



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO INMUNOESTIMULANTE DE β -GLUCANOS AISLADOS
DE *Cystobasidium benthicum* SOBRE CÉLULAS DEL TIMO DE
Totoaba macdonaldi.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Cristian Andres Machuca Valverde

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 13 del Mes de septiembre del 2021 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:

"Efecto inmunoestimulante de β -glucanos aislados de *Cystobasidium benthicum* sobre células del timo de *Totoaba macdonaldi*"

Presentada por el alumno:

Cristian Andres Machuca Valverde

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



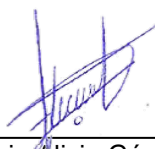
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dr. Yuniel Méndez Martínez
Co-Director de tesis



Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Co-Tutora de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 17 de septiembre de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Cristian Andres Machuca Valverde del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
Ithenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas, coincidencias y bibliografía
- Porcentajes de similitud:
8%
Se muestra captura de pantalla

resumen

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.reportworld.co.kr Internet	16 palabras – 3%
2	Jeong-Hwa Kim. "Immuno-stimulating and Antitumor Effects of Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of <i>Grifola frondosa</i> ", <i>The Korean Journal of Mycology</i> , 04/01/2011 Crossref	12 palabras – 2%
3	worldwidescience.org Internet	11 palabras – 2%
4	www.sabiia.cnptia.embrapa.br Internet	11 palabras – 2%

EXCLUIR CITAS

DESACTIVADO

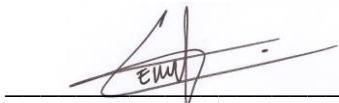
EXCLUIR COINCIDENCIAS

DESACTIVADO

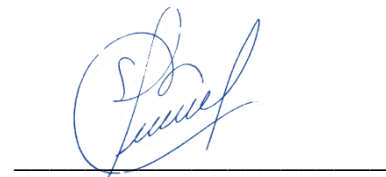
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

DESACTIVADO

Firmas del comité



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dr. Yuniel Méndez Martínez
Co-Director de Tesis



Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Co-Tutora de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

Dr. Yuniel Méndez Martínez
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Co-Director de Tesis

Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Yuniel Méndez Martínez
Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Yuniel Méndez Martínez
Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Suplente

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Resumen

La resistencia bacteriana ocasionada por el mal uso de antibióticos es un problema en la acuicultura de peces. Una alternativa es el uso de inmunoestimulantes como los β -glucanos de levaduras. Estas moléculas son capaces de modular el sistema inmune de peces e incrementar la protección contra patógenos. Son muy pocos los reportes sobre el efecto inmunoestimulante de β -glucanos en la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), un pez cultivado de importancia comercial. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del β -glucanos de *Cystobasidium benthicum* (β G-cyben) en células del timo de *T. macdonaldi*. Se probaron tres concentraciones 50, 100 y 200 μ g/mL sobre parámetros inmunes y la expresión de genes relacionados con el reconocimiento de β -glucano y funciones efectoras. Los análisis *in vitro* demostraron que la estimulación de β G-cyben por 24 horas es seguro para las células. Las células estimuladas con β G-cyben aumentaron la habilidad fagocítica, la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS), la explosión respiratoria (fgROS), y las actividades de mieloperoxidasa (MPO) y superóxido dismutasa (SOD) con todas las concentraciones. La producción de óxido nítrico (NO) solo se incrementó con las concentraciones de 100 y 200 μ g/mL. La transcripción de genes [*lectina de tipo C miembro 17a (clec17a)*, *toll like receptor-2 (tlr2)*, *receptor de manosa de macrófagos 1 (mmr)*, *receptor 2 del factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (mcsfr)* y *enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (gbe)*] aumentó en las células tratadas con la concentración de 200 μ g/mL; mientras que la expresión de *interleucina 1 beta (il-1 β)* se incrementó en células incubadas con la concentración de 50 μ g/mL. En conclusión, β G-cyben moduló parámetros inmunes y la expresión de genes en células del timo de *T. macdonaldi*, y podría ser un inmunoestimulante para totoaba en cultivo.

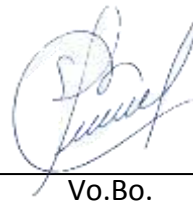
Palabras clave: *acuicultura, inmunoestimulante, sistema inmune.*

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2296-9552>



Vo.Bo.

Dr. Carlos Eiid Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Vo.Bo.

Dr. Yuniel Méndez Martínez
Co-Director de Tesis

Summary

Bacterial resistance caused by the misuse of antibiotics is a problem in fish aquaculture. An alternative is the use of immunostimulants such as yeast β -glucans. These molecules are capable of modulating the immune system of fish and increasing protection against pathogens. There are very few reports on the immunostimulant effect of β -glucans on totoaba (*Totoaba macdonaldi*), a cultivated fish of commercial importance. The objective of this work was to evaluate the effect of *Cystobasidium benthicum* β -glucans (β G-cyben) on *T. macdonaldi* thymus cells. Three concentrations 50, 100 and 200 μ g/mL were tested on immune parameters and the expression of genes related to β -glucan recognition and effector functions. In vitro analyzes demonstrated that stimulation of β G-cyben for 24 hours is safe for cells. Cells stimulated with β G-cyben increased phagocytic ability, mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) production, respiratory burst (fgROS), and myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) activities at all concentrations. Nitric oxide (NO) production only increased with concentrations of 100 and 200 μ g/mL. Gene transcription [*C-type lectin member 17a (clec17a)*, *toll like receptor-2 (tlr2)*, *macrophage mannose receptor 1 (mmr)*, *macrophage colony-stimulating factor receptor 2 (mcsfr)*, and *branching enzyme 1,4-alpha-glucan (gbe)*] increased in cells treated with the concentration of 200 μ g / mL; while the expression of *interleukin 1 beta (il-1 β)* was increased in cells incubated with the concentration of 50 μ g/mL. In conclusion, β G-cyben modulated immune parameters and gene expression in thymus cells of *T. macdonaldi*, and could be an immunostimulant for totoaba in culture.

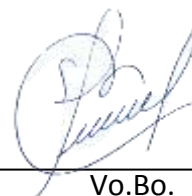
Key words: *aquaculture, immunostimulant, system immune.*

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2296-9552>



Vo.Bo.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Vo.Bo.

Dr. Yuniel Méndez Martínez
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mis padres Carlos Manuel Machuca Carrión y Pricilia del Rocío Valverde Ibarra.

A mis hermanos Luis, Carlos y mi primo Vinicio a quien considero como un hermano.

A mi tía Blanca y Bolívar Machuca.

A toda mi familia por creer en mí y apoyarme en este proceso.

Y en especial a mí mismo por la lucha y el esfuerzo diario por no dejarme vencer en la tristeza y la soledad.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No. CVU: 1014011.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por las instalaciones, profesores, personal administrativo, técnicos y por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A mi Comité Tutorial, Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, Dr. Yuniel Méndez Martínez y Dra. Martha Candelaria Reyes-Becerril, por la confianza, apoyo académico y enseñanzas durante todo el periodo académico de maestría. Al Dr. Carlos Angulo, mi Co-Director de Tesis quien siempre me apoyó, guio cuando lo necesitaba y por sus enseñanzas para mi formación profesional. Al Dr. Yuniel, mi Co-Director de Tesis quien confió, apoyó y aconsejó siempre tanto en lo académico como en lo personal. A la Dra. Martha, mi Co-Tutora por el apoyo, seguimiento y desarrollo de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Miriam Angulo y Dra. Martha, por el apoyo y acompañamiento en todos los parámetros inmunológicos realizados dentro del Laboratorio.

A la M.C. Verónica Sánchez por la ayuda prestada en el manejo de levadura, extracción y uso de β -glucanos.

A la granja productora de especies marinas Earth Ocean Farms por las facilidades con los peces para la obtención de células del timo utilizadas en el estudio *in vitro*.

A todos los Doctores y compañeros que conformamos el Grupo de Inmunología Vacunología.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Levadura <i>Cystobasidium benthicum</i>	3
2.2. β -glucanos	3
2.2.1. Características químicas de los β -glucanos.....	4
2.2.2. Actividad inmunoestimulante de β -glucanos de levaduras.....	5
2.2.3. Receptores que participan en el reconocimiento de β -glucano.....	6
2.2.3.1. Receptores Lectina de tipo C (Clr).....	6
2.2.3.2. Tlr2.....	7
2.2.4. Receptores mediadores de macrófagos	8
2.2.4.1. Receptor de manosa de macrófagos 1.....	8
2.2.4.2 Receptor 2 del factor estimulante de colonias de macrófagos 1	9
2.3. Sistema Inmune de los peces	9
2.3.1. Sistema inmune innato o inespecífico (SII)	9
2.3.1.1. Humoral.....	9
2.3.1.2. Celular	10
2.3.2. Sistema inmune adaptativo o específico (SIA)	12
2.3.2.1. Humoral.....	12
2.3.2.2. Celular	13
2.4. <i>Totoaba macdonaldi</i>	13
2.4.1. Características generales de la especie.....	15
2.4.2. Hábitos alimenticios.....	16
2.4.3. Cultivo.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1. Cepa de levadura	21
6.2. Extracción de β -glucano	21
6.3. Peces.....	21
6.4. Evaluación in vitro	22
6.4.1. Aislamiento de células de timo	22
6.4.2. Estimulación de células del timo.....	22

6.4.3.	Viabilidad celular	23
6.5.	Parámetros inmunológicos.....	23
6.5.1.	Fagocitosis por rojo neutro	23
6.5.2.	Inducción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial.....	23
6.5.3.	Actividad de explosión respiratoria	24
6.5.4.	Actividad mieloperoxidasa	24
6.5.5.	Producción de óxido nítrico	24
6.5.6.	Superóxido dismutasa	25
6.6.	Análisis de la expresión de genes	25
6.7.	Análisis estadísticos	26
7.	RESULTADOS	27
7.1.	Viabilidad celular de células del timo de Totoaba tratadas con β G-cyben.....	27
7.2.	Parámetros inmunológicos.....	27
7.2.1.	Fagocitosis	27
7.2.2.	Inducción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS)	28
7.2.3.	Explosión respiratoria (generación de especies reactivas de oxígeno en la fagolisosoma)	29
7.2.4.	Actividad Mieloperoxidasa (MPO)	29
7.2.5.	Producción de Óxido nítrico (NO)	30
7.2.6.	Actividad Superóxido dismutasa (SOD).....	31
7.3.	Expresión génica.....	31
7.3.1.	Expresión de genes de receptores implicados en el reconocimiento de β -Glucanos	31
7.3.2.	Expresión de los genes interleucina-1 β (<i>il-1β</i>) y enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (<i>gbe</i>)	33
8.	DISCUSIÓN	35
9.	CONCLUSIONES	40
10.	LITERATURA CITADA	41

Lista de figuras

- Figura 1.** Estructura tridimensional y química del β -glucano de levadura. Obtenido de (Volman *et al.*, 2008).....5
- Figura 2.** Distribución geográfica de *T. macdonaldi*, (Arvizu and Chávez, 1972).....15
- Figura 3.** Viabilidad de células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL). Las células del timo sin tratamiento (PBS) como control positivo y tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo a 24 h post-estimulación. La viabilidad celular se determinó por la técnica de resazurina. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. .27
- Figura 4.** Células fagocíticas del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La proporción células fagocíticas se determinó por la técnica de rojo neutro. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.28
- Figura 5.** Producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS) en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La producción de mtROS se determinó utilizando diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF-DA). Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.28
- Figura 6.** La actividad de explosión respiratoria o producción de especies reactivas de oxígeno en la fagolisosoma (fgROS) en células del timo de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La producción fgROS se determinó por la técnica de NBT. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.29
- Figura 7.** Actividad mieloperoxidasa en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.....30
- Figura 8.** Producción de óxido nítrico en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La producción de NO se determinó por la concentración de nitritos utilizando la reacción de Griess.

Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.30

Figura 9. Actividad superóxido dismutasa en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La actividad SOD se determinó por el porcentaje de inhibición enzimática. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.31

Figura 10. Expresión génica de (a) *lectina de tipo c 17-a (clec17a)* y (b) *receptor de tipo toll 2 (tlr2)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1 α* como gen de referencia. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.32

Figura 11. Expresión génica del (a) *receptor de manosa de macrófagos 1 (mmr)* y (b) *factor estimulante de colonias de macrófagos 1, receptor 2 (mcsfr)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1 α* como gen de referencia. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.33

Figura 12. Expresión génica de (a) *Interleucina-1 beta (il-1 β)* y (b) *enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (gbe)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1 α* como gen de referencia. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.34

Lista de tablas

Tabla 1. Estructura de β -glucanos según su origen.	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Totoaba macdonaldi</i>	14
Tabla 3. Parámetros de cultivo de la <i>Totoaba macdonaldi</i>	17
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real.	26

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades por patógenos en la producción de peces es uno de los principales problemas que enfrenta la acuicultura. Para su control y prevención se usan antibióticos, pero el uso inadecuado ha generado resistencia en los patógenos. El impacto de los antibióticos creció hasta ser un grave problema para las diferentes especies de peces cultivadas (Rios *et al.*, 2016; Sorroza Ochoa *et al.*, 2017). Ante esta situación se han propuesto enfoques alternativos como la administración inmunoestimulantes capaces de modular respuestas inmunoprotectoras contra patógenos (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2012).

Los inmunoestimulantes son compuestos naturales o sintéticos que modulan el sistema inmune (Dalmo & Børgwald, 2008). Entre ellos se encuentran elementos estructurados como los β -glucanos presentes en células de bacterias, cereales, hongos y levaduras (Volman *et al.*, 2008; Caruffo *et al.*, 2013; Vetvicka *et al.*, 2013). Los β -glucanos son polisacáridos cuyos efectos son atribuidos a su complejidad estructural de sus enlaces y ramificaciones laterales (β -1,3 y β -1,6) y por presentar altos pesos moleculares (Reyes-Becerril *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020). En diferentes especies de peces se han demostrado los efectos de los β -glucanos de levaduras sobre el sistema inmune (Aramli *et al.*, 2015; Miest *et al.*, 2016). En los peces, los β -glucanos son reconocidos por receptores extracelulares (*lectina c*, *tlr 2/6* y *cr3*) que modulan respuestas celulares y humorales (Petit *et al.*, 2019; Reyes-Becerril *et al.*, 2020) e incrementan la resistencia a enfermedades causadas por diferentes patógenos (Gopalakannan & Arul, 2010; Lokesh *et al.*, 2012; Reyes-Becerril *et al.*, 2018).

La levadura marina *Cystobasidium benthicum* se ha propuesto candidata para diferentes aplicaciones biotecnológicas (Yurkov *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015) pero solo existe un estudio de sus β -glucanos sobre el sistema inmune que fue realizado en esplenocitos de ratón (Sanchez *et al.*, 2021).

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es un pez cultivado recientemente en México y se cuenta con algunos estudios sobre su sistema inmune. Pertenece a la familia de las curvinas (*Sciaenidae*), endémico del Alto Golfo de California (Flanagan and Hendrickson, 1976). Por la sobreexplotación pesquera del buche (vejiga natatoria), su pesca está prohibida desde 1975 y es

una especie en peligro crítico de extinción (Cisneros-Mata *et al.*, 1995; SEMARNAT, 2018). Su cultivo en cautiverio empezó con fines de repoblamiento, pero en la actualidad es de las más importantes para el desarrollo de la acuicultura marina por los altos índices de crecimiento, conversión alimenticia y calidad de carne (True, 2012; Paredes Martínez, 2018).

La Totoaba presenta una característica muy interesante la cual puede ser aprovechada para realizar estudios inmunológicos. En peces producidos en granja con pesos comerciales entre 5 a 7 Kg presentan el órgano hematopoyético primario (Timo) de buen tamaño y visualmente funcional. En vertebrados como mamíferos, anfibios, aves y peces el timo involuciona perdiendo su tamaño y funcionalidad con el transcurso de la edad (Rezzani *et al.*, 2014). Al parecer en teleósteos este proceso de involución (Fishelson, 1995) está relacionado con la estacionalidad (Barraza *et al.*, 2021) y en la Totoaba no se ha descrito.

