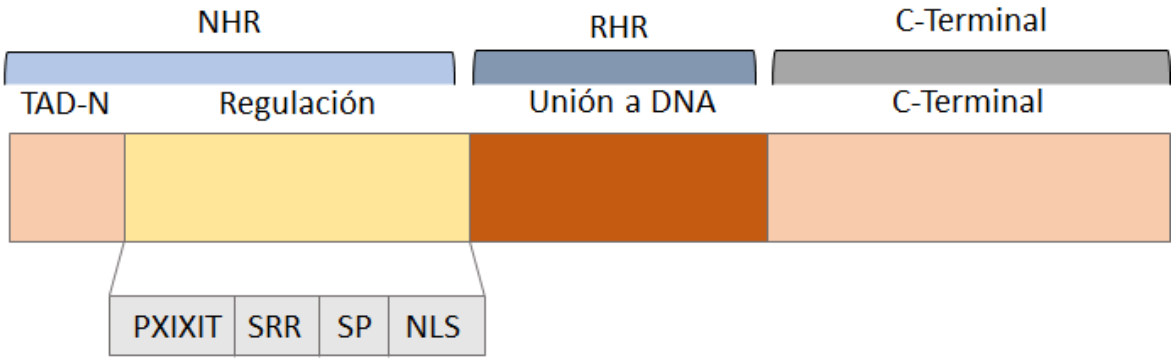


Figura 2. Organización de las proteínas de la familia de NFAT (Modificado de Mancini *et al.*, 2009). NHR: Región homologa de la familia de NFAT, RHR: Región homologa de la familia Rel, C-Terminal: Región carboxilo terminal, TAD-N: Región de transactivación en el amino terminal, PXIXIT: Sitio de unión a calcineurina, SRR: Región rica en serina, SP: Región rica en serina y prolina, NLS: Secuencia de localización celular.

Las proteínas de NFAT fueron inicialmente descritas como factores de transcripción con capacidad de unirse al promotor de interleucina 2 (IL-2) y modular la producción de esta citocina en la línea celular Jurkat de linfocitos T humanos (Serfling *et al*. 2000). Cómo se

mencionó anteriormente, se ha descrito la presencia de las proteínas de NFAT en diferentes tipos de células y con un amplio rango de funciones celulares (Graef *et al.*, 2011; Macian *et al.*, 2016). Además, esta familia de proteínas ha sido descrita como parte de una superfamilia de factores de transcripción, donde se incluyen las proteínas pertenecientes a la familia de NF-κβ, implicados en la activación y proliferación de células del sistema inmune, así como la producción de diferentes citocinas (Graef *et al*., 2001; Serfling *et al*., 2004).

2.6.2 Cascada de señalización de NFAT: Interacciones del sistema inmune

La activación del NFAT puede deberse a diferentes cascadas de señalización a partir del reconocimiento de patógenos (bacterias y hongos) o moléculas inmunoestimulantes como los β-glucanos (presentes en hongos y levaduras) por células del sistema inmune innato, incluidas las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (Fric *et al.*, 2016; Herbst *et al.*, 2015). La activación de NFAT requiere la desfosforilación de las proteínas citoplasmáticas (NFATc1-c4), proceso que es mediado por la presencia de calcio al interior de la célula y la unión de calcineurina (CaN) a NFAT (Macian, 2016; Okamura *et al.*, 2000). Una vez desfosforiladas, las proteínas de NFAT pueden traslocarse en el núcleo y unirse a DNA, donde promueven la producción de citocinas involucradas en respuesta inflamatoria (ej. IL-1β, IL-6, IL-12), reclutamiento, activación y proliferación de células del sistema inmune innato y adaptativo (Fric *et al.*, 2016; Serfling *et al.*, 2000;). A continuación, se describirá específicamente la cascada de señalización relacionada al reconocimiento de los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras y del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* (Fig. 3).

El reconocimiento de los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras se lleva a cabo mediante receptores de membrana específicos presentes en células dendríticas y macrófagos, como Dectin-1 (Brown, 2006; Fric *et al.*, 2016). Este reconocimiento desencadena una cascada de señalización que termina en la unión de calcineurina a NFAT, lo cual permite la desfosforilación de NFAT y facilita su traslocación a núcleo (Herbst *et al.*, 2015). Dentro de núcleo, las proteínas de NFAT pueden unirse a DNA y promover la

expresión de citocinas, así como formar complejos con otros factores de transcripción como el factor nuclear kappa beta (NF-κβ) (Feske, 2007; Gwack *et al.*, 2007; Serfling *et al.*, 2004).

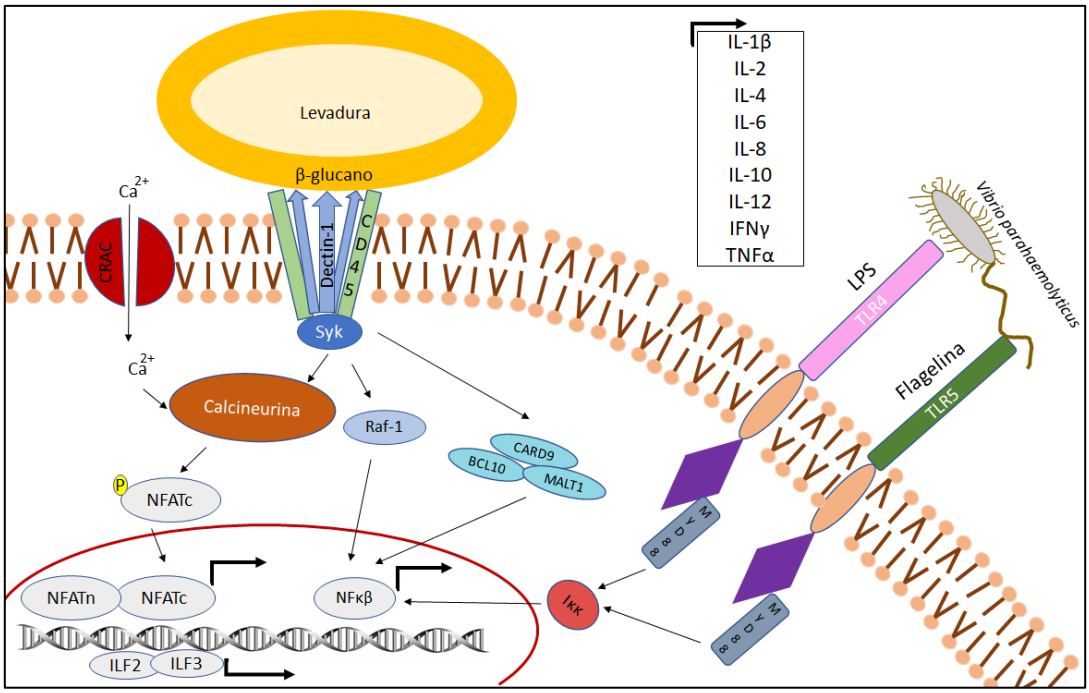


Figura 3. Cascada de señalización de NFAT y elementos implicados en el reconocimiento de *V. parahaemolyticus* en células del sistema inmune (Células dendríticas, y macrófagos). IL: Interleucinas, NFAT: Factor nuclear de células T activadas, NF-κβ: Factor nuclear kappa beta, ILF: Factor de unión potenciador de interleucina, TLR: Receptor tipo Toll, TNFα: Factor de necrosis tumoral alpha, CRAC: Canal de calcio activado por la liberación de calcio, MyD88: Proteína de diferenciación mieloide 88, LPS: Lipopolisacárido. (Adaptado de: Brown, 2006; Feske, 2007; Fric *et al.*, 2016; Gwack *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 2015; Serfling *et al.*, 2004).

Las citocinas producidas en respuesta a la activación de NFAT realizan diferentes funciones, entre ellas el reclutamiento de neutrófilos, activación de linfocitos T, y procesos relacionados con respuestas pro- y antinflamatoria, entre otras (tabla VIII) (Fric *et al.*, 2016; Herbst *et al.*, 2015; Lacy, 2015; Macian, 2005; Stow *et al.*, 2009).

Las células dendríticas y macrófagos tienen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos, lo cual involucra la activación y proliferación de células del

sistema inmune adaptativo, los linfocitos T (Graef *et al.*, 2001; Macian, 2005). De manera similar se produce una cascada de señalización que finaliza con la producción de diversas citocinas que regulará la respuesta inmune (Fig. 4).

Tabla VIII. Citocinas producidas en respuesta a la activación de NFAT.

Citocina	Actividad	Células que las producen
IL-1β	Proinflamatoria	Macrófagos, Células dendríticas, Neutrófilos
IL-2	Activación, proliferación y producción de citocinas en linfocitos T	Eosinófilos, Mastocitos, Linfocitos T
IL-4	Antinflamatoria, promueve respuesta Th2	Neutrófilos, Linfocitos T
IL-6	Pro- y Antinflamatoria, promueve respuesta Th2	Macrófagos, Células Dendríticas, Neutrófilos, Linfocitos B, Linfocitos T
IL-8	Proinflamatoria, activación de neutrófilos	Macrófagos, Neutrófilos
IL-10	Antinflamatoria, regulación (Treg)	Macrófagos, Neutrófilos
IL-12	Proinflamatoria, promueve respuesta Th1	Macrófagos, Neutrófilos, Linfocitos T
IFN-γ	Reclutamiento de macrófagos, promueve respuesta Th1	Eosinófilos, Neutrófilos, Linfocitos T
TNF-α	Proinflamatoria, reclutamiento de neutrófilos	Macrófagos, Células dendríticas, Neutrófilos, Linfocitos T

(Adaptado de: Fric *et al.*, 2016; Herbst *et al.*, 2015; Lacy, 2015; Macian, 2005; Stow *et al.*, 2009).

2.6.3 NFAT en peces

A diferencia de mamíferos, existen pocos trabajos relacionados a este factor de transcripción en peces y principalmente se ha realizado la caracterización y análisis de expresión del factor de unión potenciador de interleucina 2 (ILF2), el cual es descrito como una unidad de NFAT (Chi *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Park *et al.* (2002) describe que NFAT es necesario para la activación de las células T en peces, después de realizar estudios con leucocitos aislados de sangre periférica del bagre de canal (*Ictalarus punctatus*) y líneas celulares utilizando diferentes estimulantes. A excepción de estos antecedentes no existe información sobre este factor de transcripción y si posible

función inmunológica en peces. Por ello es necesario realizar estudios que nos permitan describir la función e implicación de NFAT en peces y poder realizar comparaciones con los modelos de mamíferos.

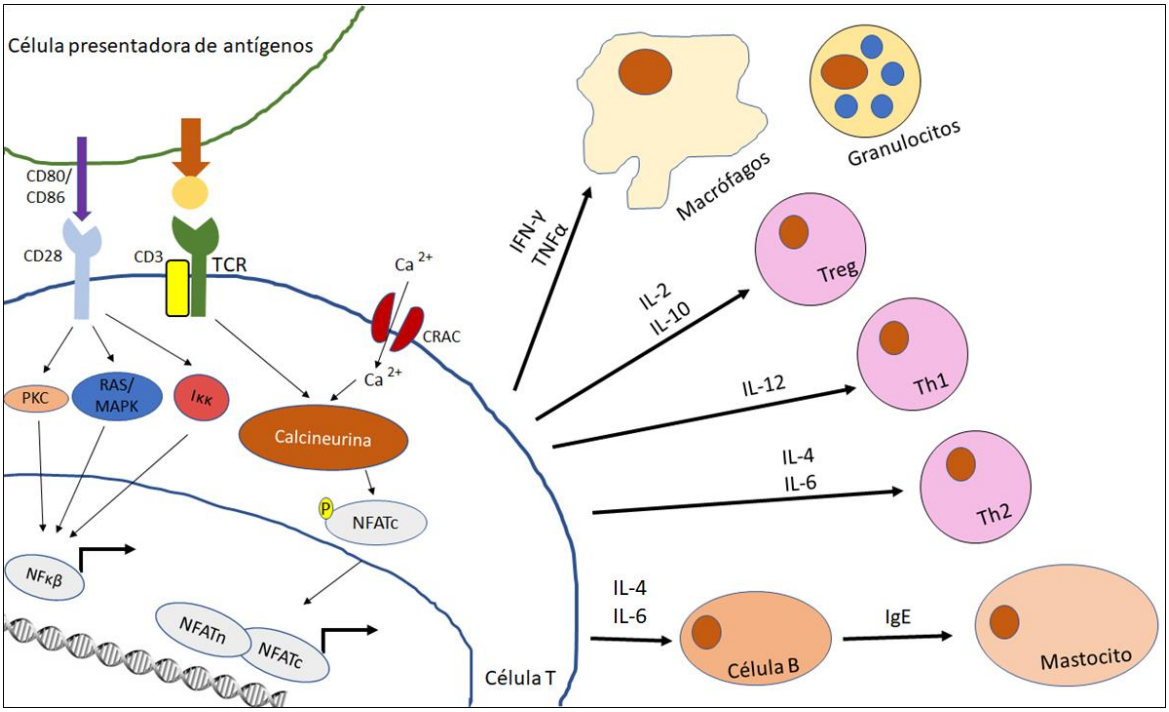


Figura 4. Cascada de señalización de NFAT en células T y activación y proliferación de otras células del sistema inmune. IL: Interleucinas, NFAT: Factor nuclear de células T activadas, NF-κβ: Factor nuclear kappa beta, ILF: Factor de unión potenciador de interleucina, TNFα: Factor de necrosis tumoral alpha, IFNγ: Interferón gamma, TCR: Receptor de células T, CRAC: Canal de calcio activado por la liberación de calcio, Ig: Inmunoglobulina. (Adaptado de: Fric *et al.*, 2016; Graef *et al.*, 2001; Herbst *et al.*, 2015; Macian, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista evolutivo se considera a los peces cómo modelo de estudio de la respuesta inmune al contar con un sistema inmune innato y adaptativo similar al sistema inmune descrito en vertebrados superiores. Sin embargo, los estudios en peces se han enfocado más en el sistema inmune innato, por lo que existe poca información relacionada a la respuesta inmune adaptativa y los factores celulares y moleculares implicados en la misma en estos organismos. Por ello, en este proyecto se propuso analizar la modulación de la ruta de señalización y mecanismos efectores del factor nuclear de células T activadas (NFAT), un factor de transcripción implicado en la activación y proliferación de células del sistema inmune como resultado de la exposición a levaduras marinas.

Además, la acuacultura es una actividad con alto potencial económico y en crecimiento constante que se ha visto afectada por la presencia de patógenos. Esto ha llevado a la búsqueda de medidas de control como el uso de levaduras probióticas que han demostrado tener efectos inmunomodulatorios al ser administradas en la dieta; razón por la cual ya se encuentran comercialmente disponible algunas levaduras o sus componentes estructurales (β-glucanos) para ser utilizados en acuacultura.

Por ello, el presente trabajo se compone de dos partes: un enfoque de generación de conocimiento o ciencia básica, que consiste en analizar el efecto de las levaduras en la modulación de factores celulares y moleculares en respuesta al reconocimiento de los β-glucanos presentes en su pared celular (ej. NFAT); y un enfoque biotecnológico, que consiste en la posible utilización de las levaduras marinas empleadas en este estudio como probióticos para la acuacultura de peces marinos.

4. HIPÓTESIS

Si se ha reportado que la administración de levaduras en la dieta de peces puede modular la respuesta inmune y el NFAT puede ser activado mediante la señalización por el reconocimiento de glucanos presentes en la pared celular de levaduras, entonces, la administración de la levadura marina *Yarrowia lipolytica* modulará la respuesta inmune e inducirá la expresión del NFAT en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru).*

A partir de esta hipótesis se formularon las siguientes preguntas científicas:

1. ¿La levadura marina *Yarrowia lipolytica* aislada de un ambiente extremo en Baja California Sur presentará propiedades probióticas e inmunoestimulantes *in vitro*?

2. ¿Qué factores de la respuesta inmune serán regulados?

3. ¿La expresión de genes relacionados al reconocimiento de glucanos y activación de NFAT será modulada por la presencia de *Yarrowia lipolytica*?

4. ¿Cuál será el efecto *in vivo* en huachinango?

5. ¿La expresión de NFAT será modulada por la dieta suplementada con la levadura marina *Yarrowia lipolytica*?

6. Si es así, ¿Qué otros factores/genes se expresarán como parte de la cascada de señalización?

7. ¿Qué factores celulares de la respuesta inmune serán regulados?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la modulación de la ruta de señalización del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) por la administración oral de la levadura marina *Yarrowia lipolytica.*

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar *in vitro* la capacidad probiótica e inmunoestimulante de *Y. lipolytica.*

2. Determinar parámetros inmunes efectores en peces alimentados con dietas adicionadas con *Y. lipolytica.*

3. Evaluar la expresión génica de los componentes de la ruta de señalización de NFAT.

4. Analizar *in silico* el factor nuclear de células T activadas (NFAT) del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Peces

Los peces utilizados (*Lutjanus peru*) fueron obtenidos del Laboratorio de Larvicultura del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Los especímenes (100±20 g de peso promedio) fueron examinados, bañados en agua dulce y puestos en cuarentena, donde fueron monitoreados para identificar posibles infecciones y/o parásitos. Los peces fueron mantenidos a 26 ºC, con un fotoperiodo de 12 horas luz/12h oscuridad, oxígeno disuelto entre 4.3-6.9 mg/L, un pH entre 7.7-8.1 y la concentración de nitritos y amonio total permaneció debajo de 0.02 mg/L.

Para la extracción de los órganos a utilizar, los peces fueron anestesiados utilizando eugenol (50 mg/L). Una vez inconscientes, los peces fueron decapitados y se tomaron muestras de riñón cefálico y bazo para los ensayos *in vitro*, y muestras de intestino para el ensayo de adhesión.

6.2 Levaduras

Para los ensayos realizados se utilizaron dos levaduras aisladas de la salinera de Exportadora de Sal, S.A. de C.V. (Guerrero Negro, B.C.S. México), las cuales fueron cultivadas en medio YPD (Sigma-Aldrich Y1375) suplementado con cloranfenicol (50 μg/mL) e incubadas a 30 ºC con agitación constante.

Como control se utilizó la levadura *Debaryomyces hansenii* (DhCBS004) perteneciente a la Colección de cepas perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR); la cual fue cultivada e incubada en las mismas condiciones.

6.2.1 Identificación molecular

A partir de los cultivos de las levaduras aisladas de la salinera, se obtuvo biomasa para realizar la extracción de ADN de acuerdo a la metodología utilizada por Abliz *et al.* (2004).

Los cultivos fueron centrifugados y el pellet celular fue resuspendido en buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, EDTA 25 mM, SDS 0.5%, NaCl 250 mM). Las muestras fueron mezcladas utilizando un agitador tipo vórtex, calentadas a 95ºC durante 15 min, enfriadas en hielo durante un minuto, y finalmente centrifugadas a 20,000 *x g* durante 15 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y el DNA fue extraído siguiendo el protocolo de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

Las muestras de DNA fueron cuantificadas y utilizadas para PCR punto final utilizando los primers 18S forward (5'- TACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') and 18S reverse (5'-TTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3'), los cuales amplifican la subunidad 18S RNA ribosomal (18rRNA) (Fell, 2001). Los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y enviados a secuenciar (Genewiz, Inc.)

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por homología en el programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) y se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA 6 (http://www.megasoftware.net).

6.3 *Vibrio parahaemolyticus*

La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* fue proporcionada por la Colección de cepas perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). *Vibrio parahaemolyticus* fue cultivado en medio TSB (Sigma-Aldrich 22092) suplementado con 1.5% NaCl e incubado a 30 ºC con agitación constante durante 24 horas. Se midió la densidad óptica del cultivo y se ajustó a una concentración de $1x10^8$ cel/mL (OD_{655nm}= 1.0, $1x10^9$ cel/mL) en medio TSB para el ensayo de propiedades inmunoestimulantes *in vitro* (Cárdenas-Reyna *et al.*, 2016).

6.4 Caracterización de las propiedades probióticas de las levaduras *in vitro*

6.4.1 Resistencia a salinidad

Se preparó medio YPD a diferentes concentraciones de sal (0%, 1.5%, 2.5%, 4.5% y 6.5% (w/v)) y se inocularon las cepas de levaduras (1%, 60 µL en 6 mL de medio YPD). Posteriormente se midió la densidad óptica y se incubaron a 30°C con agitación constante (120 rpm). La densidad óptica fue monitoreada a las 24, 48 y 72 horas (Font de Valdez y Taranto, 2001).

6.4.2 Resistencia a pH

Se preparó medio YPD a diferentes pHs (6.5, 5.5, 4.5, 3.5 y 2.5), y se inocularon las cepas de levaduras (10%, 600 µL en 6 mL de medio YPD). Luego, el cultivo se incubó a 30°C con agitación constante (120 rpm) durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron diluciones seriadas (10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}) de las cuales se tomaron 100 µL para inocular placas con medio YPD Agar. Las placas fueron incubadas a 30°C y el crecimiento de las colonias fue monitoreado a las 24, 48 y 72 horas (Park *et al.*, 2006).

6.4.3 Resistencia a bilis

Se preparó medio YPD con bilis de huachinango (2.5 partes medio YPD, 2 partes Buffer de fosfatos salino, 0.5 partes bilis). Luego se inocularon las cepas de levaduras (10%, 50 µL en 500 µL de medio) y se incubaron durante una hora y media a 30°C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron diluciones (10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}) de las cuales se tomaron 100 µL para inocular placas con medio YPD Agar. Las placas fueron incubadas a 30°C y el crecimiento de las colonias fue monitoreado a las 24, 48 y 72 horas (Pedersen *et al.*, 2014; Reyes-Becerril *et al.*, 2014).

6.4.4 Adhesión a intestino

Previo al ensayo se cultivaron las tres cepas levaduras y ajustó la densidad óptica a $1x10^9$ cel/mL (OD_{490nm}= 1.0) en Buffer de fosfatos salino (PBS) y se realizó el marcaje con diclorotriazinilamino fluoresceína (DTAF, Sigma-Aldrich D0531). Para ello se utilizaron 500 µL de levaduras con la densidad óptica deseada ($1x10^9$ cel/mL, OD_{490nm}= 1.0) y 750 µL de DTAF 1 mg/mL (en PBS). Luego se incubaron en oscuridad durante 15 minutos con agitación constante (40 ciclos por min). Una vez transcurrido el tiempo, las levaduras se lavaron con PBS para eliminar el exceso de DTAF. Se resuspendieron en PBS y almacenaron a -80°C.

Para el ensayo de adhesión se sacrificaron 4 peces de los cuales se tomaron dos secciones de intestino (anterior y posterior). Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con 200µL de cada levadura marcada durante 30 minutos. El intestino se lavó con PBS para eliminar el exceso de levaduras y DTAF, y se seccionó para su observación en fresco bajo el microscopio de fluorescencia y para realizar cortes histológicos (Sherr *et al.*, 1987).

6.5 Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de las levaduras *in vitro*

6.5.1 Aislamiento de leucocitos de riñón cefálico y bazo

Se sacrificaron 8 peces de los cuales se colectó el bazo y riñón cefálico. Los órganos fueron tamizados (40 µm) con medio RPMI (Sigma-Aldrich R0883) adicionado con Heparina para evitar la formación de coágulos. Se realizaron lavados con medio RMPI adicionado con suero fetal bovino (SFB, 10%), se midió la concentración celular utilizando el equipo TC-20 (Bio-Rad) y se ajustó la concentración a $1x10^6$ cel/mL (Reyes-Becerril *et al.*, 2016).

6.5.2 Estimulación con levaduras y reto bacteriano

Se utilizó 1 mL de leucocitos de cada tejido ($1x10^6$ cel/mL) por pocillo para realizar dos experimentos: (1) uno estimulado solamente con las cepas de levaduras y otro (2) estimulado con las cepas de levaduras y un reto bacteriano. Ambos experimentos fueron estimulados con 200 µL de las tres cepas de levaduras ($1x10^9$ cel/mL, OD_{490nm}= 1.0) e incubados a 25°C, 5%

de CO_2. Se utilizó como control de estimulación un β-glucano comercial, Zymosan A (Sigma-Aldrich Z4250, 50 µg/mL).

Para el experimento uno (solo las cepas de levaduras) se dejaron incubando las placas durante 24 horas y se tomaron muestras para los ensayos de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), mieloperoxidasa (MPO), explosión respiratoria (NBT), óxido nítrico (ON) y por citometría de flujo se analizó fagocitosis y apoptosis. Además, se almacenaron leucocitos en Trizol (Invitrogen Cat. 15596026) para la extracción de RNA y el análisis de expresión génica.

En el experimento dos (las cepas de levaduras más el reto infeccioso), los leucocitos fueron estimuladas durante 6h con las tres cepas de levaduras y posteriormente se añadió el reto bacteriano (20 µL de cultivo de *V. parahaemolyticus* ajustado a $1x10^8$ cel/mL, OD_{655nm}= 1.0, $1x10^9$ cel/mL). Las placas fueron puestas nuevamente a incubar hasta alcanzar las 24h. Se realizaron los análisis descritos en el experimento uno y adicionalmente se cuantificó la carga bacteriana.

6.5.3 Carga bacteriana

Del segundo experimento, inmunoestimulación con levaduras y reto bacteriano, se tomaron 500 µL de cultivo celular y se inocularon en 5 mL de medio APW (1% peptona, 2% NaCl, pH 8.6). Estos cultivos se guardaron a -20°C para su posterior procesamiento.

Se realizó el cultivo de *V. parahaemolyticus* en medio TSB (1.5% NaCl), se ajustó la densidad óptica a $1x10^9$ cel/mL (OD_{655nm}= 1.0) y se realizaron diluciones seriadas (de 10^9 cel/mL a 10^1 cel/mL). Se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras y de las diluciones seriadas de cultivo puro de *V. parahaemolyticus* utilizando el protocolo de Yamazaki *et al.* (2008), donde se cosechó el cultivo de la bacteria (9,600 *x g* durante 5 minutos), se descartó el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de hidróxido de sodio (NaOH) 25 mM y se resuspendió el botón celular utilizando el vórtex. Las muestras fueron llevadas a baño seco a 95°C durante 5min, luego se enfriaron en hielo y se les adicionó 8 µL de Tris-

HCl 0.5 M. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. La concentración de muestras fue obtenida utilizando el Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

Una vez realizada la extracción de ADN bacteriano se realizó una PCR en tiempo real para generar la curva estándar (concentración de DNA y número de células) utilizando los primers ToxR (F: 5'-GGAGTTTTAACCCGTAACGAGC-3', R: 5'-GGTACAAATGAGTTGATAGCCTCG-3', 196pb). Para ello se siguió el siguiente programa: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de: 95° por 15 segundos, 58° por 20 segundos, 72°C por 25 segundos), 72°C por 5 minutos. Se realizó una curva melt desde 70° hasta 95°C, aumentando 1°C por ciclo. Una vez realizada la curva estándar, se realizó el mismo procedimiento con las muestras del experimento dos.

6.5.4 Explosión respiratoria

Se tomaron 100 µL de cultivo celular por triplicado y se colocaron en tubos de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 1000 *x g* por 1 minuto a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en una solución de NBT (Sigma-Aldrich N6876, 1 mg/mL) y se incubaron en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se eliminó la solución NBT centrifugando las muestras y decantando, se añadieron 100 µL de metanol 70% (v/v) y se incubaron 10 minutos. Se eliminó el alcohol por centrifugación y se añadieron 120 µL de hidróxido de potasio 2 M y 140 µL de DMSO. Se tomaron 200 µL y se colocaron en las placas de 96 pozos para leer absorbancia en el espectrofotómetro a 655 nm (Kemenade *et al.,* 1994).

6.5.5 Óxido nítrico

Se añadieron 100 µL de cultivo celular por triplicado en una placa de 96 pozos, se adicionaron 100 µL de reactivo de Griess (Sigma-Aldrich G4410, 4 mg/mL) y se incubó durante 15min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se leyó absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm (Neumann *et al.,* 1995).

6.5.6 Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determinó empleando el SOD determination kit (Sigma-Aldrich 19160). Se colocaron 20 µL del cultivo celular de cada tratamiento por triplicado en placas de 96 pozos, se agregó 200 µL de la solución de trabajo (WST) y 20 µL de solución de trabajo enzimática. Se incubó 20 min a 37°C y posteriormente la placa se leyó a 450 nm y la actividad se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de SOD (\% inhibición)} = \{[(\text{Ablanco1} - \text{Ablanco3}) - \text{Amuestra} - \text{Ablanco2})]/(\text{Ablanco1} - \text{Ablanco3})\} \times 100. \quad \textbf{(1)}$$

6.5.7 Catalasa

Se midió la actividad de catalasa utilizando el reactivo de Purpald (Sigma-Aldrich 162892), se colocaron 25 µL del buffer de dilución, 50 µL de Metanol y 5 µL de peróxido de hidrógeno diluido en una placa de 96 pozos, se agregaron 50 µL de cultivo celular (muestra) por triplicado. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante (120 rpm). Transcurrido el tiempo, se añadió 25µL de hidróxido de potasio (KOH) 10M y 50 µL del reactivo de Purpald. Luego se incubó nuevamente durante 10 minutos, se añadieron 25 µL de periodato de potasio, se incubó durante 5 minutos y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 655 nm (Clairbone, 1985)

6.5.8 Mieloperoxidasa

Se colocaron 20 µL de cultivo celular (muestra) por triplicado en una placa de 96 pozos y se añadió 100 µL de la solución de trabajo con TMB (40 mL H_2O destilada, 10 µL de peróxido de hidrógeno (30%), 1 pastilla de TMB). Se añadieron 50 µL de ácido sulfúrico 2 M y se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm (Quade y Roth, 1997).

6.5.9 Citometría de flujo

Las muestras de riñón cefálico y bazo ajustadas a una concentración celular de $1x10^6$ cel/mL fueron filtradas utilizando tamices de 40 μm (BD Bioscience) para ser analizadas por sus patrones de tamaño (forward scatter, FSC) y granularidad (side scatter, SSC) en el citómetro S3e Cell Sorter (BioRad). Se identificaron las poblaciones celulares de acuerdo a los perfiles tamaño/granularidad (FSC/SSC) y se ajustaron los parámetros de autofluorescencia. Cada muestra fue analizada hasta alcanzar los 10,000 eventos a una velocidad de 500 cel/s y eliminando restos celulares (puntos de bajo tamaño y granularidad). Los datos obtenidos fueron analizados con FCS Express 3 Software (De Novo Software).

