

**Programa de Estudios de Posgrado**

**EFFECTO DEL  $\beta$ -GLUCANO 1,3/1,6 SOBRE LA  
RESPUESTA INMUNE, LA ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DIGESTIVA Y LA EXPRESIÓN  
DE GENES DE *Lutjanus peru* y *Sparus aurata***

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

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

present a

**Laura Teresa Guzmán Villanueva**

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 5 del Mes de Febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*"**

Presentada por el alumno:

**Guzmán Villanueva Laura Teresa**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

### LA COMISION REVISORA


  
\_\_\_\_\_  
Dr. Dariel Tovar Ramirez  
CO-DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
CO-DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Esther Macias Rodriguez  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria Angeles Esteban Abad  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Enric Gisbert  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELISA SERVIÉRE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Comité Tutorial**

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Co-Director  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC

Dr. Felipe Ascencio Valle  
Co-Director  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC

Dra. María Ángeles Esteban Abad  
Co-Tutor  
Universidad de Murcia, España

Dr. Enric Gisbert  
Co-Tutor  
IRTA Tarragona, España

Dra. María Esther Macías Rodríguez  
Co-Tutor  
Universidad de Guadalajara

**Comité Revisor de Tesis**

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dra. María Ángeles Esteban Abad  
Dr. Enric Gisbert  
Dra. María Esther Macías Rodríguez

**Jurado de Examen**

Dr. Dariel Tovar Ramírez  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dra. María Ángeles Esteban Abad  
Dr. Enric Gisbert  
Dra. María Esther Macías Rodríguez

**Suplentes**

Dr. Ángel Campa Córdova  
Dr. Héctor Nolasco Soria

## RESUMEN

El efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6, derivado de levaduras sobre el crecimiento, la expresión de genes, enzimas antioxidantes y digestivas del huachinango *Lutjanus peru* fue evaluado antes y después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS). El  $\beta$ -glucano fue adicionado a una dieta basal a diferentes concentraciones (0.0 control, 0.1 y 0.2%). Los tratamientos fueron administrados durante 6 semanas, la toma de muestras se realizó en la semana 0, 2, 4 y 6. Al final de este periodo los peces restantes tanto del grupo control como los alimentados con  $\beta$ -glucanos fueron inyectados intraperitonealmente con LPS ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) o con solución salina fisiológica estéril (SS) como control. Se tomaron muestras a las 0, 24 y 72h. Los resultados mostraron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento después de seis semanas de alimentación con  $\beta$ -glucanos. La actividad enzimática antioxidante superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) fueron medidas en hígado. Se observó un incremento significativo en la SOD, en la actividad enzimática digestiva esterasa, aminopeptidasa, tripsina y quimiotripsina en los organismos que recibieron dietas suplementadas con  $\beta$ -glucano al 0.1 y/o 0.2%. Después de la exposición a LPS, a las 72 h se observó un incremento significativo en la concentración de proteínas plasmáticas totales en suero, en SOD y CAT en peces alimentados con glucanos al 0.1% y/o 0.2% en relación a los peces inyectados con SS. Para conocer la respuesta transcriptómica de *L. peru* por efecto del  $\beta$ -glucano se realizó un análisis de expresión por medio de un microarreglo heterólogo (*Mus musculus*), se observaron 1527 genes sobre-expresados de los cuales 1049 fueron anotados y clasificados de acuerdo a su ontología en 139 procesos biológicos, 22 de ellos se encontraron directamente relacionados con el sistema inmune y digestivo, así como con el desarrollo y el crecimiento. A partir de estos resultados, se cuantificó por qPCR la expresión relativa de *IL-1 $\beta$* , y *TNF- $\alpha$* , en ambos se observó un incremento de la expresión en relación a los genes de referencia *GADPH* y *EF 1- $\alpha$* , confirmando lo encontrado en el microarreglo. Para conocer el efecto del  $\beta$ -glucano (0.1%) y el probiótico Pdp 11 (*Shewanella putrefaciens*;  $10^{-9}$  ufc  $\text{g}^{-1}$ ) sobre el sistema inmune y la expresión de genes en juveniles de *Sparus aurata*, se realizó un experimento de alimentación con diferentes dietas (dieta basal Skretting como control, Pdp 11,  $\beta$ -glucano y  $\beta$ -glucano + Pdp 11). Los tratamientos fueron administrados durante 4 semanas, la toma de

muestras se realizó en la semana 1, 2 y 4. Se observó un incremento significativo en el crecimiento, así como en la actividad peroxidasa, la capacidad fagocítica y la habilidad fagocítica en leucocitos de riñón cefálico en peces alimentados con las dietas adicionadas con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y/o en combinación con el probiótico Pdp 11. Los parámetros medidos en suero, mostraron que los niveles totales de inmunoglobulina M (IgM) presentaron un incremento significativo durante la semana 2 y un descenso en la 4 con la dieta Pdp 11; la actividad peroxidasa en suero disminuyó significativamente en todos los tratamientos con respecto al control y la actividad antiproteasa incrementó en peces alimentados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 + Pdp. El efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta mostró un incremento significativo en el nivel de expresión del gen *IL-1 $\beta$*  con respecto al gen de referencia *EF 1- $\alpha$*  en la semana 4 y una disminución en *IgM* durante la semana 1, ambos en riñón cefálico. El  $\beta$ -glucano tiene gran potencial para ser usado en el cultivo de peces y para desarrollar estrategias de prevención de enfermedades. El  $\beta$ -glucano solo o en combinación con el Pdp 11 es una opción viable para mejorar las condiciones de cultivo de *Sparus aurata*.

**Palabras clave:**  $\beta$ -glucano 1,3/1,6, *Lutjanus peru*, *Sparus aurata*, sistema inmune, actividad enzimática digestiva, microarreglo

---

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Co-director de Tesis

---

Dr. Felipe Ascencio Valle

Co-director de Tesis

## ABSTRACT

The effect of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan, derived from yeast, on growth, antioxidant, and digestive enzyme performance of Pacific red snapper *Lutjanus peru* before and after exposure to lipopolysaccharides (LPS) was investigated. The  $\beta$ -1,3/1,6-glucan was added to the basal diet at different concentrations (0.0 control, 0.1 and 0.2 %). The treatment lasted six weeks, with sampling at regular intervals (0, 2, 4, and 6 weeks). At the end of this period, the remaining fish from either control or  $\beta$ -glucan fed fish were injected intraperitoneally with LPS (3 mg kg<sup>-1</sup>) or with sterile physiological saline solution (SS) and then sampled at 0, 24, and 72 h. The results showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in growth performance after six weeks of feeding with  $\beta$ -glucan. Superoxide dismutase (SOD) activity in liver was significantly higher in diet containing 0.1 %  $\beta$ -glucan in weeks 4 and 6, compared to the control group.  $\beta$ -glucan supplementation at 0.1 and 0.2 % significantly increased esterase aminopeptidase, trypsin, and chymotrypsin activity. At 72 h after injection of LPS, we observed a significant increase in catalase activity (CAT) in liver from fish fed diets supplemented with 0.1 and 0.2 %  $\beta$ -glucan; SOD activity and total serum protein increased in fish fed with 0.1 %  $\beta$ -glucan in relation to those injected with SS. To know the transcriptomic response of *L. peru* to dietary  $\beta$ -glucan, analysis expression was performed using a heterologous microarray (*Mus musculus*), we found 1527 over-expressed genes, which 1049 were annotated and ranked according to their ontology in 139 biological processes, 22 were found directly related to the immune and digestive systems, development and growth. According to these results, we quantified the relative expression of *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  by qPCR, we observed increased expression of both genes in relation to the reference genes *GAPDH* and *EF 1- $\alpha$* , this confirms the results obtained through the microarray. To investigate the effect of  $\beta$ -glucan (0.1%) and probiotic Pdp 11 (*Shewanella putrefaciens*; 10<sup>-9</sup> cfu g<sup>-1</sup>) on the immune system and gene expression in *Sparus aurata* juveniles we conducted a feeding experiment with different diets (basal diet as a control Skretting, Pdp 11  $\beta$ -glucan and  $\beta$ -glucan + Pdp 11). Treatments were administered for 4 weeks; sampling was performed at week 1, 2 and 4. Growth, peroxidase activity, the

phagocytic capacity and phagocytic ability in head kidney leukocytes in fish fed diets with  $\beta$ -glucan 1,3/1,6 and/or in combination with the probiotic Pdp 11 showed significant increase. The measured parameters in serum, showed that the total levels of immunoglobulin M (IgM) significantly increased at week 2 and decreased at week 4 with 11 Pdp diet; peroxidase activity decreased significantly in all treatments compared to the control, the antiproteasa significantly increased in fish fed  $\beta$ -glucan 1,3 / 1,6 + Pdp. The effect of  $\beta$ -glucan 1,3/1,6 supplemented diet showed a significant increase in the expression level of *IL-1 $\beta$*  gene relative to *EF 1- $\alpha$*  at week 4 and a decrease in *IgM* at week 1, both in head kidney. The  $\beta$ -glucan has great potential for use in fish farming and to develop strategies for disease prevention. The  $\beta$ -glucan alone or in combination with Pdp 11 is a viable option for improving farming conditions of *Sparus aurata* aquaculture.

**Keyword:**  $\beta$ -glucan 1,3/1,6, *Lutjanus peru*, *Sparus aurata*, immune system, digestive enzyme activity, microarray

**DEDICATORIA**

*A la memoria de mi hermano Paul*

*A la memoria de mi gran amigo Roberto Carlos Vazquez Juárez*

*A mi mamá*

*A Mony, Faby y Alex*

*A Pablo*

*A mi familia...*



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que me otorgó a través de la beca nacional 35304 y la beca mixta para la realización de mi trabajo de doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, al personal docente y de apoyo por las facilidades prestadas durante mi estancia como estudiante de esta institución.

A el área de posgrado del CIBNOR, Lic. Osvelia, Lic. Leticia, Dra. Serviere, Lupita, Tania, Claudia, Serafina, Horacio Sandoval y Manuel Melero, por su amabilidad y apoyo a mis peticiones y para realizar cada uno de los trámites.

A mis directores de Tesis, el Dr. Dariel Tovar y el Dr. Felipe Ascencio; así también a mis co-tutores, la Dra. María Ángeles Esteban, el Dr. Enric Gisbert y la Dra. María Esther Macías Rodríguez, quienes siempre me han apoyado sin importar la distancia o las circunstancias, guiándome y trabajando conmigo para alcanzar esta meta.

Al Dr. Dariel Tovar, quien siempre me ha otorgado su voto de confianza y me ha brindado su apoyo incondicional en los mejores momentos y más aún cuando las cosas no salían como lo planeábamos, por todo lo que me ha enseñado, sus consejos y su dedicación, por hacerme miembro de su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa, por su valiosa amistad a lo largo de estos años, muchas gracias.

Al Dr. Felipe Ascencio por abrirme las puertas de su laboratorio, por permitirme trabajar en su equipo de investigación. Por la beca pre-doctoral que me brindó para que pudiera iniciar esta etapa, hace algunos años atrás.

A la Dra. Marian por recibirme en Murcia y en su laboratorio, por integrarme a su equipo, por todo su apoyo y ayuda, por su ejemplo de trabajo, por su amabilidad y su sonrisa de siempre, por guiarme y sus palabras de ánimo, especialmente en esta etapa final, muchas gracias.

Al Dr. Enric Gisbert por apoyarme, sus comentarios, correcciones y colaboración para este trabajo, por abrirme las puertas en su laboratorio.

A la Dra. Esther Macías por su guía, apoyo, aportaciones y también por su trabajo y tiempo dedicado, tanto en los experimentos como en la revisión del trabajo y por su valiosa amistad.

Al personal técnico del CIBNOR que colaboraron en este trabajo; especialmente a la M. en C. Patricia Hinojosa por su valiosa ayuda y guía en varias de las técnicas realizadas, Pablo Monsalvo, Enrique y Jorge Calvillo por cuidar y conseguir a mis peces. Así como a la Universidad de Murcia, al CAID, Laboratorio de Biología Celular e Histología (UM),

Unidad de Microarreglos de la UNAM, Laboratorio de Fisiología y Genómica Funcional, Laboratorio de Aclimatación de Organismos Marinos, Laboratorio de Nutrición Acuícola, Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, Laboratorio de Histología e Histoquímica, Laboratorio de Genómica, Laboratorio de Diagnostico de Parásitos y el Laboratorio de Bromatología.

A a maestra Diana Dorantes, Ira Fogel, al personal técnico de Buceo del CIBNOR.

A los integrantes de la Unidad de Microarreglos de la UNAM, el Dr. Jorge Ramírez, Simón Guzmán, José Luis Santillán y Lorena Chávez.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia, al Dr. José Meseguer, Patri, Héctor, Fran, Alberto Cuesta., Juan Pedro, Yulema y Said, mil gracias por recibirme, por todo el trabajo realizado y también por su valiosa amistad.

Al Dr. Ángel Campa, quien siempre me ha brindado su apoyo en todo lo que sea necesario, por sus valiosos comentarios, por su amistad y consejos.

Al Dr. Héctor Nolasco y al Dr. Juan Carlos Pérez por su ejemplo y dedicación de trabajo.

Al Dr. Ricardo Vázquez y la Dra. Mauri Rojas, a quienes estimó y aprecio, siempre están presentes apoyándome en lo que sea necesario, por brindarme su amistad, los considero grandes personas y amigos.

Tengo mucho que agradecer y pocas palabras, que no me alcanzan para expresar lo afortunada y feliz que me siento por contar con todas las personas que forman parte de mi vida, por su amistad, amor y cariño. Muchas gracias.

A mi mamá, a mis sobrinos Faby y Alex, a mi hermana Mony, su amor y cariño son mis tesoros más valiosos.

A Pablo, mi amor, por su gran apoyo, amor, cariño, su risa y alegría, que también son un gran regalo invaluable en mi vida.

A mi papá.

A mi familia.

A mis primos Gaby, Tavio, Rosy, Aidi, Fabiola, Carmelita y Elia.

A mis amigos del CIB, Fernando Abasolo, Yarelys Ferrer, Erika Zavala, Ana Bricia Guzmán, Arlett Robles, Rosy, Yssel Gadar, Rosy, Angélica Herrera, Cristina Escobedo,

Quina, Raul Llera, Martita, Claudia, Jaime Carmona, Julio Sanchez, Dilian, Claudia Morales e Izmene Rojas, por su ayuda, compañía, risa y amistad.

A Cristina Escobedo por su gran amistad, por los desvelos, platicas, por compartir los momentos más alegres y los de crisis doctorales y existenciales también, por esta maravillosa amistad y por ser una excelente persona.