De los pocos estudios realizados sobre el sistema inmune de la totoaba han reportado que el uso de β -glucanos son una excelente opción para la prevención de enfermedades (Angulo *et al.*, 2019). Por lo anterior y a los pocos estudios realizados en el sistema inmune de la *Totoaba macdonaldi*, este proyecto de investigación se enfocó en la extracción y caracterizaron de los β -glucanos de *Cystobasidium benthicum* (β G-cyben) para su evaluación sobre parámetros y la expresión de genes relacionados al sistema inmune en células del timo de la *Totoaba macdonaldi*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Levadura Cystobasidium benthicum*

La levadura pigmentada *C. benthicum* ha sido aislada de bentos, flora y fauna de las profundidades del mar (Zhang *et al.*, 2013). Pertenece al género *Cystobasidium* que está conformado por 17 especies, entre ellas *Cystobasidium benthicum* (Yurkov *et al.*, 2014) o conocida anteriormente por su sinónimo *Rhodotorula benthica* (Nagahama *et al.*, 2003).

La mayoría de las especies del género *Rhodotorula* incluidas en el orden Cystobasidiales (*R. benthica*, *R. calyptogenae*, *R. laryngis*, *R. lysiniphila*, *R. minuta*, *R. pallida*, *R. pinicola* y *R. slooffiae*) presentan características morfológicas y fisiológicas similares. Las células son subglobosas a esféricas, simples o en pares con gemación predominantemente polar. Las colonias son brillantes, de butíricas a mucosas y lisas con márgenes enteros. El color de la colonia es típicamente rosado. *C. benthicum* muestra patrones de asimilación de carbono, pero es incapaz de asimilar salicina (Laich *et al.*, 2013).

En cuanto a las características fisiológicas de *C. benthicum*, una de las diferencias más importantes entre especies pertenecientes a su género es la capacidad de crecer a temperaturas superiores a 35 ° C (Laich *et al.*, 2013). Esta levadura posee concentraciones altas de nutrientes, como proteínas, vitaminas, ácidos grasos, carotenoides y antioxidantes potentes como la astaxantina que podría ser un buen aditivo para dietas acuícolas (Zhang *et al.*, 2013).





2.2. *β-glucanos*

El polisacárido β -glucano está compuesto por monómeros D-glucosa ligados a enlaces glucosídicos. Pertenecen a un grupo muy diverso de moléculas con diferente configuración tridimensional, masa molecular, solubilidad y viscosidad, a las cuales influyen diferentes respuestas biológicas (C.Ooi & Liu, 2000; Han *et al.*, 2020). Los β -glucanos constituyen el principal componente estructural de la pared celular de varios organismos: algas marinas, bacterias, cereales, hongos y levaduras (Caruffo *et al.*, 2013). En general estos compuestos están clasificados como modificadores de respuesta biológica (BRM; por sus siglas en inglés) (Han *et al.*, 2008).

2.2.1. Características químicas de los β -glucanos

La estructura macromolecular, el tipo de enlaces de la cadena principal y de sus ramificaciones, dependen de la fuente de donde se obtienen los β -glucanos. Estos pueden ser obtenidos de la pared celular de algunos cereales (avena y cebada) compuestos de cadenas no ramificadas con enlaces β -1,3 y β -1,4 (Volman *et al.*, 2010; Pizarro *et al.*, 2014). Los β -glucanos de hongos y levaduras están compuestos principalmente por enlaces β -1,3 lineales con características de solubilidad (agua y álcali) y ramas laterales β -1,6 insolubles en agua (Kim *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015). En general, los β -glucanos con enlaces β -1,6 generan una respuesta inmunoestimulante fuerte y mayormente prolongada. Y al extraerlos de las paredes celulares pueden formar esferas huecas y porosas de 2–5 μm (Xie *et al.*, 2016).

Tabla 1. Estructura de β -glucanos según su origen.

Origen del β -glucano	Estructura	Enlaces
Bacteria		Lineal con enlaces β -1,3
Cereal		Lineal con enlaces β -1,3 y β -1,4
Hongo		Lineal con enlaces β -1,3 con ramificaciones cortas β -1,6
Levadura		Lineal con enlaces β -1,3 con ramificaciones largas β -1,6

Modificado de (Volman *et al.*, 2008).

La actividad estimulante está relacionada directamente con la fuente de origen. Los β -glucanos de levaduras y hongos, a pesar de poseer enlaces y ramificaciones similares, pero difieren en la longitud, ya que los de levaduras tienen cadenas más largas (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017). Las diferencias en el tipo de enlace y de ramificación influyen el tamaño de la molécula, su estructura terciaria, su carga eléctrica, su conformación en solución (triple hélice o simple, o espiral aleatoria) y sus propiedades de solubilidad (Kim *et al.*, 2011).

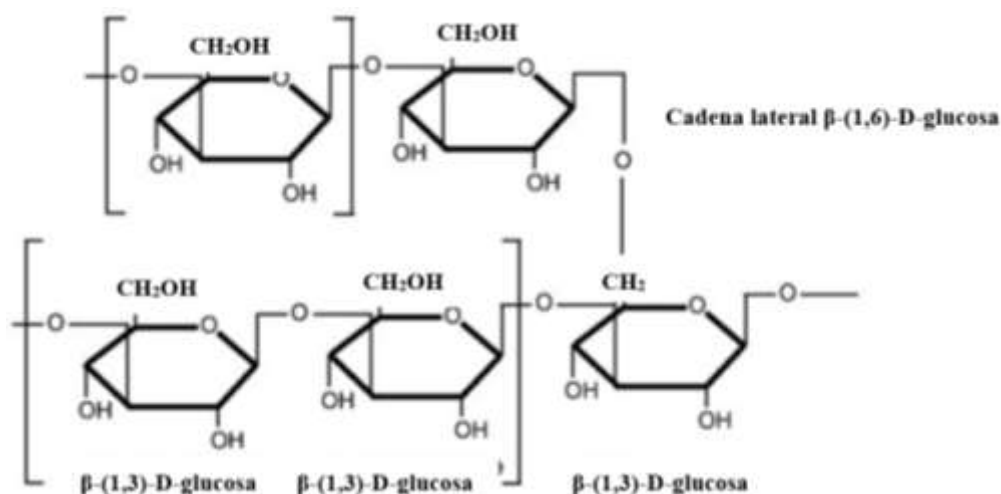


Figura 1. Estructura tridimensional y química del β -glucano de levadura. Obtenido de (Volman *et al.*, 2008).

Los β -glucanos generalmente producidos por levaduras son descritos por sus efectos inmunomoduladores (Bohn and BeMiller, 1995). La estructura tridimensional y la actividad biológica de los β -glucanos de levaduras, compuestas por enlaces β -1,3 y enlaces con ramificaciones β -1,6 (Tabla 1) y con mayor peso molecular (650 - 700. KDa), corresponden a las formas más activas (Caruffo *et al.*, 2013; Pizarro *et al.*, 2014).

2.2.2. Actividad inmunoestimulante de β -glucanos de levaduras

Los efectos biológicos de los β -glucanos se han estudiado desde hace más de 30 años, como los relacionados con la actividad inmunoestimulante. En la salud humana se han evaluado como inmunoterapéutico para combatir el cáncer (Zhang *et al.*, 2018). Sus efectos también se han evaluado en otros vertebrados como roedores, peces, vacas y cerdos, entre otros (Novak & Vetvicka, 2009; Zhu *et al.*, 2016).

Estudios en peces indican que los β -glucanos de levaduras modulan respuestas en el sistema inmune y brindan de protección contra retos infecciosos (Velazquez-Carriles *et al.*, 2018)(Sabioni *et al.*, 2020). *In vivo* mejora la supervivencia contra infecciones por patógenos como *Edwardsiella ictaluri* (Welker *et al.*, 2012), *Yersinia ruckeri* (Ghaedi *et al.*, 2015), *Edwardsiella ictaluri* (Sirimanapong *et al.*, 2015) y *Aeromonas. hydrophila* (Nguyen *et al.*, 2019). En células inmunes de peces se ha reportado resistencia contra *Vibrio parahaemolyticus* (Angulo

et al., 2018) y *Aeromonas hydrophila* (Reyes-Becerril *et al.*, 2018). Esto es atribuido por la activación del sistema inmune (inmunomodulación) y adicionalmente genera aumentos en el rendimiento productivo (inmunonutrición) (Aramli *et al.*, 2015). En peces teleósteos se ha observado que los β -glucanos modulan parámetros inmunes como la capacidad fagocítica, explosión oxidativa, actividades lisozima, del complemento y antioxidante (Franco Montoya *et al.*, 2017; Reyes-Becerril *et al.*, 2018).

2.2.3. Receptores que participan en el reconocimiento de β -glucano

El β -glucano es reconocido por los peces como una sustancia clasificada como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Pionnier *et al.*, 2014)(Ballou *et al.*, 2016). El reconocimiento de los β -glucano es a través de sinapsis inmunológicas con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Chaosomboon *et al.*, 2017).

2.2.3.1. Receptores Lectina de tipo C (Clr)

Los Clr (por sus siglas en inglés) forma una familia grande de receptores capaces de reconocer carbohidratos presentes en patógenos y han sido los más descritos para β -glucanos (Petit *et al.*, 2019). Los Clr son clasificados por la presencia de al menos un dominio de tipo lectina de tipo C (Clec) o dominio de reconocimiento de carbohidratos (Crd); y son definidos por secuencia y homología estructural, en lugar de evidencia funcional (Zelensky and Gready, 2005). Al unirse conjuntamente con la tirosina quinasa del bazo (Syk) generan la transducción de señales intracelulares río abajo por las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (Mapkin2) y del factor nuclear kappa B ($\text{Nf-}\kappa\beta$) (Pietretti *et al.*, 2013; Kiron *et al.*, 2016). Como resultado median diversos procesos celulares cruciales, incluidos la adhesión y la estimulación rápida de los mecanismos de defensa contra patógenos (Drickamer and Taylor, 1993).

En mamíferos se estudia ampliamente un receptor de tipo Clr (Dectina-1) perteneciente a la familia siete del dominio de lectina de tipo C A (Clec7a). Dectina-1 se expresa ampliamente por monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DC) y en un nivel inferior en una subpoblación de células T (Herre *et al.*, 2004). En el genoma de los peces, hasta ahora no se ha identificado un homólogo claro de Dectin-1, pero se han caracterizado varios tipos de lectinas fundamentales para el desarrollo de inmunidad contra patógenos. Es por ello que los efectos

inmunomoduladores de β -glucanos son desencadenados por miembros de la familia Clr que parecen activar una vía de señalización clásica diferente de la Dectina-1 (Petit *et al.*, 2019).

En teleósteos marinos se han caracterizados varios tipos de Clr. El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) presenta tres tipos *clra*, *clrb* y *clrc* expresados en tejidos, leucocitos de sangre periférica y riñón cefálico (Soanes *et al.*, 2004). El pez ayu (*Plecoglossus altivelis*) presenta Clr que se une a bacterias Gramnegativas y Grampositivas en ausencia de Ca^{2+} , y regula la fagocitosis y muerte bacteriana de monocitos/macrófagos (MO/M ϕ) (Yang *et al.*, 2015). En ese mismo pez también identificó otro Clr que aglutina varias bacterias Gram negativas y Gram positivas de una manera dependiente de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2015). En la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) se caracterizó molecularmente un receptor de la familia de lectinas tipo C 17 miembro A (Clec17A) (Angulo *et al.*, 2019).

De igual manera en teleósteos de agua dulce también se ha reportado Clr. El cíclido (*Paralabidochromis chilotes*) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) expresa Clr en células NK (Sato *et al.*, 2003). La carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang *et al.*, 2014), el besugo (*Megalobrama amblycephala*) (Zhao *et al.*, 2015) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Zheng *et al.*, 2015), presentan receptores de lectina de tipo C. Además, el homólogo del pez cebra CD209 (receptor similar a la lectina) se ha relacionado con el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Lin *et al.*, 2009).

2.2.3.2. Tlr2

El receptor de tipo toll 2 perteneciente a la familia de los PRR encargados de reconocer PAMP (Pasare and Medzhitov, 2004). Los TLRs Inician un proceso bien coordinado de cascadas de señalización que resultan en la inducción de respuesta inmune innata para limitar o erradicar patógenos (Acheh *et al.*, 2016). El TLR2 ha sido ampliamente estudiado y categorizado como un receptor de β -glucano (Yadav and Schorey, 2006). El Tlr2 actúa conjuntamente con la proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (Myd88) que inicia la cascada de señalización que activa el complejo proteico Nf- κ B encargado de la transcripción de genes, entre ellos los proinflamatorios (O'Neill and Bowie, 2007). TLR2 se localiza en la superficie

membranal de células presentadoras de antígeno, macrófagos, monocitos, neutrófilos y en diversas células inmunitarias no profesionales (Lee *et al.*, 2014).

En los peces se ha demostrado que este receptor de tipo Tlr está involucrado en el reconocimiento de β -glucanos. La expresión del gen *tlr2* ha sido regulado y reportado en diferentes teleósteos después de la estimulación con β -glucano de levaduras, como la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) (Chirapongsatunkul *et al.*, 2019) y el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) (Reyes-Becerril *et al.*, 2020).

2.2.4. Receptores mediadores de macrófagos

2.2.4.1. Receptor de manosa de macrófagos 1

El receptor de manosa (Mr) es un subgrupo perteneciente a la superfamilia de las lectinas de tipo C (East and Isacke, 2002). Inicialmente se identificó como un receptor endocítico en macrófagos alveolares (M ϕ) de conejo. La expresión de *mr* no es M ϕ -restringido, sino que también es expresado por células mesangiales renales, endotelios hepáticos y linfáticos (Taylor *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2006). Constituye un elemento principal para el reconocimiento de patógenos por el sistema inmune innato y tiene un papel bien establecido en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

El receptor Mr es una proteína transmembranal de tipo I que contiene tres tipos de dominios extracelulares. El primer dominio es rico en cisteína capaz de unirse independientemente a azúcares sulfatados (Taylor *et al.*, 2005). El segundo dominio es de fibronectina tipo II involucrado en la unión a colágeno (Martinez-Pomares *et al.*, 2006) y dominios similares a la lectina de tipo C que reconoce patrones de azúcares o Crd (manosa, fucosa, N-acetilglucosamina) (Stahl and Ezekowitz, 1998). Estudios en modelos animales se puede unir a ligandos de origen microbiano, ya que la manosa se encuentra con frecuencia en la superficie de muchos microorganismos (Gazi and Martinez-Pomares, 2009). Mr se une a diversos patógenos, incluidos *Candida albicans* (Ezekowitz *et al.*, 1990), *Pneumocystis carinii* (Ezekowitz *et al.*, 1991), *Mycobacterium tuberculosis* (Tailleux *et al.*, 2003).

En peces Mr también constituye un elemento principal para el reconocimiento de patógenos por el sistema inmune innato. Su reconocimiento está implicado directamente en la fagocitosis de diferentes especies de peces como el besugo (*Megalobrama amblycephala*) (Zhao *et al.*, 2015) y la dorada (*Sparus aurata* L.) (Esteban *et al.*, 2004).

2.2.4.2 Receptor 2 del factor estimulante de colonias de macrófagos 1

El receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (Mcsfr), pertenece grupo de receptores de proteína tirosina quinasa (Ueda *et al.*, 2016). Está involucrada en la proliferación y diferenciación de los precursores de células mieloides, en la estimulación funcional de células mononucleares como monocitos y macrófagos (Roca *et al.*, 2006; Katzenback & Belosevic, 2012). El Mcsfr se requiere para la producción continua de macrófagos que cumplen funciones muy importantes como el mantenimiento de la homeostasis y la respuesta inmune innata en condiciones normales y de emergencia. El Mcsfr se ha identificado en diferentes especies de peces teleósteos como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Honda *et al.*, 2005), pez cebra (*Danio rerio*) (Herbomel *et al.*, 2001) y la dorada (*Sparus aurata* L.) (Roca *et al.*, 2006).

2.3. Sistema Inmune de los peces

Los peces tienen un sistema inmune bien desarrollado e integrado, y presentan muchas funciones similares a los vertebrados superiores. Se divide en dos tipos el sistema inmune innato o inespecífico (SII) y adquirido o específico (SIA).

2.3.1. Sistema inmune innato o inespecífico (SII)

Más del 98 % de los organismos pluricelulares pueden mantener su integridad gracias a un SII, este es la primera línea de defensa contra infecciones (Werling and Jungi, 2003).