6.5.9.1 Fagocitosis

La habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico y bazo fue evaluada mediante citometría de flujo. Para ello se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* marcada con (5-([4,6-diclorotriazina-2-YL] amino)-fluoresceína (DTAF, Sigma-Aldrich D0531) de acuerdo con la metodología de Rodríguez *et al.* (2003). Las levaduras fueron inoculadas en medio YPD suplementado con cloranfenicol (50 μg/mL) e incubadas a 30 ºC con agitación constante durante 24h. El cultivo fue centrifugado a 1900 *x g*, durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió en PBS para posteriormente ajustar la concentración celular a $1x10^8$ cel/mL ($1x10^9$ cel/mL, OD_{490nm}= 1.0)

Se prepararon 15 mL de una solución de DTAF (1 mg/mL) en PBS, y se mezcló con 10 mL de cultivo de levaduras ($1x10^8$ cel/mL). La mezcla se incubó durante en un agitador a 40 ciclos/min, temperatura ambiente y en oscuridad durante 25 minutos. Se realizaron 5 lavados con PBS para eliminar el exceso de DTAF y finalmente se realizaron alícuotas. La fluorescencia de las levaduras fue comprobada mediante citometría de flujo.

Se tomaron muestras de 100 µL de leucocitos riñón cefálico y bazo del ensayo *in vitro* para realizar el ensayo de fagocitosis. Los leucocitos fueron incubados en oscuridad con 60 µL de levadura marcada con DTAF durante 30 minutos, posteriormente la fagocitosis fue detenida añadiendo 400 µL de PBS frío. La fluorescencia de las levaduras no fagocitadas fue eliminada utilizando azul de tripán.

La habilidad fagocítica se determinó mediante citometría de flujo detectando la fluorescencia en el canal FL-1 del citómetro S3e Cell Sorter (BioRad).

6.5.9.2 Apoptosis

Se evaluó apoptosis y necrosis utilizando la tinción doble de APC Annexin V (BioLegend Cat. 640920) y Ioduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich P4864) según lo descrito por Muñoz-Atienza *et al.* (2015). Se tomaron 500 µL de leucocitos riñón cefálico y bazo del ensayo *in vitro,* se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en buffer de unión (0.1 M Hepes, 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$). Las células fueron teñidas con 5 µL de APC Annexin V (BioLegend Cat. 640920) y 5 µL de PI (Sigma-Aldrich P4864), incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo utilizando los canales FL-3 (PI) y FL4 (APC Annexin V) en el equipo S3e Cell Sorter (BioRad). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células viables (Annexin-/PI-), apoptóticas tempranas (Annexin+ /PI-), y apoptóticas tardías y necróticas (Annexin+ /PI+).

6.6 Expresión génica

Se realizó la extracción de RNA total de las muestras almacenadas en Trizol (Invitrogen Cat. 15596026) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen Cat. 18068015) y posteriormente se realizó la síntesis de la hebra de cDNA utilizando el kit SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. 18080044).

Utilizando el cDNA sintetizado se realizó la PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de los genes involucrados en la cascada de señalización de NFAT utilizando el CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

6.7 Evaluación de las levaduras *in vivo*

6.7.1 Elaboración de dietas

Las cepas de levaduras *D. hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y N6 fueron inoculadas en medio YPD suplementado con cloranfenicol (50 μg/mL) e incubadas a 30 ºC con agitación constante. Los cultivos fueron escalados a matraces de 1 L posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 1900 *x g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y la biomasa obtenida fue pesada y almacenada hasta completar 43 g de biomasa por kilogramo de dieta. El alimento comercial (Skretting, Canadá) para peces fue molido y almacenado a 4 ºC hasta la preparación de las dietas.

Para la elaboración de las dietas se siguió la metodología descrita por Civera y Guillaume (1989) y Tovar *et al.* (2002). Para ello se mezcló un kilogramo de alimento comercial molido, 43 g de biomasa de levaduras, 20 g de alginato y agua destilada. La dieta fue reconstituida en pellets, secada a 30 ºC y almacenada a 4 ºC hasta su uso.

6.7.1.1 Análisis químico proximal de las dietas

Se tomaron 15g de cada dieta experimental: dieta control y las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*D. hansenii* DhCBS004, *Y. lipolytica* D1 y N6), y fueron enviados para su análisis al Laboratorio de Análisis Químicos Proximales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Se evaluó el porcentaje de humedad, proteína, nitrógeno, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas, extracto libre de nitrógeno y el contenido energético (cal/g).

6.7.2 Peces

Los peces utilizados (*Lutjanus peru*) fueron obtenidos del Laboratorio de Larvicultura del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Los especímenes (talla inicial: 19.73 ± 1.7 cm, peso inicial: 139,16 ± 30.35 g), fueron examinados, bañados en agua dulce y puestos en cuarentena, donde fueron monitoreados para identificar posibles infecciones y/o parásitos. Los peces fueron mantenidos en el Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola de CIBNOR con las siguientes condiciones: temperatura de 26 ºC, con un fotoperiodo de 12 horas luz/12h oscuridad, oxígeno disuelto entre 4.3-6.9 mg/L, salinidad de 35 UPS, un pH entre 7.7-8.1 y la concentración de nitritos y amonio total permaneció debajo de 0.02 mg/L.

6.7.3 Diseño experimental

Los peces fueron distribuidos al azar en 20 tanques, 2 peces por tanque, con 10 peces y 5 tanques por grupo. Los 4 grupos fueron: Control, DhCBS004, D1 y N6; donde cada grupo fue alimentado con 2% de peso con la dieta correspondiente a cada levadura y dieta comercial para el grupo control.

6.7.4 Muestras

Se realizaron 2 muestreos: uno a los 15 días y otro a los 30 días, tomando un pez por tanque y 5 peces por grupo. Los peces fueron anestesiados utilizando eugenol (50mg/L), para posteriormente tomar las muestras correspondientes. Se tomaron muestras para analizar enzimas antioxidantes (suero y mucus), IgM mediante ELISA (suero), expresión génica (bazo e intestino) e histología (bazo e intestino). Además de la obtención de leucocitos de bazo para el reto bacteriano *in vitro*.

Se realizó la extracción de todos los órganos de los peces del grupo basal para analizar expresión génica a nivel basal en cada tejido.

6.7.5 Reto bacteriano *in vitro*

6.7.5.1 Aislamiento de leucocitos

Se sacrificaron 5 peces por grupo del ensayo *in vivo*, de los cuales se colectó parte del bazo para el aislamiento de leucocitos. Los órganos fueron tamizados (40 µm) con medio RPMI adicionado con Heparina para evitar la formación de coágulos. Se realizaron lavados con medio RMPI adicionado con suero fetal bovino (SFB, 10%), se midió la concentración celular utilizando el equipo TC-20 (Bio-Rad) y se ajustó a $1x10^6$ cel/mL (Reyes-Becerril *et al*., 2016). Se utilizó 1 mL de leucocitos de cada tejido ($1x10^6$ cel/mL) por pozo y se realizó el reto con *V. parahaemolyticus.*

6.7.5.2 Reto con *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus fue cultivado en medio TSB liquido suplementado con 1.5% NaCl e incubado a 30 ºC con agitación constante durante 24 horas. Se midió la densidad óptica del cultivo y se ajustó a una concentración de $1x10^8$ cel/mL (OD_{655nm}= 1.0, $1x10^9$ cel/mL) en medio TSB. Se añadieron 20 µL de cultivo de *V. parahaemolyticus* ajustado a $1x10^8$ cel/mL, y las placas fueron puestas a incubar durante 24h y se tomaron muestras para los análisis de actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), mieloperoxidasa (MPO) y producción de óxido nítrico (NO), y expresión de genes relacionados con el sistema inmune.

6.7.6 Parámetros inmunes *in vivo*

A partir de las muestras de suero y mucus se realizaron los análisis de actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y mieloperoxidasa (MPO), descritos secciones anteriores. También se midió la concentración de IgM mediante la técnica de ELISA como se describe a continuación.

6.7.7 IgM

Se cuantificó IgM total en suero y mucus mediante la técnica de ELISA indirecta. Se colocaron 100 µL de las muestras de suero y mucus en placas de 96 pozos, y fueron incubados a 4°C durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con PBS adicionado con Tween 20 (0.05% v/v), y posteriormente se realizó un bloque con leche descremada al 5% por dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20, se añadieron 100 µL del anticuerpo monoclonal IgM (Aquatic Diagnostic F04) en una dilución 1:500 a cada uno de los pozos, y se incubó la placa durante una hora y media a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20, se añadieron 100 µL del anticuerpo Anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma-Aldrich A9044) en una dilución 1:1000, y se incubó la placa durante una hora y media a 37°C. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y se reveló en oscuridad con 100 µL de una solución sustrato con tetrametilbencidina (TMB, Sigma-Aldrich T5525). La reacción fue detenida con 25 µL de ácido sulfúrico 2 M y se midió la absorbancia a 490 nm.

6.7.8 Histología

Las muestras de bazo e intestino fueron colocadas en Solución Davidson con agua de mar para su posterior procesamiento. Las muestras fijadas en formalina neutral al 10%, deshidratadas en alcohol y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm y se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (Drury *et al.,* 1980). Los segmentos fueron examinados al microscopio y las imágenes fueron analizadas utilizando Image Pro Plus v. 9.0 software.

6.7.9 Expresión génica

Se realizó la extracción de RNA de los tejidos almacenados en Trizol (Invitrogen Cat. 15596026) a -80 ºC, posteriormente se realizó la síntesis de cDNA y el análisis de expresión de genes relacionados al reconocimiento de β-glucanos y activación de NFAT en PCR en tiempo real siguiendo la metodología descrita con anterioridad.

6.8 Diseño de primers

A partir de una base de datos de la secuenciación del transcriptoma de huachinango (*L. peru*) se obtuvieron las secuencias de diversos genes involucrados en respuesta inmune, y particularmente genes relacionados en el reconocimiento de glucanos de la pared celular de las levaduras y en la cascada de señalización del factor nuclear de células T activadas citoplasmático 3 (NFATc3). La secuencia completa NFATc3 fue obtenida a partir de este análisis y se utilizó para su posterior caracterización bioinformática.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para determinar homología y aquellas secuencias con alto porcentaje de homología fueron analizadas mediante el software Expert Program Analysis System (ExPASy, http://www.expasy.org) para determinar el marco de lectura abierto y la deducción de la secuencia de aminoácidos.

A partir de las estas secuencias se realizó el diseño de primers específicos para PCR en tiempo real siguiendo la Guía MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Los primers fueron evaluados en OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich (http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet) para determinar temperatura de disociación, contenido de guaninas y citocinas, formación de dímeros y estructuras secundarias. Se utilizó el servidor RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) para corroborar la formación de estructuras secundarias, además de Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) para evaluar la especificidad de los primers diseñados.

6.9 Caracterización *in silico* de NFAT

La secuencia de nucleótidos del factor nuclear de células T activadas (NFAT) fue identificada mediante la secuenciación del transcriptoma de huachinango (*Lutjanus peru*) utilizando secuenciación de siguiente generación (NGS). Se realizó un análisis de homología utilizando el programa de BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) y se dedujo la secuencia de

aminoácidos utilizando Translate Tool de ExPASy (http://web.expasy.org/translate/). Se dedujo el punto isoeléctrico y peso molecular de la secuencia aminoacídica utilizando Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/).

La secuencia de aminoácidos deducida fue analizada utilizando Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (http://smart.emblheidelberg.de/) para la predicción de los dominios proteicos, así como PROSITE (http://prosite.expasy.org/) para la predicción de posibles sitios de fosforilación.

Además, se realizó un alineamiento múltiple utilizando CLUSTAL Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining en MEGA 6 (http://www.megasoftware.net).

6.10 Análisis estadístico

Todas las ensayos y mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar (DE). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar los efectos de los tratamientos en los parámetros de carga bacteriana, parámetros inmunológicos, citometría de flujo y expresión génica; y las medias fueron separadas por una prueba posteriori de Duncan. Se consideraron diferencias significativas entre los tratamientos cuando $p<0.05$.

Para el análisis de expresión génica, los niveles de expresión relativa de los genes fueron normalizados utilizando como control endógeno el gen de factor de elongación 1 alfa (EF-1α). La expresión relativa fue calculada utilizando la ecuación de Pfaffl, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

Todos los datos fueron analizados con el software SPSS versión 19 (SPSS, Richmond, VA, USA).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación molecular de levaduras

Los aislados fueron posteriormente identificados mediante el análisis de la secuencia del gen 18S RNA ribosomal (18SrRNA), las cuales fueron secuenciadas y analizadas mediante la plataforma de BLASTn. El análisis de las secuencias obtenidas mostro un alto porcentaje de similitud con otras cepas de *Yarrowia lipolytica* reportadas (tabla IX), por lo que los aislados fueron identificados como las cepas de *Y. lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6.

Tabla IX. Análisis de homología de los aislados de *Y. lipolytica* utilizados en este estudio comparados con otras secuencias reportadas.

	Y. lipolytica N6		*Y. lipolytica* D1		No. de Acceso
	Similitud (%)	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)	
Yarrowia lipolytica N6	100%	100%	98%	99%	MF072935.1
Yarrowia lipolytica D1	97%	99%	100%	100%	MK020405
Yarrowia lipolytica isolate 7B3	100%	99%	100%	99%	EU434621.1
Yarrowia lipolytica strain Mb5	99%	99%	100%	99%	DQ486711.1
Yarrowia lipolytica strain N9a	99%	99%	98%	99%	EF190312.1
Yarrowia lipolytica strain NRRL YB-423	99%	99%	100%	99%	JQ698926.1
Yarrowia lipolytica strain ATCC 9773	99%	99%	100%	99%	GQ458037.1
Yarrowia lipolytica strain MA09-W	99%	99%	100%	99%	GQ458023.1
Yarrowia lipolytica strain N11b	99%	99%	99%	99%	DQ437080.1
Yarrowia lipolytica strain N3c	99%	99%	98%	99%	DQ437079.1
Yarrowia sp. D30L	99%	98%	99%	98%	EF141322.1
Yarrowia lipolytica strain W1a	96%	99%	99%	99%	HM627140.1
Yarrowia lipolytica strain M	96%	98%	99%	98%	EF141323.1
Yarrowia lipolytica strain CBS 599	64%	99%	75%	99%	AY497757.1

El análisis filogenético de las secuencias mostró una separación en dos grupos, donde *Y. lipolytica* N6 se agrupó con *Y. lipolytica* cepa NRRL YB-423 y N11b, y la cepa comercial *Y. lipolytica* cepa ATCC9773; mientras que *Y. lipolytica* D1 se agrupó con *Y. lipolytica* aislado 7B3 y *Yarrowia sp.* D30L (Fig. 5).

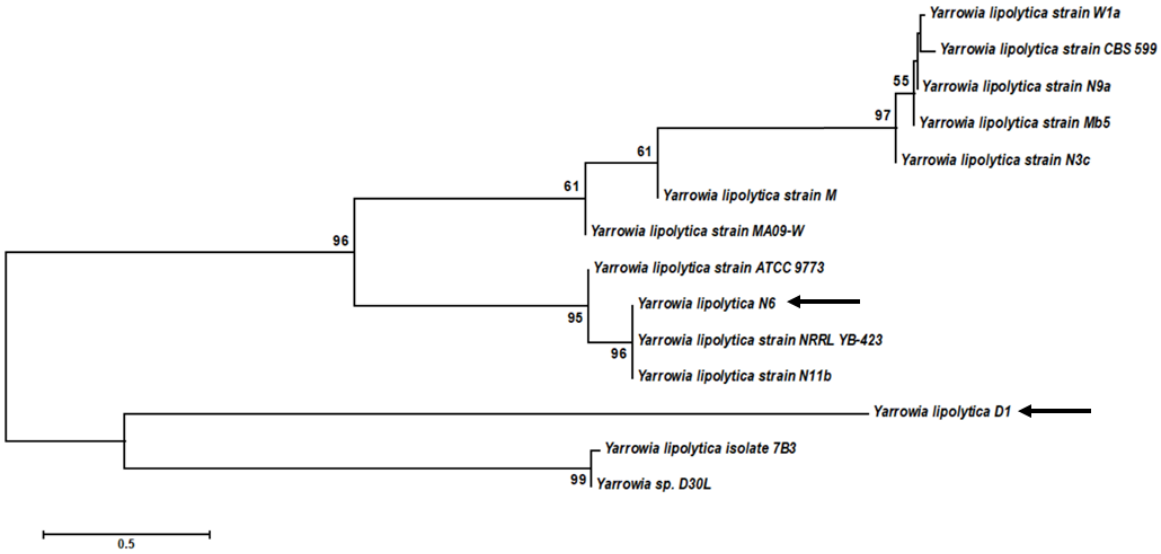


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de 18S rRNA de los aislados de *Y. lipolytica*. El análisis está basado en el alineamiento de la secuencia nucleotídica completa utilizando el programa MEGA 6.0, utilizando el método de *Neighbor-Joining* con un valor de corte de 50% y 10,000 repeticiones. Los aislados utilizados en este estudio se encuentran señalados con flechas.

7.2 Caracterización de las propiedades probióticas de las levaduras *in vitro*

7.2.1 Resistencia a salinidad

La concentración de NaCl presente en el medio tuvo un efecto en el crecimiento de todas las levaduras (Fig. 6), observándose un mayor crecimiento ($p<0.05$) en los cultivos no adicionados con NaCl (0%). Además, *D. hansenii* DhCBS004 (Fig. 6a) tuvo un mayor crecimiento comparado con las cepas de *Y. lipolytica* D1 y N6 (Fig. 6b y c).

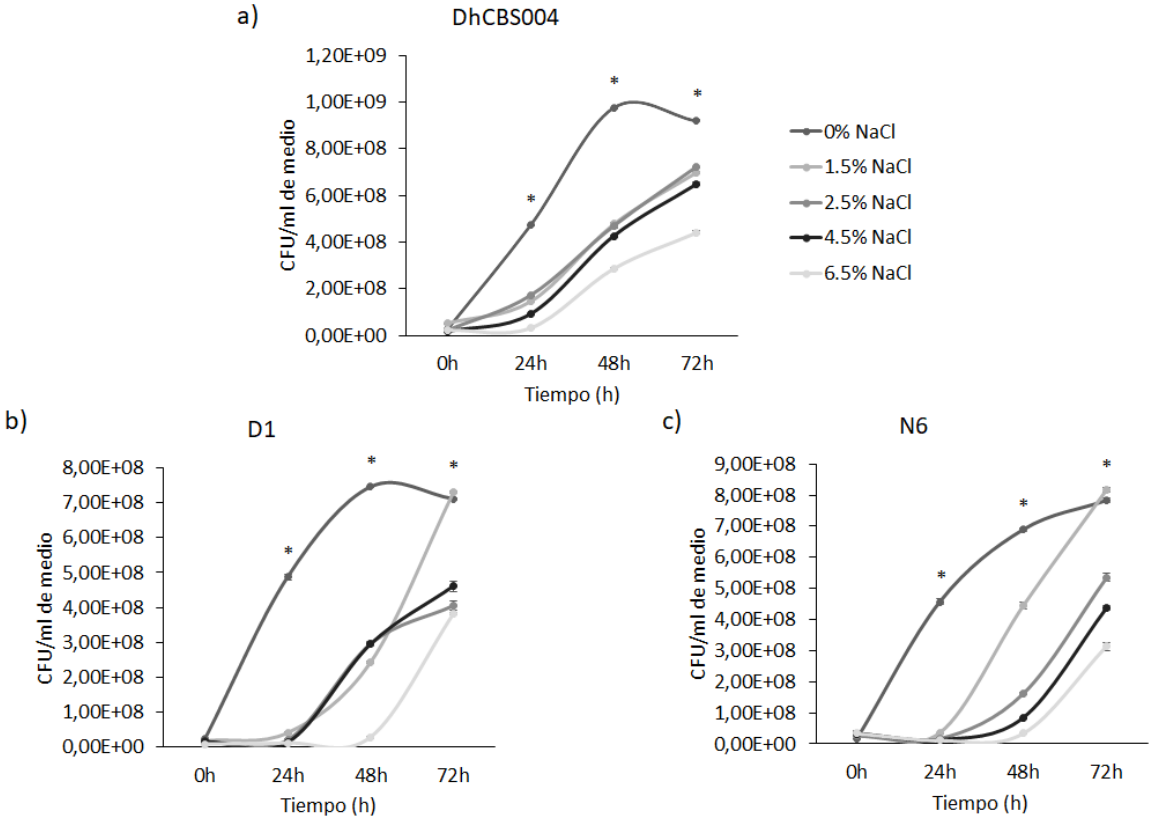


Figura 6. Resistencia a la salinidad de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio: *Debaryomyces hansenii* DhCBS004 (a) y *Yarrowia lipolytica* D1 (b) y *Yarrowia lipolytica* N6 (c). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 6). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos en los diferentes tiempos.

7.2.2 Resistencia a pH

La levadura *D. hansenii* DhCBS0004 tuvo una mayor resistencia a pH ácidos comparada con las levaduras *Y. lipolytica* D1 y N6. Además, los aislados de *Y. lipolytica* mostraron patrones de resistencia distintos (Fig. 7).

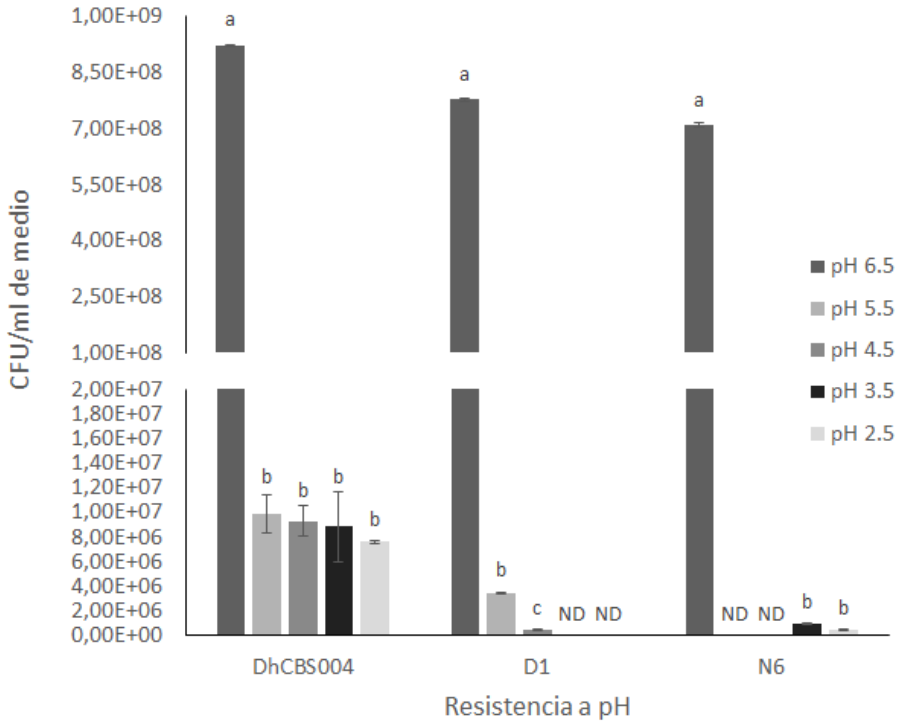


Figura 7. Resistencia a pH ácidos de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio: *Debaryomyces hansenii* (DhCBS004) y *Yarrowia lipolytica* (D1 y N6) a las 72 horas de incubación. ND: No detectado. Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 6). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos en las diferentes cepas de levaduras.

7.2.3 Resistencia a bilis

Las tres cepas de levadura mostraron resistencia a la presencia de bilis de pez (10% v/v) en el medio de cultivo. Contrario a los resultados en pH ácidos, los aislados de *Y. lipolytica* (D1 y N6) mostraron una mayor resistencia a bilis comparadas con *D. hansenii* (DhCBS004) (Fig. 8).

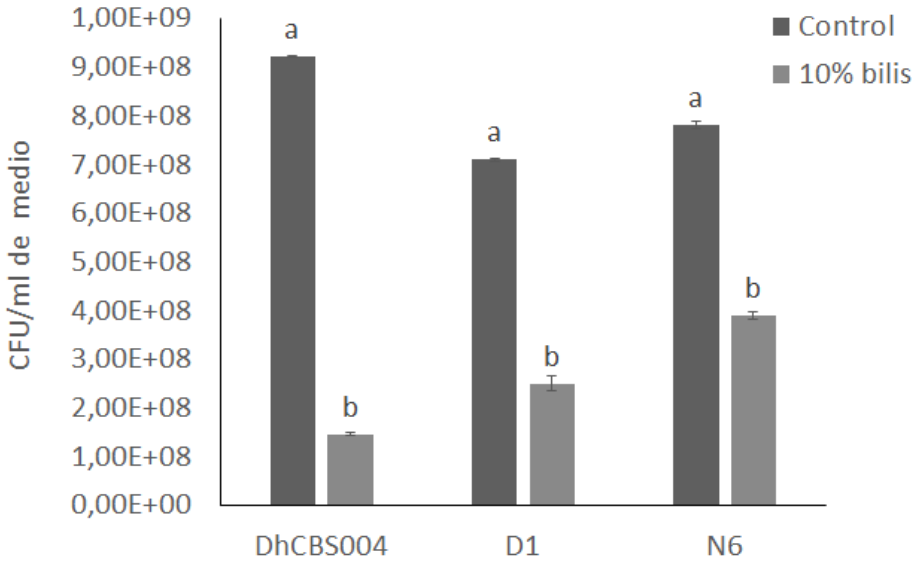


Figura 8. Resistencia a bilis de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio: *Debaryomyces hansenii* (DhCBS004) y *Yarrowia lipolytica* (D1 y N6). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 6). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos en las diferentes cepas de levaduras.

7.2.4 Adhesión a intestino

En este estudio se realizó una prueba cualitativa de adhesión de las levaduras al intestino de huachinango. Las tres cepas de levaduras marcadas con DTAF exhibieron capacidad para adherirse al intestino de peces, tanto anterior como posterior (Fig. 9).

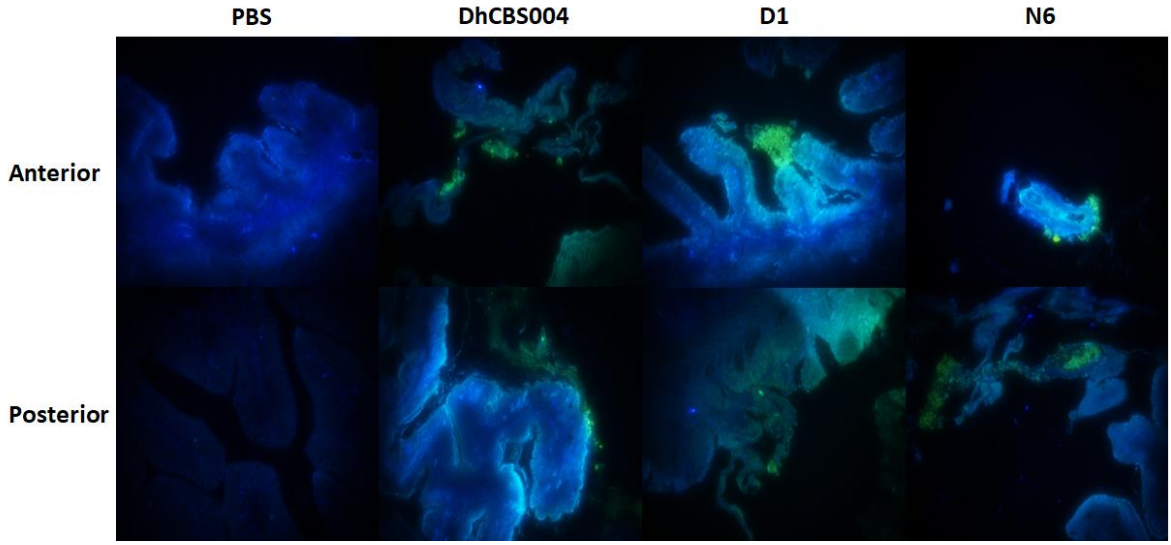


Figura 9. Adhesión a intestino de las cepas de levaduras utilizadas en este estudio: *Debaryomyces hansenii* (DhCBS004) y *Yarrowia lipolytica* (D1 y N6). PBS se utilizó como control negativo.

7.3 Caracterización de las propiedades inmunoestimulantes de las levaduras *in vitro*

7.3.1 Carga bacteriana

La carga bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) se evaluó en leucocitos de riñón cefálico y bazo estimulados con las cepas de levaduras. PBS se utilizó como control negativo PBS y Zymosan (un β-glucano comercial) como control positivo. La carga bacteriana fue diferente entre los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo, observándose una mayor carga bacteriana en bazo ($p<0.05$) (Fig. 10).

Los leucocitos de riñón cefálico estimulados con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 tuvieron menor carga bacteriana comparados con los controles. La carga bacteriana fue menor en leucocitos de bazo estimulados con *Y. lipolytica* D1 y N6 (Fig. 10).