A Mariana Pérez, Ayin Alvarado, Julio Hernández por todos los momentos compartidos, por su valiosa amistad y apoyo.

A Alberto Escalante por tu apoyo y gran cariño sin importar el tiempo y la distancia, por tus palabras de aliento y todos los momentos felices compartidos, por estar siempre presente, muchas gracias.

A mis queridos amigos, Maby Urquidi, Ale Arcieniega, Elba Olimpia, Wendy Gómez, Cristina Escobedo, Itzel Sifuentes, Madeline Rosales, Teresa Lefavre, Paty Guzmán, Lety Jerónimo, Ale Mendizabal, Vero y Alejandro Ochoa, por compartir nuestras vidas, por estar conmigo en los momentos más felices de mi vida y también en los difíciles. Por ser unas excelentes y maravillosas personas, los respeto, quiero y admiro, muchas gracias por todo.

A Pau, Yana y Samy; Car; Laura Treviño y Emilia; Karime, amigas e hijas de mis amigas, lindísimas personas que he tenido la fortuna de conocer, que llevo conmigo con gran cariño.

Gracias a Zulema Pluig e Isis Malagrino por su ejemplo de vida y actitud siempre positiva.

A las personas que me recibieron en España, Olivia y Wendy Gómez y familia, así como en Italia, Chiara Gabellini y familia.

A mis amigos Eduardo Santiago, Tere cervantes, Laura Muñoz, Román Olmos y Alex Zugasti que siempre están presentes a pesar de la distancia.

Al Agüita y a mi Cachi, amigos fieles y compañeros.

Gracias a todos por acompañarme en esta etapa de mi vida, por todo el cariño, apoyo y ayuda que me han brindado, ha sido un gran impulso para mí y me ha permitido alcanzar esta meta.

## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

Guzmán-Villanueva, LT, Ascencio-Valle, F, Macías-Rodríguez, ME, Tovar-Ramírez D. 2013. Effects of dietary  $\beta$ -1,3/1,6 glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper *Lutjanus peru* after exposure to lipopolysaccharides. *Fish Physiol Biochem.* doi 10.1007/s10695-013-9889-0

Guzmán-Villanueva, LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Cuesta A, Meseguer J, Ascencio-Valle, F, Esteban MA. 2014. Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol.* Enviado.

### Participaciones en congresos

AQUA 2012, organizado por The European Aquaculture Society and World Aquaculture Society. Effects of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on antioxidant enzyme activity in *Lutjanus peru* exposed to lipopolysaccharides. Praga, República Checa, del 01 al 05 de septiembre del 2012.

### Estancia de investigación científica

Universidad de Murcia (UM), España. Facultad de Biología, Campus Espinardo, Laboratorio de Biología Celular e Histología. Estancia dirigida por la Dra. María Ángeles Esteban Abad, investigadora titular y vicerrectora de dicha institución.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Inmunoestimulantes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Prebióticos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Probióticos y simbióticos</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> (Pdp 11) .....	5
<b>1.4 <math>\beta</math> glucano 1,3/1,6</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Uso de <math>\beta</math>-glucanos como inmunoestimulantes</b> .....	<b>6</b>
<b>1.6 Uso de <math>\beta</math>-Glucanos como prebióticos</b> .....	<b>8</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1 Huachinango Lutjanus peru</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 La dorada Sparus aurata</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3 Inmunidad de peces</b> .....	<b>11</b>
2.3.1 Sistema inmune innato .....	11
2.3.2 Sistema inmune adaptativo.....	11
2.3.3 Enzimas antioxidantes .....	12
2.3.4 Factores que afectan la respuesta inmune .....	13
2.3.5 Principales enfermedades que afectan a peces .....	14
2.3.6 Lipopolisacáridos (LPS).....	17
2.3.7 Relación entre el sistema inmune de peces y el $\beta$ -glucano 1,3/1,6 .....	18
<b>2.4 Efecto del <math>\beta</math>-glucano sobre el crecimiento</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 <math>\beta</math>-Glucanos y el sistema inmune</b> .....	<b>19</b>
2.5.1 Los receptores de los $\beta$ -glucanos.....	19
2.5.2 Receptores del complemento.....	21
2.5.3 Lactosilceramida.....	21
2.5.4 Receptores tipo Toll Like .....	21
2.5.5 Respuesta inmune después de la administración oral de $\beta$ -glucanos .....	22
2.5.8 $\beta$ -glucanos como adyuvantes.....	25
<b>2.6 Microarreglos</b> .....	<b>27</b>
2.6.1 Uso de microarreglos heterólogos en acuicultura .....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Objetivos particulares</b> .....	<b>31</b>
<b>5. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>32</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>

<b>6.1 Experimento I. Ensayo de alimentación con <math>\beta</math>-glucano 1,3/1,6 suplementado en la dieta de <i>L. peru</i>.</b> .....	<b>33</b>
6.1.1 Obtención de los organismos en campo .....	33
6.1.2 Aclimatación.....	33
6.1.4 Mantenimiento general.....	34
6.1.5 Sistema experimental.....	34
6.1.6 Elaboración de las dietas inertes y $\beta$ -glucano 1,3/1,6 .....	35
6.1.7 Diseño experimental.....	36
<b>6.2 Exposición a LPS.....</b>	<b>36</b>
<b>6.3 Muestras .....</b>	<b>36</b>
6.3.1 Obtención de muestras .....	37
6.3.4 Crecimiento .....	38
6.3.5 Análisis hematológicos.....	40
6.3.6 Actividad SOD y CAT .....	40
<b>6.4 Actividad enzimática digestiva.....</b>	<b>40</b>
6.4.1 Métodos cualitativos (sistema API ZYM).....	40
6.4.2 Métodos cuantitativos (espectrofotometría) .....	41
<b>6.5 Análisis de un microarreglo heterólogo <i>Mus musculus</i> y <i>Lutjanus peru</i>.....</b>	<b>42</b>
6.5.1 Diseño experimental.....	42
6.5.2 Precipitación del ARN.....	43
6.5.3 Hibridación del microarreglo heterólogo .....	43
6.5.4 Lectura, anotación y análisis bioinformático del microarreglo .....	44
<b>6.6 Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real .....</b>	<b>45</b>
6.6.1 Diseño de primers degenerados.....	45
6.6.2 Diseño de primers específicos .....	45
6.6.3 Evaluación de la expresión de genes del sistema inmune y digestivo .....	47
<b>6.7 Experimento II. Ensayo de alimentación con <math>\beta</math>-glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp 11 adicionados en la dieta de <i>Sparus aurata</i>.</b> .....	<b>47</b>
6.7.1 $\beta$ -Glucano 1,3/1,6 y Pdp 11 <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	47
6.7.2 Peces y mantenimiento .....	48
6.7.3 Elaboración de las dietas .....	48
6.7.4 Diseño experimental y muestreos.....	49
6.7.5 Obtención de muestras .....	50
6.7.6 Crecimiento .....	51
6.7.7 Aislamiento de leucocitos de riñón cefálico.....	51
<b>6.8 Parámetros inmunes .....</b>	<b>51</b>
6.8.1 Niveles de IgM en suero.....	52
6.8.2 Actividad antiproteasas en suero .....	52
6.8.3 Actividad peroxidasa.....	53

6.8.5 Cuantificación de la expresión de genes .....	55
<b>6.9 Análisis estadístico .....</b>	<b>55</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>7.1 Experimento I. Ensayo de alimentación con <math>\beta</math>-glucanos .....</b>	<b>56</b>
7.1.1 Análisis hematológicos.....	56
7.1.2 Actividad enzimática antioxidante .....	58
7.1.3 Crecimiento .....	59
<b>7.2 Actividad enzimática digestiva.....</b>	<b>61</b>
7.2.1 Métodos cualitativos.....	61
7.2.2 Métodos cuantitativos (espectrofotometría) .....	61
<b>7.3 Exposición a lipopolisacáridos (LPS) .....</b>	<b>61</b>
7.3.1 Ensayos hematológicos .....	61
7.3.2 Actividad enzimática antioxidante .....	65
<b>7.4 Análisis transcriptómico de <i>Lutjanus peru</i> por un microarreglo heterólogo..</b>	<b>68</b>
7.4.1 Expresión de genes de peces alimentados con $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% .....	68
7.4.2 Análisis bioinformático y anotación.....	70
7.4.3 Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real.....	82
<b>7.5 Experimento II. Efecto del <math>\beta</math>-glucano 1,3/1,6 sobre la expresión de genes y     parámetros inmunológicos de <i>Sparus aurata</i>.....</b>	<b>82</b>
7.5.1 Parámetros inmunológicos .....	82
7.5.2 Expresión de genes .....	87
7.5.3 Crecimiento .....	88
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>89</b>
<b>8.1 Experimento I.....</b>	<b>89</b>
8.1.2 Análisis hematológicos.....	89
8.1.3 Actividad enzimática antioxidante .....	89
8.1.4 Crecimiento .....	90
8.1.5 Actividad enzimática digestiva.....	91
<b>8.2 Exposición a lipopolisacáridos (LPS) .....</b>	<b>93</b>
8.2.1 Ensayos hematológicos .....	93
8.2.2 Actividad enzimática antioxidante .....	94
<b>8.3 Análisis transcriptómico de <i>Lutjanus peru</i> por un microarreglo heterólogo..</b>	<b>97</b>
8.3.1 Expresión de genes de peces alimentados con $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% .....	97
<b>8.4 Experimento II .....</b>	<b>102</b>
8.4.1 Crecimiento .....	102
<b>8.5 Parámetros inmunológicos .....</b>	<b>104</b>
8.5.1 Fagocitosis y actividad peroxidasa .....	105
8.5.2 Niveles totales de IgM en suero .....	107

8.5.3 Actividad antiproteasa .....	108
<b>8.6 Expresión de genes .....</b>	<b>108</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>110</b>
<b>Experimento I .....</b>	<b>110</b>
<b>Experimento II .....</b>	<b>110</b>
<b>9.1 Conclusiones generales .....</b>	<b>111</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>112</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO A. Evaluación de la expresión de genes .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO B. Curvas de disociación de los genes <math>\alpha</math>-Amy (a) y TNF-<math>\alpha</math> (b) por qPCR</b> .....	<b>134</b>
<b>ANEXO C. Detección del gen Factor de crecimiento insulina (IGF) .....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO D. Información general sobre los genes de estudio .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO E. Artículo científico generado del experimento I .....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO F. Artículo científico generado del experimento II .....</b>	<b>139</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
1	Huachinango <i>Lutjanus peru</i>	9
2	Dorada <i>Sparus aurata</i>	10
3	Sistema experimental (a) y (c); juvenil de <i>Lutjanus peru</i> (b); extracción de sangre (d); toma de peso (e) y disección de órganos (f)	39
4	Elaboración de las diferentes dietas usadas en dorada	49
5	Extracción de sangre (a) y disección del riñón cefálico (b)	50
6	Efecto de la inclusión en la dieta del $\beta$ -glucano al 0 control, 0.1 y 0.2% sobre la concentración de hemoglobina en <i>L. peru</i>	57
7	Efecto de la inclusión en la dieta del $\beta$ -glucano al 0 (control), 0.1 y 0.2% sobre la concentración de proteínas totales en suero en <i>L. peru</i>	57
8	Efecto de la inclusión en la dieta del $\beta$ -glucano sobre la actividad enzimática antioxidante catalasa (CAT) en <i>L. peru</i>	58
9	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en <i>L. peru</i>	59
10	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta (0 control, 0.1 y 0.2%) sobre la actividad enzimática digestiva tripsina (a), esterasa (b); lipasa (c); $\alpha$ -quimiotripsina (d) y fosfatasa alcalina (e) en <i>L. peru</i>	62
11	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta sobre la actividad enzimática digestiva de tripsina (a), quimiotripsina (b), aminopeptidasa (c) y fosfatasa alcalina (d) en <i>L. peru</i>	63
12	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre las proteínas totales plasmáticas a las 72 h, después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS) en <i>L. peru</i>	65
13	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la actividad catalasa a las 24 h (a) y 72 h (b) después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS) de <i>L. peru</i>	66
14	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la superóxido dismutasa (SOD) a las 24 h (a) y 72 h (b) después de la exposición a lipopolisacáridos LPS	67
15	Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de riñón cefálico	68
16	Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de intestino	69
17	Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de páncreas	69
18	Rutas metabólicas en las que participan los genes sobre-expresados por efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en <i>L. peru</i>	81
19	Dominios de proteínas predominantes, relacionados a los genes sobre-expresados por efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6	81

20	Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta sobre la expresión relativa de los genes $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -Amy) y Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) en riñón cefálico (RC), páncreas e intestino	83
21	Actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico en juveniles de <i>S. aurata</i>	84
22	Actividad peroxidasa en suero de juveniles de <i>S. aurata</i>	84
23	Capacidad fagocítica (a) y habilidad fagocítica (b) de <i>S. aurata</i>	85
24	Niveles de IgM total en suero de juveniles de <i>S. aurata</i>	86
25	Actividad antiproteasa en juveniles de <i>S. aurata</i>	86
26	Expresión de genes relacionados con el sistema inmune en riñón cefálico de <i>S. aurata</i>	87
27	Categorías funcionales de los genes sobre expresados por efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en <i>L. peru</i>	99

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
<b>I</b>	Enfermedades transmisibles más importantes en la acuicultura de peces	16
<b>II</b>	Primeros estudios realizados en peces con microarreglos	28
<b>III</b>	Composición de las dietas usadas en los tratamientos con diferentes concentraciones de $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en <i>Lutjanus peru</i>	35
<b>IV</b>	Primers degenerados <i>IL-1<math>\beta</math></i> e <i>IGF</i> para <i>L. peru</i>	46
<b>V</b>	Primers específicos para <i>L. peru</i>	46
<b>VI</b>	Dietas utilizadas en el bioensayo de alimentación para <i>Sparus aurata</i>	48
<b>VII</b>	Primers específicos para <i>Sparus aurata</i>	55
<b>VIII</b>	Valores hematológicos y enzimas antioxidantes de juveniles <i>L. peru</i> en cautiverio, antes del ensayo de alimentación	56
<b>IX</b>	Crecimiento de juveniles de <i>L. peru</i>	60
<b>X</b>	Concentración de hemoglobina (mg dL <sup>-1</sup> ) en juveniles de <i>L. peru</i> después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS)	64
<b>XI</b>	Bases de datos seleccionadas para realizar la anotación funcional	70
<b>XII</b>	Análisis del microarreglo heterólogo, mostró 139 procesos biológicos anotados	71
<b>XIII</b>	Procesos biológicos relacionados al sistema inmune y digestivo	77
<b>XIV</b>	Funciones moleculares anotadas	79
<b>XV</b>	Componentes celulares anotados	80
<b>XVI</b>	Crecimiento de juveniles de <i>Sparus aurata</i>	88

**LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXOS</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
<b>A</b>	Evaluación de la expresión de genes	130
<b>B</b>	Curvas de disociación de los genes $\alpha$ -Amy (a) y $TNF-\alpha$ (b) por qPCR	134
<b>C</b>	Detección del gen Factor de crecimiento insulina ( <i>IGF</i> )	135
<b>D</b>	Información general sobre los genes de estudio	136
<b>E</b>	Artículo científico generado del experimento I	138
<b>F</b>	Artículo científico generado del experimento II	139

## 1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, la acuicultura es el sector de mayor crecimiento en la producción de alimento; actualmente es responsable de cerca del 50% de la oferta mundial de pescado (FAO, 2010) y se considera que será una de las principales actividades económicas del presente siglo. Además representa una alternativa real a la sobreexplotación de los recursos pesqueros (FAO, 2007), genera trabajos permanentes y divisas para el país.