2.3.1.1. Humoral

La actividad humoral es un sistema de reconocimiento conservado en la línea evolutiva. El mucus es la barrera primaria de defensa externa de los peces, es secretado por la epidermis e internamente cubre todas las paredes del tracto digestivo y branquias (Guardiola *et al.*, 2015). Contiene carbohidratos y proteínas como aglutininas, inmunoglobulinas, lectinas, lisozimas,

mucinas, precipitinas, proteasas y proteína C-reactiva (CRP), las cuales constituyen una barrera de defensa química primaria. Estos compuestos tienen una función de protección ante bacterias, hongos y parásitos (Valdenegro-Vega *et al.*, 2014; Fæste *et al.*, 2020). El suero sanguíneo es otro componente que contiene diferentes moléculas como aglutininas, antiproteasas, citocinas, CRP, IgM, lisozima, transferrina y el sistema del complemento que aparecen por periodos breves durante picos febriles (Magnadóttir, 2006; Ceballos-Francisco *et al.*, 2018). Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular que participan como moduladores de la inmunidad innata. De este grupo se encuentran las interleucinas que generan actividades proinflamatorias y antiinflamatorias para combatir agentes extraños (Secombes *et al.*, 2011). Los interferones son moléculas comunicadoras celulares que desencadenan respuestas en ellas para la erradicación de patógenos (Stosik *et al.*, 2021). El conjunto constituido por más de 20 pro-enzimas, conocido como sistema del complemento, es un componente importante para la inmunidad humoral. Su función es la opsonización de virus, bacterias, parásitos y células moribundas iniciado a través de tres vías: clásica (CP), lectina (LP) y alternativa (AP) que inducen a la inflamación (Merle *et al.*, 2015). Otra molécula importante es la lisozima, una enzima que se encuentra en células mieloides en mucus, suero y en tejidos hematopoyéticos como riñón cefálico, bazo y el intestino de los peces (Balfry and Iwama, 2004). Es una molécula clave del SII cuya función es la lisis celular de bacterias Gram-positivas (Safarian *et al.*, 2016).

2.3.1.2. Celular

El sistema inmune innato se compone también por células de la línea mieloide como las asesinas naturales (NK) y fagocíticas. De estas últimas hay un grupo conocido como fagocitos profesionales estas realizan un proceso conocido como actividad de explosión respiratoria leucocitaria (Biller and Takahashi, 2018).

En teleósteos las células NK juegan un papel similar a la de los vertebrados superiores, se las encuentra en el bazo, riñón cefálico, sangre periférica y el timo (Zhou *et al.*, 2016). No es una célula adherente y requiere de monocitos/macrófagos como efectores para realizar el proceso de citólisis (Fischer *et al.*, 2006).

Las células fagocíticas cumplen un proceso muy importante en el mecanismo de defensa celular, el cual consiste en la ingestión y digestión de patógenos o partículas extrañas (Biller and Takahashi, 2018). Esta actividad es una reacción de defensa celular de teleósteos y otros organismos que se divide en dos tipos mononucleares y granulocitos.

Los leucocitos mononucleares son denominados así por presentar un solo núcleo. Estos son los monocitos/macrófagos juegan un papel clave en la respuesta inmunitaria de los teleósteos (Sha *et al.*, 2017). Como los monocitos que son fagocitos grandes que tienen un citoplasma vacuolado y basofílico en algunas especies de peces se encuentran en la sangre y riñón cefálico (Secombes and Wang, 2012). En cambio, los macrófagos son derivadas de los monocitos, estos son de mayor tamaño por ende pueden fagocitar partículas más grandes (Sha *et al.*, 2017). En teleósteos se encuentran abundantemente en riñón cefálico, bazo, sangre periférica, timo y su extensión llega hasta las branquias y la cavidad corporal (Secombes and Wang, 2012). Poseen grandes cantidades de enzimas en sus lisosomas y especies reactivas de oxígeno producidas durante la fagocitosis (Magnadottir *et al.*, 2011).

Los granulocitos o polimorfonucleares son fagocitos móviles activos se encuentran en todos los vertebrados tienen gránulos lisosomales en el citoplasma, mitocondrias, vacuolas y otros organelos (Lim *et al.*, 2017). En vertebrados hay cuatro tipos: neutrófilos, eosinofílicos, mastocitos y basófilos (Breedveld *et al.*, 2017). Pero en peces, la distribución y funciones de los granulocitos no imitan a sus homólogos de mamíferos ni a otros componentes de su sistema inmunológico (Esteban *et gal.*, 2013).

Los neutrófilos poseen un núcleo excéntrico multilobulado (dos o tres) (Zhu *et al.*, 2017). En peces se localizan en los tejidos hematopoyéticos de riñón cefálico, bazo, en el sistema circulatorio, y aumentan en las lesiones inflamatorias (Palić *et al.*, 2005). Son considerados como auténticos fagocitos profesionales capaces de generar una intensa actividad de explosión respiratoria. Además responden a mecanismos de reconocimiento, opsonización y poder bactericida extracelular (Lamas and Ellis, 1994).

Los eosinófilos poseen un núcleo bilobulado, excéntrico, y citoplasma con gránulos alargados o esféricos que juntamente con los neutrófilos son los más comunes en peces. Se encuentran en

el tejido conectivo como el tracto gastrointestinal y branquias pero también en corazón, piel, sistema nervioso central y nervio óptico (Penagos *et al.*, 2009)(Balla *et al.*, 2010). En el caso de los basófilos y mastocitos se conoce muy poco sobre ellos y se cree que pueden estar ausentes en algunas especies de peces (Hine, 1992).

2.3.2. Sistema inmune adaptativo o específico (SIA)

Los peces al igual que los mamíferos poseen un sistema inmune adaptativo con dos componentes fundamentales: celular y humoral (Secombes and Wang, 2012).

2.3.2.1. Humoral

Los linfocitos B y T son de tamaño pequeño con un solo núcleo redondo y son producidos por el timo y riñón cefálico. Estas se dividen y obtienen la capacidad de diferenciarse en células secretoras de anticuerpos (células plasmáticas de larga duración) y células B de memoria (Díaz-Rosales *et al.*, 2019). Son células productoras de anticuerpos que reconocen antígenos microbianos (Peñaranda *et al.*, 2019).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que componen la inmunidad humoral del SIA. Las inmunoglobulinas son producidas por linfocitos B y funcionan como los medidores de respuestas eficientes para la aniquilación de patógenos específicos (Rauta *et al.*, 2012). En teleósteos hasta la fecha se han encontrado diferentes isotipos de inmunoglobulinas como: IgM, IgD e IgT/Z (Ye *et al.*, 2013).

La IgM predomina en el suero y el moco de teleósteos y es uno de los anticuerpos más antiguos en la historia evolutiva. Es conocida como una macroglobulina por la capacidad de interaccionar con otras moléculas de IgM formando un complejo tetramero de gran tamaño y peso molecular (Bromage *et al.*, 2006). Los dominios de C de la cadena tetramérica codifican sitios para la unión con el complemento, lectinas, células efectoras y citotóxicas (Ye *et al.*, 2013). Entre las características funcionales esta se encuentra en el suero naturalmente antes del contacto con el antígeno (Boes, 2000). La aglutinación facilita la fagocitosis y contribuye a la opsonización de patógenos con la activación del complemento (Ye *et al.*, 2013).

En teleósteos el papel funcional específico de la IgD aún no se ha determinado concluyentemente. Se ha conservado a lo largo de la evolución como un sistema de vigilancia y defensa (Ramirez-Gomez *et al.*, 2012). Esta molécula se une a basófilos y mastocitos activando los factores antimicrobianos (Chen *et al.*, 2009).

Las moléculas ortólogas en la trucha y el pez cebra se publicaron al mismo tiempo y se denominaron IgT e IgZ, respectivamente para cada especie (Hansen *et al.*, 2005; Danilova *et al.*, 2005). Sus cadenas presentan cuatro dominios como la IgM, pero el número de dominios varía entre otros teleósteos. Su funcionalidad es localizada en las mucosas principalmente en el intestino (Ye *et al.*, 2013).

2.3.2.2. Celular

Los linfocitos T resultantes en su diferenciación pueden ser encargados de la inmunidad celular. Los linfocitos T reclutan otros tipos celulares como los macrófagos pertenecientes a la línea mieloide para mejorar la eficiencia de la respuesta. Ante un estímulo antigénico, y posterior la activación linfocitaria T, se produce la diferenciación a células T citotóxicas (CD8), especializadas en la lisis por contacto físico de células infectadas con patógenos intracelulares. Las células T colaboradoras (CD4), a diferencia de las anteriores, se encargan de la activación y dirección de otras células a través de la expresión de proteínas superficiales.

2.4. *Totoaba macdonaldi*

La *Totoaba macdonaldi* es el pez más grande de la familia de las curvinas (Sciaenidae) (Flanagan & Hendrickson, 1976; Cisneros-Mata *et al.*, 1995; Ramcharitar *et al.*, 2006). Especie con gran potencial para la diversificación de la acuicultura marina por sus características biológicas, como altas tasas de crecimiento, índices de conversión alimentaria y calidad de carne (Paredes Martínez, 2018). Anteriormente se clasificó como *Cynoscion macdonaldi* y se reclasificó en el género *Totoaba* hasta que se realizó un estudio morfológico en la vejiga natatoria y los poros de la mandíbula (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Esta especie se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Totoaba macdonaldi*.

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Sciaenidae-
Género	<i>Totoaba</i>
Especie	<i>macdonaldi</i> (Gilbert, 1890)

Tomado de (Coronel-Yáñez, 2016).

Es un pez endémico del Golfo de California y se distribuye desde el Delta del Río Colorado hasta el Río Fuerte en Sinaloa y Bahía Concepción del lado peninsular (Figura 2) (Flanagan and Hendrickson, 1976). En reportes actuales indican que la distribución es similar a la que se reportan décadas atrás (Valenzuela-Quiñónez *et al.*, 2011; de Anda-Montañez *et al.*, 2013; Valenzuela-Quiñónez *et al.*, 2015). Recientemente se encontraron especímenes en el sur del Golfo (La Paz, Baja California Sur y Mazatlán, Sinaloa) a una profundidad de 50 m (Rodríguez-García *et al.*, 2020).

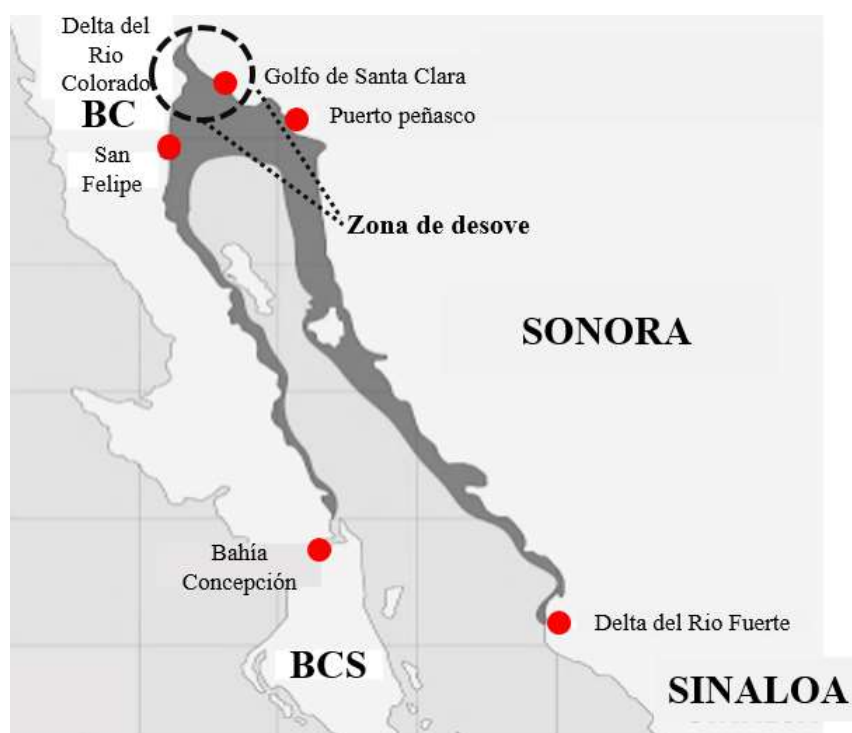


Figura 2. Distribución geográfica de *T. macdonaldi*, (Arvizu and Chávez, 1972).

2.4.1. Características generales de la especie

La pesca de esta especie está prohibida desde 1975 y está incluida en la lista CITES, IUCN y en la NOM-059 en México. Actualmente está en peligro crítico de extinción en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y enlistada en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (SEMARNAT, 2018). Su sobreexplotación pesquera se originó por el alto valor económico del buche (vejiga natatoria) en mercados internacionales como China (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). También es capturado incidentalmente por ser un pez demersal en la pesca de camarón y en la pesca deportiva (Flanagan and Hendrickson, 1976).

Es un pez que vive entre los 25 a 50 años, pero presenta una tasa de repoblamiento muy baja de acuerdo a su edad (Roman-Rodriguez, 1994; Cisneros-Mata *et al.*, 1995; Coronel-Yáñez, 2016). Se han reportado especímenes con tallas entre los 193 y 198 cm (Fischer *et al.*, 1995; Rodríguez & Hammann, 1997; Pedrín-Osuna *et al.*, 2001).

Varios estudios indican que la época reproductiva se da una sola vez al año, con una fecundidad de 15,395,000 – 46,192,400 ovas de hembras de 118-180 cm y de 20 a 70 kg (Paredes Martínez, 2018). La edad promedio de madurez sexual es a los seis años en machos y siete años en hembras (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). En los últimos reportes de madurez poblacional es de 131 cm en hembras y 118 cm en machos (de Anda-Montañez *et al.*, 2013). En la temporada reproductiva forman grandes agregaciones de desove en el Alto Golfo y sirve de vivero para juveniles hasta los dos años de vida (Figura 2) (Valenzuela-Quinonez *et al.*, 2014). Durante su etapa adulta alcanza una longitud máxima de 2,3 m y un peso de 150 kg (Coronel-Yáñez, 2016).

2.4.2. Hábitos alimenticios

Es un pez teleósteo carnívoro con hábitos alimenticios nocturnos, demersal que habita desde aguas someras hasta los 200 m de profundidad (Barrera *et al.*, 1994). Se conoce que tiene comportamiento migratorio debido a la búsqueda de alimento y reproducción. En juveniles su dieta está constituida por camarón, cangrejo, jaiba y algunas especies de pequeños peces (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Los adultos tienen una dieta constituida por peces como la anchoveta bocana *Cetengraulis mysticetus* y el pejerrey *Colpichthys sp.*, especies muy abundantes en el Alto Golfo de California (de Anda-Montañez *et al.*, 2013).

En cautiverio su alimentación se fundamenta principalmente por dietas formuladas con harina de pescado como fuente principal de proteína (López *et al.*, 2015).

2.4.3. Cultivo

La *Totoaba* presenta uno de los crecimientos más rápidos reportados en peces marinos, por ello que los esfuerzos en investigación han sido dirigidos en el establecimiento de su cultivo. A partir de 1993 la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma Baja California (UABC) estableció las bases de cultivo con fines de repoblación de esta especie. Generadas a partir de la captura y adaptación al cautiverio de un grupo de adultos logrando su ciclo reproductivo. Parte de las técnicas de cultivo se establecieron a partir de la corvina blanca del Pacífico *Atractosion nobilis* perteneciente a su misma familia (Sciaenidae) en Baja California (True, 2012).

El cultivo con interés productivo inicio en el 2007 y 2010 a pequeña escala con alevines producidos en la UABC de ensenada. El peso promedio obtenido de 1.5 Kg en 16 meses no fue suficiente para generar inversión, producto de las bajas temperaturas y la inexperiencia en su manejo. En el 2012 las condiciones climáticas también fueron la causante de un bajo crecimiento por parte de la granja acuícola Pacifico Aquaculture. En el 2013 Earth Ocean Farms (EOF) decidió sembrar juveniles en un lugar más templado con las características de la zona de alimentación de adultos silvestres. Los peces fueron sembrados en jaulas en el Mar de Cortés cerca de La Paz donde pudieron aprovechar el potencial de su crecimiento (Juarez *et al.*, 2016).

La engorda se realiza en jaulas marinas, en reproductores, larvas y alevines se usan estanques circulares. Por lo general el manejo de reproducción se lleva dentro de laboratorios siguiendo los más específicos protocolos y parámetros de cultivo (Tabla 3) (Cabanillas-Gómez *et al.*, 2020). Como toda especie marina para su reproducción requiere excelente calidad de agua para prevenir posibles patógenos. Es por ello que se usan sistemas que reciclan más del 90 por ciento del volumen del sistema diariamente con la recirculación del agua por filtros biológicos y esterilizadores ultravioleta.

Tabla 3. Parámetros de cultivo de la *Totoaba macdonaldi*.