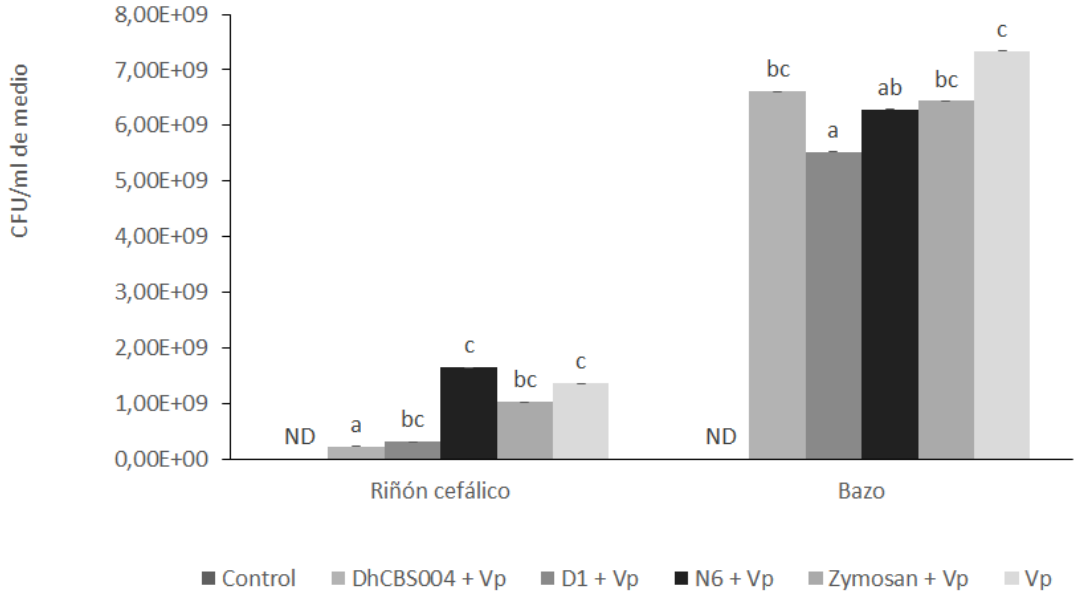


Figura 10. Carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* (Vp) en leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6). y Zymosan. ND: No detectado. Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.2 Fagocitosis

La habilidad fagocítica se evaluó de leucocitos de riñón cefálico y bazo estimulados con las cepas de levaduras, utilizando PBS y Zymosan (control negativo y positivo, respectivamente) y exponiéndolos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (Vp). Los leucocitos expuestos solamente a Vp se usaron como control positivo (Fig. 11).

La habilidad fagocítica fue similar tanto en los leucocitos solo estimulados (Fig. 11a) como en los estimulados y expuestos al reto infeccioso (Fig. 11b). Los leucocitos de riñón cefálico estimulados y retados mostraron una mayor habilidad fagocítica comparados con el control negativo (PBS), mientras que los leucocitos de bazo no mostraron un patrón definido, aunque si se observaron diferencias significativas entre grupos (Fig. 11). Esto muesta un patrón de

respuestat diferencial en los leucocitos aislados de los diferentes tejidos, donde los leucocitos aislados de riñón cefalico mostraron una mayor habilidad fagocítica comparado con los leucocitos aislados de bazo.

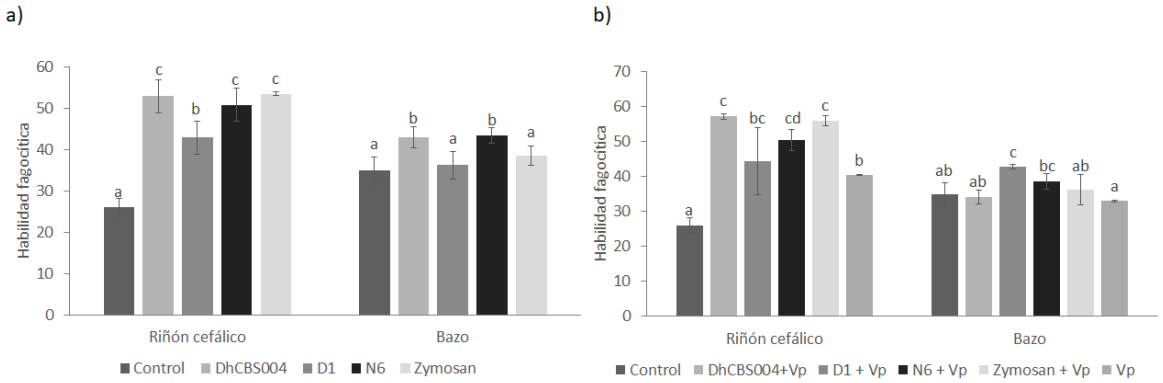


Figura 11. Habilidad fagocítica de leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y estimulados y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.3 Explosión respiratoria

La actividad de explosión respiratoria incrementó en los leucocitos estimulados con las cepas de levaduras comparados con los controles (Fig. 12a), mientras que los leucocitos estimulados y retados no mostraron diferencia o disminuyeron su actividad de explosión respiratoria (Fig. 12b). En ambos ensayos, la actividad de explosión respiratoria fue mayor en los leucocitos estimulados con *D. hansenii* DhCBS004 (Fig. 12).

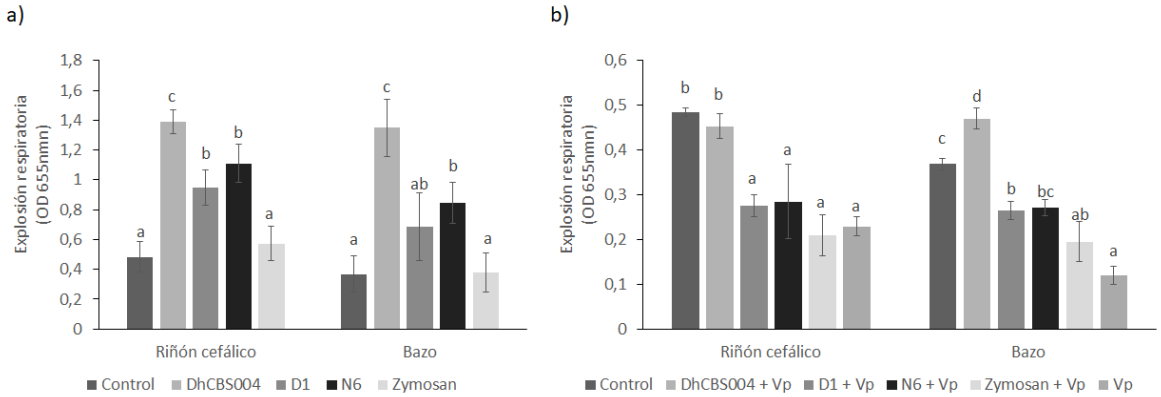


Figura 12. Explosión respiratoria de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.4 Óxido nítrico

Se determinó indirectamente la producción de óxido nítrico realizando la medición de la concentración de nitritos presentes. El nivel de nitritos aumentó en los leucocitos de riñón cefálico y bazo estimulados con las levaduras respecto a los controles (Fig. 13a). Mientras que, en los leucocitos estimulados y expuestos al reto infeccioso, la producción de óxido nitrico (nivel de nitritos) aumentó en los leucocitos de riñón cefálico estimulados con las cepas de *Y. lipolytica* (Fig. 13b).

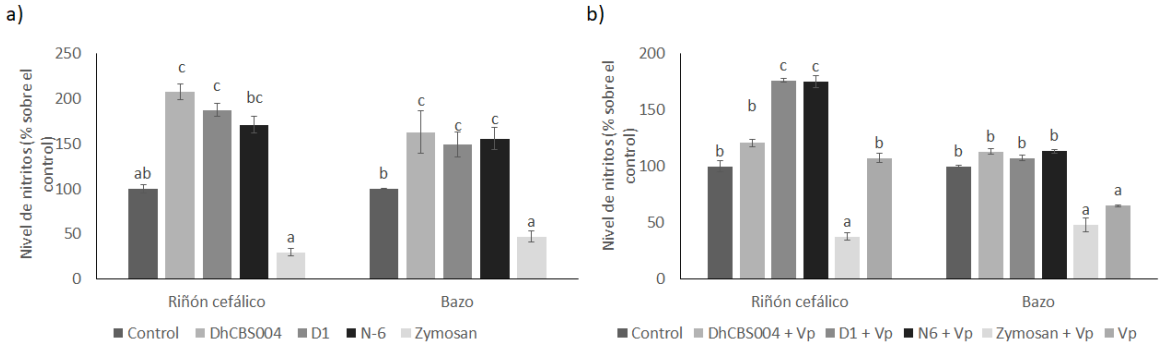


Figura 13. Producción de óxido nítrico (ON) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.5 SOD

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) aumentó en los leucocitos de riñón cefálico y bazo, tanto estimulados (Fig. 14a) como estimulados y expuestos al reto infeccioso (Fig. 14b). La actividad de SOD fue mayor en los leucocitos estimulados con las cepas de levaduras comparados con los controles (Fig. 14).

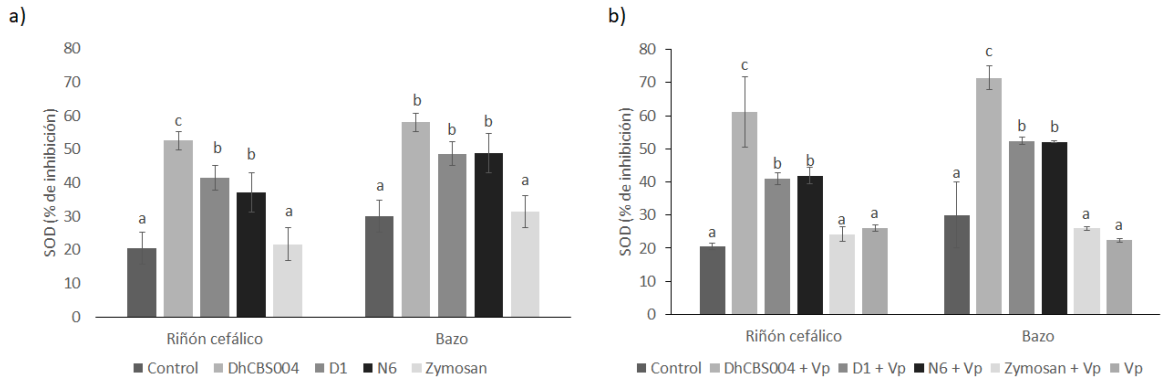


Figura 14. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.6 CAT

La actividad de catalasa no mostró un patrón definido (Fig. 15). La actividad de CAT, aumentó en los leucocitos de bazo estimulados con *D. hansenii* DhCBS004 y Zymosan (Fig. 15a). La actividad de CAT aumentó en los leucocitos, tanto de riñón cefalico como bazo, estimulados con *D. hansenii* DhCBS004 y expuestos a *V. parahaemolyticus* (Vp), así como en los leucocitos solamente (Fig. 15b).

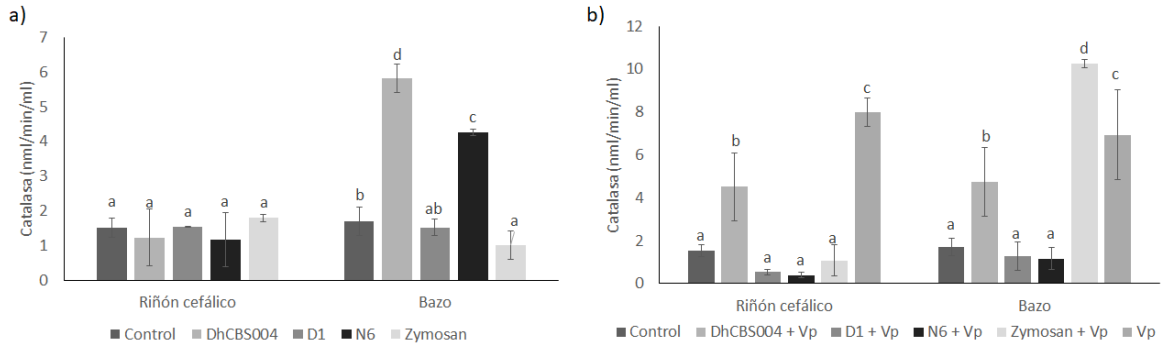


Figura 15. Actividad de catalasa (CAT) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.7 MPO

La actividad de mieloperoxidasa (MPO) incrementó en los leucocitos de riñón cefálico y bazo estimulados con las cepas de levaduras y Zymosan (Fig. 16a). Mientras que en los leucocitos riñón cefálico y bazo estimulados y retados con *V. parahaemolyticus*, la actividad de MPO incremento que estimulados con *D. hansenii* DhCBS004 y Zymosan y expuestos a V. parahaemolyticus (Fig. 16b).

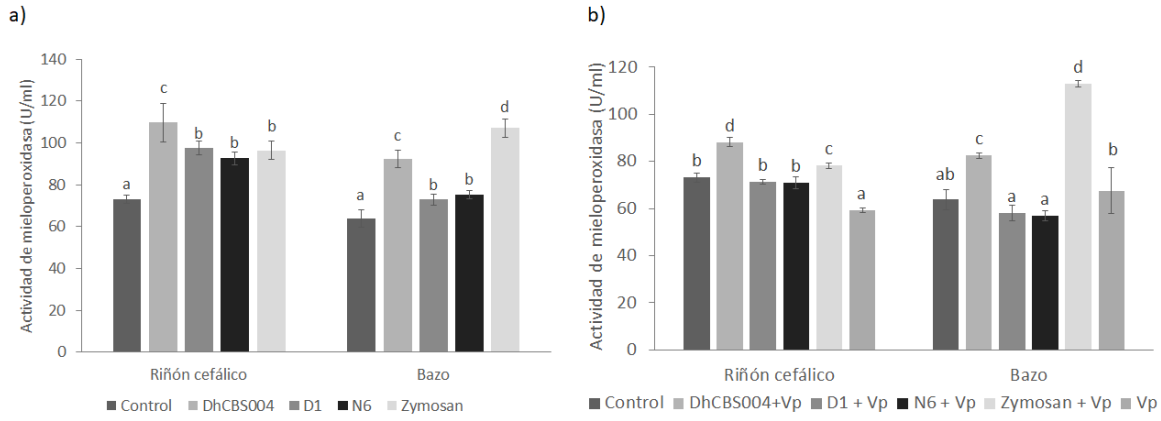


Figura 16. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) de los leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan (a), y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* (b). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.8 Apoptosis

La viabilidad de los leucocitos de riñón cefálico y bazo se evaluó después de ser estimulados y expuestos al reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Se observó un patrón de viabilidad diferente en los leucocitos aislados de riñón cefálico (Fig. 17a) y bazo (Fig. 17b), lo cual podría indicar diferentes susceptibilidades a las infecciones bacterianas. La viabilidad fue mayor en los leucocitos de riñón cefálico estimulados con *Y. lipolytica*, y, por lo tanto, se encontró un menor número de células apoptóticas y necróticas comparados con el control solamente retado con *V. parahaemolyticus* (Fig. 17a). En bazo, se observó una menor viabilidad, similar al control solo retado con *V. parahaemolyticus*, sin embargo, se observaron diferencias en el número de células apoptóticas y necróticas (Fig. 17b).

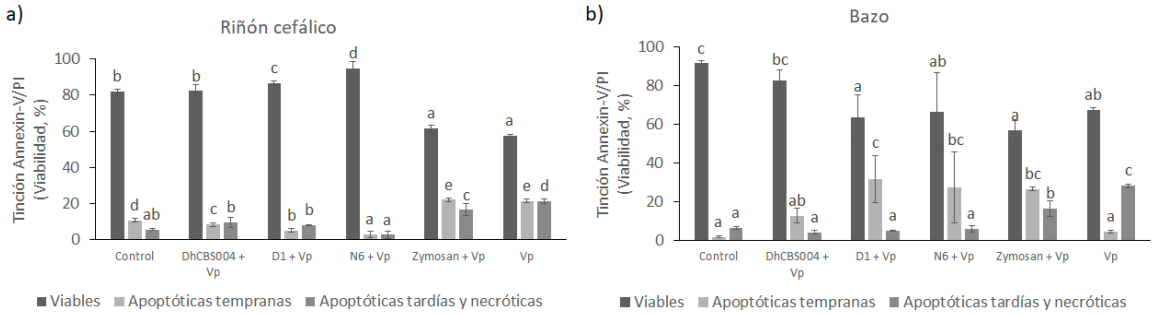


Figura 17. Viabilidad de los de los leucocitos aislados de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan, y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 6). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.3.9 Expresión génica

La expresión de algunos genes relacionados a la respuesta inmune, receptores del reconocimiento de β-glucanos presentes en la pared celular de levaduras, así como genes involucrados en la cascada de señalización de NFATc3 se evaluó por RT-qPCR. Para ello, utilizaron los primers específicos de estos genes y otros genes relacionados (tabla X).

Para el ensayo de caracterización de propiedades inmunoestimulantes de las cepas de levaduras en leucocitos de riñón cefálico y bazo de huachinango se seleccionaron cuatro genes a evaluar: interleucina 1β (IL-1β), como gen relacionado a la respuesta inmune y respuesta inflamatoria; el factor de células T activadas citoplasmático 3 (NFATc3); los factores de unión potenciadores de interleucina 2 (ILF2) y 3 (ILF3), como genes relacionados al reconocimiento de β-glucanos presentes en la pared celular de levaduras, así como genes involucrados en la cascada de señalización de NFATc3.

Tabla X. Primers específicos para PCR en tiempo real.

Gen	Primer	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño (pb)	Producto esperado (pb)	No. de Acceso GenBank
NFATc3	Fw	ACAGCAGACGACCGTTACT	23	155	KY594005.1
	Rv	ATACTGGCTGACATGTTGTTTTC	23		
ILF-2	Fw	ATTGTTGCACCTGGAAACTTTG	22	167	KY594006.1
	Rv	TCCACTACTTTGTTGCCGAGAG	22		
ILF-3	Fw	AAGCCAGGTCTCCAGTACAAAC	22	151	KY594007.1
	Rv	GGAGGACCTTTACAGCTACATG	22		
Calcineurina (CaN)	Fw	ACCGACGGAAATGGAGAAG	19	133	MF347707
	Rv	ATATGTAGCCGTCTTTGTCCATG	23		
IL-1β	Fw	AGCATCCACTGACAATGAAGAG	22	159	AJ277166
	Rv	ATTCAGACACCTCTTGCTCTTC	22		
IL-6	Fw	GCTTTTGAAAATGAATTCCAGG	22	152	MF136719
	Rv	TTGAGAAGAACCGTGTAAGTGAG	23		
IL-8	Fw	CATCAGCAGGGACTACAACAC	21	155	MF136720
	Rv	AAACCTTCTCCCCGCTTG	18		
IL-12β	Fw	ACTGTCATTCTGGAGGAAAAATC	23	157	MF136722
	Rv	GAATCTTCTCCATATTACGTTCGG	24		
TNF-α	Fw	ACCAGAGATGCAGACACAATC	21	184	KY706355.1
	Rv	TTGACCATTCTTCCACTCCAG	21		
CD3	Fw	TCAAGCAAAAAATGGTTCAATAC	23	199	MF347706
	Rv	CACCACATTTCCCATAACTAGC	22		
TCRβ	Fw	AAAAGAAGACAGCAGACATTCC	22	135	MF347708
	Rv	CATATGTGACCTTTTCTCCATCG	23		
NFkBp100	Fw	GTTCCTCAGTTCCTCCTCAGAC	22	160	MK012390
	Rv	GTTCCTCACCTTTTGACACTTG	22		
EF-α	Fw	CTGCAGGACGTCTACAAAATC	21	139	KM669764.1
	Rv	GGTGCATCTCAACAGACTTAAC	22		
GAPDH	Fw	CCAATGTTCAGTATGACTCCACC	23	159	DQ324425.1
	Rv	ACTCGACAACGTACATGGCTC	21		

Los niveles de expresión génica de interleucina 1β (IL-1β) mostraron mayores diferencias comparados con los otros genes analizados (Fig. 18). En los leucocitos de riñón cefálico aumentó la expresión de IL-1β cuando solo fueron estimulados con *Y. lipolytica* N6 y Zymosan; mientras en los leucocitos estimulados y retados con *V. parahaemolyticus* aumentó la expresión de IL-1β cuando fueron estimulados con todas las cepas de levaduras. También,

los leucocitos solo retados con *V. parahaemolyticus* tuvieron un aumento en el nivel de expresión de IL-1β (Fig. 18a).

En los leucocitos de bazo aumentó en la expresión de IL-1β en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* N6 y Zymosan, mientras que en los leucocitos expuestos al reto con *V. parahaemolyticus* se observó un aumento en la expresión de IL-1β en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* (D1 y N6) y los leucocitos solamente expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 18b).

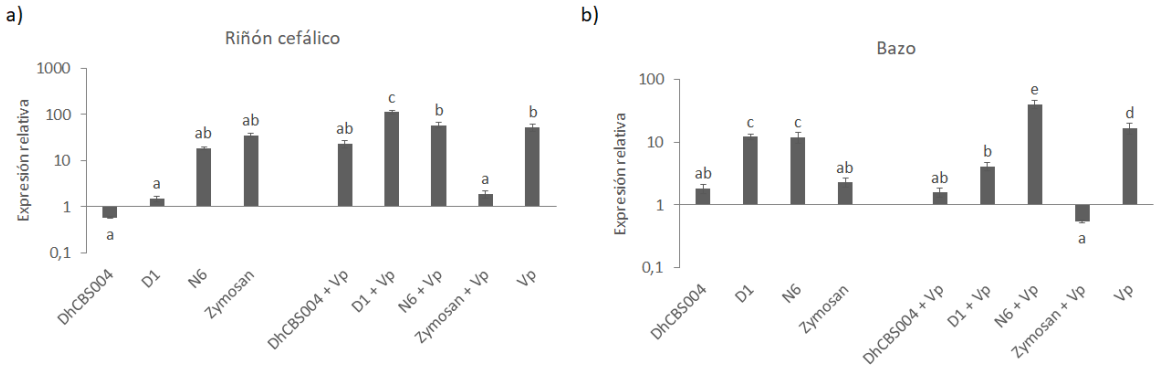


Figura 18. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de IL-1β en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan, y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

La expresión de NFATc3 se evaluó en leucocitos de riñón cefálico y bazo (Fig. 19). En riñón cefálico no se observaron diferencias en los niveles de expresión de NFATc3 de los leucocitos estimulados con las levaduras, sin embargo, la expresión de NFATc3 aumentó en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* N6 y Zymosan. En los leucocitos estimulados y retados, se observaron diferencias significativas (aumento de la expresión de NFATc3) en

los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* D1 y aquellos solamente retados con *V. parahaemolyticus* (Fig. 19a).

En bazo, los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* N6 mostraron diferencias significativas (aumento de la expresión de NFATc3). Sin embargo, en los leucocitos expuestos al reto con *V. parahaemolyticus* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque la expresión de NFATc3 aumentó en los leucocitos estimulados con las dos cepas de *Y. lipolytica* (D1 y N6) y en los leucocitos solamente retados con *V. parahaemolyticus* (Fig. 19b).

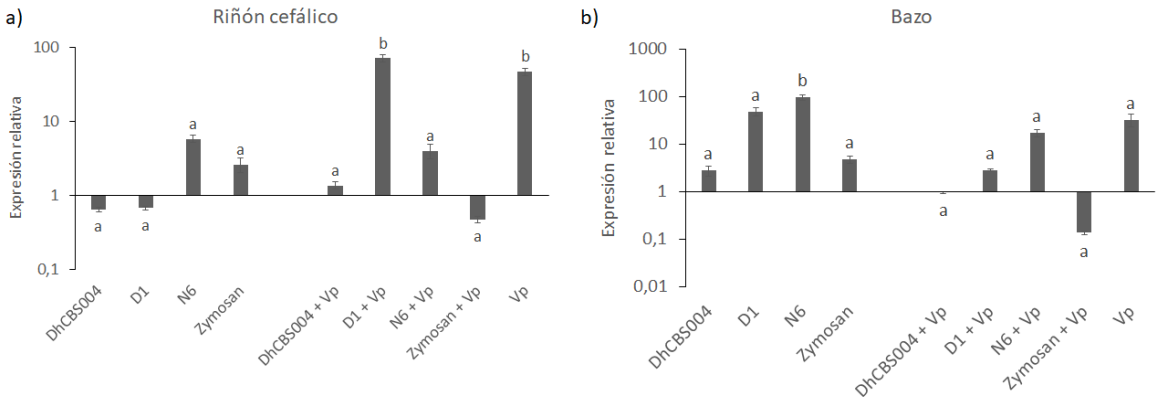


Figura 19. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de NFATc3 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan, y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

La expresión del factor de unión potenciador de interleucina 2 (ILF2) (Fig. 20) aumentó en los leucocitos de riñón cefálico estimulados con *Y. lipolytica* N6 y Zymosan. Sin embargo, en los leucocitos estimulados y expuestos a *V. parahaemolyticus* aumentó la expresión de

ILF2 en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* D1 y aquellos solo expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 20a).

En bazo, la expresión de ILF2 aumentó en los leucocitos estimulados con las tres cepas de levaduras, mientras que en los leucocitos expuestos a *V. parahaemolyticus* aumentó de expresión de ILF2 en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* N6 y los leucocitos solamente expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 20b).

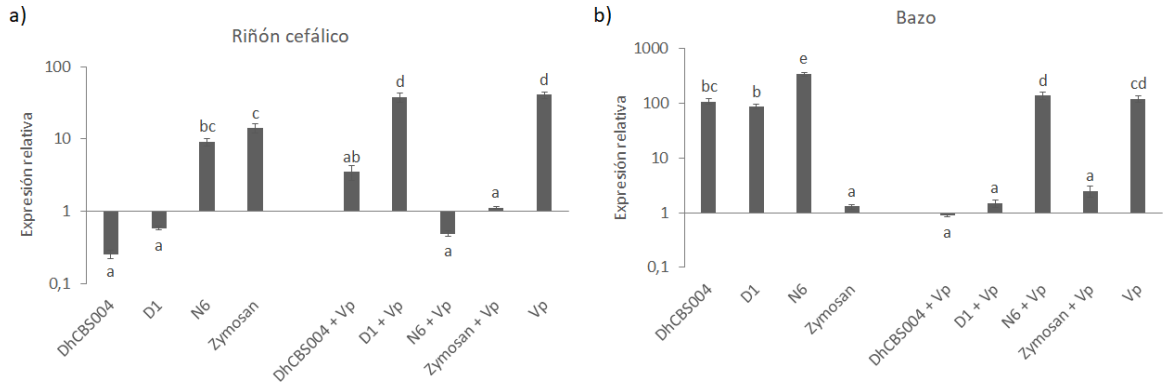


Figura 20. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de ILF2 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan, y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

El factor de unión potenciador de interleucina 3 (ILF3) (Fig. 21) no mostró diferencias en la expresión relativa en los leucocitos de riñón cefálico estimulados con las cepas de levaduras, aunque la expresión de ILF3 aumentó en los leucocitos estimulados con *Y. lipolytica* N6 y Zymosan. En los leucocitos expuestos al reto con *V. parahaemolyticus*, la expresión de ILF3 aumentó en todos los tratamientos excepto en los leucocitos estimulados con Zymosan (Fig. 21a).

En los leucocitos de bazo, la expresión de ILF3 aumentó en los leucocitos estimulados con las cepas de levaduras, mientras que en los leucocitos estimulados y retados con *V.*

parahaemolyticus aumentó la expresión de ILF3 en los leucocitos estimulados con las cepas de *Y. lipolytica* (D1 y N6) y los leucocitos solamente retados con *V. parahaemolyticus* (Fig. 21b).

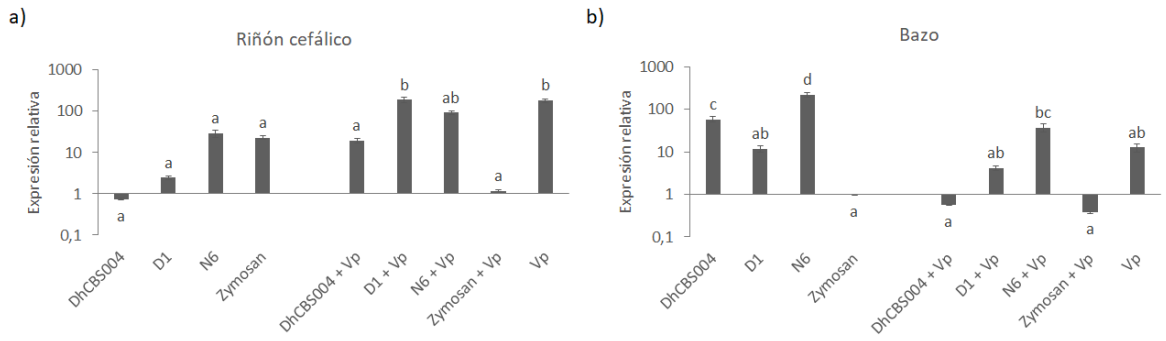


Figura 21. Expresión relativa respecto al control (sin estimular) de ILF3 en leucocitos de riñón cefálico (a) y bazo (b) de huachinango estimulados con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) y Zymosan, y expuestos a un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con las diferentes cepas de levaduras y el patógeno *V. parahaemolyticus* (Vp).

7.4 Evaluación de las levaduras *in vivo*

Se realizaron dos muestreos del experimento *in vivo* con las dietas suplementadas con las levaduras, uno a los 15 días y otro a los 30 días. A partir de este experimento se tomaron muestras de suero, mucus y tejidos para evaluar los parámetros descritos anteriormente.

Los peces utilizados durante el ensayo *in vivo* presentaron una talla inicial de 19.73 ± 1.7 cm, y un peso inicial: 139,16 ± 30.35 g. Durante ambos muestreos, se realizó la medición de talla y peso de los peces alimentados con las diferentes dietas (tabla XI).

Tabla XI. Tallas y pesos de los peces alimentados con las diferentes dietas durante los diferentes muestreos.

	Primer muestreo		Segundo muestreo	
Tratamiento	Talla (cm)	Peso (gr)	Talla (cm)	Peso (gr)
Control	21,70 ± 0,95 [b]	192,50 ± 27,38 [b]	22,75 ± 0,95 [ab]	218,75 ± 40,90 [ab]
D. hansenii DhCBS004	22,25 ± 0,95 [b]	199,75 ± 18,80 [b]	21,75 ± 1,7 [ab]	179,75 ± 33,67 [ab]
Y. lipolytica D1	21,50 ± 0,58 [b]	202,25 ± 15,08 [b]	21,25 ± 0,95 [a]	165,25 ± 15,08 [a]
*Y. lipolytic*a N6	19,25 ± 0,95 [a]	150,00 ± 9,41 [a]	23,75 ± 1,7 [b]	236 ± 48,29 [b]

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 5). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre las diferentes dietas.

Durante el primer muestreo se observaron diferencias significativas tanto en talla y peso en el tratamiento de los peces alimentados con las dietas suplementadas con la levadura *Y. lipolytica* N6. Los peces de este tratamiento presentaron una menor talla y peso respecto al control y los otros tratamientos.

Durante el segundo muestreo ninguno de los tratamientos con los huachinangos alimentados con las diferentes cepas de levaduras presentó diferencias respecto al grupo control alimentado con dieta comercial. Aunque se observaron diferencias entre las dos cepas de *Y. lipolytica.*

7.4.1 Análisis químico proximal de las dietas

Quince gramos de cada dieta se almacenaron y enviaron al Laboratorio de Análisis Químico Proximal para la determinación del porcentaje de humedad, proteína, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas, extracto libre de nitrógeno y aporte energético.