El mayor obstáculo en el desarrollo y sustentabilidad de la industria acuícola es la ocurrencia de enfermedades en los sistemas de cultivo. Hoy, la prevención y el manejo de enfermedades son medidas centrales en esta industria. En la actualidad, estos dos factores son los más importantes que conciernen a los investigadores y a los acuicultores (Meena *et al.*, 2012). La intensificación de las prácticas de acuicultura ocasiona estrés y con ello la aparición y desarrollo de diferentes organismos patógenos, en consecuencia el indiscriminado uso de antibióticos para prevenirlos ha propiciado la aparición de diversos patógenos resistentes. Las enfermedades causadas por microorganismos infecciosos son conocidas por ser uno de los mayores problemas en la acuicultura en los pasados años (Scholz *et al.*, 1999), además impiden el desarrollo y sustentabilidad de la industria a través del mundo (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005).

El concepto de la alimentación funcional es un paradigma emergente en la industria de la acuicultura, donde se pretende elaborar dietas con un balance nutricional y suplementadas con aditivos que promueven la salud y la resistencia a las enfermedades en cultivos de peces (Gatlin y Li, 2004).

Estrategias alternativas tales como el uso de vacunas, suplementación en la dieta de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes pueden ayudar a reducir la susceptibilidad de los peces a las enfermedades. Los inmunoestimulantes son una herramienta básica en acuicultura y es usada para aumentar la resistencia contra enfermedades infecciosas por aumento de la inmunidad humoral y los mecanismos de defensa celular (Raa *et al.*, 1992; Siwicki *et al.*, 1998).

La restricción o prohibición del uso de antibióticos en los alimentos de peces y crustáceos ha propuesto dirigir las investigaciones hacia productos alternativos para el mantenimiento de la salud, tales como los inmunoestimulantes (Siwicki *et al.*, 1994), los prebióticos (Kiron, 2012) y simbióticos, los cuales constituyen una opción muy interesante (Dimitroglou *et al.*, 2011). Estos beneficios han sido citados por diferentes autores (Douglas y Syers, 2008; Reid, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Varios estudios en peces han propuesto al  $\beta$ -glucano como un potente, valioso y prometedor inmunoestimulante por modular la respuesta inmune y controlar enfermedades en peces de cultivo (Robertsen *et al.*, 1994; de Baulny *et al.*, 1996; Yerson, 1997; Figueras *et al.*, 1998; Kawakami *et al.*, 1998; Robertsen, 1999); por otro lado los polisacáridos al ser usados como prebióticos han demostrado tener efectos benéficos sobre el crecimiento, la morfología intestinal y la actividad enzimática digestiva (Dimitroglou *et al.*, 2011).

### **1.1 Inmunoestimulantes**

Los inmunoestimulantes son sustancias naturales o sintéticas capaces de modular la respuesta inmune innata o adaptativa (Anderson, 1992), activando las señales del sistema inmune del animal o por diferentes rutas de señalamiento celular (Gatlin *et al.*, 2006 en Dalmo y Bøgwald, 2008), por lo cual pueden aumentar la resistencia a diferentes enfermedades (Cáceres *et al.*, 2004).

Diversos autores han publicado diferentes aspectos sobre la relación entre los inmunoestimulantes y el sistema inmune en peces (Galeotti, 1998; Gannamy Schrock, 1999). Sohn *et al.* (2000) discuten a detalle el papel de los inmunoestimulantes en animales monogástricos y en peces. Magnadóttir (2006) da su punto de vista sobre el desarrollo ontogénico del sistema inmune no específico con respecto a diferentes factores que influyen el sistema innato por inmunoestimulantes.

Más recientemente, el control inmunológico de enfermedades de peces fue discutido por Ringø *et al.*, (2012).

Existen varios reportes de inmunoestimulantes efectivos en peces, como lo son el levamisol (Cáceres *et al.*, 2004; Siwicki, 1989), vitaminas (Duncan, 1994; Hardie *et al.*,

1991), citocinas (Raa *et al.*, 1992), probióticos (Irianto y Austin, 2002; Ortuño *et al.*, 2002) y los  $\beta$ -glucanos (Dalmo y Bøgdal, 2008).

## 1.2 Prebióticos

Los prebióticos son aditivos alimentarios no digeribles (por el hospedero), que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias específicas benéficas que incrementan la salud (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los prebióticos ofrecen un método alternativo de manipulación y estimulación favorable de las poblaciones de la microbiota, aumentando las funciones digestivas del hospedero a través de la producción de enzimas digestivas exógenas y vitaminas, estimulando su crecimiento, facilitan la absorción del calcio y otros minerales, además de colaborar en la síntesis de la vitamina K y del complejo B (Cruz y Mendoza, 2000; Galán, 2004), lo que contribuye a mantener la salud y adecuada nutrición de los organismos cultivados.

A pesar de los prometedores beneficios citados en la literatura, los resultados son difíciles de interpretar debido a la dificultad y al conocimiento incompleto sobre la microbiota presente en el tracto gastrointestinal y sus subsecuentes interacciones con el hospedero (Dimitroglou *et al.*, 2011). Diferentes efectos positivos de los prebióticos son indirectos, es decir son el resultado de la modulación del metabolismo de la microbiota (de Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Los prebióticos comparados con los probióticos presentan ventajas distintas, como es la estimulación *in situ* del crecimiento de ciertas bacterias residentes (endógenas y comensales) y la activación del metabolismo bacteriano; ya que al llegar al intestino, son degradados por la microbiota, dando lugar a la producción de ácidos orgánicos (ácidos grasos volátiles y ácido láctico), así como de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ) (Rosado y Ondarza, 2003).

## 1.3 Probióticos y simbióticos

Los probióticos son ingredientes microbianos vivos, adicionados en la dieta que son benéficos para la salud y que cuando se administran en la cantidad adecuada confieren

beneficios al huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). En la actualidad una de las definiciones de probiótico en acuicultura más aceptadas por la comunidad científica es la de Verschuere *et al.* (2000): “complemento microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador modificando la comunidad microbiana relacionada con él mismo o con el ambiente, asegurando un uso mejorado del alimento ó aumentando su valor nutricional, favoreciendo la respuesta del hospedador frente a las enfermedades ó mejorando la calidad del ambiente. Además Gatesoupe (1999) definió a los probióticos en acuicultura como “células microbianas administradas de tal manera que, en el tracto gastrointestinal se mantienen vivas con el objetivo de mejorar la salud” y Gram *et al.* (1999; en García de la Banda *et al.*, 2012) lo definió como: “aquel suplemento vivo microbiano que afecta beneficiosamente al hospedador mejorando su balance microbiano”. Decir también que en una de las últimas revisiones realizadas sobre el uso de probióticos en acuicultura en el año 2010 por Merrifield *et al.* (2010a) se ha propuesto una nueva definición del término más concreta y más ampliada: “célula microbiana viva, muerta ó componente celular que, al ser administrado vía alimentación ó en el agua de cultivo, beneficia al huésped, mejorando bien la resistencia frente a las enfermedades, bien el estado de salud, el crecimiento, la utilización de la dieta alimenticia, la respuesta al estrés ó el vigor en general, obteniéndose al menos en parte, una mejora en el balance microbiano del huésped ó del medio que le rodea. Entre los posibles mecanismos de actuación de los probióticos se encuentran: la exclusión competitiva asociada a la producción de compuestos antimicrobianos tales como bacteriocinas, lisozimas y proteasas (Verschuere *et al.*, 2000), la competencia por los nutrientes y la energía disponible (Gram *et al.*, 1999 en García de la Banda *et al.*, 2012) o por los puntos de adhesión a la superficie del huésped (Nikoskelainen *et al.*, 2001; Chabrillón, 2004; Ringo *et al.*, 2010), la estimulación de la respuesta inmune (Irianto y Austin, 2003; Salinas *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2006a), la mejora del estado nutritivo del huésped mediante el aporte de enzimas, aminoácidos esenciales, péptidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc (Sugita *et al.*, 1996; de Moura *et al.*, 2009), estimula el sistema inmune innato y adquirido de los peces (Nikoskelainen *et al.*, 2001, 2003; Balcázar *et al.*, 2006b) y la inhibición de la expresión de genes de virulencia ó ruptura del “quorum sensing” (Defoirdt *et al.*, 2007).



Los simbióticos se definen como una combinación de probióticos y prebióticos que afectan positivamente al hospedero, mejorando la supervivencia e implantación de los microorganismos vivos de la dieta en el tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Los probióticos y prebióticos al combinarse en un simbiótico pueden tener un efecto sinérgico, mejorando el efecto que tienen al administrarse por separado (Cerezuela, 2012). El uso de simbióticos como promotores de la salud está aún poco definido y los estudios son escasos. En humanos, la aplicación de simbióticos ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de determinadas enfermedades (Firmansyah *et al.*, 2011; Quigley, 2011), mientras que en individuos sanos, se ha observado que el consumo de un producto simbiótico mejora la percepción subjetiva del bienestar gastrointestinal y podría mejorar el perfil de las moléculas de adhesión en el intestino (Nova *et al.*, 2011).

### **1.3.1 Probiótico *Shewanella putrefaciens* (Pdp 11)**

Chabrilón (2004), estudió diferentes cepas bacterianas aisladas de piel de dorada, con potencial probiótico para el lenguado senegalés; donde destacó la cepa *Shewanella putrefaciens* (Pdp 11), la cual presentan una alta capacidad de adhesión y crecimiento en el mucus de dorada, además es capaz de inhibir el crecimiento de algunas cepas virulentas para el lenguado senegalés, tales como *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* (Chabrilón *et al.*, 2006). Estudios posteriores con el lenguado senegalés, demostraron que la administración en la dieta de células Pdp11 inactivadas por calor, produce un aumento significativo en la capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico en *S. aurata* (Díaz-Rosales, 2006). Sin embargo, esta misma cepa, inactivada por calor, no promueve *in vitro* un aumento significativo en los parámetros de la respuesta inmune innata, tales como son el contenido de la leucocito peroxidasa y del estallido respiratorio de los leucocitos del riñón cefálico (Salinas *et al.*, 2006). Por otro lado, la administración de Pdp11 en dieta aumenta la actividad leucin aminopeptidasa en el intestino distal de los ejemplares que recibieron la dieta probiótica, frente a los peces alimentados con la dieta control (Sáenz de Rodrigañez *et al.*, 2009). Estos resultados muestran una mayor eficiencia de la

funcionalidad digestiva. Por lo anteriormente mencionado es de gran interés el estudio de esta cepa y con ello mejorar las condiciones de diferentes especies cultivadas.

#### **1.4 $\beta$ glucano 1,3/1,6**

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos, constituidos por un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa. Poseen una estructura química que contiene un esqueleto conformado por unidades repetidas (ramas) de  $\beta$ -D-glucopiranosil unidas por enlaces glicosídicos de tipo  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,6) enlazados a cadenas de tamaño, distribución y longitud variable. Esta forma es el principal constituyente de la pared celular de algunas plantas, hongos, bacterias, levaduras y algas marinas. Poseen diferentes pesos moleculares y grados de ramificaciones. En las levaduras el  $\beta$ -glucano es el carbohidrato que está en mayor proporción, aunque también contiene glucosa y manosa y es el mayor constituyente de la membrana celular. (Dalmo y Bøgdwald, 2008).

Estos patrones moleculares son abundantes en comunidades microbianas de procariontes por lo que son llamadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) (Dalmo y Bøgdwald, 2008) estos juegan un papel como moléculas de alarma activando el sistema inmune (López *et al.*, 2003; Aderem y Ulevitch, 2000), incrementando la actividad enzimática antioxidante (Kumari y Sahoo, 2006a), promoviendo el crecimiento de animales acuáticos (Del Río *et al.*, 2011), y confiriendo protección contra organismos patógenos (Rodríguez *et al.*, 2009; Dalmo y Bøgdwald, 2008; Ai *et al.*, 2007).

#### **1.5 Uso de $\beta$ -glucanos como inmunoestimulantes**

Los  $\beta$ -glucanos como inmunoestimulantes han sido ampliamente estudiados en diversas especies de vertebrados e invertebrados y discutidos en detalle por Soltanian *et al.*, (2009). En años recientes la atención ha sido enfocada sobre el uso del  $\beta$ -glucano en peces. Muchos estudios han aportado resultados sobre diferentes especies de peces, tales como salmón del Atlántico (Paulsen *et al.*, 2001), trucha arcoiris (Jorgensen *et al.* 1993; Djordjevic *et al.*, 2009), pargo (Cook *et al.*, 2003), pez gato africano (Yoshida *et al.*, 1995), langostino marfil

(Hai y Fotedar, 2009) y lubina europea (Bagni *et al.*, 2005, 2008; Bonaldo *et al.*, 2007). Estos estudios han demostrado el efecto del  $\beta$ -glucano sobre el crecimiento (Cook *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2006), supervivencia, resistencia y protección contra patógenos (Welker *et al.*, 2007; Sealey *et al.*, 2008), producción de anticuerpos (Selvaraj *et al.*, 2005; Kamilya *et al.*, 2006), expresión de genes relacionados al sistema inmune (Løvoll *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) y como adyuvantes (Rørstad *et al.* 1993; Kawakami *et al.*, 1998) en un amplio rango de especies de peces. Considerando el multifacético papel del  $\beta$ -glucano en el sistema inmune de peces se han actualizado los conocimientos de su efecto de varias fuentes del  $\beta$ -glucano a través de diferentes rutas de administración, sólo o en combinación con otros inmunoestimulantes para peces y moluscos tanto de agua dulce como de origen marino.