PARÁMETRO	RANGOS
Temperatura	24-32 °C
Salinidad	30 - 35 ups
Oxígeno disuelto	>6 mg/l
pH	7.5-8.2
Amonio	<0,5 ppm
Nitritos	<1,0 ppm
Nitratos	<1,0 ppm
Alcalinidad total	100 mg/l

Tomado de (SEMARNAT, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés ocasionado por la alta densidad productiva en sistemas acuícolas ha generado aumentos descontrolados de patógenos provocando grandes pérdidas económicas. Como alternativa se presentan los β -glucanos de levaduras que modulan el sistema inmune de los peces y confiere de protección a patógenos. Por lo tanto, evaluar el potencial inmunoestimulante de un nuevo β -glucano extraído de la levadura *Cystobasidium benthicum* en células del timo de *T. macdonaldi* podría modular y generar conocimientos del sistema inmune de peces con interés productivo.

4. HIPÓTESIS

Si se ha reportado que los β -glucanos de levaduras modulan respuestas en el sistema inmune de peces y que los β -glucanos extraídos de *Cystobasidium benthicum* (β G-cyben) presenta actividad inmune en esplenocitos de ratón, entonces, los β G-cyben serán moléculas seguras y estimularán parámetros inmunes innatos y la expresión de genes relacionados con el reconocimiento y funciones efectoras en células del timo de *Totoaba macdonaldi*.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Evaluar el β -glucano de la levadura *Cystobasidium benthicum* sobre células del timo de *Totoaba macdonaldi*.

5.2. *Objetivos particulares*

1. Determinar parámetros inmunes en células del timo de *Totoaba macdonaldi* estimuladas con β G-cyben.
2. Cuantificar la expresión relativa de genes relacionados con el reconocimiento y funciones efectoras de β G-cyben en células del timo de *Totoaba macdonaldi*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. *Cepa de levadura*

El Grupo de Inmunología y Vacunología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) aisló *Cystobasidium benthicum* LR192 de líquenes crustosos en la Sierra de San Francisco, Mulegé, Baja California Sur, México. La levadura se cultivó en caldo de peptona dextrosa (1% extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa, Sigma, St. Louis MO, EE. UU.), con agitación (150 rpm) a 30 ° C durante 48 h. La biomasa celular se recuperó por centrifugación (5000 rpm, 4 °C, 10 min) y se liofilizó (FreeZone 18, LABCONCO, Kansas City, MO, EE. UU.) durante 24 h. El producto final se utilizó para la extracción de β -glucano descrito a continuación.

6.2. *Extracción de β -glucano*

Siguiendo la metodología descrita por Wilson *et al.*, (2015) se extrajo el β -glucano. Se suspendieron dos gramos de biomasa seca en 40 mL de NaOH al 3 % y se incubó a 100 °C durante 3 h en baño de agua y luego se mantuvo a 25 °C por toda la noche. Se centrifugó (8000 rpm durante 15 minutos) para descartar el sobrenadante. Luego se resuspendió nuevamente con NaOH al 3 % y se repitió este proceso dos veces. Al sobrenadante se añadieron 40 mL de ácido acético ($C_2H_4O_2$) 0.5 N, se mantuvo a 75 °C durante 6 h y se centrifugó nuevamente (8000 rpm durante, 15 minutos). La fracción insoluble se disolvió en 40 mL de etanol, se llevó a ebullición y se centrifugó (8000 rpm durante, 15 minutos)- Este procedimiento se repitió tres veces. Por último, el residuo se lavó (tres veces) con agua destilada, se almacenó a -80 °C durante 6 h y se liofilizó durante 48 h. Se denominó β G-cyben a los β -glucanos extraídos.

6.3. *Peces*

Para el estudio se utilizaron tres peces adultos sanos sin antecedentes de infecciones bacterianas o parasitarias de *Totoaba macdonaldi* donados por la granja Earth Ocean Farms cultivados en jaulas flotantes marinas ubicadas en San Juan de la Costa, La Paz, B.C.S, México.

6.4. Evaluación *in vitro*

6.4.1. Aislamiento de células de timo

Se aislaron las células de timo (órgano hematopoyético primario) de peces con talla comercial (5-7 Kg). Las células se extrajeron mediante el método descrito por (Lee *et al.*, 2014) a través de un filtro celular de 100 μm (BD Falcon, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) y se colocaron en medio de cultivo [RPMI-1640135 (Gibco)] suplementado con cloruro sódico al 0.35 %, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina (Flow), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycin (Flow), suero fetal bovino al 5 % (Gibco), y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparina (Sigma).

Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/mL de RPMI sin heparina con un contabilizador de partículas TC20 Coulter (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). La viabilidad celular se estimó mediante la tinción de azul de tripano (Sigma, Cat. T-8154) y se usaron suspensiones celulares con más del 95% de viabilidad para los experimentos, *in vitro* (Reyes-Becerril *et al.*, 2016).

6.4.2. Estimulación de células del timo

La estimulación de células del timo se realizó mediante el método descrito por Angulo *et al.*, (2017). En una placa de fondo plano de 24 pozos se colocaron 800 μL de células (1×10^6 células/mL) más 200 μL de las concentraciones respectivas para cada ensayo de estimulación.

1. Células solas como control.
2. Células estimuladas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\beta\text{G-cyben}$.
3. Células estimuladas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\beta\text{G-cyben}$.
4. Células estimuladas con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\beta\text{G-cyben}$.

Luego se incubaron en una estufa a 25 °C, con 85 % de humedad relativa y 5 % de atmósfera de CO_2 por 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron muestras de células estimuladas con la respectiva concentración para los análisis de: fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (mtROS), explosión respiratoria (fgROS), actividad mieloperoxidasa (MPO), producción de óxido nítrico (NO) y la actividad de superóxido dismutasa (SOD).

6.4.3. Viabilidad celular

Se utilizó el ensayo de resazurina descrito por Riss *et al.*, (2016) para evaluar la viabilidad de las células estimuladas con las concentraciones de β G-cyben. En placas de 96 pozos se agregaron 80 μ L de células (1×10^6 células/ mL) y se incubaron con 20 μ L por pozo de β -glucano (β G-cyben 50, 100, 200 μ g/mL). Luego se tiñeron con 10 μ L de solución resazurina (Sigma, St. Louis MO, EE. UU.) y se incubaron a 25 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h. Se determinó la fluorescencia emitida a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión con un lector multimodo Flash Varioskan™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Como controles se usaron células del timo incubados con PBS control positivo y DMSO como (Sigma, St. Louis MO, EE. UU.).

6.5. Parámetros inmunológicos

6.5.1. Fagocitosis por rojo neutro

La actividad de fagocitosis se realizó mediante la captación de rojo neutro de acuerdo a Chen *et al.*, (2010) con ligeras modificaciones. Las células estimuladas se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 100 μ L de soluciones de rojo neutro a una concentración de 0,085% (Sigma, St. Louis MO, EE. UU.) disuelto en PBS y se incubaron a 22 °C durante 4 h. Después se eliminó el rojo neutro no fagocitado usando PBS. Se añadió tampón de lisis celular (ácido acético/etanol; 1: 1, v/v) a cada pozo y se incubó nuevamente a 4 °C durante 2 h. Para medir la densidad óptica (DO) a 570 nm con un lector de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

6.5.2. Inducción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial

Se determinó mediante la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS: siglas en inglés) inducido por la estimulación de β G-cyben en las células. Esta técnica consiste en el uso del reactivo diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA). Los grupos acetatos de DCF-DA se escinden mediante esterasas intracelulares. Luego, el compuesto no fluorescente DCFH es oxidado por ROS como peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo e incluso especies de nitrógeno reactivas presentes en las muestras al compuesto fluorescente, DCF.

Las muestras se incubaron con 20 μM de DCF-DA (diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína) (Molecular Probes, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a 22 ° C y se analizaron durante una hora (Ferreira-Cravo *et al.*, 2007). Se detectó la fluorescencia a 485 nm (excitación) y 538 nm (emisión) (Varioskan™, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

6.5.3. Actividad de explosión respiratoria

La actividad de explosión respiratoria se midió mediante el ensayo de reducción de nitro azul de tetrazolio (NBT) medida por la producción de intermediarios de oxígeno reactivo (Kemenade *et al.*, 1994). Se incubaron 100 μL de cultivo celular estimulado por triplicado con 100 μL de solución NBT (1 mg/mL; Sigma) en la oscuridad durante dos horas. Luego se lavó e incubó con 100 μL de metanol (70 % v/v) durante 10 minutos. Se eliminó el alcohol por centrifugación y se resuspendió en 120 μL de 2M hidróxido de potasio (KOH) y 140 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se colocaron por triplicado 200 μL en una microplaca de 96 pocillos y se leyeron a una densidad óptica de 655 nm en un lector de microplacas.

6.5.4. Actividad mieloperoxidasa

La actividad mieloperoxidasa (MPO) se realizó respecto a la metodología descrita por Quade and Roth, (1997). Se colocó por triplicado 10 μL de cultivo celular (muestra) en una placa de 96 pocillos y se añadieron 100 μL de 20 mM solución tetrametilbencidina (1 pastilla en 40 mL de agua destilada, 10 μL de peróxido de hidrógeno 30%) en la oscuridad. Se incubaron por 30 minutos y se detuvo la reacción con 50 μL de ácido sulfúrico 2M (H_2SO_4) y se leyó la absorbancia a 450 nm.

6.5.5. Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) se determinó indirectamente midiendo la concentración de nitritos, según el protocolo de (Neumann *et al.*, 1995). En una placa de 96 pocillos se colocaron 100 μL de cultivo celular (triplicado), se adicionó 100 μL de reactivo de Griess (4 mg/mL) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 490 nm con un lector de microplacas Varioskan y se calculó la concentración de nitrito (mM) en comparación con una curva estándar de nitrito de sodio.

6.5.6. Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determinó con el SOD Determination Kit (Sigma, Num. Cat. 19160) medido por la tasa de inhibición porcentual del sustrato xantina oxidasa que se relaciona directamente a la reducción de O_2 (reacción enzimática). Se colocaron 20 μ L del cultivo celular en una placa de 96 pocillos más 200 μ L de reactivo WST-1 (sal de tetrazolio soluble en agua) y 20 μ L de solución enzimática. De acuerdo con las instrucciones del fabricante después de 20 minutos a 37 °C de incubación. Se leyó en el lector de microplacas a 450 nm (longitud de onda de absorbancia para el producto coloreado de la reacción WST-1 con superóxido). La actividad fue expresada en porcentaje de inhibición.

6.6. *Análisis de la expresión de genes*

De las células estimuladas se extrajo ARN total con el método Trizol (Invitrogen) siguiendo el instructivo del fabricante y se trató con DNasa (Invitrogen, EE. UU.) para minimizar la contaminación del ADN genómico. Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 1 μ g de ARN total utilizando la transcriptasa inversa (RT-PCR) SuperScript III (Invitrogen, EE. UU.) con un primer oligo dT18. La qPCR se realizó con un termociclador (sistema de detección) CFX96 Touch™ Bio-Rad, utilizando Ssofast™ EVAGreen® Super Mix. Los tiempos fueron a 98 °C por 30 s, 40 ciclos a 98 °C por 10 s, 60 °C por 10 s, y finalmente 65-95 °C (In 0.5 °C Inc) para la curva de fusión.

La expresión génica se normalizó con el control endógeno factor de elongación 1 alfa en cada muestra utilizando el método Ct comparativo (2^{-DDCt}) (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos se expresaron como un aumento de veces, dividiendo cada valor de muestra por el valor de control medio en el mismo tiempo de muestreo. Los valores superiores a uno expresaron un aumento, mientras que los valores inferiores a uno expresan una disminución en el gen indicado.

La Tabla 4 muestra los oligonucleótidos utilizados en este estudio, las muestras se realizaron por triplicado para cada análisis de PCR cuantitativo.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	Abreviatura	No. Acceso	Secuencia de primers (5'-3')
<i>Familia de lectinas tipo C 17 miembro A</i>	<i>clec17a</i>	MH051307	GTCTCTCCAATGGTGTGA AGTTCCATCCACCCACTTC
<i>Toll like receptor-2</i>	<i>tlr2</i>	MH051311	GATGCTAGCTGGGTGGAA CGAAATTCTCAGAGAGGACG
<i>Receptor de manosa de macrófagos 1</i>	<i>mmr</i>	MH051308	ACAAGGCTGGAAAAAATTGAC GTTCGTGCGATCGTAAAAAG
<i>Receptor 2 del factor estimulante de colonias de macrófagos 1</i>	<i>mcsfr</i>	MH051309	TGTTTCGTACACCTTACAAAAC TGGGGTCAAGGTAACATTC
<i>Interleucina 1 beta</i>	<i>il-1β</i>	KU847776	ACCAGTTCAGTACACAAGACG CATCACAGCATGGAGTTCC
<i>Enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano</i>	<i>gbe</i>		CAGCCTTACATTCAAATCCATC CCATCAGCTGAATACAATTGTAAC
<i>Factor de elongación 1 alfa</i>	<i>ef-1α</i>	KX524957	CATTGTCAAATCATTCCACAG CACGGTCTGCCTCATGTC

6.7. Análisis estadísticos

Los bioensayos, parámetros inmunológicos y la expresión de genes se realizaron por triplicado y se calculó la media \pm desviación estándar (D.E.) para cada grupo. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) que determinó el efecto de β G-cyben sobre los diferentes parámetros inmunes y expresión de genes, una vez que los datos cumplieran con los supuestos de homocedasticidad y normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Barlett), respectivamente. Los análisis estadísticos fueron analizados a través de la prueba de rango múltiple de Tukey con significancia a $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software SPSS v. 19.0.

7. RESULTADOS

7.1. Viabilidad celular de células del timo de *Totoaba* tratadas con β G-cyben

Las concentraciones de β G-cyben evaluadas en células del timo de *Totoaba* no presentaron citotoxicidad en comparación con el control (tóxico) DMSO. Los resultados demostraron una proliferación celular en los grupos β G-50 μ g/mL (118.2 %), 100 μ g/mL (126.3 %) y 200 μ g/mL (129.2 %) en comparación con el control (109.1 %) considerando la viabilidad celular inicial (Fig. 3).

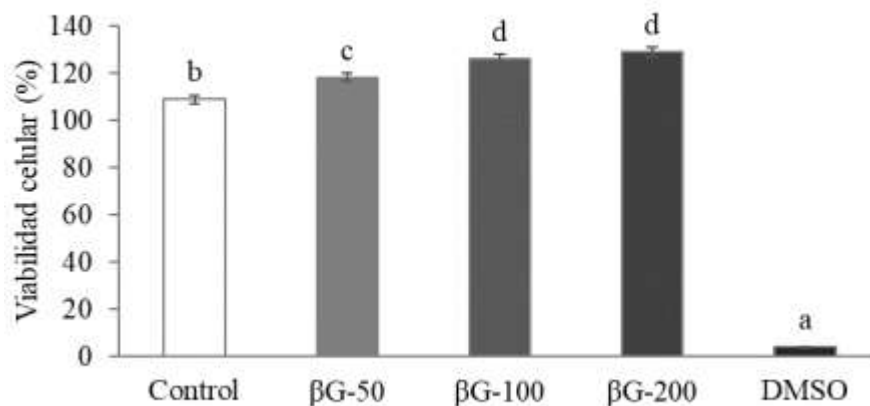


Figura 3. Viabilidad de células del timo de *Totoaba* (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL). Las células del timo sin tratamiento (PBS) como control positivo y tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo a 24 h post-estimulación. La viabilidad celular se determinó por la técnica de resazurina. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2. Parámetros inmunológicos

7.2.1. Fagocitosis

En el análisis de la habilidad fagocítica (proporción de células que fagocitan del total de la población celular) por el ensayo de rojo neutro demostró un aumento significativo en las células del timo de *Totoaba* incubadas con las tres concentraciones, β G-50 μ g/mL (162.1 %), β G-100 μ g/mL (175.3 %) y β G-200 μ g/mL (213.5 %), en comparación al control de células sin tratamiento (PBS, 119.4 %) (Fig. 4). La habilidad fagocítica mostró un comportamiento dosis-dependiente de la concentración de β G-cyben.