Las dietas experimentales mostraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad, extracto etéreo, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno y aporte energético, a diferencia del porcentaje de proteína, nitrógeno y cenizas que no mostraron diferencias (tabla XII).

El porcentaje de humedad y aporte energético aumentó en las dietas adicionadas con las cepas de levaduras, además aumentó en el porcentaje de fibra cruda en estas dietas. En el caso del

porcentaje del extracto etéreo aumentó de este valor en la dieta adicionada con *Y. lipolytica* D1, mientras que el porcentaje del extracto libre de nitrógeno aumentó significativamente en la dieta adicionada con *D. hansenii* DhCBS004

Tabla XII. Análisis químico proximal de las dietas experimentales.

	Dietas			
	Control	*D. hansenii* DhCBS004	*Y. lipolytica* D1	*Y. lipolytica* N6
Humedad (%)	9,22 ± 0,10 ^{d}	8,18 ± 0,03 ^{c}	5,89 ±0,10 ^{a}	6,96 ± 0,03 ^{b}
Proteína (%)	61,40 ± 0,25	61,14 ± 0,18	61,39 ± 0,15	61,46 ± 0,03
Nitrógeno (%)	9,82 ± 0,04	9,78 ± 0,03	9,82 ± 0,03	9,83 ± 0,01
Extracto Etéreo (%)	13,44 ± 0,05 ^{a}	13,31 ± 0,13 ^{a}	13,66 ± 0,08 ^{b}	13,34 ± 0,10 ^{a}
Fibra Cruda (%)	0,00 ± 0,00 ^{a}	0,17 ± 0,06 ^{b}	0,20 ± 0,01 ^{b}	0,23 ± 0,06 ^{b}
Cenizas (%)	12,22 ± 0,06	12,15 ± 0,02	12,14 ±0,05	12,15 ± 0,02
Extracto libre de Nitrógeno (%)	12,95 ± 0,24 ^{bc}	13,23 ± 0,17 ^{c}	12,61 ± 0,09 ^{a}	12,81 ± 0,10 ^{ab}
Energía (cal/g)	5196,28 ± 2,75 ^{c}	5177,29 ± 2,14 ^{b}	5179,95 ± 1,15 ^{b}	5167,87 ± 0,79 ^{a}

Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre las diferentes dietas.

7.4.1 Parámetros inmunes in vivo

Se realizaron dos muestreos del experimento *in vivo* con las dietas suplementadas con las levaduras, uno a los 15 días y otro a los 30 días. A partir de este experimento se tomaron muestras de suero y mucus, los cuales se utilizaron para determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), mieloperoxidasa (MPO) y la cuantificación de IgM.

7.4.1.1 SOD

La actividad de SOD fue medida según lo descrito anteriormente, tanto suero como mucus presentaron valores de actividad similar durante ambos muestreos (Fig. 22). En suero, la

actividad de SOD fue mayor en las muestras de la dieta control y la dieta adicionada con *Y. lipolytica* D1, tanto en el primer (15 días) como segundo (30 días) muestreo (Fig. 22a).

En general, en mucus se observó una mayor actividad de SOD comparado con suero. En el primer muestreo la actividad de SOD fue mayor en las muestras de los peces alimentados con la dieta control y la dieta adicionada con *Y. lipolytica* D1, mientras que en el segundo muestro la actividad de SOD fue mayor en las muestras de los peces alimentados con la dieta control, la dieta adicionada con *D. hansenii* DhCBS004 y la dieta adicionada con *Y. lipolytica* N6 (Fig. 22b).

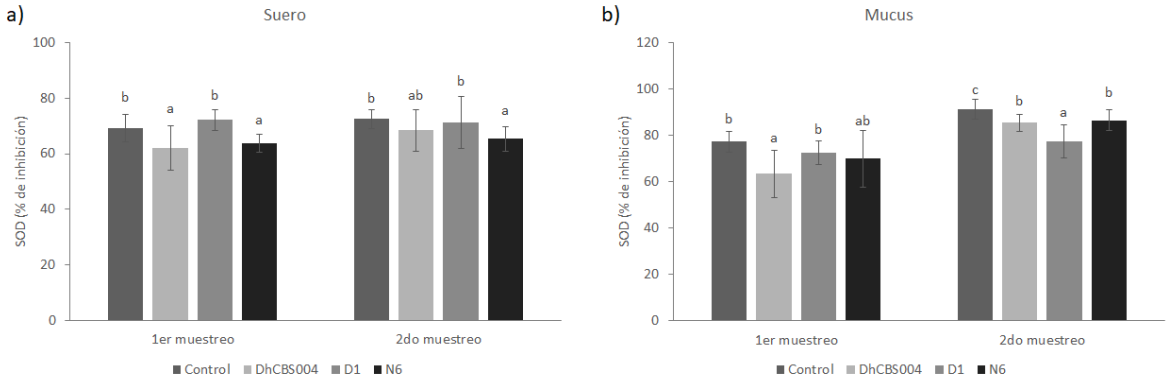


Figura 22. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los huachinangos alimentados con las diferentes dietas.

7.4.1.2 CAT

De manera similar a la actividad de SOD, la actividad de CAT fue mayor en las muestras de mucus comparado con las muestras de suero; además que en ambos casos se observó un incremento de actividad en las muestras del segundo muestreo (30 días) (Fig. 23).

En suero no se observaron diferencias significativas hasta el segundo muestro (30 días), donde las muestras de los peces alimentados con la dieta adicionada con *Y. lipolytica* D1 presentaron los valores más elevados de actividad CAT (Fig. 23a). En mucus, la actividad de CAT disminuyó en las muestras de los peces alimentados con las dietas adicionadas con levaduras comparadas con la dieta control. La acitivdade de CAT aumento en lass muestra de mucus de los peces alimentados con la dieta adicionada con *Y. lipolytica* N6, que presentaron la mayor actividad de CAT durante el segundo muestreo (30 días) (Fig. 23b).

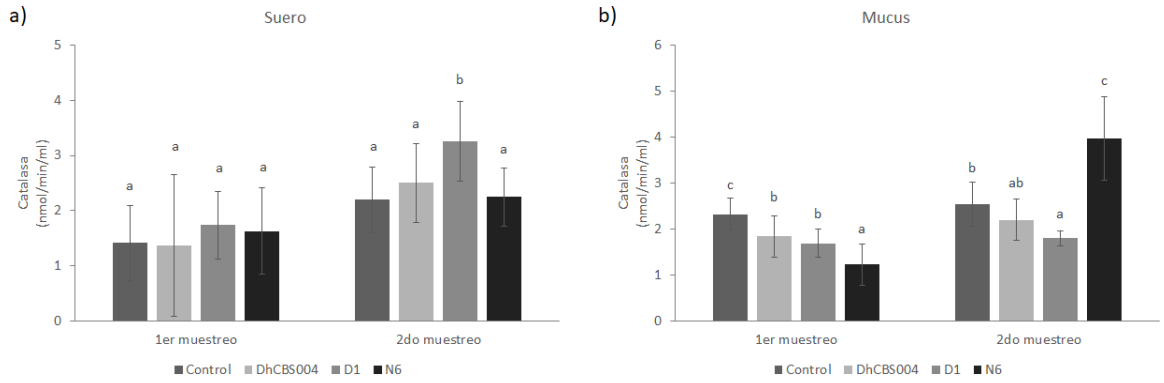


Figura 23. Actividad de catalasa (CAT) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los huachinangos alimentados con las diferentes dietas.

7.4.1.3 MPO

La actividad de MPO fue mayor en las muestras de suero en ambos muestreos comparada con las muestras de mucus (Fig. 24). En ninguno de los dos muestreos se observaron diferencias en la actividad de MPO en las muestras de suero de los diferentes tratamientos (Fig. 24a).

En mucus, la actividad de MPO disminuyó durante el primer muestreo (15 días) en las muestras de los peces alimentados con las dietas adicionadas con las cepas de levaduras, comparadas con la dieta control. Mientras que, en el segundo muestreo, la actividad de MPO

aumentó en las muestras de mucus de los peces alimentados con las dietas adicionadas con *D. hansenii* DhCBS0004 y *Y. lipolytica* N6 (Fig. 24b).

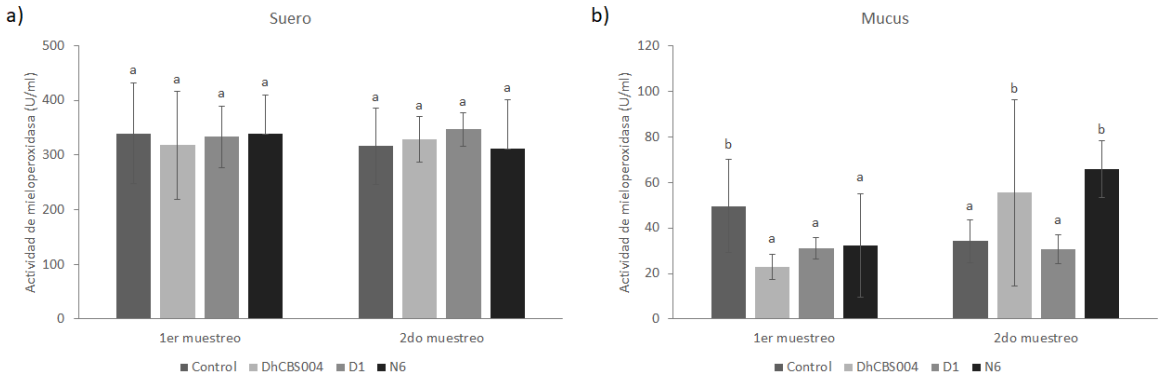


Figura. 24. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N-6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los huachinangos alimentados con las diferentes dietas.

7.4.1.4 IgM

Los niveles de IgM total se midieron en suero y mucus (Fig. 25). En suero, los niveles de IgM aumentaron en las muestras de los peces alimentados con las dietas adicionadas con las levaduras durante el primer muestreo, patrón que se repitió en el segundo muestreo (Fig. 25a).

En mucus, los niveles de IgM aumentaron en las muestras de los peces alimentados con las dietas adicionadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo. Sin embargo, durante el segunto muestro no hubo diferencias en los nieveles de IgM en las muestras de los diferentes tratamientos (Fig. 25b).

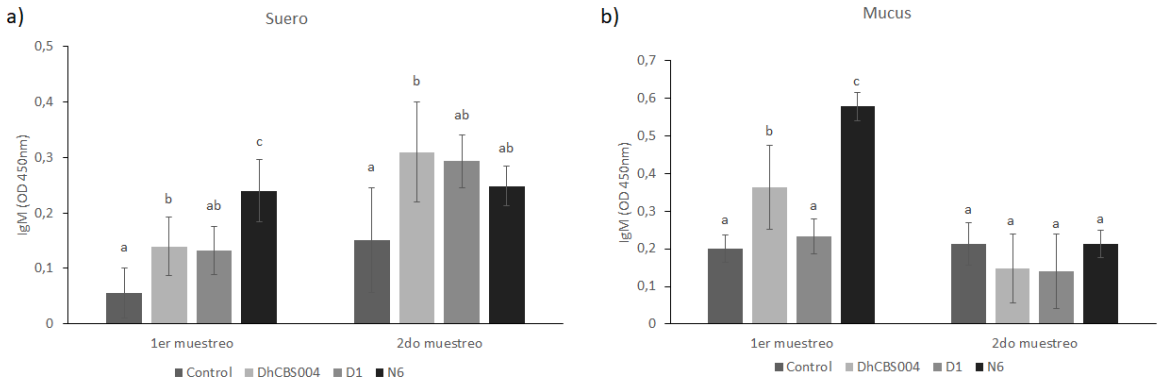


Figura 25. Niveles de IgM en suero (a) y mucus (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los huachinangos alimentados con las diferentes dietas.

7.4.1.5 Histología

Se examinaron los cortes de bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas (Fig. 26). No se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos, tanto en el primer muestreo (Fig. 26A) como segundo muestreo (Fig. 26B). En todos los cortes histológicos pudieron identificarse melanocitos y centros melanomacrófagos, además de distinguir entre la pulpa blanca y pulpa roja.

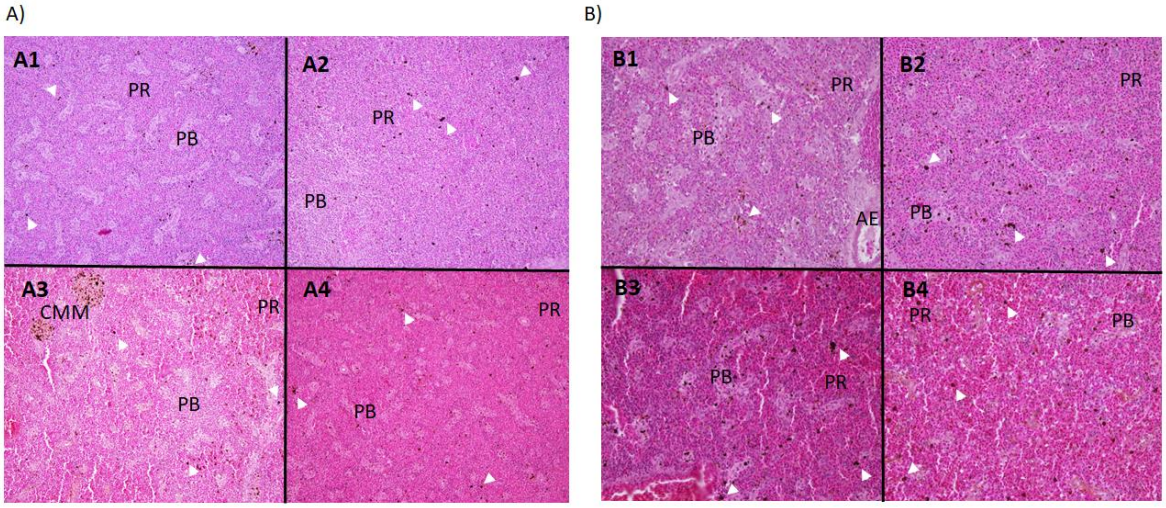


Figura 26. Cortes transversales de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras en el primer (A, 15 días) y segundo muestreo (B, 30 días). Las dietas utilizadas fueron dieta control (1), *D. hansenii* DhCBS004 (2), *Y. lipolytica* D1 (3), y *Y. lipolytica* N6 (4). Aumento 40X. PB: Pulpa blanca, PR: Pulpa roja, CMM: Centro de melanomacrófagos, AE: Arteria esplénica, Punta de flecha blanca: Melanocitos.

En los cortes de intestino se observaron diferencias entre el tratamiento de *Y. lipolytica* D1 (27-A3) entre los demás tratamientos (27-A1, A2, A4) durante el primer muestreo, sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos durante el segundo muestreo (Fig. 27-B). En los cortes pudieron identificarse las estructuras típicas como la mucosa, submucosa, musculo, lumen y microvellosidades. También se observaron las células productoras de mucus, células Globet, así como leucocitos infiltrados en el tejido.

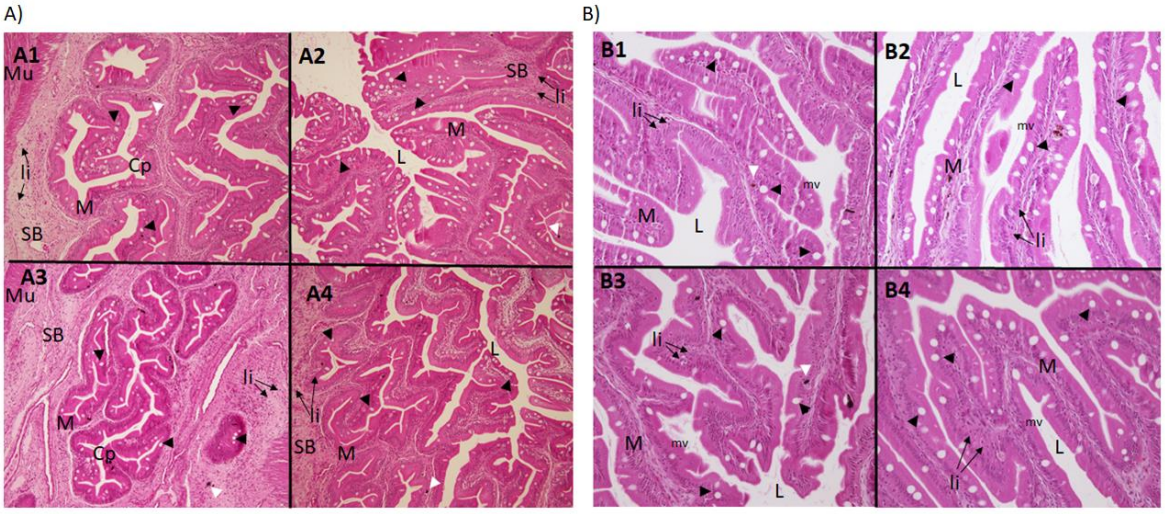


Figura 27. Cortes transversales de intestino de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras en el primer (A, 15 días) y segundo muestreo (B, 30 días). Las dietas utilizadas fueron dieta control (1), *D. hansenii* DhCBS004 (2), *Y. lipolytica* D1 (3), y *Y. lipolytica* N6 (4). Aumento 40X. L: Lumen, M: Mucosa, Mu: Musculo, SM: Submucosa, mv: microvellosidades, li: leucocitos infiltrados, Puntas de flechas negras: Células Globet, Puntas de flecha blancas: Melanocitos.

7.4.1.6 Expresión génica

La expresión basal de NFATc3 de huachinango fue evaluada en diferentes tejidos para determinar el patrón de expresión de este factor de expresión. Además, la expresión de NFATc3 y diferentes genes relacionados a su cascada de señalización fueron evaluados en bazo e intestino de los huachinangos alimentados con las diferentes dietas.

La expresión a nivel basal nos indicó una mayor expresión de NFATc3 en intestino, principalmente, seguido de estómago, bazo e hígado, siendo músculo el tejido donde se observó la menor expresión (Fig. 28).

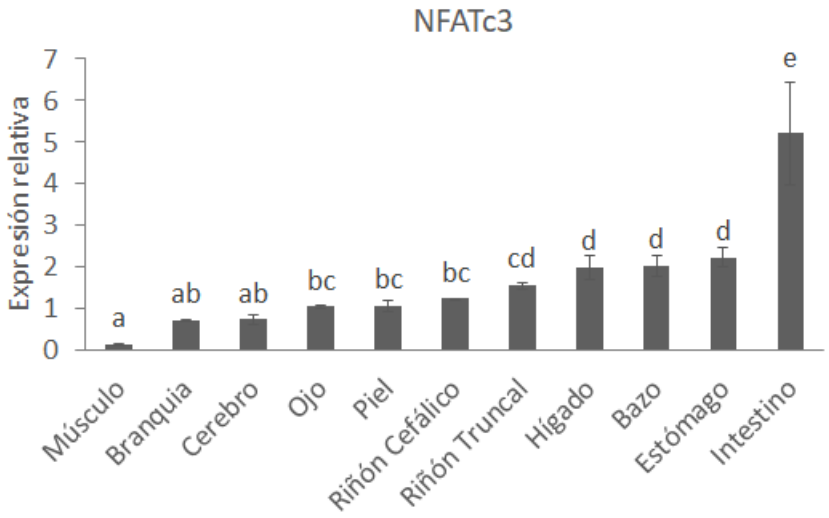


Figura 28. Expresión basal de NFATc3 de huachinango en distintos tejidos respecto a la expresión del gen endógeno EF-1α. Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los diferentes tejidos.

La expresión de NFATc3 no mostró diferencias significativas bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas, tanto en el primer como segundo muestreo. La expresión de NFATc3 en bazo de los peces alimentados con las dietas adicionadas con levaduras disminuyó respecto los peces alimentados con la dieta control en el segundo muestreo (30 días) (Fig. 29a). En intestino, la expresión de NFATc3 aumentó en los epces alimentados con la dieta adicionada con *Y. lipolytica* N6 en el primer muestreo (15 días). Durante el segundo muestreo (30 días), la expresión de NFATc3 aumentó en intestino de los peces alimentados con la dieta adicionada con *Y. lipolytica* D1(Fig. 29b).

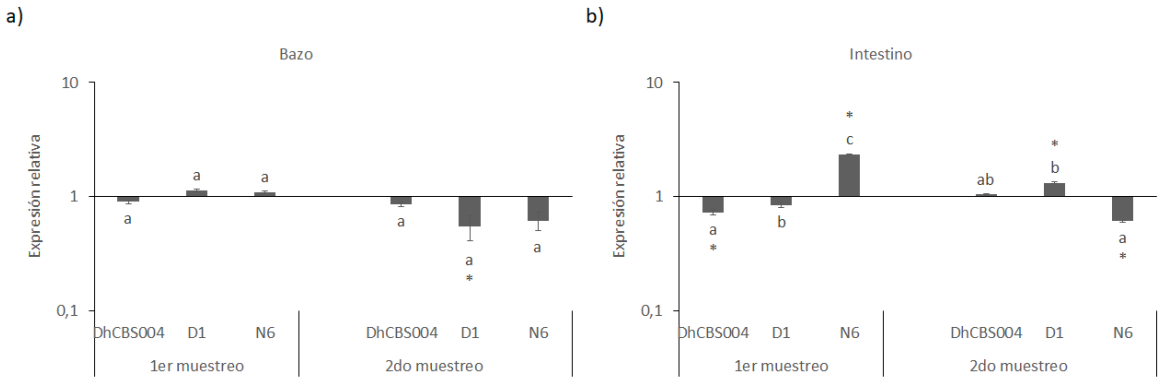


Figura 29. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de NFATc3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del factor de unión potenciador de interleucina 2 (ILF2) no mostró diferencias significativas en bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas, tanto en el primer como segundo muestre. Sin embargo, se repitió el patrón descrito en la expresión de NFATc3, donde la expresión de ILF2 disminuyó en el segundo muestreo en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras (Fig. 30a).

En intestino, la expresión de ILF2 aumento en los peces alimentados con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo (15 días). La expresión de ILF2 aumentó en intestino de los peces alimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* D1 durante el segundo muestreo (30 días) (Fig. 30b).

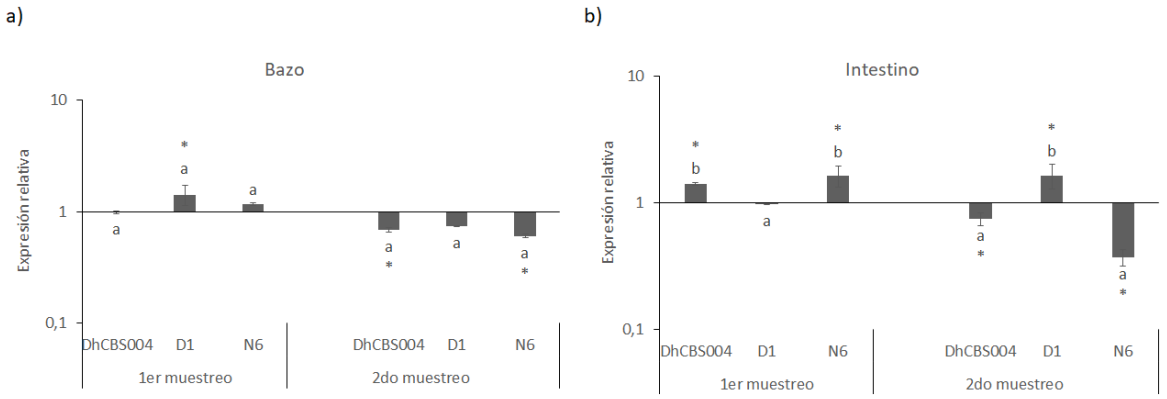


Figura 30. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de ILF2 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N-6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del factor de unión potenciador de interleucina 3 (ILF3) no mostró diferencias significativas en bazo durante el primer muestro (15 días). La expresión de ILF3 disminuto en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras comparado con los peces alimentados con la dieta control. En el segundo muestreo (30 días), la expresión de ILF3 aumentó en bazo de los peces alimentados conla dieta suplementada con *D. hansenii* DhCBS004 respecto a los epces alimentados con la dieta control y suplementada con *Y. lipoytica* (Fig. 31a).

En intestino, la expresión de ILF3 disminuyo en los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras durante el primer muestreon (15 días), mientras que en el segundo muestro la expresión de ILF3 aumento en los peces alimentaso con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 (Fig. 31b).

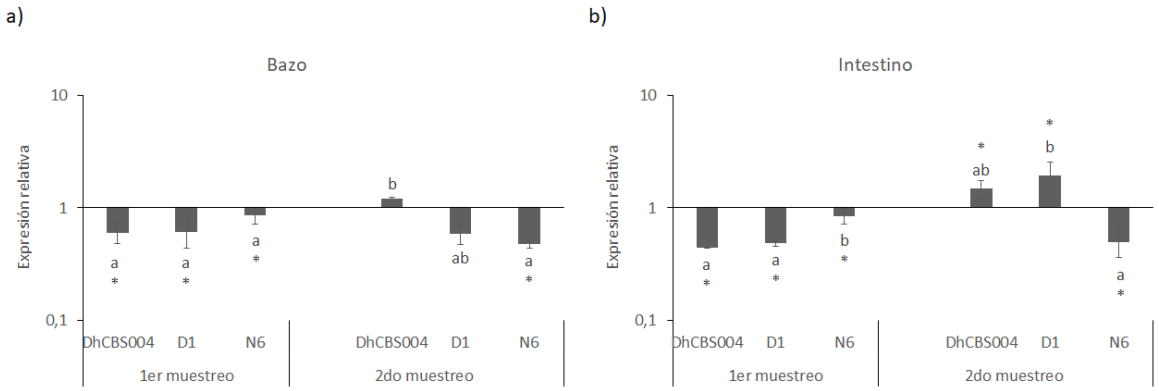


Figura 31. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de ILF3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del factor nuclear kappa beta (NF-κβ) aumentó en bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo, sin embargo, durante el segundo muestreo no se observaron diferencias significativas en la expresión de NF-κβ en bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas (Fig. 32a).

En intestino, la expresión de NF-κβ disminuyo en los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras en el primer muestreo. En el segundo muestreo, la expresión de NF-κβ aumento en los peces alimentados con las dietas cuplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 (Fig. 32b).

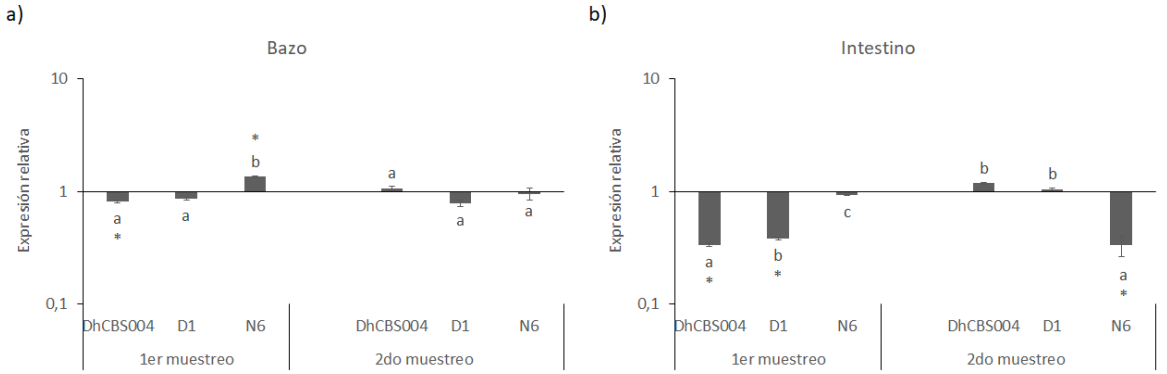


Figura 32. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de NF-κβ en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión de calcineurina (CaN) mostró diferencias significativas en bazo durante el primer muestreo. La expresión de CaN aumentó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1. Sin embargo, durante el segundo muestreo no se observaron diferencias significativas en la expresión de CaN en bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas (Fig. 33a).

En intestino se observaron diferencias significativas en el primer muestreo, donde hubo un ligero aumento de la expresión de CaN en los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Y. lipolytica* N6. En el segundo muestreo, la expresión de CaN aumento en los peces alimentados con las dietass suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 (Fig. 33b).

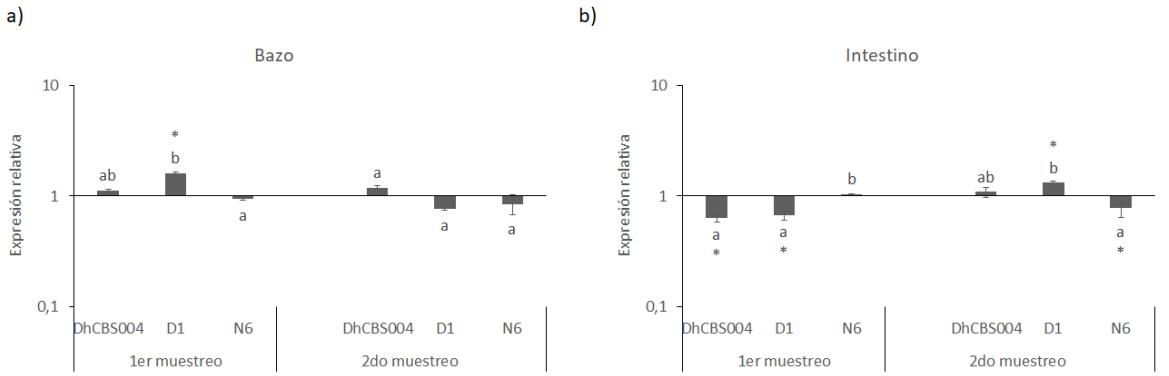


Figura 33. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de CaN en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión de interleucina 1β (IL-1β) mostró un aumento de la expresión en bazo de los peces alimentados con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 durante el primer muestreo. Mientras que, en el segundo muestreo, la expresión de IL-1β aumentó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes levaduras, siendo mayor en los peces aimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* N6 (Fig. 34a).

En intestino se observó el mismo patrón que en bazo, donde la expresión de IL-1β aumentó en los peces alimentasso con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* en el primer muestreo, y aumentó de la expresión de IL-1β en los peces alimentados con la dieta suplementadad con *Y. lipolytica* N6 en el segundo muestreo (Fig. 34b).