El uso de los  $\beta$ -glucanos, como inmunoestimulantes ha recibido mayor atención, debido a que su estructura molecular es reconocida y puede unirse a receptores tipo Toll like (TLRs), los cuales liberan moléculas que actúan como señales de peligro, activando diferentes respuestas inmunológicas asociadas a la presencia de patógenos. Sin embargo, aún existen muchas interrogantes sobre los mecanismos por los cuales los  $\beta$ -glucanos pueden prevenir o reducir las infecciones (Dalmo y Bøgwald, 2008).

Los PAMPs inician la respuesta inflamatoria. Interesantemente la mayoría de los PAMPs estudiados activan las células presentadoras de antígenos junto con las células T naïve en las células dendríticas y las células T cooperadoras (Aderem y Ulevitch, 2000; Bricknell y Dalmo, 2005; O'Hagan *et al.*, 2001; Schijns, 2003).

Durante el rompimiento y degradación microbiana, el número de PAMPs liberados pueden iniciar la respuesta inflamatoria por la unión de receptores y la activación intracelular de la transducción de señales y los factores de transcripción. La exacta composición de las señales de peligro liberadas podría ser decisiva en la transcripción de los genes llevando a la síntesis y liberación de citocinas preinflamatorias. Los inmunoestimulantes han sido usados como aditivos en los alimentos por varios años en acuicultura y el  $\beta$ -glucano de levaduras puede ser uno de los más ampliamente reportados.

### **1.6 Uso de $\beta$ -Glucanos como prebióticos**

Los efectos adversos y el elevado costo de los antibióticos usados para combatir enfermedades en acuicultura alientan a los investigadores a explorar alternativas, donde la aplicación de prebióticos es una opción. Por ejemplo, en la carpa *Carassius auratus* alimentada con el prebiótico xylo-oligosacárido, no se observó efecto sobre el crecimiento y la supervivencia, pero sí diferencias en la actividad proteasa y amilasa comparada con el control (Xu *et al.*, 2009). En otro estudio, la alimentación con fruto-oligosacáridos de cadena corta (scFO) incrementó el crecimiento de la microbiota del tracto gastrointestinal y aumentó la inmunidad en el camarón blanco del Pacífico (Li *et al.*, 2007). Similarmente los fruto-oligosacáridos y los oligosacáridos de manosa muestran un incremento en la tolerancia a la salinidad y el desarrollo de microvelledades en el tracto de larvas de cobia *Rachycentron canadum* (Salze *et al.*, 2008).

Hasta ahora, los reportes relacionados al efecto del  $\beta$ -glucano en peces han sido principalmente enfocados a su uso como inmunoestimulante y no a su efecto como prebiótico, estimulando la actividad enzimática digestiva a través de la microbiota. Sus efectos sobre la fisiología digestiva no son claros. El  $\beta$ -glucano es un polisacárido no digerible ya que las  $\beta$ -glucanasas son escasas o no existen en peces, además el conocimiento de sus efectos sobre la fisiología del tracto digestivo es escaso o no está disponible (Sinha *et al.*, 2011).

Dado que el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 es comúnmente usado en acuicultura, es importante conocer su efecto sobre el sistema inmune y digestivo así como su aplicación en especies de interés comercial y con potencial de ser cultivadas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Huachinango *Lutjanus peru***

El huachinango (Fig.1), es una especie nativa, que se distribuye en el este del Pacífico, desde México hasta Perú, alcanza la madurez sexual rápidamente (Allen, 1985). Son depredadores generalistas demersales que se alimentan principalmente durante la noche de

crustáceos, moluscos y peces (Allen, 1985; Santamaría, 1998). Habitan aguas tropicales a profundidades relativamente someras hasta 90 m (Allen y Robertson, 1994).

Su crecimiento es lento, alométrico y similar entre ambos sexos, llegando a alcanzar hasta 99 cm de longitud total (LT) (Rocha-Olivares, 1998); son gonocóricos y maduran entre los 25 y 40 cm de longitud total, presentando generalmente una proporción de sexos cercana a 1 y más de un periodo de desove anual (Santamaría, 1998). Allen (1987) menciona que los adultos y juveniles de *L. peru* son esencialmente sedentarios, sin extensas migraciones y que están típicamente asociados con sustratos rocosos o coralinos.



**Figura 1.** Huachinango *Lutjanus peru*

Sin embargo, aunque algunos estadios larvarios se han descrito (Watson y Brogan, 1996), no se cuenta con una descripción completa de su ciclo de vida y se desconoce totalmente la ecología larvaria de la especie. Al igual que otras especies demersales que durante su desarrollo comparten el hábitat con crustáceos penéidos, los juveniles del huachinango forman parte de la fauna acompañante en la pesca de camarón (Rocha-Olivares, 1998; 2003). Se carece totalmente de información genética para un manejo adecuado del recurso. En México es de importancia económica ya que tiene una gran demanda comercial y soporta grandes pesquerías (FAO, 2012), por lo que es importante realizar estudios sobre esta especie ya que son escasos y se desconocen muchos de los aspectos biológicos de estos organismos. Su cultivo es una alternativa a la sobrepesca (FAO, 2006).

## 2.2 La dorada *Sparus aurata*

La dorada *Sparus aurata* L. (1758) pertenece a la familia *Sparidae* y el género *Sparus* (Fig.2). Se distribuye en el Mar Mediterráneo en las costas del Atlántico del Este desde Gran Bretaña hasta Senegal, y ocasionalmente en el Mar Negro. Es una especie de gran importancia económica para la acuicultura intensiva en el Mar Mediterráneo (Anon, 1995). Es hermafrodita protándrica; primero madura como macho y a partir del segundo o tercer año se revierte a hembra. El desarrollo de la madurez sexual resulta en machos a los 2 años de edad (20-30 cm) y en hembras a los 2-3 años (33-40 cm). En cautiverio, el cambio de sexo está condicionado por factores sociales y hormonales. La dorada es una especie carnívora y se alimenta en su hábitat natural de moluscos y otros organismos bentónicos (Stickney, 2000). Debido a sus hábitos eurihalinos y euritérmicos, la especie se encuentra tanto en ambientes marinos y salobres, tales como lagunas costeras y áreas estuarinas, en particular en etapas iniciales de su ciclo de vida (Stickney, 2000).

Su cultivo se desarrolló durante los años 80, la reproducción a gran escala de juveniles de dorada se desarrolló entre 1988-1989 en España, Italia y Grecia (Caggiano, 2000). Esta especie tiene un alto valor comercial debido a su excelente carne, alcanzando una producción anual alrededor de 10, 000 ton (Consejería de Acuicultura y Pesca, 2001).



**Figura 2.** Dorada *Sparus aurata*

## 2.3 Inmunidad de peces

### 2.3.1 Sistema inmune innato

La primera línea de defensa de los peces y otras especies contra las infecciones, es el sistema inmune innato. Este incluye las barreras físicas como las superficies mucosas y la piel con un amplio rango de sustancias asociadas como el moco por citar una sola de ellas, pero también una variedad de leucocitos (monocitos/macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas) y diversas sustancias humorales (p. e. lisozima, factores del complemento, interferón, proteína C reactiva, transferrina, anti-proteasas, lectinas, eicosanoides) que inhiben indiferenciadamente el crecimiento de microorganismos infecciosos (Dalmo *et al.*, 1997).

El componente celular principal en la respuesta inmune innata lo constituyen los macrófagos, además de su función como presentadores primarios de antígenos en la respuesta inmune adquirida, son los principales fagocitos de los peces, secretan citocinas prei-nflamatorias (Blazer, 1991; Dalmo *et al.*, 1997) y aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades (Ewart *et al.*, 2008).

Lisozima. La presencia de la actividad lisozima ha sido bien documentada en varias especies de peces, está presente en plasma, moco de la piel, órganos y huevos de peces (Fletcher y White, 1973; Engstad *et al.*, 1992; Yousif, 1994). En la trucha arcoiris y el lenguado *Paralichthys olivaceus*, el gen de la lisozima es transcrito en diferentes órganos y ha sido identificado en el riñón e hígado (Dautigny *et al.*, 1991; Hikima *et al.*, 1997). El ARNm de lisozima en la trucha es codificado por una secuencia de 129 aminoácidos y un péptido señal de 15 aminoácidos (Irwin *et al.*, 1996).

### 2.3.2 Sistema inmune adaptativo

La segunda línea de defensa es la inmunidad adaptativa; aunque los peces no tienen médula ósea o nodos linfoides, el timo, el riñón y el bazo asumen este papel (Dalmo *et al.*, 1997).

La inmunidad adaptativa puede ser dividida en celular y humoral, y depende en gran medida de linfocitos T y B respectivamente (Ruiz *et al.*, 2003a).

Similar a como ocurre en los mamíferos, la inmunidad humoral adaptativa en peces involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B diferenciadas en células de memoria y células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos antígeno-específicos. Así también, la inmunidad adaptativa mediada por células involucra el reconocimiento de antígenos por las células T expuestas en la superficie de las células presentadoras de antígenos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que inducen la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC, CD8+), células T cooperadoras (LTA, CD4+) secretoras de citocinas y células supresoras (Ruiz *et al.*, 2003a).

Los peces son capaces de producir diferentes inmunoglobulinas (Ig), tales como la IgM, que puede aparecer como tetrámeros en teleósteos o como pentámeros o monómeros en peces cartilagosos; están compuestas por cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras de gran heterogeneidad (Ruiz *et al.*, 2003a). También se ha identificado la IgD (Ellis, 1998; Watts *et al.*, 2001), IgT en trucha (Hansen *et al.*, 2005), IgZ en pez cebra (Danilova *et al.*, 2005) y la IgH en pez globo (Savan *et al.*, 2005).

Ahora se sabe que los peces tienen diferentes isotipos de anticuerpos, aunque la relevancia funcional de esta diversidad estructural no es clara y existen considerables variaciones entre especies (Ruiz *et al.*, 2003a; Vandenberg, 2004).

### **2.3.3 Enzimas antioxidantes**

La respuesta inmune innata involucra la producción de moléculas altamente reactivas, denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Estos componentes pueden destruir efectivamente patógenos invasores durante un proceso infeccioso ayudando a contener los patógenos invasores, tales como bacterias, protozoarios u hongos (Luckhart *et al.*, 1998; Brunet, 2001; Chakravortty y Hensel, 2003; Stevenson y Riley, 2004); sin embargo su toxicidad no es solo restringida a organismos extraños



(Nathan y Shiloh, 2000) actuando también de manera no específica sobre las células del hospedero. La sobreproducción de ROS durante la respuesta inflamatoria puede por lo tanto provocar un daño tisular al propio organismo, fenómeno conocido como estrés oxidativo (Coleman, 2001). Así mismo, en todos los vertebrados, la fagocitosis está asociada con la producción de ROS; y tiene como principal función la eliminación de los patógenos siendo potentes microbicidas (Muñoz *et al.*, 2000) en este proceso muchas especies de oxígeno reactivas pueden cruzar las vacuolas fagocíticas hacia el ambiente extravacuolar y extracelular causando daño (Welker *et al.*, 2007), para contrarrestar este efecto dañino, las enzimas antioxidantes juegan un importante papel protegiendo a las células del hospedero.

La superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa pueden neutralizar o eliminar a las especies de oxígeno reactivas (Warner, 1994). La SOD, tiene la función de proteger a las células de los daños causados por estos compuestos a través de la reducción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno; el peróxido de hidrógeno luego de cruzar la membrana es removido por la acción de la catalasa y/o la glutatión peroxidasa (Anderson, 1996).

La SOD es uno de los principales mecanismos de defensa en respuesta al estrés oxidativo causado por agentes contaminantes en el medio ambiente, por infecciones de microorganismos o por cambios de temperatura (Neves *et al.*, 2000).

La CAT es una enzima presente en todos los órganos animales, plantas y organismos aerobios (Wang, 1985), protege a las células de los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno, que cataliza la descomposición a oxígeno molecular y agua sin la producción de radicales libres.

### **2.3.4 Factores que afectan la respuesta inmune**

El estado nutricional afecta el sistema inmunológico de los peces; las deficiencias de las vitaminas C y E alteran el funcionamiento de los macrófagos y el complemento; los desbalances de ácidos grasos pueden alterar la fagocitosis fundamentalmente por modificación de las características de la membrana celular de leucocitos (Blazer, 1991) y

disminuir marcadamente la microbiota del intestino y a su vez la resistencia a la adhesión y translocación bacteriana (Ringo *et al.*, 2001).

En lo que concierne a los factores extrínsecos, la temperatura es trascendental en los peces cuando debe responder a un agente patógeno. La temperatura del agua afecta la respuesta inmune en mayor o menor medida según la especie del pez y la adaptación previa a la misma (Penagos *et al.*, 2008).

### **2.3.5 Principales enfermedades que afectan a peces**

El uso de antibióticos para el control de las enfermedades ha creado resistencia en las bacterias y la destrucción en la microbiota intestinal, causando un efecto supresor del sistema inmune (Verschuere *et al.*, 2000). Por otra parte, uno de los principales problemas es la acumulación de residuos de antibióticos en los productos para consumo humano (Uma *et al.*, 1999). Actualmente, en muchos países, incluido México, se ha regulado y normado el uso de antibióticos en la acuicultura (Directiva 96/23/CE, 1996, FFDCA ; 21 U.S.C., Guidance No. 78, 2003; NOM-EM-006-PESC-2004) por lo que en la actualidad se prohíbe el uso de antibióticos para la prevención y tratamiento de enfermedades, así como su utilización para promover el crecimiento (Swamm, 1969).

Las enfermedades causadas por agentes patógenos son uno de los principales problemas en la producción sostenible de la acuicultura (Galindo y Hosokawa, 2005), lo cual se atribuye a una amplia variedad de agentes patógenos que comprenden bacterias, virus, parásitos y hongos causando altas mortalidades y pérdidas económicas (Brock y LeaMaster, 1992). Las enfermedades transmisibles más importantes que afectan a peces se muestran en la Tabla I, se clasifican fundamentalmente por su punto de vista socioeconómico y/o sanitario.

La gravedad de estas enfermedades no sólo depende de la especie cultivada o de la capacidad de difusión del agente patógeno. En la mayoría de los casos se ve también amplificada por la presencia de otros factores de distinto tipo: estadio del organismo (principalmente larval por poseer un sistema inmune muy vulnerable), ambiental, nutricional, genético e higiénico-sanitario (manejo) que condicionan el desarrollo y estado

de salud general (Ruiz *et al.*, 2002). Dentro de las enfermedades en acuicultura, la proliferación de bacterias patógenas oportunistas provoca hasta un 80% de mortalidad en cultivos (Munro *et al.*, 1994). Conroy (1984), describe un esquema en el que se agrupan las principales bacterias marinas patógenas de peces, que comprenden:

- 1) Bacterias Gram negativas (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Pasteurella*) causantes de septicemias hemorrágicas.
- 2) Bacterias Gram positivas (*Streptococcus sp.* y *Renibacterium salmoninarum*) causantes de enfermedades sistémicas y altas mortalidades.
- 3) Bacterias ácido resistentes (*Micobacterium*, *Nocardia*) causantes de tuberculosis y nocardiosis.
- 4) Mixobacteria (*Flexibacter*) causante de la patología branquial, además de erosión de piel, aletas y cartílagos.