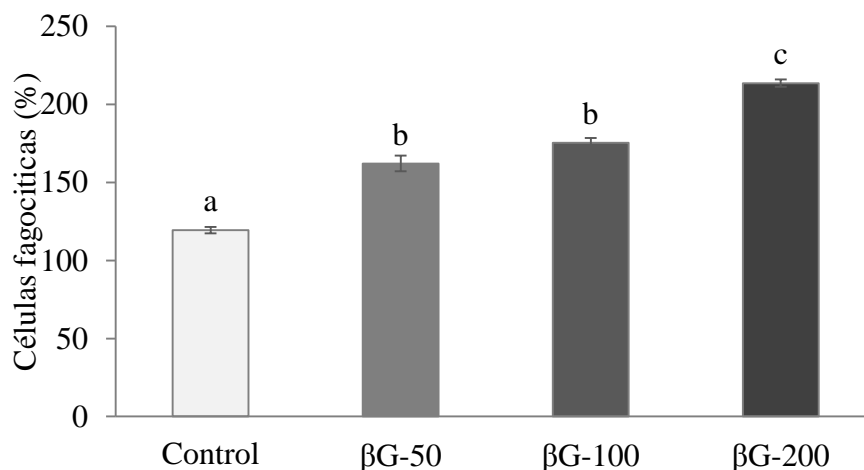


Figura 4. Células fagocíticas del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La proporción células fagocíticas se determinó por la técnica de rojo neutro. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2.2. Inducción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS)

La producción de mtROS en células del timo de Totoaba aumentó con las tres concentraciones de β G-cyben evaluadas respecto al grupo control (Fig. 5). La mayor producción de mtROS se observó en la concentración de β G-100 μ g/mL, seguido de β G-50 μ g/mL y β G-200 μ g/mL.

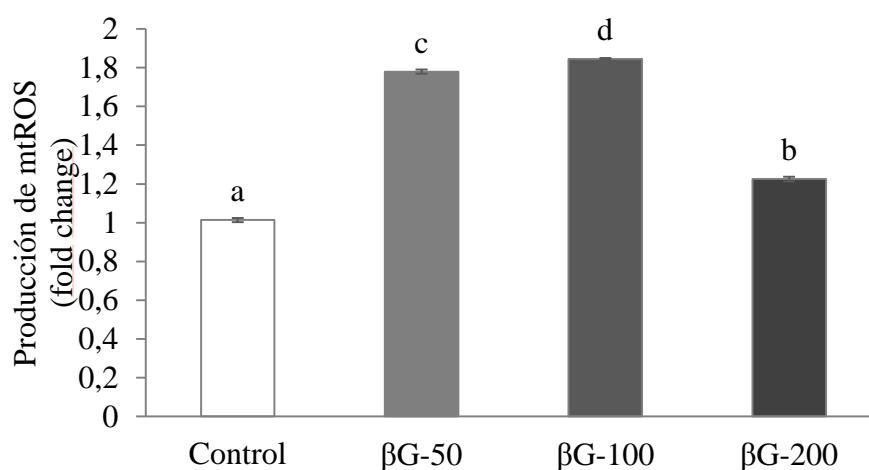


Figura 5. Producción de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS) en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La producción de mtROS se determinó utilizando diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF-DA). Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2.3. Explosión respiratoria (generación de especies reactivas de oxígeno en la fagolisosoma)

La actividad de explosión respiratoria por generación de especies reactivas de oxígeno en la fagolisosoma (fgROS) fue significativamente mayor en células del timo de Totoaba estimuladas con las tres concentraciones β G-cyben respecto al control (PBS). Se observó una mayor generación de fgROS en la concentración de β G-200 μ g/mL seguido de β G-50 y 100 μ g/mL (Fig. 6).

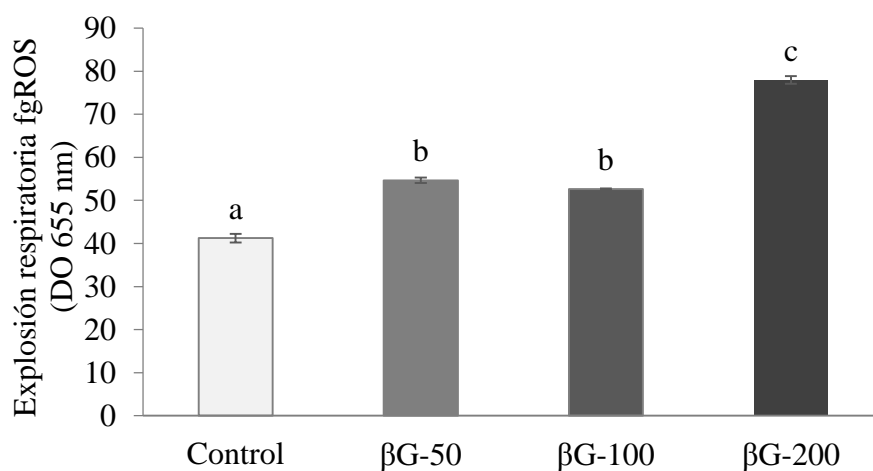


Figura 6. La actividad de explosión respiratoria o producción de especies reactivas de oxígeno en la fagolisosoma (fgROS) en células del timo de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La producción fgROS se determinó por la técnica de NBT. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2.4. Actividad Mieloperoxidasa (MPO)

La estimulación de células del timo de Totoaba con β G-cyben aumentó la actividad de la enzima MPO con todas las concentraciones de β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) respecto al control. Los resultados demostraron un efecto dosis-dependiente (Fig. 7).

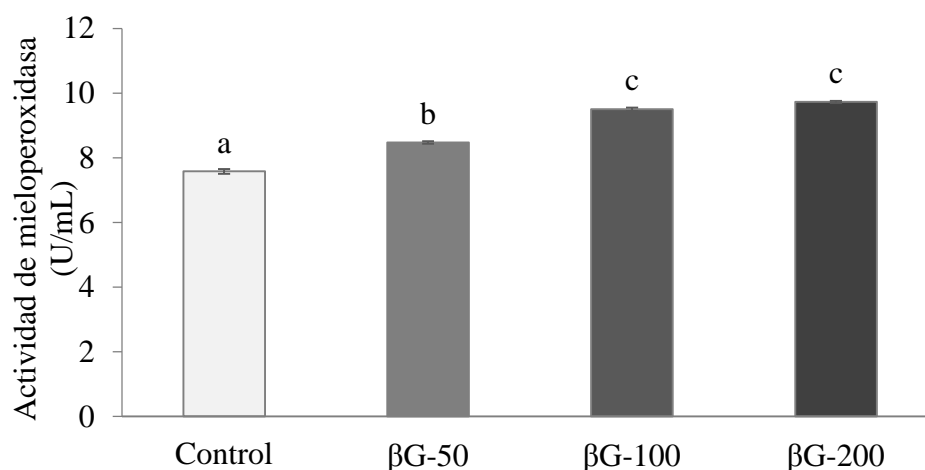


Figura 7. Actividad mieloperoxidasa en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y βG-cyben (50, 100 y 200 μg/mL) a 24 h post-estimulación. Las barras representan la media ± D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2.5. Producción de Óxido nítrico (NO)

La estimulación de células del timo de Totoaba con βG-cyben aumentó la producción de NO significativamente a partir de la concentración de βG-100 μg/mL respecto al control, lo que indicó una actividad dosis-dependiente (Fig. 8).

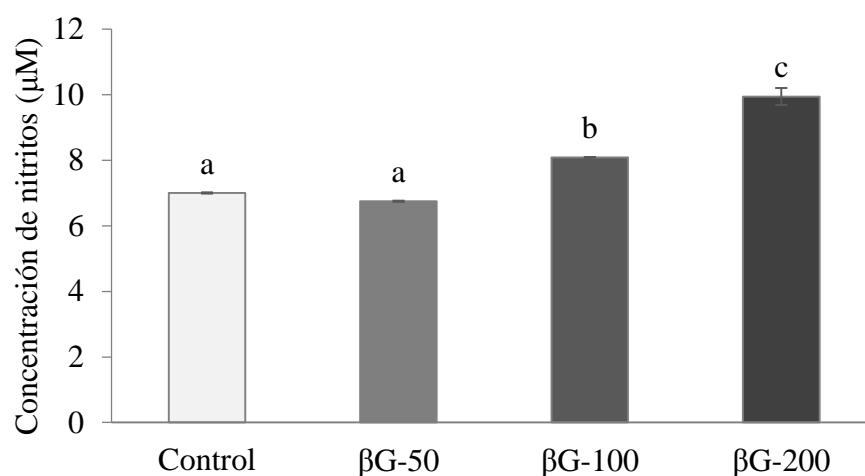


Figura 8. Producción de óxido nítrico en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y βG-cyben (50, 100 y 200 μg/mL) a 24 h post-estimulación. La producción de NO se determinó por la concentración de nitritos utilizando la reacción de Griess. Las barras representan la media ± D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.2.6. Actividad Superóxido dismutasa (SOD)

En el análisis de la actividad de la enzima antioxidante SOD fue significativa ($p < 0.001$) en células del timo de Totoaba estimuladas con las tres concentraciones β G-cyben (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto al control (PBS) (Fig. 9).

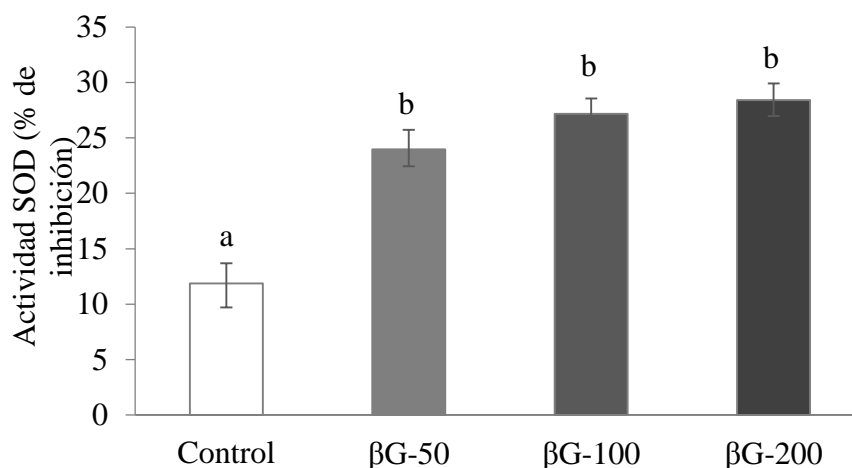


Figura 9. Actividad superóxido dismutasa en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 24 h post-estimulación. La actividad SOD se determinó por el porcentaje de inhibición enzimática. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.3. Expresión génica

7.3.1. Expresión de genes de receptores implicados en el reconocimiento de β -Glucanos

La expresión relativa del gen *clec17a* solo se sobreexpresó con la concentración de β G-cyben 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación al control (Fig. 10 a). De igual manera la sobreexpresión del gen *tlr2* se presentó con la concentración de β G-cyben 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto al control (Fig. 10 b).

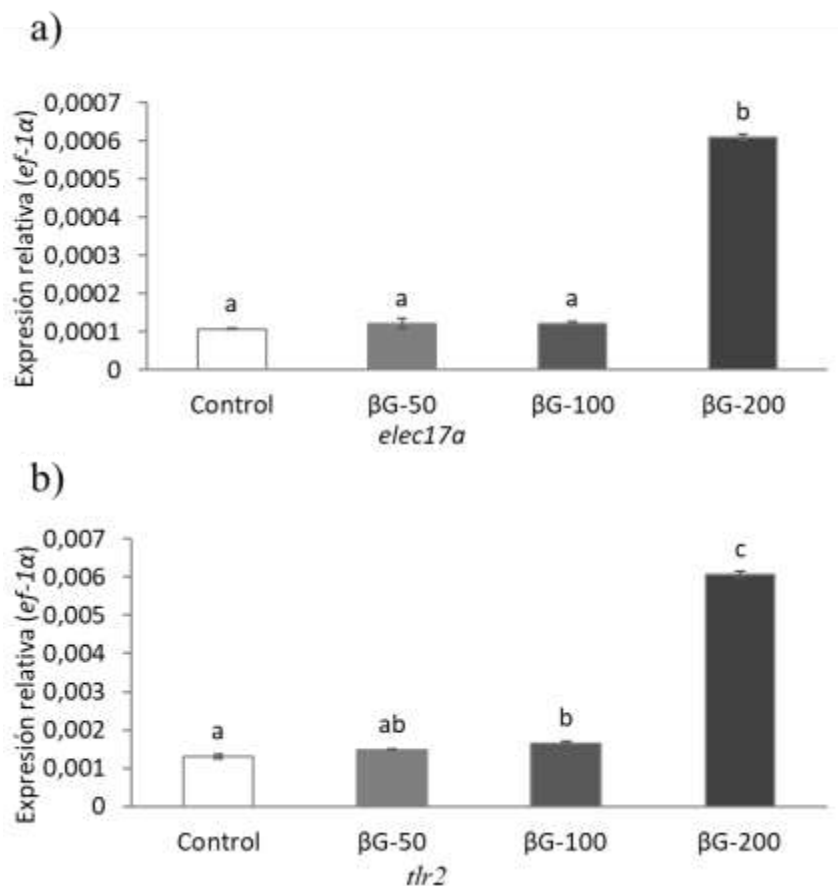


Figura 10. Expresión génica de (a) *lectina de tipo c 17-a (clec17a)* y (b) *receptor de tipo toll 2 (tlr2)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1α* como gen de referencia. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Los genes *mnr* y *mcsfr* solo presentaron una sobreexpresión después de la estimulación con la concentración más alta de β G-cyben evaluada (200 μ g/mL) respecto al control endógeno (Fig. 11 a, b).

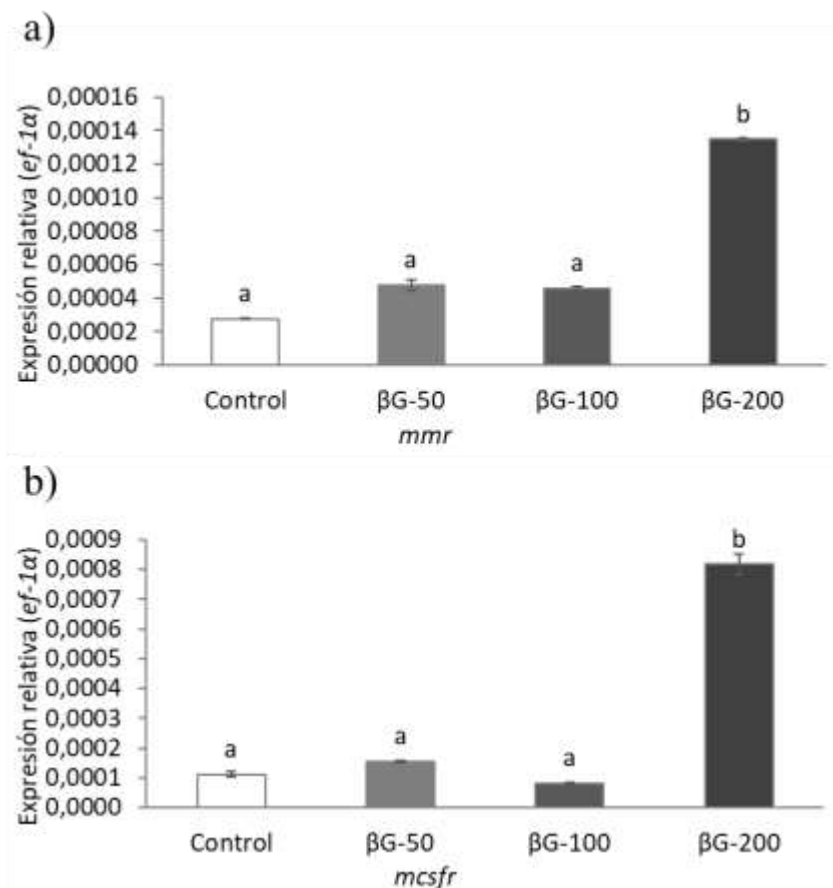


Figura 11. Expresión génica del (a) *receptor de manosa de macrófagos 1 (mmr)* y (b) *factor estimulante de colonias de macrófagos 1, receptor 2 (mcsfr)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y β G-cyben (50, 100 y 200 μ g/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1 α* como gen de referencia. Las barras representan la media \pm D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

7.3.2. Expresión de los genes interleucina-1 β (*il-1 β*) y enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (*gbe*)

La expresión del gen que codifica para la citocina proinflamatoria *il-1 β* aumentó en las células tratadas con las concentraciones de β G-cyben 50 μ g/mL y β G-cyben 200 μ g/mL respecto al control (Fig. 12 a). La expresión relativa del gen *gbe* presentó una sobreexpresión con la estimulación de β G-cyben a 200 μ g/mL respecto al control (Fig. 12 b).