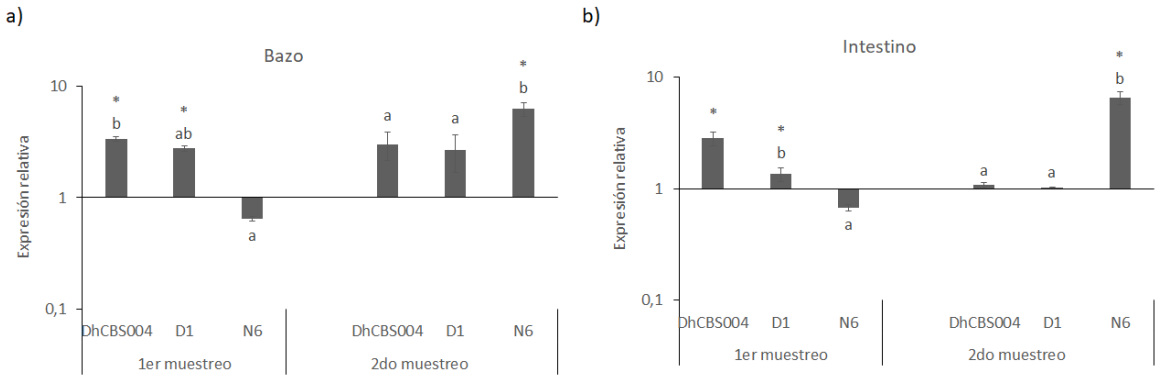


Figura 34. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-1β en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión de interleucina 6 (IL-6) disminuyó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo. Sin embargo, la expresión de IL-1β aumentó significativamente en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras respecto a la dieta control (Fig. 35a).

En intestino, la expresión de IL-1β aumento en los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *D. hansenii* DhCBS004 durante el primer muestreo. La expresión de IL-1β aumento en los peces alimentados con las dietas suplementads con las diferentes levaduras durante e segundo muestreo, siendo mayor en los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Y. lipolytica* N6 (Fig. 35b).

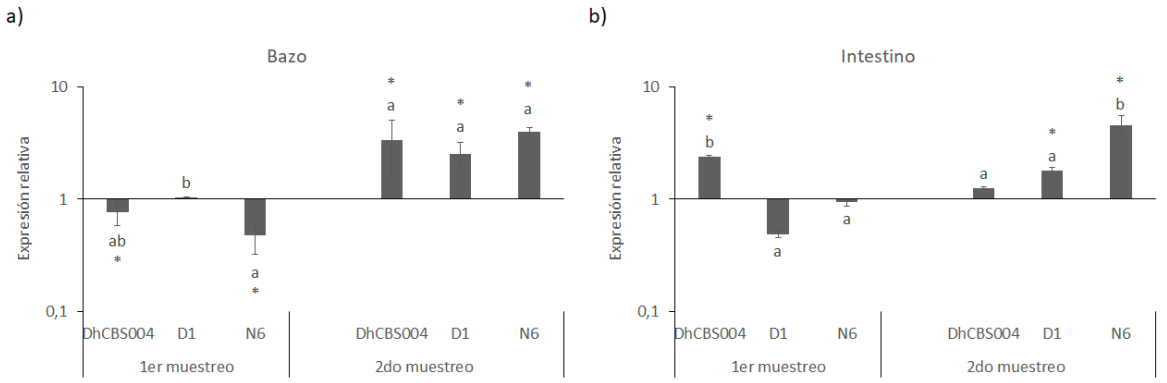


Figura 35. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-6 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión de interleucina 8 (IL-8) aumentó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *Y. lipolyti*ca (D1 y N6) durante el preimer muestreo. La expresión de IL-8 aumentó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes levaduras, siendo los peces alimentados con la dieta supllementada con la levadura *Y. lipolytica* N6 los que mostraron un mayor aumento en la expresión de IL-18 (Fig. 36a).

En intestino, la expresión de IL-8 aumento en los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *D. hansenii* DhCBS004 durante el primer muestre, mientras que la expresión de IL-8 disminuyó en los peces alimentados con las dietas suplementadass con *Y. lipolytica* (D1 y N6). En el segundo muestreo, la expresión de IL-8 aumento en intestino los peces alimentados con las diferentes dietas suplementadas on las levaduras, siendo mayor en aquellos alimentados con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 (Fig. 36b).

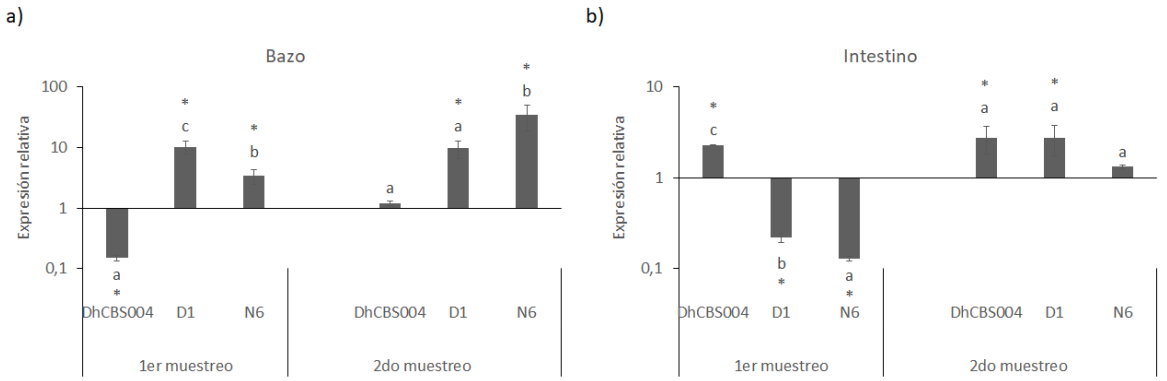


Figura 36. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-8 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión de interleucina 12 (IL-12) disminuyó en bazo de los peces alimentaso con las dietas suplementadas con las diferentes levaduras durante el primer muestreo. Sin embargo, la expresión de IL-12 aumentó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 (Fig. 37a).

En intestino, la expresión de IL-12 disminuyó en los peces alimentados con las dietass suplementadas con las levaduras respecto al control en ambos muestreos. La expresión de IL-12 en bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo fue la única excepción, donde la expresión de IL-12 aumentó ligeramente respecto al control (Fig. 37b).

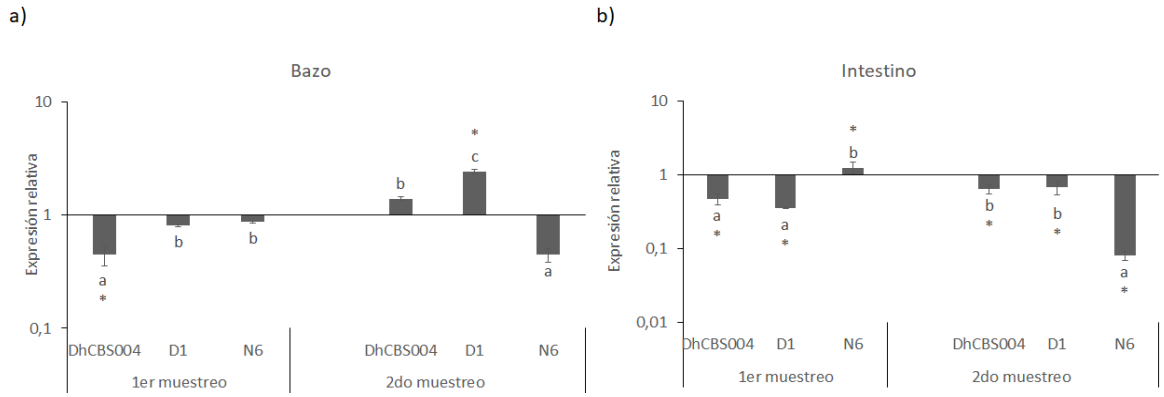


Figura 37. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de IL-12 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) disminuyó en bazo de los peces alimentados con la dieta suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1y aumentó ligereramente en bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* N6, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los peces alimentados con las diferentes dietas. Durante el segundo muestreo, la expresión de TNF-α disminuyó en bazo de los peces alimentados con dietas suplementadas con las diferentes levaduras (Fig. 38a).

En intestino, la expresión de TNF-α disminuyó en los peces alimentados con las diferentes dietas durante el primer muestreo. La expresión de TNF-α aumentó en intestino de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 durante el segundo muestreo (Fig. 38b)

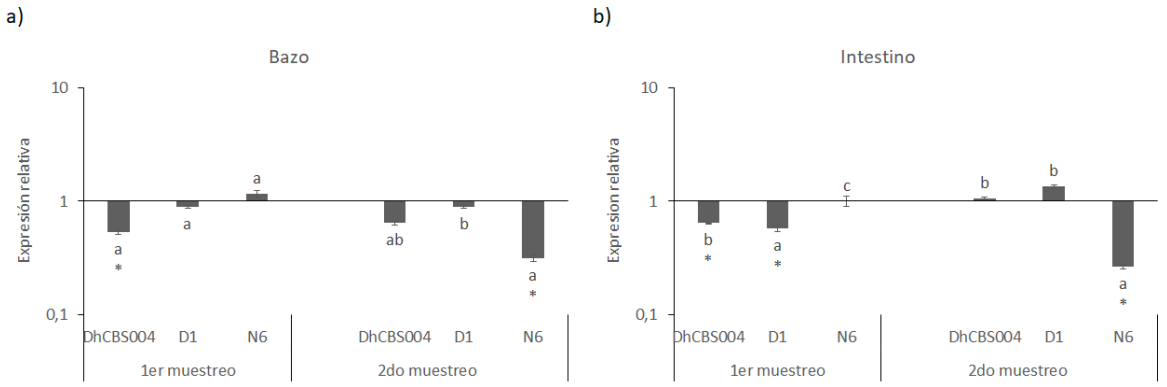


Figura 38. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de TNF-α en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del receptor de células T subunidad β (TCR-β) aumentó enbazo de os peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Y. lipolytica* N6, sin embargo, durante el segundo muestreo a expresión de TCR-β disminuyó en bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes levaduras (Fig. 39a).

En intestino, la expresión de TCR-β no tuvo diferencias entre los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes dietas, tanto en el primer como en el segundo muestreo (Fig. 39b).

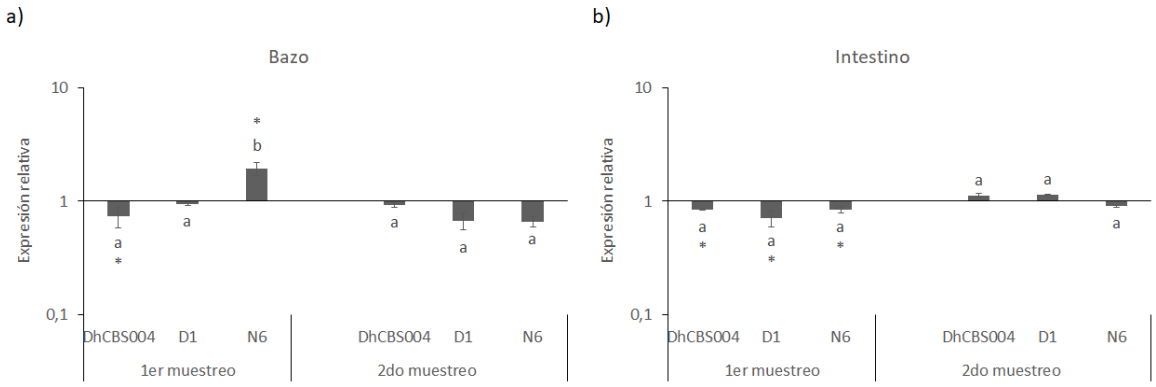


Figura 39. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de TCRβ en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

La expresión del gen CD3 aumentó en bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Y. lipolytica* (D1 y N6) durante el primer muestreo. Sin embargo, la expresión de CD3 disminuyó durante el segundo muestreo y no hubo diferencias entre los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes levaduras (Fig. 40a).

En intestino, la expresión de CD3 amento en los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* y *Y lipolytica* N6 durante el primer muestreo, mientras que en el segundo muestreo solamente hubo un aumento en la expresión de CD3 en intestino de los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *D. hansenii* DhCBS004 (Fig. 40b).

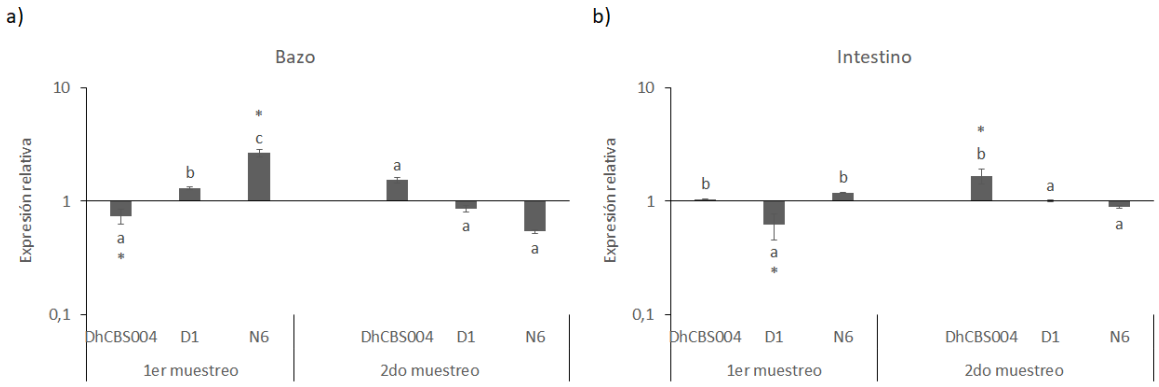


Figura 40. Expresión relativa respecto al control (dieta comercial) de CD3 en bazo (a) e intestino (b) de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (15 días) y segundo muestreo (30 días). Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p<0.05$).

7.4.2 Reto bacteriano *in vitro*

A partir de los leucocitos de bazo aislados de los peces alimentados con las diferentes dietas (Control, *D. hansenii* DhCBS004, *Y. lipolytica* D1 y N6) en los diferentes muestreos, se realizó una infección *in vitro* con *V. parahaemolyticus*. Después de 24h de incubación, se midió la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), mieloperoxidasa (MPO) y producción de óxido nítrico (NO) de los leucocitos de bazo de los peces de las diferentes dietas expuestos a *V. parahaemolyticus*.

7.4.2.1 SOD

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) durante el primer muestreo no mostró diferencias entre los leucocitos aislados de bazo de los peces alimentados con la dieta control y los peces alimentados con la dieta suplementada con la levadura *Y. lipolytica* D1, mientras que la actividad de SOD disminuyó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* N6. La actividad de de

SOD aumentó en los leucocitos de bazo aislados de los peces alimentados con Y: lipolytica N6 y expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 41a).

En el segundo muestreo, la actividad de SOD disminuyó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las diferentes levadutas, mientras que en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas y expuestos a *V. parahaemolyticus* no se observaron diferencias significativas (Fig. 41b).

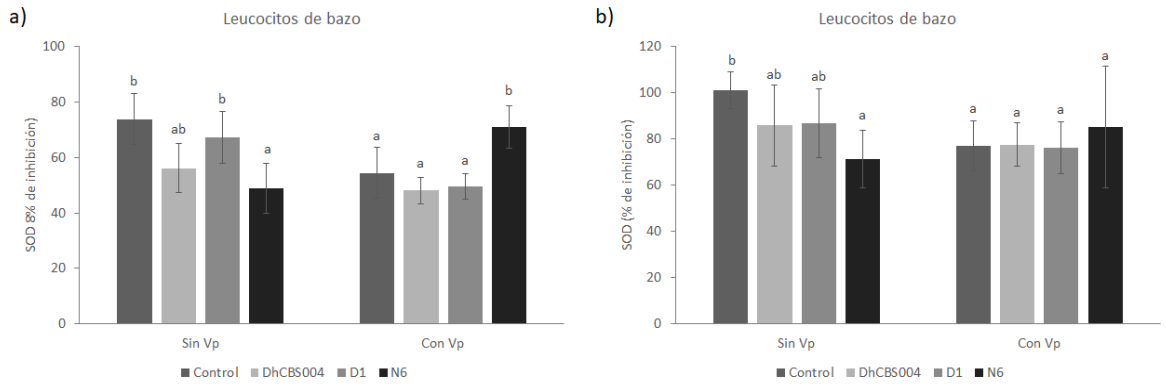


Figura 41. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (a, 15 días) y segundo muestreo (b, 30 días) y expuestos a un reto con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

7.4.2.2 CAT

La actividad de catalasa (CAT) aumento en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii* DhCBS004, mientras que en los lecocitos expuestos a *V. parahaemolyticus* la actividad de CAT disminuyo en los leucocitos auslados de bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *Y. lipolytica* N6 (Fig. 42a).

En el segundo muestreo, la actividad de CAT aumento respecto al primer muestreo. La actividad de CAT aumentó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas

suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* N6 respecto a los peces alimentados con la dieta control. En los leucocitos expuestos a *V. parahaemolyticus* no hubo diferencias de los leucocitos aislados de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras respecto a los peces alimentados con la dieta control (Fig. 42b).

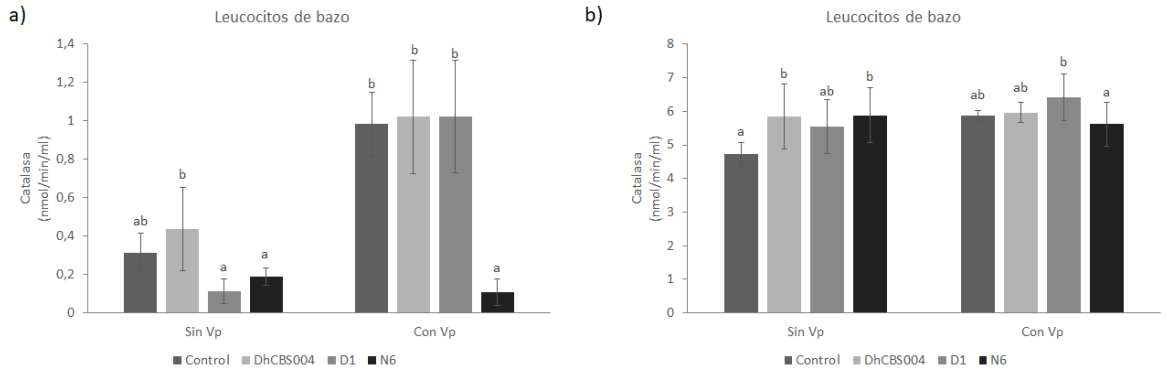


Figura 42. Actividad de catalasa (CAT) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (a, 15 días) y segundo muestreo (b, 30 días) y expuestos a un reto con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

7.4.2.3 MPO

La actividad de mieloperoxidasa (MPO) aumentó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1, tanto en los leucocitos expuestos como no expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 43a).

En el segundo muestreo, la actividad de MPO aumento en los leucocitos de bazo los peces aliemntados con las diferentes dietas. La actividad de MPO disminuyo en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas expuestos a *V. parahaemolyticus*, donde los leucocitos de bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii* DhCBS004 tuvo la mayor actividad de MPO (Fig. 43b).

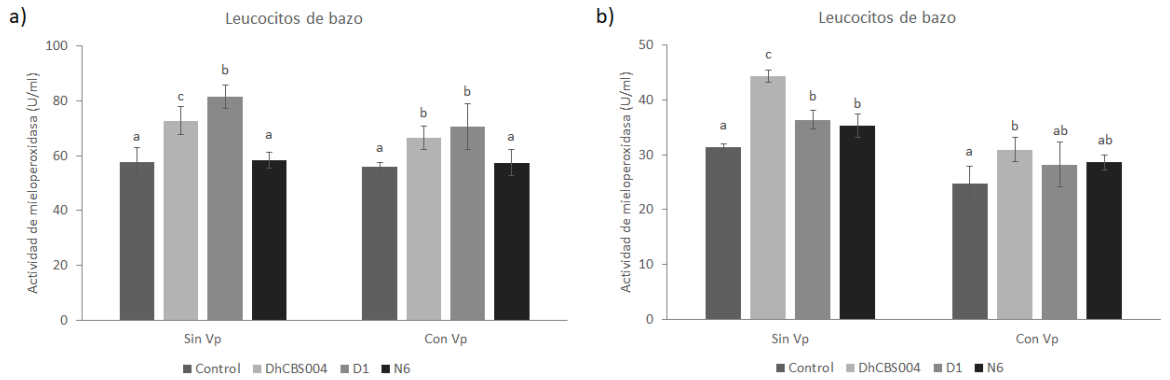


Figura 43. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (a, 15 días) y segundo muestreo (b, 30 días) y expuestos a un reto con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

7.4.2.4 NO

La producción de óxido nítrico (ON) no mostró diferencias significativas en los leucocitos de bazo aislados de los peces alimentados con las diferentes dietas en el primer muestreo, sin embargo, si hubo un aumento en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras. La producción de óxido nítrico no mostró diferencias en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las diferentes dietas y expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 44a).

En el segundo muestreo, la producción de óxido nítrico aumentó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con la dieta suplementada con *D. hansenii* DhCBS004. La producción de óxido nítrico aumentó en los leucocitos de bazo de los peces alimentados con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 y expuestos a *V. parahaemolyticus* (Fig. 44b).

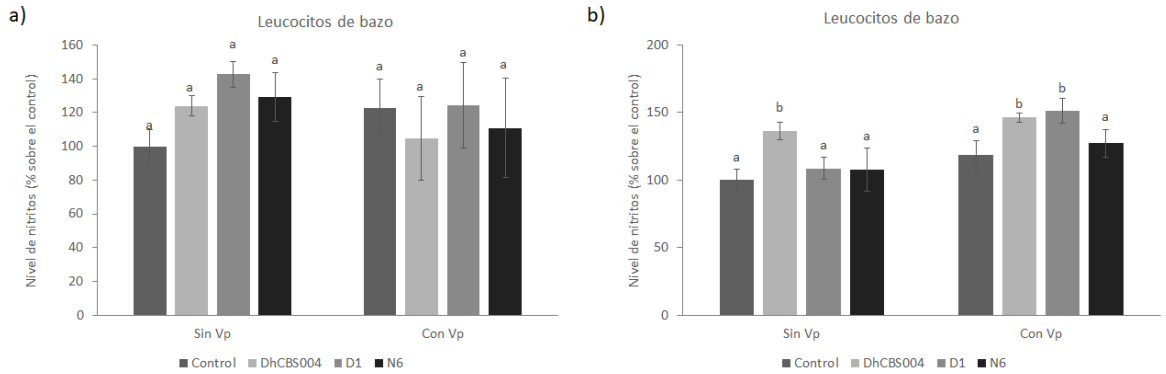


Figura 44. Producción de óxido nítrico (ON) de los leucocitos aislados de bazo de huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras (*Debaryomyces hansenii* DhCBS004, *Yarrowia lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6) en el primer (a, 15 días) y segundo muestreo (b, 30 días) y expuestos a un reto con *V. parahaemolyticus.* Los datos corresponden a la media ± desviación estándar (n= 3). Las letras indican diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

7. 5 Caracterización *in silico* de NFAT

El análisis de homología de la secuencia de nucleótidos mediante BLASTx mostró altos porcentajes de identidad y similitud con otras secuencias de NFAT citoplasmático 3 (NFATc3) reportadas, especialmente de peces (arriba del 60%). Este análisis, identificó el posible marco de lectura (+2), el cual fue utilizado para la predicción de la secuencia de aminoácidos (Fig. 45).

La secuencia de NFATc3 de huachinango (GenBank: KY594005.1) consistió de 4210 pares de bases (pb), con 429 pb en la región no traducida en el extremo 5’ (UTR-5’), 478 pb en el extremo 3’(UTR-3’), y un marco de lectura de 3300 pb que codifica para una proteína de 1100 aminoácidos (aa) (GenBank: ARN61497.1), con punto isoeléctrico (pI) de 6.45 y un peso molecular estimado de 118.2kDa.

El alineamiento múltiple y análisis de la estructura de NFATc3 de huachinango (LpNFATc3) reveló que su estructura proteica es similar a otras proteínas pertenecientes a la familia de NFAT (Fig. 46). LpNFATc3 presenta las cuatro regiones estructurales características: una región de transactivación (TAD-N) en el amino terminal (N-terminal), una región de regulación, una región de unión a ADN, y una región en el carboxilo terminal (C-terminal).

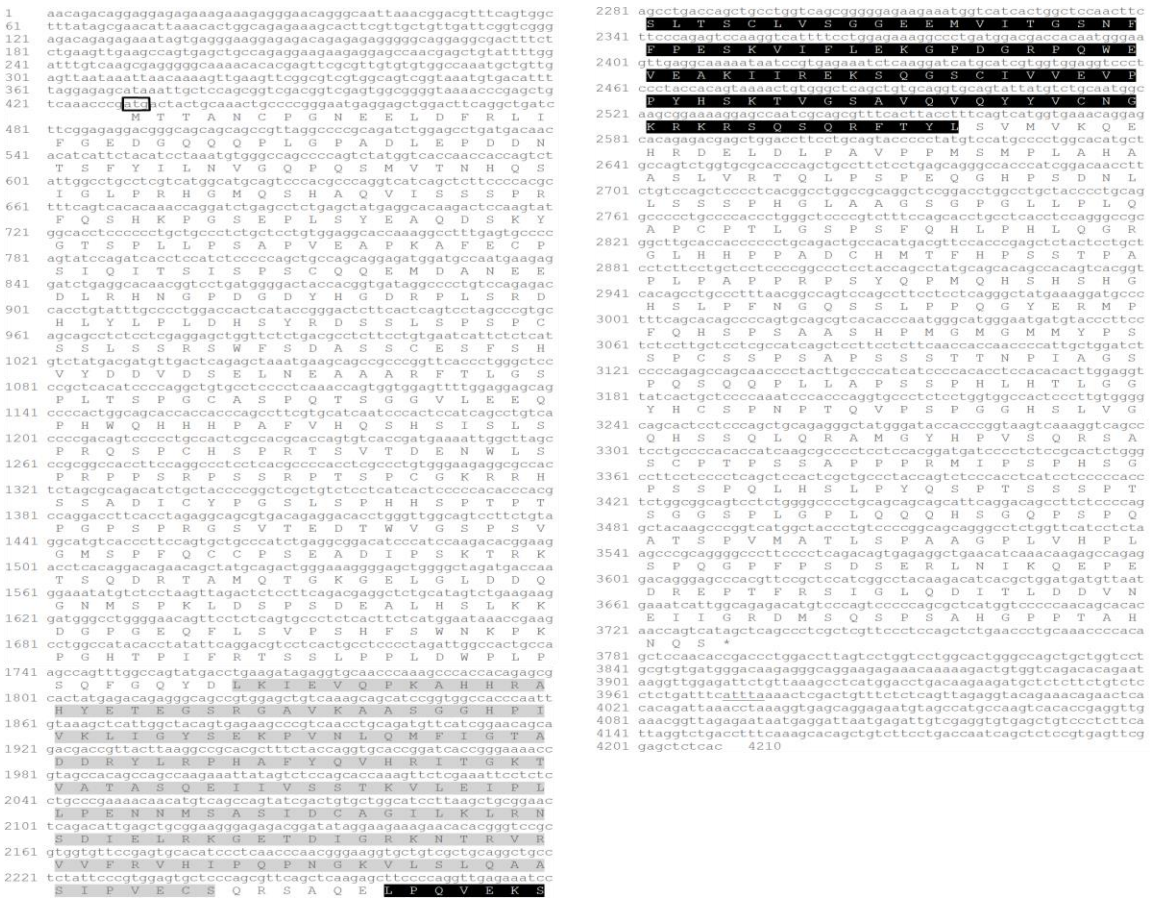


Figura 45. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de NFATc3 de *Lutjanus peru.* El codón de inicio (cuadro) y codón de paro (asterisco) se encuentran indicados. Los dominios de unión a DNA e IPT se encuentran marcados con gris y negro, respectivamente. El motivo asociado a inestabilidad del ARNm (ATTTA) se encuentra subrayado en el extremo UTR-3'.

Las regiones de regulación y unión a ADN fueron analizadas mediante alineamientos múltiples y utilizando el servidor SMART para determinar los motivos y dominios típicos de la familia de NFAT.

El alineamiento múltiple mostró que la región de regulación exhibe los motivos característicos: la región consenso de unión a calcineurina (CaN) (PXIXIT), la región consenso rica en serina (SRR) (YR[D/E]XXXSPSXSSXSSXSXXS[D/E]), la región

consenso rica en serina y prolina (SP-1, 2, 3) (SPXXSPXXSPXXXXX[D/E][D/E]), y la región de localización nuclear (NLS) (RXXXXRXSXXKRRXS); los cuales son importantes unión de calcineurina y la translocación citoplasma/núcleo.

El análisis de la secuencia usando el servidor SMART mostró que la región de unión a ADN presenta un dominio homólogo Rel (RHD) de unión a ADN y un dominio de transcripción inmunoglobulina-plexina (IPT), involucrados en la unión a ADN, dimerización y activación transcripcional. Además, el servidor de SMART detectó múltiples regiones de baja complexidad, fragmentos con baja diversidad en su secuencia aminoacídica.