**Tabla I.** Enfermedades transmisibles más importantes en la acuicultura de peces

<b>Enfermedades</b>	<b>Agente etiológico</b>	<b>Especies sensibles</b>
Anemia infecciosa del salmón	<i>Ortomyxovirus</i>	Salmón del Atlántico <i>Salmo salar</i>
Necrosis pancreática infecciosa	<i>Birnaviridae</i>	Salmónidos
Septicemia hemorrágica viral	<i>Rhabdovirus</i>	Salmónidos, Rodaballo <i>Scophthalmus maximus</i>
Aeromoniasas	<i>Aeromonas moviles</i>	Salmónidos
Estreptococosis	<i>Strettococcus iniae</i>	Rodaballo <i>Scophthalmus maximus</i>
Necrosis Hematopoyética	<i>Lactococcus</i>	Salmónidos
infecciosa	<i>garviae</i>	
Piscirickettiosis	<i>Lisavirus</i>	Salmónidos
Síndrome del alevín	<i>Piscirickettsia</i>	Salmónidos
	<i>salmonis</i>	
	<i>Flavobacterium</i>	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus</i>
	<i>psy</i>	<i>mykiss</i>
	<i>chrophilum</i>	
Furunculosis	<i>Aeromonas</i>	Salmónidos
	<i>salmonicida</i>	

El estudio de la bacterias Gram negativas ha prestado especial atención a los lipopolisacáridos, componentes presentes en su pared celular que son considerados como uno de los mayores factores de virulencia (Swain *et al.*, 2008).

### **2.3.6 Lipopolisacáridos (LPS)**

Los lipopolisacáridos, también llamados endotoxinas son responsables de efectos letales y manifestaciones clínicas de enfermedades en animales y humanos (Swain *et al.*, 2008), caracterizado por la disminución de la ingesta de alimentos y pérdida de masa corporal (Konsman *et al.*, 2002). Son conocidos por estimular la respuesta inflamatoria, por activar rápidamente (en horas) células fagocíticas produciendo ROS (Soszynski y Krajewska, 2002; Braulio *et al.*, 2004). En otra investigación Bertrand *et al.*, (2006) evaluó el efecto de la exposición a LPS sobre las células rojas de la sangre frente a un ataque con radicales libres, demostrando que los LPS activan la maquinaria inflamatoria e inducen un decremento en la capacidad de resistencia de estas células ante radicales libres.

Los animales superiores son extremadamente sensibles a estas endotoxinas incluso a dosis bajas; sin embargo los vertebrados inferiores como los peces son frecuentemente resistentes a este shock endotóxico (Swain *et al.*, 2008).

Los receptores tipo Toll-like (TLR)-4 están principalmente involucrados en la activación del sistema inmune por LPS a través del reconocimiento del motivo de la endotoxina (Lípido A). Aunque diversos receptores tipo Toll-like están presentes en peces, estas moléculas específicamente involucradas en el reconocimiento de la endotoxina mediada por TLR-4 aún no han sido completamente establecidas en varias especies de peces. A pesar de esto, los LPS tienen el potencial para expresar citocinas, proteínas de fase aguda y también ejercen efectos inmunológicos, patológicos, fisiológicos, inmuno-endocrinos y neuro-inmunológicos en diferentes especies de peces. Además esta endotoxina puede estimular la activación de varios parámetros inmunes tales como linfocitos T y B, macrófagos y el sistema del complemento, tales efectos han sido bien establecidos en teleósteos (Swain *et al.*, 2008).

Además esta endotoxina puede estimular la activación de varios parámetros inmunes tales como linfocitos T y B, macrófagos y el sistema del complemento, tales efectos han sido bien establecidos en teleósteos (Swain *et al.*, 2008).

Existen varios reportes sobre el efecto del los LPS en peces, los cuales mencionan que estas endotoxinas estimulan la proliferación policlonal en linfocitos de peces en el salmón (Warr y Simon, 1983), la explosión respiratoria y la actividad fagocítica de macrófagos (Dalmo y Seljelid, 1995; Solem *et al.*, 1995) e inducen la producción de IL-1 $\beta$  en el pez gato (Clem *et al.*, 1985). En otro estudio demuestran que LPS inyectados a *Pragus mayor* incrementan la actividad fagocítica de macrófagos (Salati *et al.*, 1987). Sin embargo el efecto de LPS sobre la producción de lisozima en peces no ha sido completamente estudiado.

### **2.3.7 Relación entre el sistema inmune de peces y el $\beta$ -glucano 1,3/1,6**

Distintas investigaciones realizadas en peces y camarones (Siwicki *et al.*, 1994; Yano, 1992); han demostrado que los  $\beta$ -glucanos actúan como estimulantes del sistema inmunológico; mejoran las condiciones generales de peces y crustáceos, capturan y absorben toxinas y fortalecen a las larvas, lo que permite tolerar el estrés, causado por el transporte, siembra y transferencia en cultivos comerciales.

Otras investigaciones (Dalmo y Bøgwald, 2008), comprobaron que los oligosacáridos de la levadura, mejoran la actividad fagocíticas en monocitos de peces activando el sistema inmunológico humoral.

Ainsworth *et al.* (1996), evaluaron  $\beta$ -glucanos procedentes de *Schizophyllum commune* para activar la respuesta inmune de bagre de canal *I. punctatus*, encontraron que los peces alimentados con dietas suplementadas con 0.1% de  $\beta$ -glucanos, tenían títulos de anticuerpos significativamente superiores para *E. ictaluri* que los peces alimentados con raciones tipo control o a una concentración del 1.0%.

Los glucanos son capaces de inducir la inmunidad innata al incrementar la lisozima en plasma, el complemento y estimulando la actividad fagocítica de los macrófagos en diversos cultivos de peces (Yano, 1992), además incrementan la resistencia contra

infecciones por patógenos oportunistas en salmón Atlántico (Raa *et al.*, 1992) y la trucha arcoiris (Jeney y Anderson, 1993).

#### **2.4 Efecto del $\beta$ -glucano sobre el crecimiento**

Diversos reportes han descrito los efectos y eficacia de los  $\beta$ -glucanos sobre el crecimiento de peces, tal como lo son los  $\beta$ -glucanos de levadura obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae*, que incorporada al alimento incrementa el rango de crecimiento de algunas especies de peces, en ciertas condiciones ambientales (Ai *et al.*, 2007; Cool *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2006; Sealey *et al.*, 2008). Sin embargo en otros experimentos científicos el crecimiento no ha mostrado diferencias significativas después de alimentar a los peces con diferentes  $\beta$ -glucanos (Bagni *et al.*, 2005; Welker *et al.*, 2007; Whittington *et al.*, 2005). No existen reportes que indiquen la absorción de las partículas del  $\beta$ -glucano en el intestino o si éste puede ser digerido y degradado por algún tipo de enzimas, que le permitan ser nutritivo (Dalmo *et al.*, 1997). Otros aditivos en el alimento tales como los alginatos bioactivos que son enriquecidos con ácido manurónico, han mostrado beneficios y desventajas con respecto al incremento del peso en larvas de peces y juveniles (Conceicao *et al.*, 2001; Skjermo *et al.*, 2006; Vollstad *et al.*, 2006).

#### **2.5 $\beta$ -Glucanos y el sistema inmune**

##### **2.5.1 Los receptores de los $\beta$ -glucanos**

Se ha hipotetizado que los  $\beta$ -glucanos son reconocidos por diferentes familias de receptores membranales, así como también opsoninas no clásicas y cascadas de proteínas, tales como el complemento; lo que probablemente es un importante mecanismo para aumentar la afinidad de unión o especificidad (Taylor *et al.*, 2005). Diversos y diferentes receptores han sido reportados por unirse a los  $\beta$ -glucanos, como lo son los SR (*scavenger receptors*), receptor 3 del complemento (CD11b/CD18), dectin 1 y el complejo TLR2/6. Todos siendo innatos pero dectin 1 y TLR2/6 están involucrados con la respuesta adaptativa. Existen al menos tres clases de SR (SR-A, SR-B y SR-C) basados en sus características estructurales. La mayoría de los SR son receptores no específicos de opsoninas que muestran baja afinidad y se unen promiscuamente a muchas sustancias polianiónicas modificadas. Dectin-1, pertenece al tipo C no clásico, como la familia de lectinas, que predominantemente se

unen ligando proteínas y es considerado el mayor receptor de los  $\beta$ -glucanos (Dennehy y Brown, 2007). En ratones, dectin-1 es expresado sobre neutrófilos, macrófagos alveolares y macrófagos inflamatorios, y en menor grado sobre macrófagos y células detriticas (DC) (Taylor *et al.*, 2005). Se conoce que dectin-1 media señales e induce respuestas específicas tales como la producción de IL-10 en DC y la explosión respiratoria en macrófagos y neutrófilos, recientemente se ha demostrado que la unión a ligandos de dectin-1, solo o junto con TLR2 induce otras respuestas, como es la estimulación y producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12p40 (Rothfuchs *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha sugerido, que dectin media el reconocimiento de hongos induciendo preferentemente a IL-17 produciendo células Th (Th17) tanto en humanos como en ratones (Palm y Medzhitov, 2007).

La respuesta de Th17 es importante en las células de activación epiteliales, en el reclutamiento de neutrófilos y durante la migración de leucocitos a la mucosa, ya que involucra la modulación de los receptores que expresan quimocinas. La respuesta inmune después de una infección con patógenos extracelulares y hongos, sintetiza ligandos de dectin-1 que puede favorecer la diferenciación de Th17, hipotéticamente esto es muy importante para la erradicación de bacterias extracelulares y hongos de la mucosa.

La estimulación combinada de TLR y dectin-1 por zymosan, extractos de paredes celulares de levadura, resulta principalmente en la diferenciación de las células Th1. Esto probablemente es debido a que IFN- $\gamma$  e IL-12 median el antagonismo de la diferenciación celular de Th17 (Palm y Medzhitov, 2007). La diferenciación de Th17 es también dependiente de la presencia y de la transformación del factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6 e IL-23. La respuesta de Th17 podría ser muy importante para utilizarse en peces junto con el uso de  $\beta$ -glucanos como un estimulante para incrementar la actividad de defensa en la mucosa contra bacterias y hongos. Con respecto a esto, cinco genes de IL-17 en pez cebra han sido clonados y caracterizados (Gunimaladevi *et al.*, 2006), mientras que en el salmón del Atlántico se inició su secuenciación y clonación (Dalmo *et al.*, 1997). Relativamente la mayor cantidad de transcritos se han encontrado en la mucosa de tejidos del pez cebra (Gunimaladevi *et al.*, 2006).



Los receptores para  $\beta$ -glucanos han sido encontrados en macrófagos de salmón del Atlántico (Engstad y Robertsen, 1994) y en neutrófilos del pez gato (Ainsworth, 1994). No se ha investigado eficazmente el efecto antifúngico del  $\beta$ -glucano en peces aunque ya existen reportes (Dalmo *et al.*, 1997). Los estudios en la distribución de tejidos en peces han revelado que las células endoteliales y los macrófagos son potencialmente responsables de la absorción parenteral de la inyección de  $\beta$ -glucanos, mientras las células del epitelio intestinal (enterocitos) han absorbido al  $\beta$ -glucano después de la administración oral y peritoneal (Dalmo *et al.*, 1997).

### **2.5.2 Receptores del complemento**

Los receptores del complemento tipo 3 (CR3; CD11b/CD18), pertenecen a la familia de las integrinas y de las  $\beta$ 2-integrinas, los cuales son receptores bien caracterizados. CR3 tiene una unión a  $\beta$ -glucanos en el sitio de la cadena (alfa) (CD11b), de los heterodímeros de proteínas (Xia y Ross, 1999). La activación de CR3 puede controlar la síntesis de IL-12 de monocitos humanos, de tal modo que afecta la inmunidad de las células T (Hawlich y Köhl, 2006). El gen (s) CR3 no ha sido clonado y no se tiene su secuencia completa en ninguna especie de pez.

### **2.5.3 Lactosilceramida**

La lactosilceramida ha sido encontrada en leucocitos y células endoteliales, es un glicolípido que contiene una lípido-ceramida hidrofóbica y una azúcar hidrofílica. Esto le permite unirse específicamente a un  $\beta$ -glucano, esto con una producción concomitante de metabolitos reactivos del oxígeno (Chen y Sviour, 2007; Zimmerman *et al.*, 1998). Se desconoce si tales uniones pueden afectar a APC y a la actividad de las células T.

### **2.5.4 Receptores tipo Toll Like**

Se conoce que la pared de hongos y el zymosan contienen varios motivos de diferentes moléculas que pueden unirse a TLR2 y TLR4, esto facilitando por myD88 y dependiente de la señalización intracelular que inducen las citocinas, favoreciendo la diferenciación celular de Th1 (Romagne, 2007). El zymosan que se obtiene de las paredes celulares de la levadura, está compuesto de  $\beta$ -glucanos insolubles y manosa; ha sido utilizado en

numerosos experimentos, debido principalmente a esta habilidad para activar a los macrófagos. En los últimos años, esto ha sido cuestionado debido a que estos compuestos tienen diferentes moléculas y/o grados de pureza, por ejemplo, los lipopolisacáridos bacterianos pueden ser decisivos para la activación de TLR4 (Chen y Sviour, 2007), para apoyar esto, es preciso conocer el contenido de manosas, quitinas, proteínas y lípidos en el zymosan, ya que puede interferir con la interpretación de los resultados. Los reportes más recientes, proponen que la actividad independiente de dectin-1 y la cooperación de dectin-1 con TLR2 es el evento más importante que induce la señalización celular (Dostert y Tschopp, 2007).

### **2.5.5 Respuesta inmune después de la administración oral de $\beta$ -glucanos**

La actividad de complemento en plasma fue evaluada en peces de lubina *Dicentrarchus labrax* alimentados con una dieta suplementada con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 2% por un periodo de tres meses (suministrada cada dos semanas), se observó que los organismos inmunoestimulados mostraron valores mas altos de la actividad de complemento en comparación con los peces control (Bagni *et al.*, 2000). En otro ensayo la vía de activación alterna del complemento fue significativamente aumentada al día 15, en peces alimentados con  $\beta$ -glucano (MacroGard<sup>TM</sup>) y ácido alginico (Ergosan), después del primero de cuatro ciclos, de dos semanas. Sin embargo, los inmunoestimulantes no modularon o incrementaron los niveles de lisozima, la actividad del complemento o modificaron el número de células T y B en sangre periférica después de que los peces fueron alimentados por 35 semanas (Bagni *et al.*, 2005).