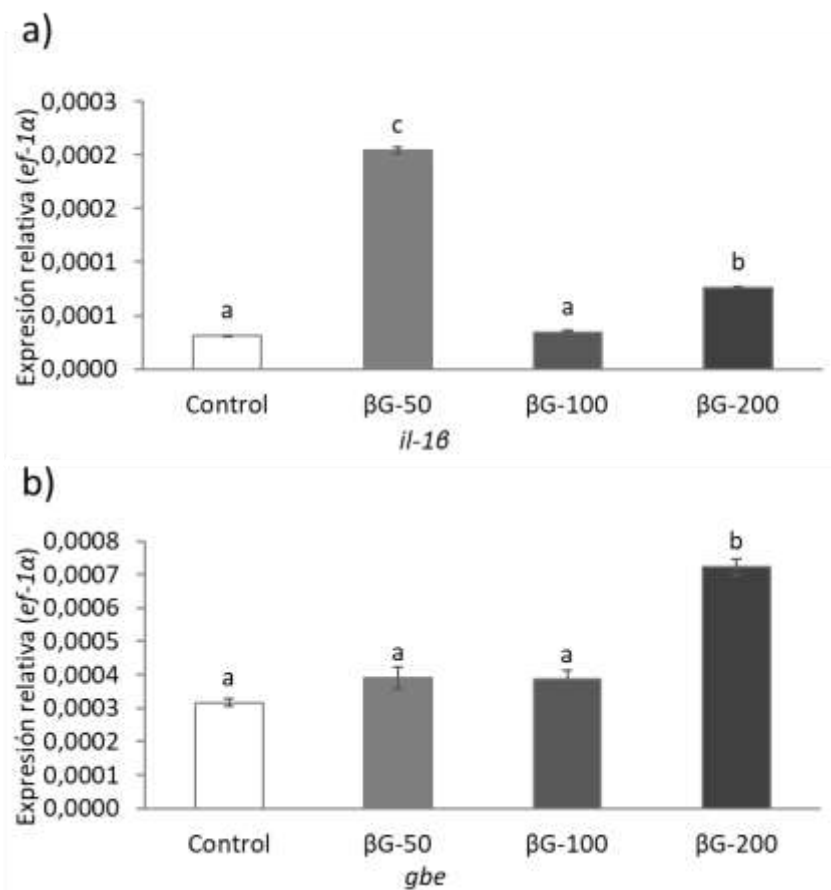


Figura 12. Expresión génica de (a) *Interleucina-1 beta (il-1β)* y (b) *enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (gbe)* en células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) estimuladas con PBS (control) y βG-cyben (50, 100 y 200 μg/mL) a 24 h post-estimulación. La expresión de genes se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real y se utilizó *ef-1α* como gen de referencia. Las barras representan la media ± D.E. y las letras minúsculas indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio *in vitro* evaluó el efecto inmunoestimulante de β -glucanos de *Cystobasidium benthicum* denominados β G-cyben sobre células del timo de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). El timo es un órgano hematopoyético primario denominado así por la alta presencia de linfocitos T (Takaba and Takayanagi, 2017), pero también se encuentran presentes células dendríticas, macrófagos y monocitos entre otros tipos celulares. Se relaciona que los vertebrados incluido los teleósteos con la edad el timo sufre un proceso de involución. En la Totoaba este proceso involutivo no parece claro ya que en adultos se ha observado que el timo posee un tamaño relativamente grande comparado con otras especies de teleósteos.

El potencial inmunoestimulante de β G-cyben se evaluó con las respuestas inmunes generadas por las células de timo de Totoaba. Para ello primeramente se consideró que esta molécula no debería producir ningún efecto de citotoxicidad. La viabilidad celular es la cuantificación de células que sobreviven ante una situación particular como la exposición a un estímulo. Los resultados demostraron un aumento en la viabilidad celular después de la estimulación con las tres concentraciones de β G-cyben. En el estudio realizado por (Sanchez *et al.*, 2021) consideraron al β -glucano de *C. benthicum* como una molécula segura por no presentar efectos citotóxicos en esplenocitos de ratón después de la exposición con una concentración de 100 μ g/mL. Con los resultados obtenidos y lo reportado, se demuestra que los β -glucanos de la levadura en estudio pueden ser seguros para ratones y peces.

Se evaluaron los efectos inmunoestimulantes de β G-cyben en diversos parámetros del sistema inmune innato. La fagocitosis es un proceso realizado por células fagocíticas o fagocitos de los peces, como macrófagos y monocitos. Este proceso consiste en la captura de patógenos y la degradación por mecanismos que pueden ser dependientes de oxígeno (anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) y radicales libres de nitrógeno (óxido nítrico). El análisis del porcentaje de células que fagocitan en el timo resultó en un efecto dosis-dependiente de β G-cyben. Es decir que a mayor concentración la habilidad fagocítica aumentó en 42.7, 55.9 y 94.1 %, respectivamente, por cada una de las concentraciones evaluadas en comparación con el control. Resultados similares fueron obtenidos por Callol *et al.*, (2013) al estimular células primarias similares a macrófagos de la Anguila Europea (*Anguilla anguilla*) con

una concentración baja de 10 $\mu\text{g/mL}$ del β -glucano purificado de *S. cerevisiae*. De acuerdo con otros estudios realizados con β -glucanos purificados la concentración administrada se relaciona estrechamente con la eficiencia de la actividad. *In vivo*, El-Boshy *et al.*, (2010) administraron 1 g/kg en la dieta de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y reportaron un aumento significativo en la actividad fagocítica en macrófagos de riñón cefálico a los 21 días post-inicio de la administración. En cambio, Lin *et al.*, (2011) administraron 5 g/kg durante 56 días en la Carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) y la actividad fagocítica solo aumentó en leucocitos de riñón cefálico a los 21 días post-inicio de la administración.

Como se mencionó, la fagocitosis activa mecanismos dependientes de oxígeno. Los resultados obtenidos demostraron que la inducción de mtROS aumentó en todas las concentraciones respecto al control, pero entre ellas $\beta\text{G-200 } \mu\text{g/mL}$ presentó la menor actividad. Diversos estudios han demostrado que aumentos considerables de mtROS generan estrés oxidativo celular. West *et al.*, (2011) demostraron que la producción de mtROS puede ser desencadenada por la señalización de receptores similares a Toll (TLRs) de la superficie celular, que afecta a múltiples vías iniciadas por TLRs y la actividad bactericida de los macrófagos de ratón. (Banh *et al.*, 2016) determinaron que las mitocondrias de músculo de tres especies de peces: Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa común (*C. carpio*) y esturión de lago (*Acipenser fulvescens*) produjeron más ROS que el músculo de la rata. Adicionalmente, los mtROS son indispensables para la inmunidad innata y desencadenan inflamación por medio de la función de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ y la producción de citocinas proinflamatorias como *il-1\beta* (Naik and Dixit, 2011).

La explosión respiratoria ocurre en la fagolisosoma (fgROS) de células fagocíticas, como los monocitos, macrófagos y los neutrófilos. Este es un potente mecanismo innato contra patógenos (Haugland *et al.*, 2012). Estudios previos informan que los β -glucanos de levadura tienen la capacidad de activar este proceso oxidativo celular (Jørgensen & Robertsen, 1995). En este estudio la actividad de fgROS en células del timo de Totoaba fue a razón dosis-dependiente respecto al control. Resultados similares a razón dosis-dependiente fueron obtenidos por Vera-Jimenez *et al.*, (2013) al estimular leucocitos de Carpa común (*C. carpio*) con tres concentraciones (10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) de β -glucanos purificados de *S. cerevisiae* (MacroGard y Zymosan).

Como resultado de la activación de explosión respiratoria, se generan ROS catalizados por enzimas especializadas. La NADPH oxidasa, inicia la catálisis enzimática al reducir el oxígeno molecular (O_2) a partir de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y generar el anión superóxido (O_2^-). La SOD cumple la función antioxidante al regular los niveles de anión superóxido, además de tener un papel importante en la formación de compuestos oxidativos (Atli *et al.*, 2016) ya que puede evitar el efecto tóxico en células por estrés oxidativo ocasionado por la acumulación oxidante y mantiene la homeostasis tisular (Godahewa *et al.*, 2015). En las células del timo de Totoaba la actividad enzimática de SOD incrementó en todas las concentraciones. El anión superóxido se puede transformar por la acción de la SOD en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es sustrato de la enzima mieloperoxidasa (MPO) para la formación de ácido hipocloroso (HClO) en presencia de cloro (Cl^-) (Lambeth, 2004; Akong-Moore *et al.*, 2012). La actividad MPO en las células del timo de Totoaba aumentó en todas las concentraciones respecto al control. En general, la actividad de SOD puede aumentarse por la administración de β -glucanos en peces (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014). En el caso de la actividad MPO, los resultados en células de Totoaba concuerdan con los reportados por Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017 quienes estimularon leucocitos de riñón cefálico del Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) con 200 μ g/mL de β -glucano fúngico de *Aspergillus niger*. In vivo, Divya *et al.*, (2020) observaron la acción enzimática de MPO en suero y mucus con la inclusión 2, 5 y 10 mg/g de β -glucano de *S. cerevisiae* en la dieta de la Tilapia (*Oreochromis mossambicus*).

Otra enzima encargada en el proceso oxidativo es el óxido nítrico sintasa que produce óxido nítrico, un compuesto microbicida relacionado con la estimulación celular. La producción de NO en este estudio aumentó en las células incubadas con las concentraciones de 100 y 200 μ g/mL. Resultados similares fueron reportados por Velazquez-Carriles *et al.*, (2018) cuando estimularon leucocitos de bazo del Huachinango del Pacífico (*L. peru*) con el β -glucano de la levadura marina *Yarrowia lipolytica* N6 a una concentración de 200 μ g/mL. Dong *et al.*, (2016) indicaron que el NO está involucrado en muchas funciones fisiológicas incluyendo la respuesta inflamatoria y es considerado como un potente efector de defensa con actividad antimicrobiana.

Adicionalmente se determinó la transcripción de dos genes receptores (*clec17a* y *tlr2*), dos mediadores celulares (*mmr* y *mcsfr*), una citocina proinflamatoria (*il-1 β*) y un gen relacionado con el almacenamiento energético celular (*gbe*).

Por otra parte, las lectinas son una gran familia de receptores que contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y las específicas de manosa poseen especificidad para los glucanos. Por ello, este estudio determinó la transcripción del gen *clec17a*. La sobreexpresión de *clec17a* solo se presentó en las células estimuladas con la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Angulo *et al.*, (2019) indicaron que este receptor se expresa mayormente en riñón cefálico, seguido de hígado, bazo, piel, músculo, timo, y más bajo en intestino de la Totoaba. En otros teleósteos también se expresan genes pertenecientes a esta gran familia luego de la estimulación con β -glucanos de levaduras. Kiron *et al.*, (2016) indicaron que los genes *sclra*, *sclrb*, *sclrc* (lectinas tipo C) se sobreexpresan en el intestino distal del Salmón (*Atlantic salmon*) después de la intubación con 15 g/kg de β -glucano purificado. Resultados similares de sobreexpresión del gen *clec* fueron encontrados por Carballo *et al.*, (2019) en el Lenguado (*Solea senegalensis*).

La sobreexpresión de *tlr2* se presentó en células del timo de Totoaba estimuladas con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Zhang *et al.*, (2016) reportaron que en el Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) el *tlr2* se expresa en células linfomieloides. En cambio, en mamíferos, el *tlr2* se expresa predominante en la superficie de células mieloides (monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos) y células T. A nivel transcripcional estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los β -glucanos de levaduras activan la expresión de genes receptores. Pietretti *et al.*, (2013) indicaron que *clec* y *tlr2* son claves para su reconocimiento de glucanos en peces. Esto de igual manera ha sido reportado en varias especies de teleósteos como en el Salmón del Atlántico (*A. salmon*) (Kiron *et al.*, 2016) y la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Johansson *et al.*, 2016). En general, la principal función de estos genes PRRs (*clec17a* y *tlr2*) está ligada a la inmunidad innata ya que reconocen PAMP. La expresión obtenida en este estudio también se puede otorgar a que son expresadas mayormente por células de la línea mieloides. Como es bien conocido el timo es un órgano hematopoyético encargado de la maduración de linfocitos. Por lo que la cuantificación

de la expresión obtenida podría atribuirse a la baja población de células mieloides en el timo de la Totoaba.

La transcripción de receptores de macrófagos se evaluó por la afinidad específica que tienen a los carbohidratos a través de los receptores Clr (Yadav and Schorey, 2006). Así que este estudio evaluó dos genes: *mmr* y *mcsfr*. Estos genes se sobreexpresaron *mmr* y *mcsfr* en las células del timo de Totoaba después de la estimulación con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El gen *mmr* es expresado principalmente por macrófagos y células dendríticas (McKenzie *et al.*, 2007; Gazi & Martinez-Pomares, 2009) y *mcsfr* es expresado por monocitos y macrófagos (Ueda *et al.*, 2016). Al igual que en los genes anteriormente mencionados la expresión obtenida en el presente estudio se puede atribuir a una baja población de estas células que expresan *mmr* y *mcsfr* en el timo de la Totoaba.

Por otra parte, la sobreexpresión de la citocina proinflamatoria *il-1 β* se presentó con las concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto al control. Pietretti *et al.*, (2013) demostraron que la sobreexpresión de este gen se da en macrófagos de riñón cefálico de la carpa (*C. carpio carpio*) tratados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y menor 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Zymosan (*S. cerevisiae*). Callol *et al.*, (2013) encontraron que la expresión de *il-1 β* depende de la interacción PAMP-PRR en células primarias similares a macrófagos de la Anguila Europea (*A. anguilla*). De acuerdo con los estudios previos y lo obtenido en esta investigación la producción de *il-1 β* se da principalmente por células innatas, la cual puede ser inducida con bajas y altas concentraciones.

Finalmente, la sobreexpresión del gen *gbe* en células del timo de Totoaba se presentó con la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto pudo ser atribuido a que forma parte de una gran lista de enzimas con afinidad activa a carbohidratos (Lombard *et al.*, 2014). Hasta la fecha este es el primer reporte sobre su activación en células de peces post-estimulo con un β -glucano de levadura. Zmasek and Godzik, (2014) demostraron que está presente en todos los reinos de la vida luego de realizar análisis filogenéticos de más de 400 genomas más 200 de eucariotas. Su función es la biosíntesis glucógeno, hidroliza enlaces α -1,4 glicosídicos e introduce cadenas α -1,6-glucosídicas ramificadas a la estructura para la reserva energética celular (Malinska *et al.*, 2020). Además Thon *et al.*, (1993) indicaron que está vinculada al aumento de la solubilidad de la molécula y disminuye la fuerza osmótica en la célula.

9. CONCLUSIONES

Este estudio demostró que β G-cyben es una molécula segura que induce respuestas celulares y humorales innatas en células de timo de *T. macdonaldi*, ya que no presentó citotoxicidad en ninguna de las tres concentraciones evaluadas. La concentración de 200 μ g/mL generó las mejores respuestas inmunes celulares en los diferentes parámetros inmunológicos evaluados (habilidad fagocítica, fgROS, MPO, NO y SOD) con una excepción en la producción de mtROS que se presentó significativa con la concentración de 100 μ g/mL.

La estimulación con la concentración de 200 μ g/mL incrementa el nivel de expresión de genes relacionados con el reconocimiento de β -glucanos y funciones efectoras se sobreexpresaron en células de timo de *T. macdonaldi* excepto en la expresión de la citocina proinflamatoria *il-1 β* que presentó la mayor sobreexpresión con la concentración de 50 μ g/mL seguido de 200 μ g/mL.

Además, con lo obtenido se demostró que las células del timo generadoras de respuestas innatas de la totoaba con peso comercial se encuentran funcionalmente activas ante la estimulación con una molécula como β G-cyben.

Perspectivas: 1) Evaluar *in vivo* la administración de β G-cyben en la dieta de peces y la protección ante un reto infeccioso. 2) Determinar la expresión de otros genes que participan en el reconocimiento a los β -glucanos y funciones efectoras. 3) Validar con más estudios el funcionamiento del timo en adultos de *T. macdonaldi*.