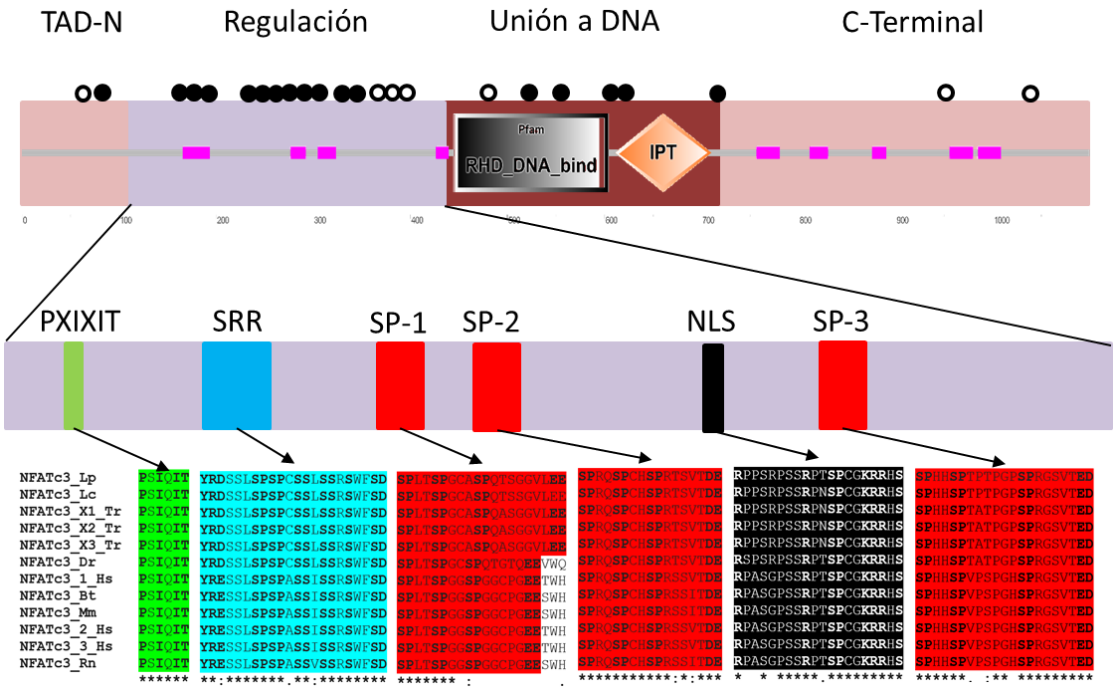


Figura 46. Alineamiento múltiple y estructura de LpNFATc3. Las regiones estructurales características de NFAT se encuentran señaladas: región TAD-N, regulación, unión a ADN y C-terminal. Los posibles sitios de fosforilación están indicados con círculos, donde los círculos oscuros representan los sitios altamente conservados. Los dominios involucrados en la unión a ADN se encuentran indicados con un recuadro negro y rombo naranja, y las regiones de baja complejidad en rosa. Los motivos de la región regulatoria se encuentran señaladas en verde (PXIXIT), azul (SPP), rojo (SP-1, 2, 3) y negro (NLS). Los símbolos debajo del alineamiento indican residuos conservados (*), residuos con grupos similares (:), y residuos con baja similitud. Las secuencias utilizadas para este análisis fueron: Lp (*Lutjanus peru*), Lc (*Larimichthys crocea*), Tr (*Takifugu rubripes*), Dr (*Danio rerio*), Hs (*Homo sapiens*), Bt (*Bos taurus*), Mm (*Mus musculus*), y Rn (*Rattus norvegicus*).

Adicionalmente, el análisis mediante el servidor de PROSITE indicó la presencia de veinticuatro posibles sitios de fosforilación, diecisiete de los cuales fueron altamente conservados en otras secuencias reportadas.

El análisis de homología mediante BLASTp mostró altos porcentajes de similitud (>88%) e identidad (>76%) con otras secuencias reportadas de peces, y alta similitud (>97%) pero baja identidad (59-60%) con secuencias de mamífero (tabla XIII). La secuencia de LpNFATc3 presentó mayor similitud (100%) e identidad (96%) con la secuencia de NFATc3 de corvina amarilla (*Larimichthys crocea*). Por otro lado, el análisis filogenético mostró una separación entre las secuencias de NFATc3 de mamíferos y las secuencias de peces. La secuencia de LpNFATc3 se agrupó con la secuencia de NFATc3 de corvina (*Larimichthys crocea*), y las isoformas de NFATc3 del fugu (*Takifugu rubripes*), secuencias con las que se observó un mayor porcentaje de identidad (>76%) en el análisis de homología (Fig. 47).

Tabla XIII. Análisis de homología de LpNFATc3 con otras secuencias de NFATc3 reportadas.

	NFATc3 *Lutjanus peru*		**No. de acceso**
Especies	**Similitud (%)**	**Identidad (%)**	
NFATc3 *Larimichthys crocea*	100%	96%	KKF12597.1
NFATc3 isoform X1 *Takifugu rubripes*	98%	88%	XP_003969569.1
NFATc3 isoform X2 *Takifugu rubripes*	97%	88%	XP_011607961.1
NFATc3 isoform X3 *Takifugu rubripes*	88%	87%	XP_011607962.1
NFATc3 *Danio rerio*	100%	76%	XP_690273.3
NFATc3 isoform 1 *Homo sapiens*	99%	59%	NP_775188.1
NFATc3 *Bos taurus*	99%	59%	NP_001179760.1
NFATc3 Mus musculus	98%	60%	NP_035031.2
NFATc3 isoform 2 *Homo sapiens*	99%	59%	NP_004546.1
NFATc3 isoform 3 *Homo sapiens*	97%	59%	NP_775186.1
NFATc3 *Rattus norvegicus*	97%	59%	NP_001101917.1

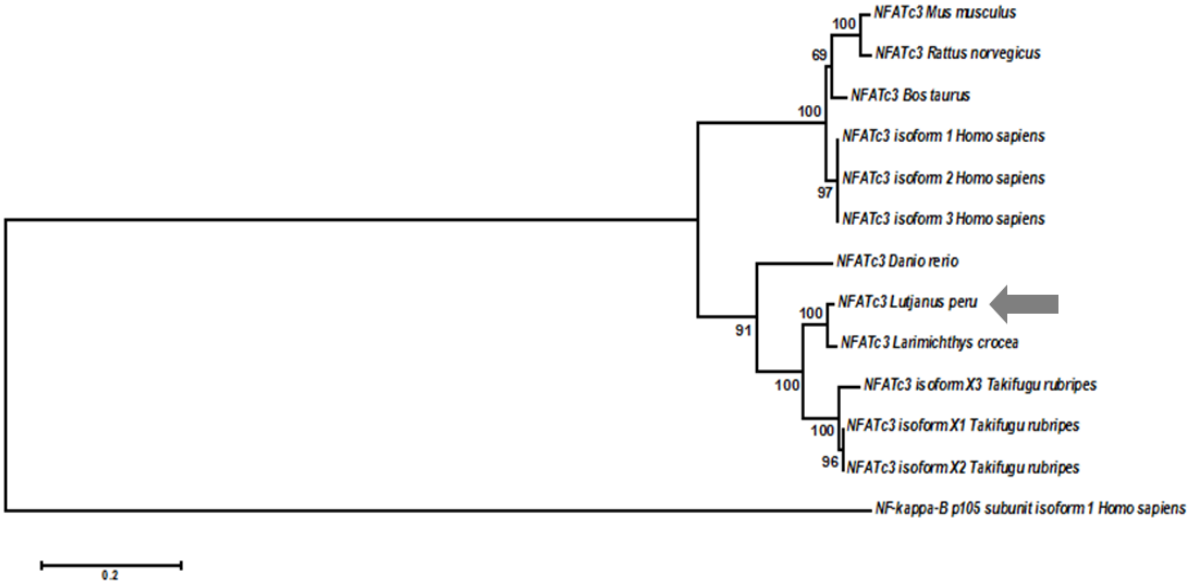


Figura 47. Árbol filogenético de LpNFATc3. El análisis está basado en el alineamiento de la secuencia aminoacídica completa utilizando el programa MEGA 6.0, utilizando el método de *Neighbor-Joining* con un valor de corte de 50% y 10,000 repeticiones. La distancia genética fue calculada con las diferencias proteicas (distancia-p). La secuencia de LpNFATc3 se encuentra señalada con una flecha, y la secuencia de NF-κβ subunidad 105 fue utilizada como grupo externo.

8. DISCUSIÓN

Yarrowia lipolytica es una levadura del orden *Saccharomycetales* cuyo análisis genómico indica un lejano parentesco con *Saccharomyces cerevisiae* (Bankar *et al.*, 2009). Esta levadura es de interés biotecnológico por acumular una gran cantidad de lípidos y otros compuestos de interés, por ser capaz de sobrevivir en ambientes extremos, por su fácil manipulación genética y por estar considerada como segura para consumo humano (Bankar *et al.*, 2009; Butinar *et al.*, 2005; Çelik y Çalık, 2012). Además, algunas cepas de esta especie de levadura han sido propuestas como inmunoestimulantes y probióticos en diferentes organismos, entre ellos peces (Caruffo *et al.*, 2015; Czech *et al.*, 2014; Hatlen *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2014).

En este estudio se utilizaron dos aislados de levaduras, posteriormente identificadas como las cepas *Y. lipolytica* D1 y *Y. lipolytica* N6. Estas cepas fueron aisladas de la salinera de Guerrero Negro en Baja California Sur (Exportadora de Sal, S.A. de C.V.); específicamente en sedimentos del área de bombeo donde la concentración de sal es de aproximadamente 4%. En otros reportes se ha observado la alta adaptabilidad de *Y. lipolytica* a salinidad, llegándose a aislar en las salinas Eilat en Israel donde la salinidad se encuentra en un rango de entre 10-25% NaCl (Andreishcheva *et al.*, 1999; Butinar *et al.*, 2005).

Las cepas utilizadas en este estudio mostraron un alto porcentaje de similitud (arriba del 98%) con otras cepas de *Y. lipolytica* reportadas. Además, el análisis filogenético mostró una separación entre ambos aislados, donde *Y. lipolytica* D1 se agrupó con *Y. lipolytica* aislado 7B3 y *Yarrowia sp.* D30L. Sin embargo, ambos aislados fueron solamente identificados más no reportados en ninguna publicación científica. Mientras que *Y. lipolytica* N6 se agrupó con los aislados *Y. lipolytica* cepa NRRL YB-423, *Y. lipolytica* cepa N11b y la cepa comercial *Y. lipolytica* ATCC 9773®. Ésta última cepa es utilizada como cepa control en diversos estudios como la producción de lipasas (Arteau *et al.*, 2010; Pliego *et al.*, 2015).

Las cepas de *Y. lipolytica* (D1 y N6), además de la cepa de *D. hansenii* DhCBS004 como control, fueron utilizadas para realizar las evaluaciones *in vitro* de sus posibles propiedades

probióticas e inmunoestimulantes antes de proceder a un bioensayo *in vivo*. De manera inicial, se evaluó el potencial probiótico, midiendo la resistencia a salinidad, bajos pHs, la presencia de bilis y la capacidad de adhesión a intestino de peces. Ambos aislados de *Y. lipolytica* mostraron una alta resistencia a salinidad, una propiedad que ha sido reportada en otras cepas de esta especie que han mostrado ser tolerantes a altas salinidades (Andreishcheva *et al.*, 1999; Butinar *et al.*, 2005). Sin embargo, la tasa de crecimiento de las levaduras disminuyó a medida que la concentración de cloruro de sodio aumentaba. Este efecto ha sido documentado en otras especies de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, que disminuyen su tasa de crecimiento debido al estrés salino y osmótico (Abdel y Moghaz, 2010; Yale y Bohnert, 2001). Las cepas de *Y. lipolytica* D1 y N6 mostraron una baja resistencia a pHs bajos y una alta resistencia a la presencia de bilis, a diferencia de *D. hansenii* DhCBS004. En otros trabajos se han reportado tanto altas como bajas resistencias, por lo que no existe un consenso en la tolerancia a estas condiciones de esta especie, sin embargo, se acepta que las cepas de levaduras probióticas pueden presentar una o varias de las características de tolerancia analizadas (Adouard *et al.*, 2015; Kumura *et al.*, 2004). Finalmente, la capacidad de adhesión de la levadura se evaluó en segmentos de intestino de huachinango observándose que ambos aislados tienen la capacidad de adherirse. Sin embargo, este análisis fue meramente cualitativo, por lo que haría falta realizar algún análisis cuantitativo para conocer su capacidad de adhesión y colonización. Kumura *et al.* (2004) realizó una evaluación de potenciales probióticos con diferentes cepas de levaduras, entre ellas cuatro cepas de *Y. lipolytica*. Curiosamente, en esa evaluación se realizó un ensayo de adhesión utilizando la línea celular Caco-2, donde las cepas de *Y. lipolytica* mostraron una baja adhesión.

Los resultados de las propiedades probióticas de las cepas de *Y. lipolytica* D1 y N6, mostraron patrones similares a otras cepas de levaduras aisladas de ambientes marinos evaluadas anteriormente (Reyes-Becerril *et al.*, 2008a; 2008b; 2012a). Posteriormente, se evaluó el potencial estimulante utilizando leucocitos aislados de riñón cefálico y bazo de huachinango, los cuales fueron expuestos a las cepas de levaduras y realizando una infección *in vitro* con *V. parahaemolyticus*. Se determinó la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* en los cultivos *in vitro* de leucocitos, así como la habilidad fagocítica, actividad de explosión

respiratoria, superóxido dismutasa, catalasa, mieloperoxidasa, producción de óxido nítrico y la viabilidad de los leucocitos. La carga bacteriana disminuyó en los leucocitos previamente expuestos a las cepas de levaduras, tanto en los leucocitos de riñón cefálico como bazo. Otros estudios han demostrado que microorganismos probióticos, como levaduras, tiene la capacidad de reducir la carga patogénica (Angulo *et al.*, 2017; Villamil *et al.*, 2003).

La habilidad fagocítica determina la capacidad de los leucocitos para fagocitar, uno de los mecanismos de respuesta inmunológica más importantes y que se encuentra relacionada al reconocimiento específico de patrones moleculares, como los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras (Goodridge *et al.*, 2012; Herre *et al.*, 2004). En este estudio, la habilidad fagocítica de los leucocitos de riñón tuvo un mayor incremento comparado con la habilidad fagocítica con los leucocitos de bazo. Haugland *et al.* (2012) evaluó la fagocitosis y explosión respiratoria en lumpo (*Cyclopteus lumpus*), mostrando que los leucocitos de riñón cefálico presentan un mayor porcentaje de células fagocíticas, seguido por los leucocitos de sangre periférica y bazo.

De igual manera la explosión respiratoria que asociada al alto consumo de oxígeno durante el proceso de fagocitosis (Babior, 2000; Forman y Torres, 2002). Se evaluó en los leucocitos aislados. La actividad de explosión respiratoria incrementó en leucocitos de riñón cefálico y de bazo expuestos a las cepas de levaduras. Sin embargo, la actividad de explosión respiratoria disminuyó en los leucocitos expuestos a *V. parahaemolyticus*, lo cual puede deberse a un mecanismo de supervivencia de este patógeno. Se ha observado que otras especies de *Vibrio*, como *V. anguillarum* evade el sistema inmune mediante la inhibición de la explosión respiratoria en lubina (*Dicentrarchus labrax*) y trucha arcoíris (*Oncorynchus mykiss*) (Boesen *et al.*, 2001; Sepulcre *et al.*, 2007).

La producción óxido nítrico, de manera general, incrementó en los leucocitos de riñón cefálico y de bazo, tanto los estimulados como los estimulados y expuestos a *V. parahaemolyticus.* Arumugam *et al.* (2000) demostró que la presencia de laminarina, un β-glucano aislado de algas, y la levadura *S. cerevisiae* aumentan la producción de óxido nítrico en hemocitos del mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*).

La actividad de superóxido dismutasa mostró un incremento en los leucocitos de riñón cefálico y de bazo estimulados con las cepas de levaduras, tanto en los leucocitos expuestos y no expuestos a *V. parahaemolyticus*. En trabajos de donde se utilizó *D. hansenii* como probiótico en peces se ha demostrado que la presencia de la levadura aumenta la actividad de superóxido dismutasa (Reyes-Becerril *et al.*, 2008a; 2008b; 2011).

La actividad de mieloperoxidasa incrementó en los leucocitos de riñón cefálico y de bazo, principalmente por la estimulación con *D. hansenii* CBS004 y Zymosan. Rodríguez *et al.* (2003) describió un incremento en la producción de peroxidasa en leucocitos de dorada (*Sparus aurata*) en respuesta a la estimulación de con la levadura *S. cerevisiae*. En otro estudio, Palić *et al.* (2006) reportó que β-glucanos aumentan la actividad de la mieloperoxidasa en una especie de carpa (*Pimephales promelas*).

La actividad de catalasa no mostró un patrón definido, sin embargo, se observó un aumento significativo de la actividad en los leucocitos solamente expuestos a *V. parahaemolyticus*. Wang *et al.* (2013) sugiere que catalasa puede jugar un rol en la respuesta inmune contra *Vibrio parahaemolyticus* en almeja (*Meretrix meretrix*) y podría sugerirse que también juega un rol en los leucocitos del huachinango retados con *V. parahaemolyticus*.

La viabilidad de los leucocitos estimulados y posteriormente expuestos a *V. parahaemolyticus* se evaluó mediante citometría de flujo utilizando una tinción doble con Anexina-V y Yoduro de propidio (PI). Anexina-V se une principalmente a fosfatidilserina, un fosfolípido presente en la parte interna de la membrana celular y es externalizada en procesos apoptóticos (Henry *et al.*, 2013). Mientras que PI se intercala en los ácidos nucleicos de las células que presentan daño en su membrana plasmática (apoptóticas tardías-necróticas) (Holville y Martin, 2016; Rieger *et al.*, 2011). En los leucocitos de riñón cefálico se observó una viabilidad similar o ligeramente superior entre el tratamiento control sin *V. parahaemolyticus* y los leucocitos estimulados con las levaduras y expuestos al patógeno, además de una disminución en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas comparadas con el control solo expuesto a *V. parahaemolyticus*. En los leucocitos de bazo se observó una menor viabilidad debido a la exposición con el patógeno y un mayor porcentaje de células

apoptóticas. Estos resultados pueden correlacionarse con los resultados obtenidos en carga bacteriana, donde se observó una mayor carga bacteriana en los leucocitos de bazo comparado a los leucocitos de riñón cefálico. Estas diferencias en la carga bacteriana y viabilidad pueden deberse a diferencias en las poblaciones celulares y susceptibilidad en los diferentes tejidos asociados a respuesta inmune (Haugland *et al.*, 2012; Reyes-Becerril, *et al.*, 2016).

Considerando los mecanismos de iniciación de la respuesta inmune, como resultado del reconocimiento de los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras, y la subsecuente cascada de señalización, se evaluó la expresión génica de NFATc3 y genes relacionados a dicha vía (ILF2, ILF3 e IL-1β). De manera general, se observó un aumento en la expresión de estos genes, los cuales presentaron patrones de expresión muy similares. Se ha observado que la estimulación con levaduras o β-glucanos purificados puede desencadenar la activación de NFAT y la subsecuente producción de diversas interleucinas, así como el reclutamiento y activación de diversas células del sistema inmune, principalmente células T (Fric *et al.*, 2012; Goodrindge *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 2015).

Todos los parámetros evaluados *in vitro* nos dieron una idea del potencial probiótico e inmunoestimulante de las los aislados de *Y. lipolytica*, así como el posible papel del factor de transcripción NFAT en la modulación de la respuesta inmune, por lo que procedió a realizarse una evaluación *in vivo* añadiendo las cepas de levaduras en la dieta de juveniles de huachinango.

Las dietas fueron elaboradas en base a alimento comercial, el cual fue molido y posteriormente reconstituido obteniéndose cuatro dietas experimentales: dieta control, dieta con *D. hansenii* DhCBS004, dieta con *Y. lipolytica* D1, y dieta con *Y. lipolytica* N6. Previo al ensayo, las dietas fueron enviadas al Laboratorio de Análisis Químico Proximal en CIBNOR La Paz, donde se evaluó la composición química de los ingredientes principales. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de humedad, extracto etéreo (grasa cruda), fibra cruda, extracto libre de nitrógeno (carbohidratos digeribles, vitaminas, compuestos orgánicos solubles no nitrogenados) y aporte energético (Olvera *et al.*, 2003). Se

observaron diferencias significativas especialmente en el porcentaje de humedad y aporte energético, donde las dietas adicionadas con las cepas de levaduras presentaron una disminución en estos valores, sin embargo, el porcentaje de fibra cruda el cual fue mayor en estas dietas. La disminución de humedad y aporte energético puede deberse a la presencia de las cepas de levaduras vivas presentes en el alimento, así mismo, el aumento de porcentaje de fibra puede ser asociado al contenido de polisacáridos complejos como lo son los β-glucanos (Abdel-Tawwab *et al.,* 2008; Giavasis, 2014; Hoseinifar *et al.,* 2011)

Para la evaluación *in vivo*, los juveniles de huachinango fueron alimentados con 2% de peso vivo de la dieta correspondiente a cada grupo por 4 semanas, realizándose dos muestreos (un muestreo cada dos semanas), donde se tomaron muestras de suero y mucus para determinar parámetros inmunes y los tejidos (bazo e intestino) para evaluar la expresión de genes y análisis histológicos.

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) en suero tuvo el mismo patrón de actividad en ambos muestreos (a los 15 y 30 días) con valores similares. Mientras que en mucus se observó un ligero aumento en la actividad de SOD durante el segundo muestreo (30 días). De manera general, se observó que una disminución en la actividad de SOD en los peces alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras. SOD es una enzima antioxidante importante regular los niveles del anión superóxido, además de tener un papel importante en los procesos de inflamación relacionados a la activación de células fagocíticas (Marikovsky *et al.,* 2003). En diversos trabajos con probióticos se ha observado que los niveles de actividad de esta enzima se mantienen constantes o aumentan respecto al control (Lee *et al.,* 2017 Park *et al.,* 2016; Reyes-Becerril *et al*., 2008a; 2008b, 2017;). Lin *et al.* (2017) observó una disminución en la actividad de SOD en barramundi (*Lates calcarifer*) alimentados con dietas probióticas, sugiriendo que los niveles de SOD habían disminuido debido a que los niveles del anión superóxido estaban regulados. En otros trabajos se ha observado la disminución de la actividad de SOD durante los primeros días de administración de los probióticos (7-14 días) y un posterior aumento (28 días) (Chiu *et al.,* 2010). Liu *et al.* (2012) sugiere que la actividad de SOD puede estar relacionada a la cepa, dosis y duración de la

administración, sin embargo, son necesarios otros estudios para determinar el efecto de los probióticos en las enzimas antioxidantes.

La actividad de catalasa (CAT) también fue evaluada en suero y mucus, sin embargo, la actividad de esta enzima no mostró un patrón definido. En suero se observó un aumento de actividad durante el segundo muestreo (30 días), observándose una mayor actividad en los la dieta de *Y. lipolytica* D1. En mucus se observó una menor actividad en todas las dietas adicionadas con levaduras comparado con el control, con excepción de la dieta de *Y. lipolytica* N6 durante el segundo muestreo (30 días). Catalasa (CAT) participa en la defensa antioxidante previniendo la generación de radical hidroxilo, además se ha demostrado que la inclusión de probióticos en dietas puede modular la actividad de esta y otras enzimas antioxidantes (Wang *et al.*, 2017). Se han observado patrones diferentes en diferentes especies de peces, observándose tanto aumento como la disminución de la actividad de CAT (Reyes-Becerril *et al*., 2008a; 2014; 2017; Zhang *et al*., 2017).

La actividad de mieloperoxidasa (MPO) no mostraron diferencias en suero, sin embargo, en mucus si se observaron diferencias, aunque no un patrón definido. La MPO es otra enzima antioxidante importante, la cual interviene en la producción de ácido hipocloroso, una molécula importante en la eliminación de patógenos, ya que puede reaccionar con una amplia variedad de moléculas (ej. ADN, RNA, proteínas) oxidándolas y causando daño molecular y celular (Lee *et al.*, 2017; Peskin y Winterbourn, 2001; Wang *et al*., 2007). Park *et al.* (2016) observó resultados similares, donde los valores de MPO no mostraron diferencias significativas en los diferentes tratamientos con uno o varios probióticos. La modulación de esta y otras enzimas antioxidantes está bien documentada en suero, aunque en mucus se ha analizado pocas ocasiones (Gobi *et al.*, 2018).

Los niveles de IgM en suero fueron mayores en lo peces alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras, tanto en el primer como en el segundo muestreo. En mucus se observaron diferencias durante el primer muestro (15 días), sin embargo, en el segundo no se observaron diferencias entre los tratamientos. IgM es la principal inmunoglobulina y un componente mayor en la respuesta humoral en peces al estar involucrada en procesos de

fagocitosis, opsonización y neutralización de patógenos (Lee *et al.,* 2017; Reyes-Becerril *et al.,* 2014). La administración de probióticos en dietas ha mostrado tener un efecto positivo en la producción de esta inmunoglobulina (Adel *et al.,* 2017; Giri *et al.,* 2014; Reyes-Becerril *et al.,* 2008a; 2017). Giri *et al.* (2013) sugiere que mientras los probióticos aumentan los niveles de IgM, este es un proceso de corta duración, lo cual explicaría el aumento de los niveles durante los primeros días y su posterior disminución.

A partir de las muestras de tejidos de bazo e intestino se evaluó el posible daño histológico, donde no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos. Diferentes estudios han reportado no cambios, daño o inflamación tras la administración de diferentes probióticos (Kristiansen *et al.,* 2011, Pooramini *et al.,* 2014). Entre los efectos positivos de las dietas adicionadas con probióticos se han descrito alteraciones morfológicas en intestino, como el aumento de área de absorción, aumento del área y grosor de las microvellosidades intestinales (Lee *et al.,* 2017; Nakandakare *et al.,* 2013; Pirarat *et al.,* 2011).

El reconocimiento de los β-glucanos presentes en las paredes de las levaduras se da mediante receptores de lectinas tipo C, siendo Dectin-1 el miembro mejor caracterizado de este grupo (Greenblatt *et al.,* 2010, Herbst *et al.,* 2015). La interacción entre los β-glucanos y estos receptores desencadena procesos de fagocitosis, flujo intracelular de calcio y la producción de diversas citocinas (Brown *et al.,* 2003; Brown y Gordon, 2003). Goodridge *et al.* (2007) reporta que el reconocimiento de levaduras mediante Dectin-1 desencadena la activación de NFAT. Este factor de transcripción vez modifica la expresión de diversos genes y regula la respuesta inmune (Bendickova *et al.,* 2017). En peces no se ha identificado el gen de Dectin-1, sin embargo, se han reportado los genes de otros receptores de lectinas tipo C que han mostrado diferente grado de reconocimiento a diferentes carbohidratos (Ao *et al.,* 2015; Sattler *et al.,* 2012; Zhang *et al.,* 2000). Los siguientes resultados son analizados, siguiendo la ruta de señalización descrita para Dectin-1 e hipotetizando una ruta similar en peces con otros con otros receptores reconociendo los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras.

NFATc3 es un miembro de la familia de factores de transcripción de NFAT, altamente expresado en órganos linfoides, principalmente timo, bazo e intestino (Ho *et al.*, 1995; Peuker *et al.*, 2016). NFATc3 está involucrado en la regulación y activación de células T, pero principalmente se le ha asociado con la selección positiva de los timocitos (Canté-Barrett *et al.*, 2007; Urso *et al.*, 2011). En este estudio se midió la expresión relativa de NFATc3 en distintos órganos de huachinango (*Lutjanus peru*), observándose una mayor expresión en intestino, seguido de estómago y bazo, lo cual concuerda con los reportes del patrón de expresión de este factor de transcripción. Ho *et al.* (1995) considera que la expresión encontrada en órganos no linfoides se debe a la presencia de células de la sangre en la periferia.

Considerando la expresión tejido-específica de este factor de transcripción, se evaluó su expresión y la de diferentes genes relacionados en la cascada de señalización en bazo e intestino de los huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las cepas de levaduras. Además, se ha observado que la administración de oral de inmunoestimulantes y/o probióticos puede modular la expresión génica, no solamente en intestino, sino en otros órganos relacionados a la respuesta inmune como riñón cefálico y bazo (Reyes-Becerril *et al.*, 2008; 2017; Wang *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2017).

De manera general se observó una mayor modulación de la expresión génica en intestino comparada con bazo, un resultado esperado al administrar las levaduras en la dieta. Diferentes trabajos han demostrado que la administración de dietas con inmunoestimulantes, como las levaduras, puede modular la expresión de genes involucrados en el sistema inmune (Doñate *et al.*, 2010; Lokesh *et al.*, 2012; Reyes-Becerril *et al.*, 2008b; 2012; 2017). Particularmente se observó un patrón de expresión similar en la los genes de NFATc3 y Calcineurina (CaN). Estos dos genes están altamente relacionados, al ser necesaria la actividad de Calcineurina para realizar la desfosforilación de NFATc3, lo que permite su posterior translocamiento al núcleo y unión a DNA (Macian *et al.*, 2001; 2005; Masuda *et al.*, 1998). Además, se observó un aumento de las citocinas IL-1β, IL-6 e IL-8, tanto en bazo como intestino. Estas citocinas se encuentran involucradas en la respuesta inflamatoria, producción de proteínas de fase aguda, reclutamiento y activación de monocitos, neutrófilos

y células natural killer (NK) (Arango y Descoteaux, 2014; Köhidai y Csaba, 1998; Lokesh *et al*., 2012). Además, por los patrones de expresión de TCR-β y CD3 podemos inferir la posible activación de células T en bazo e intestino, algo propuesto en otros trabajos con probióticos (Okada *et al*., 2009).

En el presente trabajo se analizó la expresión de diferentes genes involucrados en la cascada de señalización de NFATc3, los cuales se irán discutiendo en orden y se hipotetizará su implicación en la respuesta inmune en huachinango, específicamente en intestino.

El reconocimiento de los β-glucanos presentes en la pared celular de las levaduras, mediante el receptor de membrana Dectin-1, conlleva a la activación de diferentes rutas de señalización y diferentes moléculas (Fric *et al.*, 2016; Gantner *et al*., 2003). Una de estas rutas implica el flujo de calcio, necesario para la actividad de Calcineuria (CaN), y la unión y desfosforilación de NFAT (Bendickova *et al*., 2017; Macian, 2005). En este trabajo se observaron diferencias en la expresión de CaN durante el primer muestreo (15 días) en bazo de huachinangos alimentados con *D. hansenii* CBSDh004 y *Y. lipolytica* D1, sin embargo, no hubo diferencias durante el segundo muestreo (30 días). En intestino se observaron diferencias en los huachinangos alimentados con *Y. lipolytica* N6 en el primer muestreo (15 días), mientras que durante el segundo muestreo (30 días) se observaron diferencias en los huachinangos alimentados con *D. hansenii* CBSDh004 y *Y. lipolytica* D1. Herbst *et al*. (2015) probaron que el reconocimiento de *Aspergillus fumigatus* activa la CaN y NFAT, y junto a otras rutas de señalización, regula la producción de citocinas y reclutamiento de otras células, como los neutrófilos. Un punto importante para que esta activación se realice, no sólo es el reconocimiento de los β-glucanos, sino el proceso de fagocitosis posterior a este reconocimiento. Macian (2005) ha descrito el rol de CaN/NFAT en el proceso de activación de las células T posterior al mecanismo de presentación de antígenos mediado por macrófagos y células dendríticas, por lo que el proceso de fagocitosis juega un papel crucial. Otros trabajos ya han demostrado que los β-glucanos inducen el proceso de fagocitosis y el estallido respiratorio (Brown, 2006; Goodridge *et al*., 2007).