En otro estudio, *Pseudosciaena crocea* alimentada con  $\beta$ -glucano al 0.09% y 0.18% durante ocho semanas mostraron que las bajas concentraciones del glucano (0.09%) aumentaron significativamente la explosión respiratoria y la actividad de fagocitosis en los macrófagos del riñón cefálico, mientras que la alta concentración (0.18%) no mostró efectos (Ai *et al.*, 2007). La actividad de lisozima en suero de peces alimentados con ambas concentraciones de glucanos fueron significativamente mayores que el control y la dieta con 0.18% del glucano estimuló significativamente la actividad lisozima comparado con el

0.09%. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la vía del complemento con ninguna de las concentraciones del glucano.

Un  $\beta$ -glucano comercial (EcoActiva™) fue administrado como un suplemento alimenticio al pargo *Pagrus auratus*. El inmunoestimulante incrementó el número de macrófagos, la producción del radical oxígeno durante el invierno pero no durante el verano. En contraste para los macrófagos, activados con EcoActiva™ no se estimuló la vía clásica o alternativa del complemento. Los resultados de este estudio sugirieron que puede ser favorable incluir al  $\beta$ -glucano en la alimentación del pargo durante el invierno para incrementar la resistencia contra enfermedades y el crecimiento (Cool *et al.*, 2003).

El efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 de levaduras sobre la inmunomodulación, en trucha arcoiris fue evaluada a través de la actividad de macrófagos, activación de la lisozima y el complemento. En adición la respuesta a anticuerpos fue analizada después de la vacunación formalin-*Yersenia ruckeri* muertas (Verlhac *et al.*, 1998). Los parámetros del sistema inmune no específico fueron evaluados al finalizar un periodo de alimentación después de la semana dos y cuatro. Se encontró un aumento significativo en el efecto de la dieta del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre concavalin-A induciendo la proliferación de linfocitos y la respuesta a anticuerpos después de la vacuna contra *Y. ruckeri*. Pero los glucanos no mostraron efecto sobre la explosión oxidativa, pinocitosis, actividad lisozima y la vía de activación alternativa del complemento.

En la carpa *Cyprinus carpio* se administró  $\beta$ -glucano por la vía oral después de la vacunación con *Aeromonas hydrofila*, los anticuerpos titulados fueron significativamente incrementados. La administración oral del  $\beta$ -glucano no evidenció cambios de la vía alternativa del complemento (Selvaraj *et al.*, 2005).

En otro ensayo, se estudió el efecto de diferentes dosis de  $\beta$ -glucanos en juveniles de *Labeo rohita* Hamilton durante 56 días; se realizó conteo de leucocitos y diferentes parámetros inmunes humorales (Misra *et al.*, 2006). La administración de altas dosis (500 mg de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de alimento) dió como resultado la disminución del conteo de leucocitos comparado con peces alimentados de 250 y 100 mg. También maximizó la

producción del anión superóxido y la actividad fagocítica en macrófagos de riñón cefálico, cuando fueron alimentados con 500 mg y 250 mg de  $\beta$ -glucano  $\text{kg}^{-1}$  de alimento durante 42 días respectivamente. La actividad hemolítica del complemento fue significativamente mayor en peces estimulados con el  $\beta$ -glucano, excepto la dosis de 500  $\text{mg kg}^{-1}$ . La actividad bactericida y lisozima fueron altas a la dosis de 250 mg de  $\beta$ -glucano en peces alimentados por 42 días.

Es conocido que los  $\beta$ -glucanos y los LPS pueden activar la vía alternativa del complemento. De hecho una inyección intraperitoneal de LPS (por ejemplo, 5 mg LPS por  $\text{kg}^{-1}$  de peso corporal) ha demostrado estimular la actividad hemolítica del complemento en el *Anarhichas minor* (Dalmo y Bøgwald, 2008).

### **2.5.6 Efectos del $\beta$ -glucano en peces inmunocomprometidos**

El efecto en la dieta del  $\beta$ -glucano 1,3 sobre la respuesta inmune en la salud de peces inmunocomprometidos inducidos con aflatoxinas en *Labeo rohita* Hamilton fue investigado. Una sola inyección de aflatoxinas redujo la inmunidad no específica, según lo medido por fagocitosis de neutrófilos, actividad bactericida en suero e inmunidad específica contra *Edwardsiella tarda* (Sahoo y Mukherjee, 2001; 2002). Alimentando con  $\beta$ -glucanos a estos peces por siete días, aumentó la actividad inmune no específica medida a través de la actividad bactericida en suero, la actividad fagocítica y la titulación de anticuerpos.

El  $\beta$ -glucano usado como un suplemento alimenticio aumenta significativamente la explosión respiratoria, la mieloperoxidasa y la actividad fagocítica, su uso puede ser una ventaja sobre los estados inmunosupresivos en estrés ambiental o fisiológico (Kumari y Sahoo, 2006a y b).

### **2.5.7 El estado inmune después de la inyección con $\beta$ -glucanos**

Yano *et al.* (1992) analizó extractos de  $\beta$ -glucanos procedentes de levadura y plantas; los inyectaron en carpa, previamente infectada por *Edwardsiella tarda*. Los autores observaron

que todos los peces testigo, murieron dentro de los tres días siguientes, sin embargo, los peces que recibieron la inyección con los extractos fúngicos presentaron un rango de supervivencia de 60 a 90%.

Estos autores también encontraron que los peces inyectados con  $\beta$ -glucanos tenían actividades séricas de complemento superiores, que podrían ser correlacionadas con el grado de protección.

Rosado y Ondarza, (2003) reportaron reducciones de mortalidad en el bagre de canal infectado con *E. ictaluri*, con inyección intraperitoneal de  $\beta$ -glucano 1,3. Robertson, *et al.* (1990) inyectó  $\beta$ -glucanos al salmón del Atlántico *Salmo salar*, observaron una disminución de la mortalidad cuando éstos se infectaron con *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida* o *Yersinia ruckerii*.

La carpa *C. carpio* inyectada intraperitonealmente con  $\beta$ -glucano (100, 500 y 1000 mg) incrementó significativamente el conteo total de leucocitos e incrementó proporcionalmente los neutrófilos y monocitos al día siete (Selvaraj *et al.*, 2005). La activación clásica y alternativa del complemento no se vió modificada por la inyección de glucanos. Los macrófagos de riñón cefálico tanto para el grupo control como los inyectados con glucanos fueron cultivados y se observó que la actividad SOD fue significativamente mayor en peces inyectados con glucanos a altas dosis. En adición *A. hydrophila* fue más eficientemente lisada por macrófagos de peces estimulados con glucanos.

Una combinación de  $\beta$ -glucanos y LPS inyectados intraperitonealmente a carpas (100 mg de  $\beta$ -glucanos + 10 mg de LPS) tuvo un incremento significativo en el conteo total de leucocitos en sangre y un incremento en la proporción de neutrófilos y monocitos (Selvaraj *et al.*, 2006). La producción del anión superóxido por macrófagos fue también elevada. La vía del complemento clásica y alternativa no fue afectada por el glucano. También la expresión de IL-  $I\beta$  no se elevó en los peces estimulados.

### **2.5.8 $\beta$ -glucanos como adyuvantes**

La acuicultura moderna no sería posible sin el uso de vacunas inyectables contra enfermedades comunes. Sin embargo el uso de emulsiones de aceite como adyuvantes puede causar mayores daños que beneficios tales como, su adhesión interna a órganos,

depósitos de melanina, efectos sobre el crecimiento y deformidades esqueléticas (Berg *et al.*, 2006). Este último es la implicación ética más importante, por ello se intenta desarrollar estrategias de inmunización menos dañinas tales como el uso de  $\beta$ -glucanos como adyuvantes u otros inmunoestimulantes. Rørstad *et al.* (1993) describe la respuesta de protección de los  $\beta$ -glucanos usados como adyuvantes en salmón del Atlántico (Rørstad *et al.*, 1993). Una protección similar también fue encontrada aplicando  $\beta$ -glucanos de levadura en combinación con la bacteria *A. salmonicida* en la protección contra furunculosis (Aakre *et al.*, 1994). Sin embargo existen otros reportes como lo son los de Kawakami y colaboradores, quienes usan partículas de levaduras del  $\beta$ -glucano inyectadas con *Pasteurella piscida* donde no existe una respuesta a los adyuvantes (Kawakami *et al.*, 1998).

Debido a estos resultados diferentes, se requieren más investigaciones para garantizar los términos de las dosis, duración, modelos experimentales y un estudio detallado de las características moleculares (peso molecular, conformación, solubilidad en el agua y carga) de los  $\beta$ -glucanos para conocer si pueden o no potenciar la eficacia de las vacunas y ser aplicados en los sistemas de acuicultura.

### **2.5.9 Expresión de genes seguidos de la administración de $\beta$ -glucanos**

La cuantificación de los niveles de expresión de genes estudiados de ciertos productos de fases agudas (*TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, componentes del complemento 3, 5 y sus subtipos) (Bagni *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2003; Løvoll *et al.*, 2007; Selvaraj *et al.*, 2006), no ha respondido a la pregunta de como actúan los  $\beta$ -glucanos sobre la respuesta inmune adaptativa en peces. En la línea celular de monocitos (THP-1) un alto número de genes fueron subregulados después de la estimulación por  $\beta$ -glucanos, fueron particularmente interesantes los genes involucrados en la quimiotaxis (ligandos de quimiocinas) tales como *CXCL1*, *CXCL2*, *CLXCL3* y *Th1* a su vez asociados a genes tales como *TNF*, *IL-12 $\beta$*  e *IL-8* (Ellertsen *et al.*, 2006).

Conociendo que los  $\beta$ -glucanos tienen la capacidad de inducir a Th17 y a los ligandos de quimocinas, se especula que estos polisacáridos pueden incrementar la resistencia a enfermedades de la mucosa; además su habilidad para incrementar la expresión de los TLR podría ser importante para hipotetizar que pueden incrementar la resistencia a enfermedades bacterianas intracelulares.

En peces, es esencial realizar investigaciones para entender la caracterización, la expresión de genes y la función de las moléculas inmunes relacionadas a nivel de gen (Aoki *et al.*, 2011) así también, conocer su condición nutricional, de acuerdo a los nutrientes y aditivos que son proporcionados en la dieta (Kiron, 2012).

En la actualidad existen herramientas de análisis masivo de genes, como son los microarreglos, esta tecnología es considerada una de las más poderosas y usadas en las ciencias genómicas. La aparición de tecnología de los microarreglos de cDNA y oligonucleótidos ha llevado a recapitular el paradigma en la investigación biológica, de tal manera que el cuello de botella en la investigación está cambiando de la generación de datos hacia el análisis masivo de datos (Sherlock, 2000). Con esta tecnología es factible entender y monitorear diferentes procesos biológicos, detectar mutaciones y realizar mapeos genéticos (DeRise y Lyer, 1999).

## **2.6 Microarreglos**

Los microarreglos de ADN son soportes sólidos (laminillas de vidrio, silico o membranas de nylon) donde se fijan robóticamente cientos o miles de genes (sondas de cDNA). Las sondas están impresas y adheridas en lugares fijos llamados spots o elementos del arreglo, están colocados en un orden específico y cada spot corresponde a un gen diferente. Los chips de ADN (*del inglés DNA microarray*) se usan para analizar la expresión diferencial de genes, monitoreando los niveles de miles de ellos en forma simultánea. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*, en inglés), y la molécula diana (*target*), mediante la intensidad de una

señal fluorescente y cuantificandola a través del análisis de la imagen, lo cual nos indicará el nivel de expresión del gen (Tsoi *et al.*, 2003).

La expresión relativa de los ARNs mensajeros es comparada entre los tratamientos experimentales midiendo el porcentaje de fluorescencia de los spots de cada réplica. Finalmente, basados en la identidad o ubicación de los transcritos sobre el microarreglo se puede determinar qué genes se están regulando bajo diferentes condiciones experimentales (Kassahn *et al.*, 2007b).

### 2.6.1 Uso de microarreglos heterólogos en acuicultura

En cuanto a las aplicaciones de esta tecnología en acuicultura, la información generada en un microarreglo podría servir como la base para desarrollar métodos de prevención para enfermedades infecciosas (Aoki *et al.*, 2011), así también crear estrategias de alimentación adecuadas para peces en cultivo. Los estudios pioneros que se realizaron con peces y microarreglos son citados en la Tabla II.

**Tabla II.** Primeros estudios realizados en peces con microarreglos

Referencia	Objetivo del estudio
Douglas, 2006	Conocer procesos fisiológicos básicos
Bernardi, 2008	Estudios de evolución molecular
Shiu y Borevitz, 2008	Regulación del genoma
Kassahn, 2008	Microarreglos diseñados en una especie pueden ser usados para medir la expresión de genes en otra especie no relacionada (microarreglos heterólogos)

El uso de microarreglos ha crecido rápidamente en pocos años, los investigadores en la actualidad utilizan esta tecnología para realizar estudios ecológicos, cuestiones ambientales y evolutivas incluyendo la variabilidad de la expresión de genes en



poblaciones naturales, especiación, diversidad ecotípica, remedación ambiental e interacciones hospedero-parásito (Wenne *et al.*, 2007; Kirchner *et al.*, 2007; Goetz y MacKenzie, 2008).

Se espera que los estudios basados en microarreglos en acuicultura tengan impacto en:

1. Generar conocimientos sobre patógenos y resistencia a enfermedades.
2. Identificar y diagnosticar rápidamente enfermedades y cepas resistentes.
3. Identificar genes de respuesta inmune y factores que promuevan la resistencia a enfermedades.
4. Conocer deficiencias nutrimentales y cambios en la formulación de dietas óptimas en diferentes estados de desarrollo en organismos cultivados.

Los microarreglos son una herramienta importante ya que puede ayudar a entender el significado biológico de la regulación de genes; sin embargo el desarrollo de microarreglos especie-específicos pueden consumir tiempo y ser costosos. Por lo tanto, el empleo de una plataforma heteróloga puede ser una alternativa atractiva, su uso ha ganado interés en los últimos años (Bar-Or *et al.*, 2007; Buckley, 2007). Investigadores de la biología de peces, han puesto su atención en la aplicación de la tecnología de microarreglos heterólogos (Buckley, 2007). Existen varios estudios de peces teleósteos en diferentes organismos, como por ejemplo; las respuestas al estrés ambiental (Kassahn *et al.*, 2007a, b), la deficiencia de nutrientes en acuicultura (Kirchner *et al.*, 2007) y la respuesta inmune (Tsoi *et al.*, 2003).