10. LITERATURA CITADA

- Achek, A., Yesudhas, D., Choi, S., 2016. Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of pharmacal research* 39, 1032–1049. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s12272-016-0806-9>
- Akong-Moore, K., Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., Nizet, V., 2012. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PloS one* 7, e42984. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0042984>
- 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. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.001>
- Angulo, C., Maldonado, M., Delgado, K., Reyes-Becerril, M., 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. *Developmental & Comparative Immunology* 71, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.020>
- Angulo, C., Sanchez, V., Delgado, K., Reyes-Becerril, M., 2019. C-type lectin 17A and macrophage-expressed receptor genes are magnified by fungal β -glucan after *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Totoaba macdonaldi* cells. *Immunobiology* 224, 102–109. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.imbio.2018.10.003>
- Aramli, M.S., Kamangar, B., Nazari, R.M., 2015. Effects of dietary β -glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. *Fish & shellfish immunology* 47, 606–610. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.004>
- Arvizu, J., Chávez, H., 1972. Sinopsis sobre la biología de la *Totoaba*: "*Cynoscion macdonaldi*" Gilbert, 1890. *FAO Fisheries Synopsis* 1, 21.
- Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M., 2016. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 30–37. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.012>
- Balfry, S.K., Iwama, G.K., 2004. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 138, 207–211. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.12.010>
- Balla, K.M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J.M., Stachura, D.L., Hu, Y., Bañuelos, K., Romo-Fewell, O., Aroian, R.V., Traver, D., 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood* 116, 3944–3954. <https://doi.org/doi: 10.1182/blood-2010-03-267419>
- Ballou, E.R., Avelar, G.M., Childers, D.S., Mackie, J., Bain, J.M., Wagener, J., Kastora, S.L., Panea, M.D., Hardison, S.E., Walker, L.A., Erwig, L.P., Munro, C.A., Gow, N.A.R., Brown, G.D., MacCallum, D.M., Brown, A.J.P., 2016. Lactate signalling regulates fungal β -glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol* 2, 16238–16238. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.238>
- Banh, S., Wiens, L., Sotiri, E., Treberg, J.R., 2016. Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative

- stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 191, 99–107. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.10.001>
- Barraza, F., Montero, R., Wong-Benito, V., Valenzuela, H., Godoy-Guzmán, C., Guzmán, F., Köllner, B., Wang, T., Secombes, C.J., Maisey, K., 2021. Revisiting the Teleost Thymus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Biology* 10, 8. <https://doi.org/doi.org/10.3390/biology10010008>
- Barrera, G., Román, R., Licón, G., 1994. Desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la Totoaba. Secretaría de Pesca, Subsecretaría de Fomento y Desarrollo Pesqueros, Dirección General de Acuicultura, México 90.
- Biller, J.D., Takahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90, 3403–3414. <https://doi.org/doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
- Boes, M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37, 1141–1149. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00025-6](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00025-6)
- Bohn, J.A., BeMiller, J.N., 1995. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate polymers* 28, 3–14.
- Breedveld, A., Groot Kormelink, T., van Egmond, M., de Jong, E.C., 2017. Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *Journal of leukocyte biology* 102, 1003–1016. <https://doi.org/doi.org/10.1189/jlb.4MR0217-048RR>
- Bromage, E.S., Ye, J., Kaattari, S.L., 2006. Antibody structural variation in rainbow trout fluids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 143, 61–69. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.10.003>
- Cabanillas-Gómez, M., Bardullas, U., Galaviz, M.A., Rodriguez, S., Rodriguez, V.M., López, L.M., 2020. Tryptophan supplementation helps totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles to regain homeostasis in high-density culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 597–611. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10695-019-00734-2>
- Callol, A., Roher, N., Amaro, C., MacKenzie, S., 2013. Characterization of PAMP/PRR interactions in European eel (*Anguilla anguilla*) macrophage-like primary cell cultures. *Fish & shellfish immunology* 35, 1216–1223.
- Carballo, C., Pinto, P.I.S., Mateus, A.P., Berbel, C., Guerreiro, C.C., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Mantecon, L., Power, D.M., Manchado, M., 2019. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology* 92, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>
- Cárdenas-Reyna, T., Angulo, C., Guluarte, C., Hori-Oshima, S., Reyes-Becerril, M., 2017. In vitro immunostimulatory potential of fungal β -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells. *Developmental & Comparative Immunology* 77, 350–358. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.003>
- Caruffo, M., Lopez, P., Díaz, A., Navarrete, P., 2013. 2013 Uso de beta-glucanos como inmune estimulantes en la acuicultura.pdf. *Indualimentos* 118–121.
- Ceballos-Francisco, D., Guardiola, F.A., Cordero, H., Cuesta, A., Esteban, M.Á., 2018. Humoral immune parameters in serum of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) after induced skin injury. *Fish & Shellfish Immunology* 75, 291–294. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.017>

- Chaosomboon, A., Phupet, B., Rattanaporn, O., Runsaeng, P., Utarabhand, P., 2017. Lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein from *Fenneropenaeus merguensis* functions as a pattern recognition receptor with a broad specificity for diverse pathogens in the defense against microorganisms. *Developmental & Comparative Immunology* 67, 434–444. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.006>
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nature immunology* 10, 889–898. <https://doi.org/doi.org/10.1038/ni.1748>
- Chen, W., Zhang, W., Shen, W., Wang, K., 2010. Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages in vitro. *Cellular Immunology* 262, 69–74. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.01.001>
- Chirapongsatonkul, N., Mueangkan, N., Wattitum, S., Kittichon, U., 2019. Comparative evaluation of the immune responses and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) induced by yeast β -glucan and crude glucan derived from mycelium in the spent mushroom substrate of *Schizophyllum commune*. *Aquaculture Reports* 15, 100205. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100205>
- Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-López, G., Román-Rodríguez, M.J., 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology* 9, 806–814. <https://doi.org/doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.09040806.x>
- C.Ooi, V., Liu, F., 2000. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. *CMC* 7, 715–729. <https://doi.org/10.2174/0929867003374705>
- Coronel-Yáñez, L., 2016. La totoaba: gigante del alto golfo de California. *Centros de Estudio Sobre la Universidad de la Universidad Autónoma de Baja California*. México, D. F. 36.
- Dalmo, R.A., Børgwald, J., 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008>
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature immunology* 6, 295–302.
- de Anda-Montañez, J.A., García-De León, F.J., Zenteno-Savin, T., BalartPaez, E.F., Méndez-Rodríguez, L.C., Bocanegra-Castillo, M.J., Martínez-Aguilar, S., Campos-Dávila, L., Román-Rodríguez, M.J., Valenzuela-Quiñonez, F., Rodríguez-Jaramillo, M.E., Meza-Chávez, M.E., Ramírez-Rosas, J.J., SaldañaHernández, I.J., Olguín-Monroy, N.O., Martínez-Delgado, M.E., 2013. Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC La Paz, Baja California Sur. Informe Final, SNIB-CONABIO. Proyecto No. HK050, México, DF.
- Divya, M., Gopi, N., Iswarya, A., Govindarajan, M., Alharbi, N.S., Kadaikunnan, S., Khaled, J.M., Almanaa, T.N., Vaseeharan, B., 2020. β -glucan extracted from eukaryotic single-celled microorganism *Saccharomyces cerevisiae*: Dietary supplementation and enhanced ammonia stress tolerance on *Oreochromis mossambicus*. *Microbial Pathogenesis* 139, 103917. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103917>
- Drickamer, K., Taylor, M.E., 1993. Biology of animal lectins. *Annual review of cell biology* 9, 237–264. <https://doi.org/doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001321>

- East, L., Isacke, C.M., 2002. The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1572, 364–386. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00319-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00319-7)
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., Ehrenfeld, N., 2017. β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de biología marina y oceanografía* 52, 33–49.
- Esteban, M., Rodríguez, A., Meseguer, J., 2004. Glucan receptor but not mannose receptor is involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus aurata* L.) blood leucocytes. *Fish & shellfish immunology* 16, 447–451. <https://doi.org/doi:10.1016/j.fsi.2003.07.004>
- Esteban, M.Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J., 2013. Influence of melatonin on the immune system of fish: a review. *Int J Mol Sci* 14, 7979–7999. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms14047979>
- Ezekowitz, R., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A., 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 1785–1794. <https://doi.org/doi.org/10.1084/jem.172.6.1785>
- Ezekowitz, R., Williams, D., Koziel, H., Armstrong, M., Warner, A., Richards, F., Rose, R., 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351, 155–158. <https://doi.org/doi.org/10.1038/351155a0>
- Fæste, C.K., Tartor, H., Moen, A., Kristoffersen, A.B., Dhanasiri, A.K.S., Anonsen, J.H., Furmanek, T., Grove, S., 2020. Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. *Journal of Chromatography B* 1138, 121965. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121965>
- Ferreira-Cravo, M., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Ferreira, J.L.R., de Freitas, D.P.S., Machado, M.D., Geracitano, L.A., Monserrat, J.M., 2007. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere* 66, 1367–1374. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.050>
- Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Köllner, B., Ototake, M., Nakanishi, T., 2006. Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 209–226. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.013>
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K., Niem, V., 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental, in: *Vertebrados*. Fao, Roma, pp. 1201–1813.
- Fishelson, L., 1995. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei). *Journal of Morphology* 223, 175–190. <https://doi.org/doi.org/10.1002/jmor.1052230206>
- Flanagan, C.A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the Totoaba *Cynoscion macdonaldi* in the Northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74, 531–544.
- Franco Montoya, L.N., Martins, T.P., Gimbo, R.Y., Zanuzzo, F.S., Urbinati, E.C., 2017. β -Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish & Shellfish Immunology* 60, 197–204. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.055>

- Gazi, U., Martinez-Pomares, L., 2009. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554–561. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.004>
- Ghaedi, G., Keyvanshokoo, S., Azarm, H.M., Akhlaghi, M., 2015. Effects of dietary β -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 441, 78–83. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.023>
- Godaheva, G., Kim, Y., Dananjaya, S., Jayasooriya, R., Noh, J.K., Lee, J., De Zoysa, M., 2015. Mitochondrial peroxiredoxin 3 (Prx3) from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): immune responses and role of recombinant Prx3 in protecting cells from hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Fish & shellfish immunology* 43, 131–141. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.011>
- Gopalakannan, A., Arul, V., 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast. *Aquaculture research* 41, 884–892. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02368.x>
- Guardiola, F.A., Cuartero, M., del Mar Collado-González, M., Arizcún, M., Díaz Baños, F.G., Meseguer, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2015. Description and comparative study of physico-chemical parameters of the teleost fish skin mucus. *Biorheology* 52, 247–256. <https://doi.org/10.3233/BIR-15052>
- Guzmán-Villanueva, L.T., Ascencio-Valle, F., Macías-Rodríguez, M.E., Tovar-Ramírez, D., 2014. Effects of dietary β -1, 3/1, 6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. *Fish physiology and biochemistry* 40, 827–837. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10695-013-9889-0>
- Han, B., Baruah, K., Cox, E., Vanrompay, D., Bossier, P., 2020. Structure-Functional Activity Relationship of β -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Frontiers in Immunology* 11, 658. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2020.00658>
- Han, M.D., Han, J., Hyun, S.H., Shin, H.W., 2008. Solubilization of water-insoluble beta-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Journal of environmental biology* 29, 237.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 6919–6924.
- Haugland, G.T., Jakobsen, R.A., Vestvik, N., Ulven, K., Stokka, L., Wergeland, H.I., 2012. Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. *PloS one* 7, e47909. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0047909>
- Herbomel, P., Thisse, B., Thisse, C., 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Developmental biology* 238, 274–288. <https://doi.org/doi:10.1006/dbio.2001.0393>
- Herre, J., Gordon, S., Brown, G.D., 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular immunology* 40, 869–876. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.007>
- Hine, P.M., 1992. The granulocytes of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 2, 79–98. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S1050-4648\(05\)80038-5](https://doi.org/doi.org/10.1016/S1050-4648(05)80038-5)

- Honda, T., Nishizawa, T., Uenobe, M., Kohchi, C., Kuroda, A., Ototake, M., Nakanishi, T., Yokomizo, Y., Takahashi, Y., Inagawa, H., 2005. Molecular cloning and expression analysis of a macrophage-colony stimulating factor receptor-like gene from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Molecular immunology* 42, 1–8. <https://doi.org/doi:10.1016/j.molimm.2004.07.002>
- Johansson, P., Wang, T., Collet, B., Corripio-Miyar, Y., Monte, M.M., Secombes, C.J., Zou, J., 2016. Identification and expression modulation of a C-type lectin domain family 4 homologue that is highly expressed in monocytes/macrophages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology* 54, 55–65. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2015.08.005>
- Jørgensen, J.B., Robertsen, B., 1995. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 19, 43–57. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)00045-H](https://doi.org/doi.org/10.1016/0145-305X(94)00045-H)
- Juarez, L.M., Konietzko, P.A., Schwarz, M.H., 2016. Totoaba aquaculture and conservation: Hope for an endangered fish from Mexico's Sea of Cortez. *World Aquaculture* 47, 30–38.
- Katzenback, B.A., Belosevic, M., 2012. Colony-stimulating factor-1 receptor protein expression is a specific marker for goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophage progenitors and their differentiated cell types. *Fish & shellfish immunology* 32, 434–445. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2011.12.003>
- Kemenade, B., Groeneveld, A., Rens, B., Rombout, J., 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of experimental biology* 187, 143–158.
- Kim, H.S., Hong, J.T., Kim, Y., Han, S.-B., 2011. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. *Immune network* 11, 191–195. <https://doi.org/dx.doi.org/10.4110/in.2011.11.4.191>
- Kiron, V., Kulkarni, A., Dahle, D., Lokesh, J., Elvebo, O., 2016. Recognition of purified beta 1, 3/1, 6 glucan and molecular signalling in the intestine of Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology* 56, 57–66. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2015.11.007>
- Laich, F., Vaca, I., Chavez, R., 2013. *Rhodotorula portillonensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3884–3891. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052753-0>
- Lamas, J., Ellis, A.E., 1994. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 201–219. <https://doi.org/doi.org/10.1006/fsim.1994.1019>
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4, 181–189. <https://doi.org/doi.org/10.1038/nri1312>
- Lee, P.T., Zou, J., Holland, J.W., Martin, S.A.M., Collet, B., Kanellos, T., Secombes, C.J., 2014. Identification and characterisation of TLR18-21 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology* 41, 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.006>
- Lim, J.J., Grinstein, S., Roth, Z., 2017. Diversity and versatility of phagocytosis: roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 12. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fcimb.2017.00191>
- Lin, A.-F., Xiang, L.-X., Wang, Q.-L., Dong, W.-R., Gong, Y.-F., Shao, J.-Z., 2009. The DC-SIGN of zebrafish: insights into the existence of a CD209 homologue in a lower vertebrate and its

- involvement in adaptive immunity. *The Journal of Immunology* 183, 7398–7410. <https://doi.org/doi.org/10.4049/jimmunol.0803955>
- Lin, S., Pan, Y., Luo, Lin, Luo, Li, 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & Shellfish Immunology* 31, 788–794. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.013>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods* 25, 402–408. <https://doi.org/doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lokesh, J., Fernandes, J.M., Korsnes, K., Bergh, Ø., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish & shellfish immunology* 33, 626–631. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.017>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* 42, D490–D495. <https://doi.org/doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- López, L.M., Galaviz, M.A., Ibarra, M.F., Vargas, I.B., Satriyo, T.B., Peres, H., Jiménez, A.P., Salze, G., True, C.D., 2015. Importancia Nutricional de Taurina en Peces Carnívoros Como Totoaba Macdonaldi, Cuando es Alimentada con Dietas Ricas en Proteína Vegetal. *Avances en Nutrición Acuicola* 353–360.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137–151. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Magnadóttir, B., Audunsdóttir, S.S., Bragason, B.Th., Gísladóttir, B., Jonsson, Z.O., Gudmundsdóttir, S., 2011. The acute phase response of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Humoral and cellular response. *Fish & Shellfish Immunology* 30, 1124–1130. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.010>
- Malinska, D., Testoni, G., Duran, J., Brudnicka, A., Guinovart, J.J., Duszynski, J., 2020. Hallmarks of oxidative stress in the livers of aged mice with mild glycogen branching enzyme deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 695, 108626. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.abb.2020.108626>
- Martens, J., Kzhyshkowska, J., Falkowski-Hansen, M., Schledzewski, K., Gratchev, A., Mansmann, U., Schmuttermaier, C., Dippel, E., Koenen, W., Riedel, F., 2006. Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 208, 574–589. <https://doi.org/doi:10.1002/path.1921>
- Martinez-Pomares, L., Wienke, D., Stillion, R., McKenzie, E.J., Arnold, J.N., Harris, J., McGreal, E., Sim, R.B., Isacke, C.M., Gordon, S., 2006. Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *European journal of immunology* 36, 1074–1082. <https://doi.org/doi.org/10.1002/eji.200535685>
- McKenzie, E.J., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Lucas, A.D., Harris, J., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2007. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *The Journal of Immunology* 178, 4975–4983. <https://doi.org/doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4975>

- Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T., 2015. Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in immunology* 6, 262. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, T.B., 2016. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. *Fish & shellfish immunology* 48, 94–104. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.013>
- Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T., Horikoshi, K., 2003. *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 897–903. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02395-0>
- Naik, E., Dixit, V.M., 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine* 208, 417–420. <https://doi.org/doi.org/10.1084/jem.20110367>
- Neumann, N., Fagan, D., Belosevic, M., 1995. Macrophage activating factor (s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 19, 473–482. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0145-305X\(95\)00032-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/0145-305X(95)00032-0)
- Nguyen, T.M., Mandiki, S.N., Tran, T.N.T., Larondelle, Y., Mellery, J., Mignolet, E., Cornet, V., Flamion, E., Kestemont, P., 2019. Growth performance and immune status in common carp *Cyprinus carpio* as affected by plant oil-based diets complemented with β -glucan. *Fish & Shellfish Immunology* 92, 288–299. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.011>
- Novak, M., Vetvicka, V., 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 9, 67–75.
- O'Neill, L.A., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 7, 353–364.
- Palić, D., Andreasen, C.B., Menzel, B.W., Roth, J.A., 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish & Shellfish Immunology* 19, 217–227. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.003>
- Paredes Martínez, A.E., 2018. Descripción de la gonadogénesis e identificación del periodo de diferenciación sexual de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity 16, 23–26. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.006>
- Pedrin-Osuna, O., Córdova-Murueta, J.H., Delgado-Marchena, M., 2001. Crecimiento y mortalidad de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*, del alto golfo de California. *Ciencia Pesquera* 14, 131–140.
- Penagos, G., Barato, P., Iregui, C., 2009. Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica Colombiana* 14, 3–24.