Siguiendo con la cascada de señalización, posterior al reconocimiento/fagocitosis, la molécula de Calcineurina se une al sitio de unión en NFAT (PXIXIT) y se realiza la desfosforilación de este factor de transcripción, lo cual permite su posterior translocación a núcleo, donde se une al DNA y modula la transcripción de diferentes citocinas involucradas en la respuesta inmune (Macian, 2005; Mancini y Toket, 2009). En este trabajo no se observaron diferencias en bazo ambos muestreos, llegándose a observar supresión de la expresión. Interesantemente, la expresión de NFAT en intestino siguió el mismo patrón de expresión que CaN durante ambos muestreos. Este patrón nos muestra la posible interacción de Calcineurina/NFAT en huachinango, algo altamente descrito en modelos de mamíferos (Crabtree, 2001; Fric *et al*., 2016; Vandewalle *et al*., 2014).

Los factores de unión potenciadores de interleucina 2 (ILF2) y 3 (ILF3), también conocidos como NF45 y NF90 respectivamente, son un complejo de proteínas pertenecientes a la familia de NFAT asociadas a la regulación de la expresión de interleucina 2 (Kao *et al*., 1994; Ranpura *et al.*, 2008). En este trabajo, se observó de manera general una baja expresión e incluso supresión de la expresión en bazo durante ambos muestreos. En intestino no se observó una relación de la expresión entre ambos factores, salvo en los huachinangos alimentados con *Y. lipolytica* D1 durante el segundo muestreo (30 días). Esta relación también se cumple con el patrón de expresión de CaN/NFAT, que mostraron un aumento en los niveles de expresión con este mismo tratamiento durante el mismo muestreo. Estos dos factores existen como un complejo, por lo que sus niveles de expresión deberían encontrarse relacionados, patrón que no se observó (Ranpura *et al*., 2008). Algunos trabajos han demostrado la modulación de la expresión de estos factores utilizando inmunoestimulantes como fitohemaglutinina (PHA) y lipopolisacáridos (LPS) (Lin *et al.*, 2006; Wang *et al*., 2006). En peces se ha caracterizado y realizado el análisis de expresión de ILF2, además de observarse una modulación de la expresión por efecto de *Saccharomyces cerevisiae* (Chi *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2011).

Otra de las posibles rutas descritas durante el reconocimiento de β-glucanos por Dectin-1 implica la participación de proteínas pertenecientes a la familia del factor nuclear kappa beta (NF-κβ) (Fric *et al*., 2016; Goodridge *et al*., 2007; Saijo y Iwakura, 2011). Esta familia de

proteínas puede formar complejos entre ellas, pudiéndose formar homo- y heterodímeros, y posteriormente unirse al DNA mediante un dominio de unión a DNA similar a NFAT (Serfling *et al.*, 2004; Tak y Firestein, 2001). En este trabajo se observó que la expresión de NF-κβ no mostró diferencias en bazo durante ambos muestreos, mientras que en intestino se observó un aumento de la expresión durante el segundo muestreo (30 días) en los huachinangos alimentados con *D. hansenii* CBSDh004 y *Y. lipolytica* D1. Este patrón de expresión en intestino es similar a lo observado en CaN/NFAT, lo cual podría indicar que el reconocimiento de los β-glucanos presentes en las levaduras utilizadas en este estudio están activando diversas vías de señalización donde participan estos dos factores de transcripción.

Posterior a la activación de estos factores de transcripción, se inicia la regulación de la transcripción de ciertas interleucinas como IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF-α. Estas interleucinas participan en la respuesta inflamatoria y la activación y reclutamiento de distintas células del sistema inmune (Fric *et al*., 2016; Graef *et al*., 2001; Lokesh *et al*., 2012). Interleucina 1β (IL-1β) juega un papel importante en la respuesta inmune, específicamente en la respuesta inflamatoria mediando la activación de macrófagos, células NK y linfocitos; así como regulando la producción de otras citocinas (Arango y Descoteaux, 2014; Li *et al.*, 2017; Panigrahi *et al.*, 2007). En este trabajo se observaron diferencias significativas en bazo durante ambos muestreos (15 y 30 días), mientras que en intestino se observaron diferencias significativas en los huachinangos alimentados con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 durante el primer muestreo (15 días) y *Y. lipolytica* N6 durante el segundo muestreo (30 días). Esta modulación de la expresión de IL-1β se ha observado en otros organismos alimentados con levaduras o componentes de su pared celular, como β-glucanos, modulando la respuesta inflamatoria y la actividad fagocítica (Biswas *et al.*, 2012; Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Zhang *et al*., 2012). Interleucina 6 (IL-6) es una citocina con funciones tanto pro- como antinflamatoria, además de estar involucrada en la infiltración de neutrófilos, y la diferenciación de monocitos/macrófagos y linfocitos T (Arango y Descoteaux, 2014; Bird *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2008). En este trabajo se observaron diferencias significativas en todas las dietas suplementadas con levaduras, tanto en bazo como intestino durante el segundo muestreo (30 días). Otros trabajos han demostrado que el uso de diferentes

probióticos puede modular la expresión de esta citocina, haciendo énfasis en su rol en el sistema inmune innato; sin embargo, esta citocina también es importante para la diferenciación de linfocitos T (Beck *et al.,* 2015; El-Shafei *et al.,* 2013; Tanaka *et al.,* 2014). Interleucina 8 (IL-8) es una citocina proinflamatoria que al igual que IL-6 está involucrada en la regulación de la migración de los neutrófilos y la inducción de la fagocitosis (Beck *et al.,* 2015; Cerezuela *et al.,* 2013). En este trabajo se observaron diferencias significativas en bazo de los huachinangos alimentados con las cepas de *Yarrowia lipolytica* (D1 y N6), tanto en el primer (15 días) como en el segundo muestreo (30 días). Mientras que en intestino se observó un aumento de la expresión durante el segundo muestreo (30 días), mas no diferencias significativas entre los tratamientos. Cerezuela *et al.* (2013) observó un aumento de la expresión de esta citocina en intestino de dorada (*Spaurus aurata*) después de administrar uno o varios probióticos durante 4 semanas, un efecto que ya se ha demostrado en otros trabajos (Kim *et al.,* 2006; Pérez-Sánchez *et al.,* 2004). También se ha descrito que el aumento de la expresión de esta citocina en bazo esta probablemente relacionado con procesos inflamatorios y la respuesta inmune innata/temprana (Caipang *et al.,* 2012; Fast *et al.,* 2007). Interleucina (IL-12) es una citocina producida principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas; la cual tiene múltiples funciones como estimular la proliferación de células NK, además de proliferación y diferenciación de células T, específicamente células T $CD4^+$ a células Th1 (Arango y Descoteaux, 2014; Blanco *et al.,* 2008; Gee *et al*., 2009; Hamza *et al*., 2010). En nuestro trabajo, en el bazo se presentó una supresión de la expresión de esta citocina durante el primer muestreo (15 días) y un aumento en los tratamientos de *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1 durante el segundo muestreo (30 días). En intestino se observó una supresión general de la expresión de esta citocina, con excepción del tratamiento de *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo (15 días). Kim *et al*. (2013) reportó un aumento en la expresión de IL-12 en bazo de halibut bastardo (*Paralichthys olivaceus*) que fueron alimentados con el probiótico *Lactococcus lactis* durante 9 semanas (90 días) y sugirió este probiótico como un posible adyuvante para vacunas orales. Interesantemente, un estudio *in vitro* con células de bazo e intestino de trucha arcoíris *(Oncorhynchus mykiss*) estimulados con bacterias probióticas mostró una inducción en la expresión de citocinas en las células de bazo más no en intestino, patrón similar al obtenido

en este trabajo (Kim y Austin, 2006). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citocina proinflamatoria relacionada con la activación de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T (Beck *et al.,* 2015; Smyth *et al.,* 2000). En nuestro trabajo se observó una supresión en la expresión de este gen en bazo, tanto en el primer (15 días) como en el segundo muestreo (30 días). En intestino se repitió este patrón durante el primer muestreo (15 días), mientras que en el segundo muestreo (30 días) se observó un aumento de la expresión en los tratamientos de *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1. (Panigrahi *et al.,* 2007). Beck *et al.* (2015) observó un aumento de la expresión de TNF-α en intestino de halibut bastardo (*Paralichthys olivaceus*) después de alimentarlos durante 30 días con una dieta adicionada con probióticos, lo cual se relacionó con un aumento de la expresión de IL-8 y producción de especies reactivas de oxígeno analizadas mediante el ensayo de NBT, sugiriendo la activación y migración de neutrófilos. En nuestro caso observamos un aumento en la expresión, tanto de TNF- α como IL-8, por lo que podríamos suponer una respuesta similar. La modulación de la expresión de citocinas además concuerda con el patrón de expresión de los factores de transcripción evaluados en este trabajo, efecto observado en un trabajo donde se evaluaba el efecto del probiótico *Lactobacillus delbrueckii* en carpa (*Cyprinus carpio*) (Zhang *et al*., 2017).

El resultado final de la cascada de señalización, cómo se describió anteriormente, es la producción de citocinas que inducirán la activación y proliferación de diferentes células del sistema inmune (Fric *et al.*, 2016; Graef *et al.*, 2001; Lokesh *et al.*, 2012). Sin embargo, este trabajo se enfoca en las células T al ser NFAT un factor de transcripción altamente asociado a su activación, proliferación y diferenciación (Macian, 2005; 2016; Masuda *et al*., 1998). Las células T presentan característicamente el complejo formado por el receptor de células T (TCR) y la molécula CD3, las cuales desencadenan la cascada de señalización después de interactuar con las células presentadoras de antígenos (Huang y Wange, 2004; Natarajan *et al*., 2016). Subsecuentemente, se activa el complejo CaN/NFAT presente en las células T, el cual regula la producción de citocinas asociadas a la proliferación y diferenciación de estas células (Hogan, 2017; Macian, 2016). En este trabajo se evaluó la expresión de TCR subunidad β (TCRβ) y CD3 en bazo e intestino de huachinangos alimentados con las dietas

suplementas con las levaduras marinas. En el caso de TCRβ, de manera general, no se observaron diferencias significativas en su expresión en ninguno de los dos tejidos ni en ningún muestreo, con la excepción de bazo de huachinangos alimentados con la dieta con *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo (15 días). Mientras que para CD3 se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen en bazo de los huachinangos alimentados con las dietas de *Y. lipolytica* D1 y N6 durante el primer muestreo (15 días); pero no así durante el segundo muestreo (30 días), donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Comparando el patrón de expresión de estas moléculas, podemos inferir dos cosas: 1) el aumento de expresión de TCRβ/CD3 en bazo de los huachinangos alimentados con *Y. lipolytica* N6 durante el primer muestreo (15 días) podría indicar una activación de células T que presentan el complejo TCRαβ/CD3, y 2) el aumento de expresión de CD3, más no de TCRβ, en intestino de los huachinangos alimentados con *D. hansenii* DhCBS004 podría indicar la activación de otro tipo de células T. Las células T pueden ser clasificadas dependiendo de las cadenas presentes en el TCR en: TCRαβ, las cuales necesitan interactuar con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presente en las células presentadoras de antígenos; y TCRγδ, las cuales no necesitan de esta interacción (Fischer *et al*., 2013; Prinz *et al*, 2013; Tafalla *et al.*, 2016). La mayoría de las células T expresan TCRαβ, sin embargo, en células epiteliales y mucosas (como intestino), pueden encontrarse células T que expresan TCRγδ (Kuhns *et al*., 2006; Tafalla *et al*., 2016). Las células T que presentan TCRγδ han sido principalmente descritas en mamíferos, sin embargo, las cadenas γδ ya han sido descritas en algunas especies de peces (Nam *et al*., 2003). Esto también coincidiría con la falta de expresión de IL-12 en intestino, ya que esta interleucina es necesaria para la diferenciación de células T mediante la interacción con el MHC (Fischer *et al*., 2013; Wang y Secombes, 2013).

La modulación de la expresión de los genes evaluados, sugiere que en peces el reconocimiento de los β-glucanos activa una ruta de señalización similar a Dectin-1 presente en mamiferos. Sin embargo, aún es necesario identificar al gen/receptor involucrado en esta cascada de señalización en huachinango.

En conjunto, los patrones de expresión observados indican una modulación del sistema inmune de los huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con las levaduras tanto a durante el primer muestreo (15 días) como durante el segundo muestreo (30 días). En diferentes trabajos con probióticos se ha establecido que para que ocurra una modulación del sistema inmune es necesario un régimen de alimentación de entre 1 a 10 semanas (7 a 75 días), sin embargo, la respuesta es variable dependiendo de la especie de pez, la cepa del probiótico y el tiempo de alimentación (Nayak, 2010).

Con el fin de evaluar esta estimulación, en cada muestreo se aislaron leucocitos de bazo, los cuales fueron incubados *in vitro* con el patógeno *V. parahaemolyticus*. A partir de este experimento se evaluó la actividad de superóxido dismutasa, catalasa, mieloperoxidasa y producción de óxido nítrico, actividades moduladas durante los procesos de estallido respiratorio y fagocitosis, los cuales pueden ser estimulados por el reconocimiento de los β-glucanos de las levaduras (Brown, 2006). De manera general no se observan diferencias entre en las actividades señaladas en los leucocitos expuestos y los no expuestos a *V. parahaemolyticus*. Esto puede deberse, como se mencionó anteriormente, a mecanismos propios de este patógeno para inhibir la actividad de explosión respiratoria y fagocitosis (Boesen *et al.*, 2001; Sepulcre *et al.*, 2007). A pesar de que no hay diferencias entre los leucocitos expuestos y no expuestos a *V. parahaemolyticus*, si se observó un aumento en la actividad de mieloperoxidasa (MPO) y la producción de óxido nítrico (NO) en los leucocitos de bazo de los huachinangos alimentados con las dietas suplementadas con *D. hansenii* DhCBS004 y *Y. lipolytica* D1. Esto nos indica que aun cuando no hay diferencias entre los leucocitos expuestos y no expuestos, si hay una estimulación en la actividad de estallido respiratorio y fagocitosis, lo cual se puede relacionar con los demás resultados obtenidos y demostrando la implicación de NFAT en estos procesos (Fric *et al.*, 2014; Herbst *et al.*, 2015).

Finalmente, a partir de la secuencia del factor nuclear de células T activadas citoplasmático 3 (NFATc3) de huachinango (*Lutjanus peru*), la cual fue obtenida mediante análisis transcriptómicos, fue analizada mediante diferentes programas bioinformáticos. La secuencia contaba con un marco de lectura de 3300 pb, el cual codificaba para una proteína de 1100

aminoácidos. Esta proteína presentaba las características típicas de las proteínas pertenecientes a la familia de NFAT (Okamura *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1997).

La secuencia proteica deducida mostró las tres regiones típicas; una región homologa de las proteínas de la familia de NFAT (NHR), una región homologa a las proteínas de la familia Rel (RHR), y una región carboxilo terminal (C-terminal) (Macian, 2016). Además, se identificaron otras regiones específicas, como la región de transactivación en el amino terminal (TAD-N), la cual es un presunto sitio de interacción con otros factores de transcripción y control de algunas funciones biológicas, como proliferación y muerte celular (Mognol *et al.*, 2016).

Se identificó además la región de regulación, la cual se encuentra altamente fosforilada para mantener las proteínas de NFAT inactivas (Mognol *et al.*, 2016). Esta región cuenta con diferentes motivos, como los motivos ricos en serina (SRR), los motivos ricos en serina y prolina (SP), un sitio de unión a calcineurina (PXIXIT) y una secuencia de localización celular (NLS) (Macian, 2005). Estos motivos y sitios controlan la unión de calcineurina a NFAT, su desfosforilación y subsecuente translocación de NFAT al núcleo (Macian *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 1998).

Además, dentro de la región homologa a las proteínas Rel (RHR), se identificaron los dominios homologo a Rel de unión a DNA (RHD DNA Bind) y el dominio inmunoglobulina-plexina (IPT), los cuales están involucrados en la unión a DNA, dimerización y activación transcripcional (Masuda *et al.*, 1998). Esta región también proporciona un posible sitio de unión con otros factores de transcripción como NF-κβ y AP-1 (Jun/Fos), los cuales pertenecen a la misma superfamilia que NFAT (Serfling *et al.*, 2000).

La secuencia de NFATc3 de huachinango mostró una alta identidad (arriba del 70%) con otras secuencias reportadas de peces, y una menor identidad (abajo del 60%) con las secuencias de mamíferos, observándose una mayor similitud (96%) con la secuencia de la corvina amarilla (*Larimichthys crocea*). Este patrón se observó nuevamente en el análisis filogenético, donde se mostró una separación entre las secuencias de peces y mamíferos, típica por la divergencia evolutiva entre ambos grupos (Capasso *et al.*, 2003). De manera

similar a otros trabajos se observó que la secuencia de pez cebra (*Danio rerio*) que es un intermediario entre el grupo de peces y mamíferos (Huang *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2013).

La presencia de NFAT y su similitud con secuencias mamíferos, además de contar con las características estructurales típicas de esta familia de proteínas, nos permite suponer una función similar a sus contrapartes en organismos superiores. Park *et al.* (2002) reportó la presencia de al menos dos proteínas de la familia NFAT en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) y su implicación en la activación linfocitos T, así como su unión al sitio del promotor de IL-2. Sin embargo, aún no se han descrito la expresión y la modulación de su cascada de señalización o su posible rol en la respuesta inmune de peces.

La cascada de señalización de NFAT es el resultado del reconocimiento de moléculas (β-glucanos y lipopolisacáridos) o microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) por receptores específicos presentes en las células del sistema inmune, principalmente macrófagos y células dendríticas (Fric *et al.*, 2016; Hogan *et al.*, 2003).

9. CONCLUSIONES

De manera general, este trabajo demostró que la levadura *Y. lipolytica* puede modular la respuesta inmune en huachinango (*Lutjanus peru*), tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su capacidad para modular la expresión y cascada de señalización del factor de transcripción NFATc3. Esto también nos indica la presencia de receptores, similares Dectin-1, capaz de inducir la cascada de señalización de NFATc3, de manera simiñar a la señalización en mamiferos.

La levadura *Yarrowia lipolytica* exhibió características probióticas e inmunoestimulantes *in vitro* en leucocitos de riñon cefalico y bazo de huachinango (*Lutjanus peru*), lo que la volvió una levadura candidata a evaluaciones *in vivo*.

La evaluación *in vivo* demostró un efecto positivo en la respuesta inmune de huachinango, donde la inclusión de la levadura *Y. lipolytica* indujó una mayor producción de IgM en suero.

Las muestras de bazo e intestino de la evaluación *in vivo* mostraron que la inclusión de la levadura *Y. lipolytica* puede modular la expresión de genes relacionas a la cascada de señalización de NFATc3, particularmente incrementar la expresión de interleucinas proinflamatorias, como IL-1β, IL-6 e IL-8.

Finalmente, la evaluación *in silico* de la secuencia de NFATc3 demostró que la secuencia, motivos y dominios de está proteína están altamente conservados en peces como en mamiferos.

Todo esto nos lleva a la confimación de que la ruta de reconocimiento de los β-glucanos presentes en las levaduras y ruta de señalización de NFATc3 es similar en peces a las rutas descritas en mamiferos, lo que confirma a los peces como un buen modelo de estudio de inmunología comparativa.

10. LITERATURA CITADA

Abdel, N. A., E. Moghaz. 2010. Comparative study of salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* yeast strains. *Adv Biores*, 1, 170-7.

Abdel-Tawwab, M., A. M. Abdel-Rahman, N. E. Ismael. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1-4), 185-189.

Abliz, P., K. Fukushima, K. Takizawa, K. Nishimura. 2004. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40(1), 41-49.

Adel, M., C. C. Lazado, R. Safari, S. Yeganeh, M. J. Zorriehzahra. 2017. Aqualase®, a yeast-based in-feed probiotic, modulates intestinal microbiota, immunity and growth of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Res*, *48*(4), 1815-1826.

Adouard, N., B. Foligné, J. Dewulf, M. Bouix, D. Picque, P. Bonnarme. 2015. *In vitro* characterization of the digestive stress response and immunomodulatory properties of microorganisms isolated from smear-ripened cheese. *Int J Food Microbiol*, *197*, 98-107.

Aguilar-Macías, O. L., J. J. Ojeda-Ramírez, A. I. Campa-Córdova, P. E. Saucedo. 2010. Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *J World Aquac Soc*, *41*(3), 447-454.

Alaboudi, A. R., M. Ababneh, T. M. Osaili, K. A. Shloul. 2016. Detection, identification, and prevalence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in fish and coastal environment in Jordan. *J Food Sci*, 81(1), M130-M134.

Alamillo, E., M. Reyes-Becerril, A. Cuesta, C. Angulo. 2017. Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. *Fish Shellfish Immunol*.

Aldana-Aranda, D. 2002. Overview of aquaculture in Mexico: production and research. In: Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute, 53, pp. 241-254.

Álvarez-Sánchez, A. R., H. Nolasco-Soria, A. Peña-Rodríguez, H. Mejía-Ruíz. 2018. *In vitro* Digestibility of *Yarrowia lipolytica* Yeast and Growth Performance in Whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Turk J Fish Aquat Sci*, 18(3), 395-404

Andreishcheva, E. N., E. P. Isakova, N. N. Sidorov, N. B. Abramova, N. A. Ushakova, G. L. Shaposhnikov, R. A. Zvyagilskaya. 1999. Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry Mosc.*, *64*, 1061-1067.

Angulo, C., M. Maldonado, K. Delgado, M. Reyes-Becerril. 2017. *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev Comp Immunol*, 71, 18-27.

Ao, J., Y. Ding, Y. Chen, Y. Mu, X. Chen. 2015. Molecular characterization and biological effects of a C-type lectin-like receptor in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Int J Mol Sci*, 16(12), 29631-29642.

Arango Duque, G., A. Descoteaux. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491.

Arredondo Figueroa, J. L. 1996. Estado actual y perspectivas de la acuicultura en México, *ContactoS*, 14:28-38

Arteau, M., S. Labrie, D. Roy. 2010. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *Int Dairy J*, *20*(8), 545-554.

Arumugam, M., B. Romestand, J. Torreilles, P. Roch. 2000. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol*, *79*(7), 513-519.

Babior, B. M. 2000. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*, 109(1), 33-44.

Banerjee, G., A. K. Ray. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci*.

Bankar, A. V., A. R. Kumar, S. S. Zinjarde. 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *84*(5), 847.

Barth, G., C. Gaillardin. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*, *19*(4), 219-237.

Batbayar, S., D. H. Lee, H. W. Kim. 2012. Immunomodulation of fungal β-glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomol Ther*, *20*(5), 433.

Beck, B. R., D. Kim, J. Jeon, S. M. Lee, H. K. Kim, O. J Kim, W. H. Holzapfel. 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, *42*(1), 177-183.

Bendickova, K., F. Tidu, J. Fric. 2017. Calcineurin–NFAT signalling in myeloid leucocytes: new prospects and pitfalls in immunosuppressive therapy. *EMBO Mol Med*, 9(8), 990-999.

Biller-Takahashi, J. D., E. C. Urbinati. 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *An Acad Bras Cienc*, *86*(3), 1484-1506.

Bird, S., J. Zou, R. Savan, T. Kono, M. Sakai, J. Woo, C. Secombes. 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *Dev Comp Immunol*, *29*(9), 775-789.

Biswas, G., H. Korenaga, H. Takayama, T. Kono, H. Shimokawa, M. Sakai. 2012. Cytokine responses in the common carp, *Cyprinus carpio* L. treated with baker's yeast extract. *Aquaculture*, *356*, 169-175.

Blanco, P., A. K. Palucka, V. Pascual, J. Banchereau. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(1), 41-52.

Boesen, H. T., M. H. Larsen, J. L. Larsen, A. E. Ellis. 2001. *In vitro* interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup O2a. *Fish Shellfish Immunol*, *11*(5), 415-431.

Bondad-Reantaso, M. G., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan, M. Shariff. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol*, *132*(3), 249-272.

Bostock, J., B. McAndrew, R. Richards, K. Jauncey, T. Telfer, K. Lorenzen, R. Corner. 2010. Aquaculture: global status and trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *365*(1554), 2897-2912.

Breuer, U., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, *23*(6), 415-437.

Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, S. Gordon. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of β-glucans. *J Exp Med*, 197(9), 1119-1124.

Brown, G. D., S. Gordon. 2003. Fungal β-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19(3), 311-315.

Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6(1), 33-43.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, J. Vandesompele. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, *55*(4), 611-622.

Butinar, L., S. Santos, I. Spencer-Martins, A. Oren, N. Gunde-Cimerman. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett*, *244*(2), 229-234.

Caipang, C. M. A., C. C. Lazado, M. F. Brinchmann, V. Kiron. 2012. Transcription of selected immune-related genes in spleen cells of cod, Gadus morhua following incubation with alginic acid and β-glucan. *J Exp Mar Bio Ecol*, *416*, 202-207.

Campa-Córdova A.I., H. González-Ocampo, A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, and F. Ascencio. 2009. Growth, survival, and superoxide dismutase activity in juvenile *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) treated with probiotics. *Hidrobiológica*,19 (2): 151-157

Campos, M. N., P. M. Sevilla, L. S. Velasco, C. Filograsso, O. L. Cárdenas. 2012. Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC*, (37), 20-25

Canté-Barrett, K., M. M. Winslow, G. R. Crabtree. 2007. Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes. *J Immunol*, 179(1), 103-110.

Capasso, C., V. Carginale, R. Scudiero, O. Crescenzi, R. Spadaccini, P. A. Temussi, E. Parisi. 2003. Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. *J Mol Evol*, *57*(1), S250-S257.

Cárdenas-Reyna, T., C. Angulo, S. Hori-Oshima, E. Velázquez-Lizárraga, M. Reyes-Becerril. 2016. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Vibrio parahaemolitycus*. *Dev Comp Immunol*, *62*, 72-81.

Caruffo, M., N. Navarrete, O. Salgado, A. Díaz, P. López, K. García, P. Navarrete. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front Microbiol*, *6*.

Çelik, E., P. Çalık. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*, *30*(5), 1108-1118.

Cerezuela, R., J. Meseguer. 2013. Effects of dietary inulin, Bacillus subtilis and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, *34*(3), 843-848.

Chatterjee, S., S. Haldar. 2012. Vibrio related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J Marine Sci Res Dev S*, *1*.

Chelliah, R., S. R. Ramakrishnan, P. R. Prabhu, U. Antony. 2016. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401.

Chen, J., R. Zhang, X. Qi, B. Zhou, J. Wang, Y. Chen, H. Zhang. 2017. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2010–2014 in Zhejiang Province, China. *Food Control*, 77, 110-115.

Chi, H., Z. Z. Xiao, L. Sun. 2013. Nuclear factor 45 of half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*: Gene structure, expression profile, and immunoregulatory property. *Fish Shellfish Immunol*, 35(3), 972-978.

Chiu, C. H., C. H. Cheng, W. R. Gua, Y. K. Guu, W. Cheng. 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, 29(6), 1053-1059.

Civera, R., J. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 77(2-3), 145-156.

Claiborne, A. L. (1985). Catalase activity. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, 1*, 283-284.

CONAPESCA. Guzmán y D. F. Fuentes (eds.) (2006). Pesca, Acuacultura e Investigación en México. P. ISBN: 970-9764-05-5.

Crabtree, G. R. 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, 276(4), 2313-2316.

Cui, H., Y. Yan, J. Wei, Z. Hou, Y. Huang, X. Huang, Q. Qin. 2011. Cloning, characterization, and expression analysis of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) ILF2 gene (EcILF2). *Fish Shellfish Immunol*, *30*(1), 378-388.

Czech, A., M. Merska, K. Ognik. 2014. Blood immunological and Biochemical indicators in turkey hens fed diets with a different content of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Ann Anim Sci*, *14*(4), 935-946.

Czech, A., A. Smolczyk, K. Ognik, M. Kiesz. 2016. Nutritional Value of *Yarrowia lipolytica* Yeast and its Effect on Growth Performance Indicators on Piglets. *Ann Anim Sci*, *16*(4), 1091-1100.

Defoirdt, T., P. Sorgeloos, P. Bossier. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol*, *14*(3), 251-258.

Díaz-Uribe, J. G., E. A. Chávez, J. F. Elorduy Garay. 2004. Evaluación de la pesquería del huachinango (*Lutjanus peru*) en el suroeste del Golfo de California. *Cienc Mar*, *30*(4).

Didari, T., S. Solki, S. Mozaffari, S. Nikfar, M. Abdollahi. 2014. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf*, *13*(2), 227-239.

Ding, J., T. Feng, Y. Ning, W. Li, Q. Wu, K. Qian, C. Qi. 2015. β-Glucan enhances cytotoxic T lymphocyte responses by activation of human monocyte-derived dendritic cells via the PI3K/AKT pathway. *Hum Immunol*, *76*(2), 146-154.

DOF. Diario Oficial de la Federación (2013). Carta Nacional Acuícola. INAPESCA, México.

Doñate, C., J. C. Balasch, A. Callol, J. Bobe, L. Tort, S. MacKenzie. 2010. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity. *Mar Biotechnol*, 12(1), 88-99.

Drury, R. A., E. A. Wallington, R. Cancerson. 1976. Carlton's histopathological techniques. Oxford University Press, Oxford, London, New York.

El-Shafei, K., M. Sharaf, A. Ibrahim, I. Sadek, S. El-Sayed. 2013. Evaluation of Lactobacillus plantarum as a probiotic in aquaculture: emphasis on growth performance and innate immunity. *J Appl Sci Res*, *9*(1), 572582Imelda.

FAO, 1995. Code of Conduct for Responsible Fisheries. Rome, FAO. 41 pp.

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

Fast, M. D., S. C. Johnson, S. R. M. Jones. 2007. Differential expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1β-1, TNFα-1 and IL-8 in vaccinated pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) salmon juveniles. *Fish Shellfish Immunol*, *22*(4), 403-407.