La información generada en un microarreglo puede proveer importantes interacciones hospedero-patógeno que podrían servir como la base para desarrollar métodos de prevención de enfermedades infecciosas (Aoki *et al.*, 2011), así también crear estrategias de alimentación adecuadas para peces en acuicultura.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El aumento de las prácticas en acuicultura ha llevado al crecimiento rápido y descontrolado de patógenos y al uso indiscriminado de antibióticos para su prevención, lo que ha ocasionado la aparición de cepas resistentes, estos hechos son dos de los factores más importantes que involucran tanto a investigadores como a productores. Las enfermedades causadas por agentes infecciosos son uno de los principales problemas en acuicultura que impiden la sustentabilidad y desarrollo de esta industria.

El concepto de alimentación funcional es un paradigma emergente en la industria de acuícola que pretende desarrollar dietas nutricionalmente balanceadas y suplementadas con aditivos que mejoren la salud y resistencia de los organismos cultivados.

Intentando solucionar esta problemática, han surgido diferentes estrategias como son la suplementación en la dieta de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes para ayudar a reducir mortalidades en organismos cultivados; tal es el caso del uso del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en acuicultura.

Hasta ahora, la mayoría de los reportes relacionados al efecto del  $\beta$ -glucano en peces, han propuesto a este polisacárido como un potente, valioso y prometedor inmunoestimulante. Por otra parte, el  $\beta$ -glucano es un polisacárido no digerible, dado que no existen o son muy escasas las  $\beta$ -glucanasas en peces, el estudio de sus efectos sobre la fisiología del tracto digestivo es reducido o no está disponible (Sinha *et al.*, 2011); sin embargo puede ser metabolizado por la microbiota de peces por lo que se considera que podría ser usado como prebiótico, incrementando el crecimiento y de manera indirecta la producción de enzimas digestivas del hospedero; por ello, es muy importante conocer sus mecanismos de acción, el perfil de expresión de los genes que estimula y regula así como su aplicación en organismos marinos de importancia comercial.

Por lo tanto, se considera de gran importancia investigar y evaluar el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta de *L. peru* y la dorada *S. aurata* como una alternativa para mejorar las condiciones de cultivo, estimulando el sistema inmune y el crecimiento.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del  $\beta$  glucano 1,3/1,6 al ser administrado en la dieta sobre la expresión de genes, sistema inmune y actividad enzimática digestiva de juveniles del huachinango *Lutjanus peru* y de la dorada *Sparus aurata*.

##### 4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre el crecimiento, la actividad enzimática antioxidante y digestiva de *Lutjanus peru*.
2. Conocer el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta sobre la actividad enzimática antioxidante del huachinango después de la exposición a LPS.
3. Evaluar el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado al 0.1% sobre el transcriptoma de *Lutjanus peru* a través del uso de un microarreglo heterólogo.
4. Validar un microarreglo heterólogo a través de la cuantificación de la expresión de genes relacionados al sistema inmune y digestivo de diferentes órganos por qPCR del huachinango.
5. Conocer el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp11 sobre el crecimiento y la modulación de la respuesta inmune de *Sparus aurata*.
6. Evaluar el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp11 sobre la expresión de genes del sistema inmune de *Sparus aurata*.

## 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- I. Dado que el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 es considerado un PAMP y es reconocido por receptores específicos presentes en células del sistema inmune, entonces podrá modificar la actividad enzimática antioxidante y la expresión de genes relacionados al sistema inmune de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*.
- II. Si los prebióticos son metabolizados por la microbiota presente en el tracto digestivo, estimulando el crecimiento selectivo de bacterias benéficas y estas tienen la capacidad de producir enzimas digestivas exógenas, entonces el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 podrá incrementar el crecimiento y modificar la actividad enzimática digestiva de *Lutjanus peru*.
- III. Si el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp 11 al ser adicionados en la dieta de manera individual, pueden incrementar el crecimiento y la respuesta inmune entonces al ser adicionados juntos en la dieta, tendrán un efecto sinérgico en dichos procesos en *Sparus aurata*.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Experimento I. Ensayo de alimentación con $\beta$ -glucano 1,3/1,6 suplementado en la dieta de *L. peru*.**

#### **6.1.1 Obtención de los organismos en campo**

Se realizaron tres salidas de campo al Municipio del Sargento, con la finalidad de obtener organismos para el experimento. Se colectaron 153 juveniles de *L. peru* con ayuda de los pescadores locales, a través de pesca artesanal utilizando anzuelos. Los peces fueron capturados cerca de la Isla Cerralvo (~24.25 °N, ~109.85 °W), en el Estado de Baja California Sur, y transportados en tanques al CIBNOR. Los organismos fueron encontrados a 40 m de profundidad por lo que se les extrajo el aire de la vejiga natatoria.

#### **6.1.2 Aclimatación**

Los peces fueron aclimatados por doce semanas antes de comenzar el experimento. En el primer día de cautiverio no se alimentó a los animales, a partir del segundo y hasta el séptimo día se les administró alimento fresco (calamar). La coalimentación, se llevó a cabo partir del octavo día, con alimento particulado y alimento fresco. La sustitución alimenticia se logró el día 25, a partir de ese momento, solo se alimentó con la dieta particulada, la cual fue administrada *ad libitum*, dos veces al día, una vez por la mañana y otra por la tarde.

#### **6.1.3 Monitoreo y manejo de parásitos**

El monitoreo de parásitos se realizó semanalmente colocando cuerdas de nylon (sustrato utilizado para atrapar huevos de monogéneos) durante 24 horas y se analizó el sedimento de cada tanque, ambas muestras eran revisadas por microscopía óptica y contraste de fases.

Durante el primer mes de cautiverio se detectaron monogéneos *Microcotylidae* (parásitos de branquias, gusanos alargados con numerosas pinzas) y escasos copépodos. Posteriormente, se detectaron huevos de monogéneos capsálidos (parásitos de piel, gusanos aplanados, grandes con un disco adhesivo). Estos parásitos tienen una alta tasa reproductiva por lo que pueden dañar fácilmente al hospedero.

Por lo arriba mencionado, en dos ocasiones los peces fueron tratados con una solución de formaldehído al 10% por 1 h para remover ectoparásitos de las branquias. Los peces no mostraron síntomas patológicos causados por infecciones o enfermedades o el desinfectante, este método mostró resultados positivos, ya que la supervivencia fue del 100% y los análisis siguientes no revelaron la presencia de parásitos.

#### **6.1.4 Mantenimiento general**

Los organismos fueron puestos en tanques con capacidad de 500 L con un sistema de circulación abierto, flujo de 500% de reciclado y aereación constante, el agua fue filtrada cada día y expuestos a un fotoperiodo natural. La temperatura ( $27 \pm 1.5$  °C), salinidad ( $40 \pm 0.83$  g mL<sup>-1</sup>) y el oxígeno disuelto ( $6.8 \pm 0.75$  mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) fueron medidos cada dos días. Los tanques fueron limpiados dos veces al día, incluyendo la remoción de la materia fecal.

El sistema de circulación constó de una bomba marca Jacuzzi de 1 HP y otra de la misma marca de ½ HP, un filtro mecánico de arena y un filtro tipo bolsa GAF (10µ, 5 µ y 1µ).

#### **6.1.5 Sistema experimental**

El sistema experimental consistió en nueve tanques de plástico, cada uno con capacidad de 550 L (Fig. 3). Para probar el buen funcionamiento del sistema, este se llenó con agua de mar dos días previos a la introducción de los peces. Los organismos fueron aleatoriamente distribuidos en los tanques a una densidad de 17 peces por cada tanque. Finalmente se realizó una ANOVA con los datos de pesos y tallas para asegurar que no existieran diferencias significativas entre los grupos experimentales.

**Tabla III.** Composición de las dietas usadas en los tratamientos con diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucano 1,3/1,6. El análisis químico se realizó siguiendo los métodos

Dietas	Control	$\beta$ -Glucano 0.1%	$\beta$ -Glucano 0.2%
Composición Proximal	(0% $\beta$ -glucano)		
Proteínas <sup>a</sup>	52.84±0.1	52.79±0.21	52.69±0.17
Lípidos <sup>a</sup>	23.25±0.06	22.62±0.27	22.78±0.29
Fibra Cruda <sup>a</sup>	0.17±0.04	0.16±0.05	0.20±0.07
$\beta$ -glucano 1,3/1,6 (Fibosel®) <sup>b</sup>	0.0	0.1	0.2

AOAC (1990)

<sup>a</sup> Todas las dietas fueron preparadas a partir del alimento comercial SKRETTING (Vancouver, Canada) conteniendo harina de pescado, harina de ave, harina de gluten de maíz, aceite de pescado, grasa de ave, trigo integral, harina de plumas, lisina, polisorbato 60, mezcla vitamínica que contiene: acetato de vitamina A, vitamina D, vitamina E, inositol, pantotenato de calcio, riboflavina, ácido nicotínico, tiamina, piridoxina, cobalamina, D-Biotina, ácido fólico, polifosfato ascórbico, menadiona de sodio y complejo bisulfito (vitamina K); DL metionina, una mezcla de minerales que contiene manganeso, sulfato, metionina de zinc, iodato de calcio, cobre, sulfato, sulfato ferroso, selenio de sodio y etoxiquina (antioxidante)

<sup>b</sup> Fibosel® manufacturado por LALLEMAND

### 6.1.6 Elaboración de las dietas inertes y $\beta$ -glucano 1,3/1,6

Se prepararon tres dietas experimentales a partir de un alimento comercial (Skretting, Stavanger, Norway). El alimento fue pulverizado y después reconstituido adicionando 2% de ácido alginico (Sigma, #A7128, St. Louis, MO) como agente de unión, las partículas fueron mezcladas por 15 min con una batidora industrial, lentamente y cuidadosamente se adicionó el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 (Fibosel®) (Lallemand, Montreal, QC) para asegurar la efectiva incorporación y las concentraciones deseadas de 0.1 y 0.2%. La dieta control no fue suplementada con  $\beta$ -glucano. Se agregó agua (40%). El alimento se pasó por un extrusor con un cubo de 1/8 cortándose en trozos de 1 cm aproximadamente, se colectó en

charolas, fue secado en un horno durante 20 h a 40 °C. Finalmente se almacenó a 4° C para su posterior uso. Su producción se llevo a cabo en el Laboratorio de Nutrición Acuícola perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Los ingredientes usados para las dietas experimentales son enlistados en la Tabla III. La composición química proximal de los principales ingredientes en las dietas fue analizado de acuerdo a los Métodos Oficiales de Análisis (AOAC, 1990) (Tabla III).

### **6.1.7 Diseño experimental**

153 juveniles de *L. peru* (peso promedio inicial  $340.38 \pm 28.39$  g; longitud estándar  $23.20 \pm 1.06$  cm) fueron aleatoriamente divididos en tres tratamientos experimentales (17 peces por tratamiento, cada tratamiento por triplicado) basados en la concentración del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado al alimento: 0.0% (control), 0.1 y 0.2%. Los peces fueron alimentados dos veces al día a aparente saciedad sin sobrepasar el límite del 2% de su biomasa por día, durante seis semanas. El alimento no consumido cada día, se almacenó para su posterior cuantificación. Los tiempos de alimentación y dosis del  $\beta$ -glucano fueron basados en trabajos previos (Berg *et al.*, 2006; Bricknell y Dalmo, 2005).

Al concluir el periodo de alimentación los peces fueron expuestos a LPS.

### **6.2 Exposición a LPS**

Después de seis semanas de alimentación con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6, 36 peces (12 peces por tratamiento experimental) fueron inyectados intraperitonealmente con LPS ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) de *E. coli* (Sigma, #0127B8) y 18 peces (6 peces por cada tratamiento experimental) fueron inyectados con SS como un control.

### **6.3 Muestras**

De los 153 peces iniciales, 99 fueron muestreados durante las seis semanas del experimento de alimentación y los 54 peces restantes fueron usados para realizar el reto con LPS.



Durante el periodo de seis semanas de alimentación con el  $\beta$ -glucano1,3/1,6, se tomaron 27 peces (9 peces por cada tratamiento), en las semanas 0, 2 y 4. En la semana 6 se colectaron 18 peces (6 peces por cada tratamiento), por la mañana antes de ser alimentados.

Al concluir el periodo de alimentación con  $\beta$ -glucanos, los peces fueron expuestos a LPS, de estos se colectaron 12 peces por tratamiento (6 peces inyectados con LPS y 6 peces inyectados con SS). Las muestras fueron tomadas en tres intervalos: justo antes de la inyección y después de la inyección a los 24 y 72 h.

### **6.3.1 Obtención de muestras**

En cada uno de los muestreos se tomó peso y longitud de los peces y se disectaron los siguientes órganos y tejidos: Sangre total, riñón cefálico, intestino, hígado y páncreas (Fig. 3) Las muestras colectadas fueron almacenadas y preservadas para posteriormente realizar pruebas de secreción enzimática *in vitro*, hematológicas y extracción de ARN total; todo ello encaminado a conocer diferentes parámetros del sistema inmune y digestivo de los organismos de interés.