- Petit, J., Bailey, E.C., Wheeler, R.T., de Oliveira, C.A., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., 2019. Studies into β -glucan recognition in fish suggests a key role for the C-type lectin pathway. *Frontiers in immunology* 10, 15, Article 280. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2019.00280>
- Pietretti, D., Vera-Jimenez, N., Hoole, D., Wiegertjes, G., 2013. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard® and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. *Fish & shellfish immunology* 35, 847–857. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.022>
- Pionnier, N., Falco, A., Miest, J.J., Shrive, A.K., Hoole, D., 2014. Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β -glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. *Fish & shellfish immunology* 39, 285–295. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.008>
- Pizarro, S., Ronco, A.M., Gotteland, M., 2014. β -glucanos:¿ qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición* 41, 439–446.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary immunology and immunopathology* 58, 239–248. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2)
- Ramcharitar, J., Gannon, D.P., Popper, A.N., 2006. Bioacoustics of fishes of the family Sciaenidae (croakers and drums). *Transactions of the American Fisheries Society* 135, 1409–1431. <https://doi.org/doi.org/10.1577/T05-207.1>
- Ramirez-Gomez, F., Greene, W., Rego, K., Hansen, J.D., Costa, G., Kataria, P., Bromage, E.S., 2012. Discovery and characterization of secretory IgD in rainbow trout: secretory IgD is produced through a novel splicing mechanism. *The Journal of Immunology* 188, 1341–1349. <https://doi.org/doi.org/10.4049/jimmunol.1101938>
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Reyes-Becerril, M., Angulo, M., Sanchez, V., Guluarte, C., Angulo, C., 2020. β -D-glucan from marine yeast *Debaryomyces hansenii* BCS004 enhanced intestinal health and glucan-expressed receptor genes in Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Microbial Pathogenesis* 104141. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104141>
- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Hirono, I., Kondo, H., Jirapongpairoj, W., Esteban, M.A., Alamillo, E., Angulo, C., 2016. TLR21's agonists in combination with *Aeromonas* antigens synergistically up-regulate functional TLR21 and cytokine gene expression in yellowtail leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 61, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.012>
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F.A., Sanchez, V., Maldonado, M., Angulo, C., 2018. *Sterigmatomyces halophilus* β -glucan improves the immune response and bacterial resistance in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) peripheral blood leucocytes: In vitro study. *Fish & shellfish immunology* 78, 392–403. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.043>
- Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., Rodella, L.F., 2014. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age* 36, 313–351. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9564-5>

- Rios, A.C., Moutinho, C.G., Pinto, F.C., Del Fiol, F.S., Jozala, A., Chaud, M.V., Vila, M.M.D.C., Teixeira, J.A., Balcão, V.M., 2016. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research* 191, 51–80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008>
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2016. Cell viability assays, in: *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Roca, F.J., Sepulcre, M.P., López-Castejón, G., Meseguer, J., Mulero, V., 2006. c. *Molecular immunology* 43, 1418–1423. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.028>
- Rodríguez, R., Hamman, M.G., 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi*(Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin* 95, 620–628.
- Rodríguez-García, O.U., Román-Rodríguez, M.J., Morales-Bojorquez, E., Montañez, J.A.D.A., García-De León, F.J., Campos-Dávila, L., Bervera-León, H., Rivera-Rodríguez, L.B., 2020. New features on spatial distribution, age and growth of the protected species *Totoaba macdonaldi* in the Gulf of California. *Biotecnia* 22, 61–72. <https://doi.org/doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.945>
- Roman-Rodriguez, M.J., 1994. Edad y crecimiento de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert en el Alto Golfo de California. Centro de Investigacion Cientifica y de Educaci6n Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, Mexico.
- Sabioni, R.E., Zanuzzo, F.S., Gimbo, R.Y., Urbinati, E.C., 2020. β -Glucan enhances respiratory activity of leukocytes suppressed by stress and modulates blood glucose levels in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 629–640. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10695-019-00739-x>
- Safarian, M., Tabandeh, M.R., Zolgharnein, H., Ghotrami, E.R., 2016. Molecular characteristics of lysozyme G in *Euryglossa orientalis*; cDNA cloning, phylogenic analysis, physicochemical properties and tissue gene expression. *Fish physiology and biochemistry* 42, 1833–1844. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10695-016-0261-z>
- Sanchez, V., Rosales-Mendoza, S., Monreal-Escalante, E., Murillo-Álvarez, J.I., Angulo, C., 2021. Conjugation of β -glucans on heat-stable enterotoxin (ST) to enhance the immunogenic response in mouse leucocytes. *Materials Science and Engineering: C* 118, 111464. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.msec.2020.111464>
- Sato, A., Mayer, W.E., Overath, P., Klein, J., 2003. Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7779–7784. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.1235938100>
- Secombes, C.J., Wang, T., 2012. The innate and adaptive immune system of fish, in: *Infectious Disease in Aquaculture*. Elsevier, pp. 3–68. <https://doi.org/10.1533/9780857095732.1.3>
- Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S., 2011. The interleukins of fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 1336–1345. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>
- SEMARNAT, 2017. Manifestación de impacto ambiental modalidad regional del proyecto. “Desarrollo y validación tecnológica para maricultivo”. CYGNUS OCEAN FARMS S.A. de C.V.
- SEMARNAT (Secretaria del Media Ambiente y Recursos Naturales), 2018. La totoaba especie en peligro de extinción víctima del tráfico ilegal. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/la-totoaba-especie-en-peligro-de-extincion-victima-deltrafico-ilegal?idiom=es>

- Sha, Z., Wang, L., Sun, L., Chen, Y., Zheng, Y., Xin, M., Li, C., Chen, S., 2017. Isolation and characterization of monocyte/macrophage from peripheral blood of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunology* 65, 256–266. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.015>
- Sirimanapong, W., Thompson, K.D., Ooi, E.L., Bekaert, M., Collet, B., Taggart, J.B., Bron, J.E., Green, D.M., Shinn, A.P., Adams, A., 2015. The effects of feeding β -glucan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & shellfish immunology* 47, 595–605. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.042>
- Soanes, K.H., Figueredo, K., Richards, R.C., Mattatall, N.R., Ewart, K.V., 2004. Sequence and expression of C-type lectin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics* 56, 572–584. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00251-004-0719-5>
- Sorroza Ochoa, L., Campoverde, M.I., Santacruz-Reyes, R.A., 2017. Estudio preliminar del extracto de dos plantas medicinales con efecto antibacteriano para uso en acuicultura. *Revista AquaTIC* 49, 1–7.
- Stahl, P.D., Ezekowitz, R.A.B., 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology* 10, 50–55. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80031-9](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80031-9)
- Stosik, M., Tokarz-Deptuła, B., Deptuła, W., 2021. Type I interferons in ray-finned fish (Actinopterygii). *Fish & Shellfish Immunology* 110, 35–43. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.016>
- Tailleux, L., Maeda, N., Nigou, J., Gicquel, B., Neyrolles, O., 2003. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology* 11, 259–263. [https://doi.org/doi:10.1016/S0966-842X\(03\)00102-1](https://doi.org/doi:10.1016/S0966-842X(03)00102-1)
- Takaba, H., Takayanagi, H., 2017. The mechanisms of T cell selection in the thymus. *Trends in immunology* 38, 805–816. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>
- Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in immunology* 26, 104–110. <https://doi.org/doi:10.1016/j.it.2004.12.001>
- Thon, V.J., Khalil, M., Cannon, J.F., 1993. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 268, 7509–7513. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53204-X](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53204-X)
- True, C.D., 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada Baja California.
- Ueda, K., Saito, E., Iwasaki, K., Tsutsui, S., Nozawa, A., Kikuchi, K., Nakamura, O., 2016. Accumulation of cells expressing macrophage colony-stimulating factor receptor gene in the ovary of a pregnant viviparous fish, *Neoditrema ransonnetii* (Perciformes, Embiotocidae). *Fish & shellfish immunology* 50, 223–230. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.028>
- Valdenegro-Vega, V.A., Crosbie, P., Bridle, A., Leef, M., Wilson, R., Nowak, B.F., 2014. Differentially expressed proteins in gill and skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affected by amoebic gill disease. *Fish & Shellfish Immunology* 40, 69–77. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.025>
- Valenzuela-Quiñonez, F., Arreguín-Sánchez, F., Salas-Márquez, S., García-De León, F.J., Garza, J.C., Román-Rodríguez, M.J., De-Anda-Montañez, J.A., 2015. Critically endangered

- totoaba *Totoaba macdonaldi*: signs of recovery and potential threats after a population collapse. *Endangered Species Research* 29, 1–11. <https://doi.org/doi.org/10.3354/esr00693>
- Valenzuela-Quiñónez, F., García-de-León, F.J., de Anda-Montañez, J.A., Balart-Páez, E.F., 2011. La totoaba del Golfo de California¿ Una especie en peligro de extinción? *Interciencia* 36, 664–671.
- Valenzuela-Quinonez, F., Garza, J.C., De-Anda-Montanez, J.A., García-de-León, F.J., 2014. Inferring past demographic changes in a critically endangered marine fish after fishery collapse. *ICES Journal of Marine Science* 71, 1619–1628. <https://doi.org/doi.org/10.1093/icesjms/fsu058>
- Vásquez-Piñeros, M.A., Rondón-Barragan, I.S., Eslava- Mocha, P.R., 2012. Inmunoestimulantes em teleósteos: Probióticos, Beta-glucanas e LPS. *ORINOQUIA - Universidad de los Llanos - Villavicencio*, Meta 16, 17.
- Velazquez-Carriles, C., Macias-Rodríguez, M.E., Carbajal-Arizaga, G.G., Silva-Jara, J., Angulo, C., Reyes-Becerril, M., 2018. Immobilizing yeast β -glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response in fish leukocytes. *Fish & shellfish immunology* 82, 504–513. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.055>
- Vera-Jimenez, N., Pietretti, D., Wiegertjes, G., Nielsen, M., 2013. Comparative study of β -glucan induced respiratory burst measured by nitroblue tetrazolium assay and real-time luminol-enhanced chemiluminescence assay in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & shellfish immunology* 34, 1216–1222. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.004>
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., 2013. The effects of β -glucan on fish immunity. *North American journal of medical sciences* 5, 580–588. <https://doi.org/10.4103 / 1947-2714.120792>
- Volman, J.J., Mensink, R.P., Ramakers, J.D., de Winther, M.P., Carlsen, H., Blomhoff, R., Buurman, W.A., Plat, J., 2010. Dietary (1→ 3),(1→ 4)- β -d-glucans from oat activate nuclear factor- κ B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. *Nutrition Research* 30, 40–48. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.023>
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology & behavior* 94, 276–284. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.045>
- Wang, J., Zhao, L., Liu, J., Wang, H., Xiao, S., 2015. Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & shellfish immunology* 43, 330–336. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.028>
- Wang, L., Liu, L., Zhou, Y., Zhao, X., Xi, M., Wei, S., Fang, R., Ji, W., Chen, N., Gu, Z., 2014. Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Developmental & Comparative Immunology* 43, 54–58. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.006>
- Welker, T., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P., 2012. Effect of short-term feeding duration of diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents on immune function and disease resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 96, 159–171. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01127.x>

- Werling, D., Jungi, T.W., 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00228-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00228-3)
- West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476–480. <https://doi.org/10.1038/nature09973>
- Wilson, W., Lowman, D., Antony, S.P., Puthumana, J., Bright Singh, I.S., Philip, R., 2015. Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 43, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.032>
- Xie, Y., Hu, X., He, H., Xia, F., Ma, Y., Qi, J., Dong, X., Zhao, W., Lu, Y., Wu, W., 2016. Tracking translocation of glucan microparticles targeting M cells: implications for oral drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 4, 2864–2873
- Yadav, M., Schorey, J.S., 2006. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 108, 3168–3175. <https://doi.org/doi.org/10.1182/blood-2006-05-024406>
- Yang, G.-J., Lu, X.-J., Chen, Q., Chen, J., 2015. Molecular characterization and functional analysis of a novel C-type lectin receptor-like gene from a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & shellfish immunology* 44, 603–610. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.037>
- Ye, J., Kaattari, I.M., Ma, C., Kaattari, S., 2013. The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology* 35, 1719–1728. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>
- Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C., Ma, X., 2020. Effect of the Modifications on the Physicochemical and Biological Properties of β -Glucan—A Critical Review. *Molecules* 25, 57. <https://doi.org/doi.org/10.3390/molecules25010057>
- Yurkov, A.M., Kachalkin, A.V., Daniel, H.M., Groenewald, M., Libkind, D., de Garcia, V., Zalar, P., Gouliamova, D.E., Boekhout, T., Begerow, D., 2014. Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f.a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchieii* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 173–185. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10482-014-0315-0>
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal* 272, 6179–6217. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
- Zhang, H., Hu, G., Liu, Q., Zhang, S., 2016. Cloning and expression study of a Toll-like receptor 2 (*tlr2*) gene from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish & shellfish immunology* 59, 137–148. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.001>
- Zhang, M., Kim, J.A., Huang, A.Y.-C., 2018. Optimizing tumor microenvironment for cancer immunotherapy: β -glucan-based nanoparticles. *Frontiers in immunology* 9, 14. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2018.00341>
- Zhang, R., Niu, S., Yang, Z., Zhang, H., 2013. Effects of different amount of *Rhodotorula benthica* in diet on the feeding and growth of *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)* 6, 618–621.
- Zhang, X.-H., Shi, Y.-H., Chen, J., 2015. Molecular characterization of a transmembrane C-type lectin receptor gene from ayu (*Plecoglossus altivelis*) and its effect on the recognition of

- different bacteria by monocytes/macrophages. *Molecular Immunology* 66, 439–450. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.molimm.2015.05.009>
- Zhao, X., Liu, L., Hegazy, A.M., Wang, H., Li, Jie, Zheng, F., Zhou, Y., Wang, W., Li, Jun, Liu, X., 2015. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca²⁺-dependent manner. *Fish & shellfish immunology* 43, 357–363. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.002>
- Zheng, F., Asim, M., Lan, J., Zhao, L., Wei, S., Chen, N., Liu, X., Zhou, Y., Lin, L., 2015. Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*. *International journal of molecular sciences* 16, 10997–11012. <https://doi.org/doi.org/10.3390/ijms160510997>
- Zhou, Q.-J., Wang, J., Liu, M., Qiao, Y., Hong, W.-S., Su, Y.-Q., Han, K.-H., Ke, Q.-Z., Zheng, W.-Q., 2016. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 55, 195–202. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.035>
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B., 2015. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis* 41, 165–173. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.019>
- Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2016. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* 52, 275–288.
- Zhu, Y., Gong, K., Denholtz, M., Chandra, V., Kamps, M.P., Alber, F., Murre, C., 2017. Comprehensive characterization of neutrophil genome topology. *Genes & development* 31, 141–153. <https://doi.org/doi:10.1101/gad.293910.116>
- Zmasek, C.M., Godzik, A., 2014. Phylogenomic analysis of glycogen branching and debranching enzymatic duo. *BMC Evol Biol* 14, 183–183. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0183-2>