Fell, J. W. 2001. Collection and identification of marine yeasts. *J Microbiol Methods*, 30, 347-356.

Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 690-702.

Fischer, U., E. O. Koppang, T. Nakanishi. 2013. Teleost T and NK cell immunity. *Fish Shellfish Immunol*, *35*(2), 197-206.

Font de Valdez D.G., M.P. Taranto. 2001. Food microbiology protocols. Probiotic properties of lactobacilli, Spencer. Humana Press Inc., Totowa.

Forman, H. J., M. Torres. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(supplement_1), S4-S8.

Fric, J., T. Zelante, A. Y. Wong, A. Mertes, H. B. Yu, P. Ricciardi-Castagnoli. 2012. NFAT control of innate immunity. *Blood*, *120*(7), 1380-1389.

Fric, J., T. Zelante, P. Ricciardi-Castagnoli. 2014. Phagocytosis of particulate antigens–all roads lead to calcineurin/NFAT signaling pathway. *Front Immunol*, *4*, 513.

Fric, J., T. Zelante, A. Wong, A. Mencarelli, B. Lee, M. Poidinger, P. Ricciardi-Castagnoli. 2016. Calcineurin-NFAT signaling control of the innate response. *Eur J Immunol*, Vol. 46, pp. 515-515

Gagliardi, M. C., R. Teloni, S. Mariotti, C. Bromuro, P. Chiani, G. Romagnoli, R. Nisini. 2010. Endogenous PGE2 promotes the induction of human Th17 responses by fungal β-glucan. *J Leukoc Biol*, *88*(5), 947-954.

Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, *197*(9), 1107-1117.

Garduño-Dionate, M., M. L. Unzueta-Bustamante, M. Hernández-Martínez, R. M. Lorán-Núñez, F. R. Martínez-Isunza. 2010. Crecimiento de huachinangos juveniles silvestres (*Lutjanus peru*) en un encierro de engorda en Puerto Vicente Guerrero, Guerrero. *Cienc Pesq*, *18*(1), 93-96.

Gee, K., C. Guzzo, C. Mat, F. Nor, W. Ma, A. Kumar. 2009. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, *8*(1), 40-52.

Giri, S. S., V. Sukumaran, M. Oviya. 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol*, 34(2), 660-666.

Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Curr Opin Biotechnol*, 26, 162-173.

Gjedrem, T., N. Robinson, M. Rye. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, *350*, 117-129.

Gobi, N., B. Vaseeharan, J. C. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam, A. Iswarya. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus. Fish Shellfish Immunol.*

Gómez-Gil, B., E. Fajer-Avila, F. García-Vargas. 2007. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *J Appl Microbiol*, *102*(6), 1518-1526.

Gómez-Gil, B., E. Fajer-Avila, J. Pascual, M. C. Macian, M. J. Pujalte, E. Garay, A. Roque. 2008. *Vibrio sinaloensis* sp. nov., isolated from the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869. *Int J Syst Evol Microbiol*, *58*(7), 1621-1624.

Goodridge, H. S., R. M. Simmons, D. M. Underhill. 2007. Dectin-1 stimulation by Candida albicans yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*, *178*(5), 3107-3115.

Goodridge, H. S., D. M. Underhill, N. Touret. 2012. Mechanisms of Fc Receptor and Dectin-1 Activation for Phagocytosis. *Traffic*, 13(8), 1062-1071.

Graef, I. A., F. Chen, G. R. Crabtree. 2001. NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, 11(5), 505-512.

Greenblatt, M. B., A. Aliprantis, B. Hu, L. H. Glimcher. 2010. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *J Exp Med*, 207(5), 923-931.

Groenewald, M., T. Boekhout, C. Neuvéglise, C. Gaillardin, P. W. Van Dijck, M. Wyss. 2014. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit Rev Microbiol*, *40*(3), 187-206.

Gupta, G. N., S. Srivastava, S. K. Khare, V. Prakash. 2014. Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *Int J Agric Environ Biotechnol*, *7*(2), 371.

Gwack, Y., S. Feske, S. Srikanth, P. G. Hogan, A. Rao. 2007. Signalling to transcription: store-operated Ca 2+ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell calcium*, 42(2), 145-156.

Haenen, O. L. M., B. Fouz Rodríguez, C. Amaro González, M. M. Isern, H. Mikkelsen, S. Zrnčić, I. Dalsgaard. 2014. Vibriosis in aquaculture. 16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. *Bull Eur Assoc Fish Pathol, 2014, vol. 34, num. 4, p. 138-147*.

Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol*, *119*(4), 917-935.

Hamza, T., J. B. Barnett, B. Li. 2010. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci*, 11(3), 789-806.

Hamza, F., A. Vaidya, M. Apte, A. R. Kumar, S. Zinjarde. 2017. Selenium nanoparticle-enriched biomass of *Yarrowia lipolytica* enhances growth and survival of Artemia salina. *Enzyme Microb Technol*, *106*, 48-54.

Hatlen, B., G. M. Berge, J. M. Odom, H. Mundheim, B. Ruyter. 2012. Growth performance, feed utilisation and fatty acid deposition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed graded levels of high-lipid/high-EPA *Yarrowia lipolytica* biomass. *Aquaculture*, *364*, 39-47.

Haugland, G. T., R. A. Jakobsen, N. Vestvik, K. Ulven, L. Stokka, H. I. Wergeland. 2012. Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analyzed by flow cytometry. *PloS one*, *7*(10), e47909.

Hendrikson, R. G., R. D. Zenoble. 1983. Vibriosis in fish: a review. *Iowa State University Veterinarian*, *45*(1), 5.

Henry, C. M., E. Hollville, S. J. Martin. 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, *61*(2), 90-97.

Herbst, S., A. Shah, M. M. Moya, V. Marzola, B. Jensen, A. Reed, D. Armstrong-James. 2015. Phagocytosis-dependent activation of a TLR9–BTK–calcineurin–NFAT pathway co-ordinates innate immunity to *Aspergillus fumigatus*. *EMBO Mol Med*, 7(3), 240-258.

Herre, J., A. S. Marshall, E. Caron, A. D. Edwards, D. L. Williams, E. Schweighoffer, G. D. Brown. 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, 104(13), 4038-4045.

Ho, S. N., D. J. Thomas, L. A. Timmerman, X. Li, U. Francke, G. R. Crabtree. 1995. NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J Biol Chem*, 270(34), 19898-19907.

Hogan, P. G., L. Chen, J. Nardone, A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 17(18), 2205-2232.

Hogan, P. G. 2017. Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell calcium*, *63*, 66-69.

Hollville, E., S. J. Martin. 2016. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 14-38.

Hoseinifar, S. H., A. Mirvaghefi, D. L. Merrifield. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318(1-2), 90-94.

Huang, Y., R. L. Wange. 2004. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J Biol Chem*, *279*(28), 28827-28830.

Huang, X., H. Zhou, H. Zhang. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, *20*(5), 750-757.

Huang, X. D., G. J. Wei, H. Zhang, M. X. He. 2015. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) in pearl oyster *Pinctada fucata*: molecular cloning and functional characterization. *Fish Shellfish Immunol*, *42*(1), 108-113.

Kao, P. N., L. Chen, G. Brock, J. Ng, J. Kenny, A. J. Smith, B. Corthesy. 1994. Cloning and expression of cyclosporin A-and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem*, 269(32), 20691-20699.

Kemenade, B. M. L. V., A. Groeneveld, B. T. T. M. Rens, J. H. W. M. Rombout. 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *J Exp Biol*, *187*(1), 143-158.

Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan, L. Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.

Khalkhane A.S., K. Abbasi, F.S. Zadeh, A.H. Arian. 2013. Effect of Dietary Beta-Glucan Supplementation on Humoral and Cellular Immunologic Factors in Lambs. *Glob Vet;* 11: 38-43. DOI: 10.5829/idosi.gv.2013.11.1.73188

Kim, D. H. y B. Austin. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Vet Immunol Immunopathol*, *114*(3-4), 297-304.

Kim, D., B. R. Beck, S. B. Heo, J. Kim, H. D. Kim, S. M. Lee, K. Lee. 2013. *Lactococcus lactis* BFE920 activates the innate immune system of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), resulting in protection against *Streptococcus iniae* infection and enhancing feed efficiency and weight gain in large-scale field studies. *Fish Shellfish Immunol*, *35*(5), 1585-1590.

Köhidai, L. y G. Csaba. 1998. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, Rantes and TNF-α) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine,* 10(7), 481-486.

Kreger-van Rij, N. J. W. (Ed.). 2013. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Kristiansen, M., D. L. Merrifield, J. L. Gonzalez Vecino, R. Myklebust, E. Ringø. 2011. Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).

Kuhns, M. S., M. M. Davis, K. C. Garcia. 2006. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*, *24*(2), 133-139.

Kumura, H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka, K. Shimazaki. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *J Dairy Sci*, *87*(12), 4050-4056.

Kurtzman, C. P. 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, *10*(13), 1727-1740.

Kurtzman, C. P., J. Piškur. 2006. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In *Comparative Genomics* (pp. 29-46). Springer Berlin Heidelberg.

Kutty, S. N. y R. Philip. 2008. Marine yeasts—a review. *Yeast*, *25*(7), 465-483.

Lacy, P. 2015. Secretion of cytokines and chemokines by innate immune cells. *Front Immunol*, 6, 190.

Lafferty, K. D., C. D. Harvell, J. M. Conrad, C. S. Friedman, M. L. Kent, A. M. Kuris, S. M. Saksida. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci*, *7*, 471-496.

Lamari, F., A. Mahdhi, I. Chakroun, M. A. Esteban, D. Mazurais, B. Amina, F. J. Gatesoupe. 2016. Interactions between candidate probiotics and the immune and antioxidative responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *J Fish Dis*, 39(12), 1421-1432.

Lazado, C. C., C. M. A. Caipang, E. G. Estante. 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol*, *45*(1), 2-12.

Lee, S., K. Katya, Y. Park, S. Won, M. Seong, S. C. Bai. 2017. Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Shellfish Immunol*, 61, 201-210.

Li, Z., W. Wang, Z. Lv, D. Liu, Y. Guo. 2017. *Bacillus subtilis* and yeast cell wall improve the intestinal health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. *Br Poult Sci*, 58(6), 635-643.

Libkind, D., S. Brizzio, A. Ruffini, M. Gadanho, M. van Broock, J. P. Sampaio. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*, *84*(4), 313-322.

Lin, H. F., J. Z. Shao, L. X. Xiang, H. J. Wang. 2006. Molecular cloning, characterization and expression analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) NF45 (ILF2) cDNA, a subunit of the nuclear factor of activated T-cells (NF-AT). *Fish Shellfish Immunol*, 21(4), 385-392.

Lin, H. L., Y. L. Shiu, C. S. Chiu, S. L. Huang, C. H. Liu. 2017. Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 60, 474-482.

Liu, C. H., C. H. Chiu, S. W. Wang, W. Cheng. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*, 33(4), 699-706.

Lokesh, J., J. M. Fernandes, K. Korsnes, Ø. Bergh, M. F. Brinchmann, V. Kiron. 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), 626-631.

Luu, V. T., H. Y. Moon, J. Y. Hwang, B. K. Kang, H. A. Kang. 2017. Development of recombinant *Yarrowia lipolytica* producing virus-like particles of a fish nervous necrosis virus. *J Microbiol*, 55(8), 655-664.

Macian, F., C. López-Rodríguez, A. Rao. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, 20(19).

Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, *5*(6), 472-484.

Macian, F. 2016. Nuclear Factor of Activated T Cells and Tolerance.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*, 20(2), 137-151.

Magnadottir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol*, *12*(4), 361-379.

Mancini, M., A. Toker. 2009. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *9*(11), 810-820.

Marikovsky, M., V. Ziv, N. Nevo, C. Harris-Cerruti, O. Mahler. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J Immunol*, 170(6), 2993-3001.

Masuda, E. S., R. Imamura, Y. Amasaki, K. Arai, N. Arai. 1998. Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal*, *10*(9), 599-611.

Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. Baker, J. Bøgwald, E. Ringø. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, *302*(1), 1-18.

Merska, M., A. Czech, K. Ognik. 2013. The effect of different doses of dried yeast *Yarrowia lipolytica* on production effects of turkey hens and hematological indicators of blood. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska*, *4*(31).

Merska, M., A. Czech, K. Ognik. 2015. The effect of yeast *Yarrowia lipolytica* on the antioxidant indices and macro-and microelements in blood plasma of turkey hens. *Pol J Vet Sci.*, *18*(4), 709-714.

Mognol, G. P., F. R. G. Carneiro, B. K. Robbs, D. V. Faget, J. P. B. Viola. 2016. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis*, *7*(4), e2199.

Monte-Luna, D., G. G. J. Pablo, R. Moncayo-Estrada, S. Sánchez-González, A. Ayala-Cortés. 2001. Máximo rendimiento sostenible y esfuerzo óptimo de pesca del huachinango (*Lutjanus peru*) en La Cruz de Huanacaxtle, Nayarit, México.

Muñoz-Atienza, E., C. Araújo, N. Lluch, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas, S. Magadán. 2015. Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol*, *44*(1), 214-223.

Nam, B. H., I. Hirono, T. Aoki. 2003. The four TCR genes of teleost fish: the cDNA and genomic DNA analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) TCR α-, β-, γ-, and δ-chains. *J Immunol*, *170*(6), 3081-3090.

Nakandakare, I. B., M. K. P. Iwashita, D. D. C. Dias, L. Tachibana, M. J. T. Ranzani-Paiva, E. Romagosa. 2013. Growth performance and intestinal histomorphology of Nile tilapia juveniles fed probiotics. *Acta Sci Ani Sci*, 35(4), 365-370.

Natarajan, A., V. Nadarajah, K. Felsovalyi, W. Wang, V. R. Jeyachandran, R. A. Wasson, M. Krogsgaard. 2016. Structural model of the extracellular assembly of the TCR-CD3 complex. *Cell Rep*, *14*(12), 2833-2845.

Navarrete, P., D. Tovar-Ramírez. 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. *Sustainable Aquaculture Techniques*, 135-172.

Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol*, *29*(1), 2-14.

Nelapati, S., K. Nelapati, B. K. Chinnam. 2012. *Vibrio parahaemolyticus*-An emerging foodborne pathogen-A Review. *Vet World*, *5*(1), 48-62.

Neumann, N. F., D. Fagan, M. Belosevic. 1995. Macrophage activating factor (s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev Comp Immunol* 19(6), 473-482.

Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi, B. Austin. 2014. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture, 431*, 1-11.

Newaj-Fyzul, A., B. Austin. 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J Fish Dis*, *38*(11), 937-955.

Nicaud, J. M. 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, *29*(10), 409-418.

Nordstrom, J. L., M. C. Vickery, G. M. Blackstone, S. L. Murray, A. DePaola. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol*, 73 (18) 5840-7.

Novriadi, R. 2016. Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, *12*(1).

Ochangco, H. S., A. Gamero, I. M. Smith, J. E. Christensen, L. Jespersen, N. Arneborg. 2016. In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii*. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(9), 1-13.

Odeyemi, O. A. 2016. Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus*, 5(1), 464.

Ogunremi, O. R., A. I. Sanni, R. Agrawal. 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *J Appl Microbiol*, *119*(3), 797-808.

Okada, Y., Y. Tsuzuki, R. Hokari, S. Komoto, C. Kurihara, A. Kawaguchi, S. Miura. 2009. Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-IκB and SOCS gene expression. *Int J Clin Exp Pathol*, *90*(2), 131-140.

Okamura, H., J. Aramburu, C. García-Rodríguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*, *6*(3), 539-550

Olvera, N., P. Martínez, E. Real de León. 1993. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. FAO. México. Reporte No: FAO-FI-GCP. *RLA/102/ITA*, 110.

Palić, D., C. B. Andreasen, D. M. Herolt, B. W. Menzel, J. A. Roth. 2006. Immunomodulatory effects of β-glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Dev Comp Immunol*, *30*(9), 817-830.

Pandiyan, P., D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E. G. J. George, K. Subaramaniyan, S. Manikkam, B. Sadayappan. 2013. Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, *5*(1), 55-59.

Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh, I. Hirono, T. Kobayashi, H. Sugita, T. Aoki. 2007. Immune modulation nd expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol*, 31(4), 372-382.

Park, H., H. Zhou, E. Bengten, M. Wilson, V. G. Chinchar, L. W. Clem, N. W. Miller. 2002. Activation of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) T cells involves NFAT-like transcription factors. *Dev Comp Immunol*, 26(9), 775-784.

Park, S. C., M. H. Hwang, Y. H. Kim, J. C. Kim, J. C. Song, K. W. Lee, T. W. Kim. 2006. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World J Microbiol Biotechnol*, 22(1), 35-37.

Park, Y., M. Moniruzzaman, S. Lee, J. Hong, S. Won, J. M. Lee, S. C. Bai. 2016. Comparison of the effects of dietary single and multi-probiotics on growth, non-specific immune responses and disease resistance in starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Fish Shellfish Immunol*, 59, 351-357.

Pedersen, C., H. Jonsson, J. E. Lindberg, S. Roos. 2004. Microbiological characterization of wet wheat distillers' grain, with focus on isolation of *lactobacilli* with potential as probiotics. *Appl Environ Microbiol*, 70(3), 1522-1527.

Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, D. L. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol*, *31*(2), 196-201.

Peskin, A. V., C. C. Winterbourn. 2001. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. *Free Radic Biol Med*, 30(5), 572-579.

Peuker, K., S. Muff, J. Wang, S. Künzel, E. Bosse, Y. Zeissig, A. Kaser. 2016. Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development. *Nat Med*, 22(5), 506.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45-e45.

Pietretti, D., N. I. Vera-Jimenez, D. Hoole, G. F. Wiegertjes. 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 Immunol*, *35*(3), 847-857.

Pirarat, N., K. Pinpimai, M. Endo, T. Katagiri, A. Ponpornpisit, N. Chansue, M. Maita. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Sci*, 91(3), e92-e97.

Pliego, J., J. C. Mateos, J. Rodriguez, F. Valero, M. Baeza, R. Femat, E. J. Herrera-López. 2015. Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate. *Sensors*, *15*(2), 2798-2811.

Pooramini, M., A. Kamali, A. Hajimoradloo, M. Alizadeh, R. Ghorbani, R. Hatami, S. Haghparast. 2014. The effects of different concentrations of probiotic *Saccharomyces cerevisia* on growth performance and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fry and resistance against salinity. *Afr J Biotechnol*, 13(10).

Press, C. M., Ø. Evensen 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol*, 9(4), 309-318.

Prinz, I., B. Silva-Santos, D. J. Pennington. 2013. Functional development of γδ T cells. *Eur J Immunol*, *43*(8), 1988-1994.

Quade, M. J., J. A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol*, *58*(3), 239-248.

Rampelotto, P. H. 2013. Extremophiles and extreme environments.

Ranpura, S. A., U. Deshmukh, P. P. Reddi. 2008. NF45 and NF90 in murine seminiferous epithelium: potential role in SP-10 gene transcription. *J Androl*, 29(2), 186-197.

Rao, A., C. Luo, P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15(1), 707-747.

Rauta, P. R., B. Nayak, S. Das 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol Lett*, 148(1), 23-33.

Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu. 2008a. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280(1), 39-44.

Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu. 2008b. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 25(6), 731-739.

Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu, M. Á. Esteban. 2011. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult Res*, *42*(11), 1676-1686.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, J. Meseguer, S. T. Tapia-Paniagua, M. A. Moriñigo, M. Á. Esteban. 2012a. *Debaryomyces hans*enii L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult Res*, *43*(8), 1107-1118.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, M. E. Macías, M. Maldonado, M. Rojas, M. Á. Esteban. 2012b. Effects of marine silages enriched with *Lactobacillus sakei* 5-4 on haemato-immunological and growth response in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immunol*, *33*(4), 984-992.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio, V. Gracia-López, M. E. Macías, M. C. Roa, M. Á. Esteban. 2014. Single or combined effects of Lactobacillus sakei and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish Physiol Biochem*, 40(4), 1169-1180.

Reyes-Becerril, M., E. Alamillo, L. Sánchez-Torres, F. Ascencio-Valle, J. C. Perez-Urbiola, C. Angulo. 2016. Leukocyte susceptibility and immune response against *Vibrio parahaemolyticus* in *Totoaba macdonaldi*. *Dev Comp Immunol*, 65, 258-267.

Reyes-Becerril, M., C. Guluarte, D. Ceballos-Francisco, C. Angulo, M. Á. Esteban. 2017. Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, *64*, 165-175.

Rieger, A. M., K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, D. R. Barreda. 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*, (50).

Ringø, E., R. E. Olsen, I. Jensen, J. Romero, H. L. Lauzon. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Rev Fish Biol Fisher Journal*, *24*(4), 1005-1032.

Rocha-Olivares, A. 1998. Age, growth, mortality, and population characteristics of the Pacific red snapper, *Lutjanus peru*, off the southeast coast of Baja California, Mexico. *Fishery Bulletin*, *96*(3), 562-574.

Rodríguez, A., M. Esteban, J. Meseguer. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat Rec (Hoboken)*, 272(1), 415-423.

Rosa, C., G. Peter. 2006. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 370-417). Berlin: Springer.

Rothschild, L. J., R. L. Mancinelli. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, *409*(6823), 1092.

Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*, 1(1), 47-57.

Poynter, S., B. Dixon. 2017. Bony Fish Immunology, In Reference Module in Life Sciences, Elsevier, ISBN 9780128096338, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12178-8. (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338121788)

Sahasrabudhe, N. M., L. Tian, M. van den Berg, G. Bruggeman, E. Bruininx, H. A. Schols, P. de Vos. 2016. Endo-glucanase digestion of oat β-Glucan enhances Dectin-1 activation in human dendritic cells. *J Funct Foods*, *21*, 104-112.

Saijo, S., Y. Iwakura. 2011. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*, 23(8), 467-472.

Sattler, S., H. Ghadially, E. Hofer. 2012. Evolution of the C-type lectin-like receptor genes of the DECTIN-1 cluster in the NK gene complex. *ScientificWorldJournal*, 2012.

Satyanarayana, T., C. Raghukumar, S. Shivaji. 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Curr Sci*, 78-90.

Secombes, C. J., T. Wang. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. *Inf Disc Aquac Prev Control*, 231, 3-68.

Sekova, V. Y., E. P. Isakova, Y. I. Deryabina. 2015. Biotechnological Applications of the Extremophilic Yeast *Yarrowia lipolytica* (Review). *Prikl Biokhim Mikrobiol*, *51*(3), 290-304.

Sepulcre, M. P., E. Sarropoulou, G. Kotoulas, J. Meseguer, V. Mulero. 2007. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Mol Immunol*, *44*(15), 3751-3757.

Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik, A. Avots. 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1498(1), 1-18.

Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, A. Avots, S. Chuvpilo, S. Klein-Hessling, M. K. Jha, A. Palmetshofer 2004. NFAT and NF-κB factors—the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(7), 1166-1170.

Sherr, B. F., E. B. Sherr, R. D. Fallon. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl Environ Microbiol*, *53*(5), 958-965.

Smyth, M. J., R. W. Johnstone. 2000. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech*, *50*(3), 196-208.

Sommerset, I., B. Krossøy, E. Biering, P. Frost. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines*, *4*(1), 89-101.

Song, X., J. Hu, P. Jin, L. Chen, F. Ma. 2013. Identification and evolution of an NFAT gene involving *Branchiostoma belcheri* innate immunity. *Genomics*, *102*(4), 355-362.

Stow, J. L., P. C. Low, C. Offenhäuser, D. Sangermani. 2009. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*, 214(7), 601-612.

Subasinghe, R. P. 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Prev Vet Med*, *67*(2), 117-124.

Sullivan, C.,, C. H. Kim. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol*, *25*(4), 341-350.

Sunyer, J. O. 2013. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol*, *14*(4), 320-326.

Tafalla, C., E. Leal, T. Yamaguchi, U. Fischer. 2016. T cell immunity in the teleost digestive tract. *Dev Comp Immunol*, *64*, 167-177.

Tak, P. P., G. S. Firestein. 2001. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 107(1), 7-11.

Tanaka, T., M. Narazaki, T. Kishimoto. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *6*(10), a016295.

Thevenieau, F., J. M. Nicaud, C. Gaillardin. 2009. Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 589-613.

Tort, L., J. C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, *22*(3), 277-286.

Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, *204*(1), 113-123.

Uribe, C., H. Folch, R. Enriquez, G. Moran. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med*, 56, 486-503.

Urso, K., A. Alfranca, S. Martínez-Martínez, A. Escolano, I. Ortega, A. Rodríguez, J. M. Redondo. 2011. NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood*, 118(3), 795-803.

Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture*, *446*, 88-96.

Vandewalle, A., E. Tourneur, M. Bens, C. Chassin, C. Werts. 2014. Calcineurin/NFAT signaling and innate host defence: a role for NOD1-mediated phagocytic functions. *Cell Commun Signal*, 12(1), 8.

Villamil, L., A. Figueras, M. Planas, B. Novoa. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, *219*(1), 43-56.

Wang, H. J., J. Z. Shao, L. X. Xiang, J. Shen. 2006. Molecular cloning, characterization and expression analysis of an ILF2 homologue from *Tetraodon nigroviridis*. *BMB Reports*, *39*(6), 686-695.

Wang, L., M. Bassiri, R. Najafi, K. Najafi, J. Yang, B. Khosrovi, M. C. Robson. 2007. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds*, 6.

Wang, C., X. Yue, X. Lu, B. Liu. 2013. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol*, *34*(1), 91-99.

Wang, T,, C. J. Secombes. 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish Shellfish Immunol*, *35*(6), 1703-1718.

Wang, J. L., X. L. Meng, R. H. Lu, C. Wu, Y. T. Luo, X. Yan, G. X. Nie. 2015. Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, *435*, 293-300.

Wang, Y., Y. Wu, Y. Wang, H. Xu, X. Mei, D. Yu, W. Li. 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.

WHO, FAO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1-34.

Yale, J., H. J. Bohnert. 2001. Transcript Expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem*.

Yamazaki, W., M. Ishibashi, R. Kawahara, K. Inoue. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microb*, *8*(1), 163.

Yi, Q., R. Liu, R. Sun, L. Wang, Z. Zhou, M. Wang, L. Song. 2014. The protection of CpG ODNs and *Yarrowia lipolytica* harboring VP28 for shrimp *Litopenaeus vannamei* against White spot syndrome virus infection. *Invertebr Survival J*, *11*(1-3), 119-31.

Yuan, X. Y., W. B. Liu, C. Liang, C. X. Sun, Y. F. Xue, Z. D. Wan, G. Z. Jiang. 2017. Effects of partial replacement of fish meal by yeast hydrolysate on complement system and stress

resistance in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Shellfish Immunol*, 67, 312-321.

Zhang, H., B. Robison, G. H. Thorgaard, S. S. Ristow. 2000. Cloning, mapping and genomic organization of a fish C-type lectin gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta*, 1494(1-2), 14-22.

Zhang, S., B. Liao, X. Li, L. Li, L. Ma, X. Yan. 2012. Effects of yeast cell walls on performance and immune responses of cyclosporine A-treated, immunosuppressed broiler chickens. *Br J Nutr*, *107*(6), 858-866.

Zhang, C. N., J. L. Zhang, W. C. Guan, X. F. Zhang, S. H. Guan, Q. H. Zeng, W. Cui. 2017. Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var. *Fish Shellfish Immunol*, 68, 84-91.

Zinjarde, S. S., B. V. Kale, P. V. Vishwasrao, A. R. Kumar. 2008. Morphogenetic behavior of tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* in response to hydrophobic substrates. *J Microbiol Biotechnol*, *18*(9), 1522e8.

Zorriehzahra, M. J., S. T. Delshad, M. Adel, R. Tiwari, K. Karthik, K. Dhama, C. C. Lazado. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: An update on their multiple modes of action: A review. *Vet Q*, *36*(4), 228-241.

11. ANEXOS

ANEXO I.

Esta tesis está basada en los siguientes artículos, que serán referidos por sus números romanos:

I. **Alamillo, E**., Reyes-Becerril, M., Cuesta, A., Angulo, C. (2017). Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. *Fish & shellfish immunology, 70*, 48-56.

II. Angulo, C., **Alamillo, E.**, Ascencio, F., Reyes-Becerril, M. (2018). Characterization of nuclear factor of activated T-cells-c3 (NFATc3) and gene expression of upstream-downstream signaling molecules in response to immunostimulants in Pacific red snapper cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 149-159.

ANEXO II.

Secuencias depositadas en el GenBank:

I. Alamillo, E. *et al.* (2017). *Yarrowia lipolytica* isolate N6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. MF072935.1. GenBank (NCBI).

II. Alamillo, E. *et al.* (2017). *Yarrowia lipolytica* isolate D1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. MK020405. GenBank (NCBI).

III. Angulo, C. *et al*. (2018). *Lutjanus peru* nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 3 (NFATc3) mRNA, complete cds. KY594005.1. GenBank (NCBI).

IV. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* interleukin enhancer-binding factor 2 (ILF2) mRNA, complete cds. KY594006.1. GenBank (NCBI).

V. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* interleukin enhancer-binding factor 3 (ILF3) mRNA, complete cds. KY594007.1. GenBank (NCBI).

VI. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* calcineurin subunit B type 1 (CaN) mRNA, complete cds. MF347707.1. GenBank (NCBI).

VII. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* interleukin 6 (IL-6) mRNA, partial cds. MF136719.1. GenBank (NCBI).

VIII. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* interleukin 8 (IL-8) mRNA, complete cds. MF136720.1. GenBank (NCBI).

IX. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* interleukin 12 subunit beta (IL-12b) mRNA, partial cds. MF136722.1. GenBank (NCBI).

X. Angulo, C. *et al.* (2018 *Lutjanus peru* T-cell surface glycoprotein CD3 gamma/delta (CD3) mRNA, complete cds. MF347706.1. GenBank (NCBI).

XI. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* T cell receptor beta chain (TCR) mRNA, partial cds. MF347708.1. GenBank (NCBI).

XII. Angulo, C. *et al.* (2018). *Lutjanus peru* Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit (NFkb) mRNA, partial cds. MK012390. GenBank (NCBI).