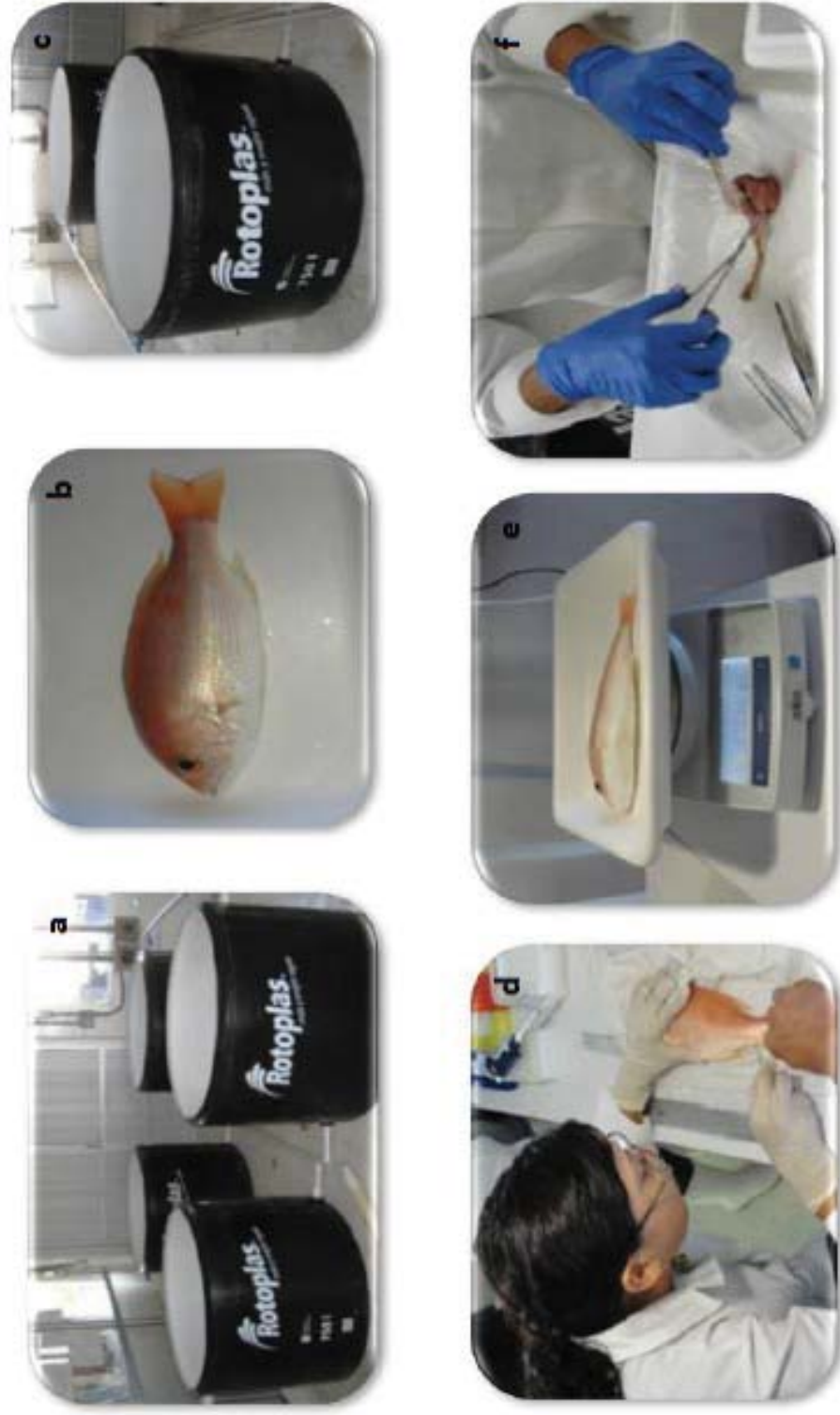
Se tomaron aproximadamente 500 mg de cada uno de los diferentes órganos, de todos los peces. Las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las muestras para biología molecular fueron primero sumergidas en RNAlater<sup>®</sup> (#AM7020 Ambion, Inc.) y después almacenadas hasta su manejo posterior.

Antes de colectar la sangre, todos los peces fueron anestesiados con eugenol (Sigma, #E-5504) (1 mL eugenol en 30 L agua). Las muestras de sangre fueron colectadas de la vena caudal con una aguja del núm. 21 y con jeringa de 3 ó 5 mL. A continuación fueron centrifugadas a 12,000g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar el plasma y fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Una porción del hígado fue extraída para pruebas de enzimas antioxidantes y un segmento del intestino anterior para medir actividad digestiva. Todas las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 6.3.4 Crecimiento

El peso corporal y la longitud de cada pez fue medido y el crecimiento fue monitoreado en términos de ganancia en peso porcentual (WG%), tasa específica de crecimiento (SGR) y factor de condición (FC), los cuales fueron calculados para cada uno de acuerdo a las siguientes ecuaciones (1)  $FC = (\text{peso}/\text{longitud estándar}^3) \times 100$ ; (2)  $SGR = [\text{Ln}(\text{peso final} - \text{peso inicial})/\text{número de días} \times 100]$ ; y (3)  $WG\% = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) \times 100$  (Silva-Carrillo *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Sistema experimental (a) y (c); juvenil de *Lutjanus peru* (b); extracción de sangre (d); toma de peso (e) y disección de órganos (f).

### **6.3.5 Análisis hematológicos**

El contenido de proteínas plasmáticas fue medido por el método descrito por Bradford, (1976). La concentración total de proteínas solubles fue leída a 595 nm, de acuerdo al ensayo del kit (Bio-Rad Laboratories, #500-0006, Hercules, CA). Para construir la curva estándar se utilizó albumina de suero bovino (Sigma, #A4503) para determinar la concentración de proteína en cada muestra. Los niveles de hemoglobina total en sangre fresca fueron determinados por análisis de espectrofotometría a 540 nm, siguiendo la reacción con los reactivos de Drabkin (Drabkin y Austin, 1935).

### **6.3.6 Actividad SOD y CAT**

La actividad SOD y CAT fueron medidas en hígado, como se describe brevemente a continuación: 0.1 g del tejido fue homogenizado en 4 volúmenes (v/w) de agua fría destilada (4 °C) y centrifugados a 12,000g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80 °C hasta su análisis.

Las enzimas CAT y SOD fueron analizadas por triplicado, usando 10 y 20 µL de los homogenizados respectivamente. La actividad CAT fue realizada midiendo el decremento de la absorbancia a 240 nm causada por la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 min (Beauchamp y Fridovich, 1971). La actividad SOD se realizó de acuerdo a McCord y Fridovich (1969), donde SOD compete con el citocromo *c* por los iones superóxido generados por las reacciones de hipoxantina y la xantina oxidasa. La actividad SOD es determinada por el nivel de reducción en la inhibición del citocromo *c* a 550 nm. Las actividades son reportadas como unidad mg<sup>-1</sup> proteína. Las concentraciones de proteínas en cada una de las muestras fueron determinadas de acuerdo a Bradford, (1976).

## **6.4 Actividad enzimática digestiva**

### **6.4.1 Métodos cualitativos (sistema API ZYM)**

El sistema API ZYM (bioMérieux Ref. #25200) es un micrométodo semicuantitativo de actividad enzimática, donde se puede utilizar un extracto complejo no purificado. Este

método no sustituye a las técnicas de separación electroforética, aunque puede orientar los resultados, dando una idea general de la actividad de las muestras.

Se realizó la determinación enzimática de todas las muestras obtenidas durante el experimento de alimentación y después de la exposición a LPS de *E. coli*.

Las galerías API fueron inoculadas con 20  $\mu$ L de extracto de hígado de pez, previamente diluido 1:10 con agua destilada estéril, se incubó en una cámara húmeda durante 4 h a 30 °C y en agitación constante. Para crear la atmósfera húmeda de cada galería, se repartieron 5 mL de agua destilada en la charola donde fueron colocadas.

Las reacciones producidas se tradujeron en cambios de color que se revelaron mediante la adición de una gota de los reactivos ZYM A (Réf. #70 494) y ZYM B (Réf. #70 493). La lectura de estas reacciones se realizó en presencia de una muestra testigo. El valor 0 correspondió a una reacción negativa, el valor 5 a una reacción de intensidad de color, las reacciones intermedias se anotan como 1, 2, 3 ó 4, según su intensidad (3, 4 y 5 siendo consideradas como positivas). Cada muestra se midió por triplicado.

Para conocer las condiciones óptimas de incubación y la concentración adecuada de la muestra se realizaron diferentes ensayos preliminares.

#### **6.4.2 Métodos cuantitativos (espectrofotometría)**

Cada segmento intestinal fue homogenizado en cuatro volúmenes (v/w) de agua destilada fría (4 °C) y centrifugada a 12,000g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80 °C hasta analizar la actividad enzimática determinada, la cual fue medida durante el periodo de alimentación antes de la exposición a LPS.

La actividad tripsina fue medida a 25° C como describe Elanger *et al.*, (1961), usando *N*- $\alpha$ -benzoil- DL-arginina 4-nitroanilina hidrocloreuro (BAPNA) como sustrato en dimetil sulfóxido 10 mM (DMSO) y en buffer Tris-HCl 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8.2. La actividad quimotripsina fue medida a 25 °C como describe Del Mar *et al.*, (1979), usando *N*-succinil-ala-ala-pro-phe p-nitroanilina (SAAPNA) como sustrato en DMSO 10 mM y buffer Tris-HCl 100 mM con CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.8. La aminopetidasa fue determinada a 25 °C de acuerdo a Maraun *et al.*, (1973), usando buffer de fosfato de sodio

pH 7.2 y leucina *p*-nitroanilina como sustrato DSMO 0.1 Mm. Para todas las enzimas, las reacciones fueron detenidas adicionando ácido acético al 30%. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroanilina liberada por minuto usando un coeficiente de extinción molar de  $8.2 \text{ mL}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 410 nm. La fosfatasa alcalina fue realizada a 25° C como describe Bergmeyer (1974), por incubación del sustrato 4-nitrofenil fosfato al 2% (v/v) en un buffer de citrato ácido pH 5.5. Después de 30 minutos se adicionó NaOH 0.05 N y la absorbancia fue medida a 405 nm. Una unidad fue definida como 1  $\mu\text{g}$  de nitrofenil liberado por minuto usando un coeficiente de extinción molar de 18.5 a 405 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. La actividad específica de los extractos fue determinada usando las siguientes ecuaciones: (4) Unidades  $\text{mL}^{-1} = (\Delta\text{abs} \times \text{volumen de la reacción final (mL)}) / [\text{MEC-tiempo (min)} - \text{extracto volumen mL}^{-1}]$ ; (5) Unidades  $\text{mg}^{-1}$  de proteína = Unidades  $\text{mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína soluble  $\Delta\text{abs}$  representa cambios en la absorbancia a determinada longitud de onda y MEC representa el coeficiente de extinción molar de los productos de la reacción ( $\text{mL}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad enzimática digestiva fue expresada como  $\text{U mg proteína}^{-1}$ .

## 6.5 Análisis de un microarreglo heterólogo *Mus musculus* y *Lutjanus peru*

### 6.5.1 Diseño experimental

Se tomaron aleatoriamente nueve peces del grupo control y nueve del grupo experimental alimentados con  $\beta$ -glucano al 0.1%, a cada uno de los organismos se les disectó el riñón cefálico, intestino y páncreas. Estos órganos fueron conservados en RNAlater<sup>®</sup> y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Se realizaron 54 extracciones de ARN total de los diferentes órganos arriba mencionados, utilizando TRIZOL, siguiendo el protocolo descrito en el ANEXO A.

Para corroborar la calidad e integridad del ARN se realizaron geles de agarosa al 0.8% utilizando buffer TAE al 1%, los geles se corrieron a 60 voltios durante 70 minutos. Una vez visualizadas las bandas correspondientes al ARN (28s, 18s y 5s), se hicieron dos grupos tomando una alícuota de cada una de las muestras, ajustadas previa e individualmente a una concentración de 1  $\text{mg}/\mu\text{l}$  (27  $\text{mg}$  de ARN total) tanto para el grupo control como para el grupo experimental,

después nuevamente este ARN fue visualizado en un gel de agarosa para confirmar que en el proceso mencionado no existiera degradación. Por último el ARN fue precipitado para su adecuada preservación y transportación a temperatura ambiente.

### **6.5.2 Precipitación del ARN**

A cada uno de los grupos finales de ARN se le agregó la décima parte de su volumen total de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se mezcló perfectamente utilizando un vórtex, se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Las muestras se conservan a -80 °C durante 24 horas, después fueron centrifugados a velocidad máxima durante 20 minutos, los tubos Eppendorf fueron cuidadosamente cerrados y sellados con parafilm. Finalmente, el ARN fue enviado a la Unidad de Microarreglos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### **6.5.3 Hibridación del microarreglo heterólogo**

El ARN de *L. peru*, proveniente de diferentes tejidos (riñón cefálico, intestino y páncreas) fue hibridado en un microarreglo heterólogo comercial de ratón *Mus musculus*, con sondas de 70 pb, que representan 22,000 genes.

Para realizar la hibridación se utilizó 5 µg de ARN previamente extraído tanto de las muestras del grupo control como del experimental, se incubaron a 70 °C durante 10 min con una mezcla que contenía oligo dT (1 µg) y random primers (3 µg) en un volumen final de 20 µl. La retrotranscripción a cDNA se realizó durante toda la noche a 25 °C con: MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP mix-aminoallyl (4 µl), Chipshot RT 5X buffer (8 µl) y transcriptasa reversa (3.2 µl) del sistema ChipShot indirect labeling and clean-up system (Promega).

La eliminación de las RNAsas se realizó con Rnase H (1 µl) y RNase solution (0.35 µl) incubando a 37 °C durante 15 min.

El cDNA con aminoallyl fue purificado con la columna del sistema Promega y marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5. Finalmente el cADN marcado fue purificado y cuantificado mediante el Nanodrop 2000.

El microarreglo fue pre-hidratado con vapor y fijado al vidrio con dos ciclos de luz UV 0.12 J x cm<sup>2</sup>. Posteriormente se realizó un lavado con SDS 0.1% y dos lavados con agua desionizada para incorporarle al microarreglo la solución de pre-hibridación (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%) durante 1 h a 42°C, continuando con una serie de lavados con SSC 0.06X, el exceso de solución fue retirado mediante centrifugación a 1,500 rpm durante 5 min. Las dos muestras de cADN resuspendidas con solución de hibridación (SSC 20X, SDS 1%, TE en 70 µl) fueron mezcladas y desnaturalizadas a 94°C por 5 min y a 65°C durante 30 seg. La mezcla se vertió en el microarreglo, el cual fue cubierto con un cubreobjetos (HybriSlip Schleicher and Schuell) y colocado en una cámara de hibridación durante 12 hrs a 42°C. Finalmente la laminilla fue lavada y secada por centrifugación.

#### **6.5.4 Lectura, anotación y análisis bioinformático del microarreglo**

La lectura del microarreglo se realizó en el escáner confocal ScanArray 4000 Packard Biochips. La imagen escaneada fue analizada con el software GenePix, se determinó el ruido de fondo y la intensidad de cada spot para calcular la intensidad final de la señal de acuerdo a la siguiente ecuación: (6) Intensidad = intensidad del primer plano - intensidad de fondo generada por los dos fluorocromos Cy3 y Cy5, en seguida se utilizó el software GenArise para normalizar los datos de cada spot.

Se seleccionaron los genes que presentaron Z-score de 2.0 y que fueron sobre-regulados por efecto del tratamiento en relación al grupo control. Para realizar el análisis se utilizó el software DAVID v6.7, (Datebase for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) con un valor de Ease de 0.5. Los genes fueron anotados y se determinó su ontología en relación a los componentes celulares, la función molecular y procesos biológicos en los que participan, a continuación se eligieron los procesos involucrados con el sistema inmune y digestivo, finalmente se obtuvieron las secuencias en formato FASTA y se buscaron homologías con bases de datos de teleósteos mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool Blast) de la NCBI para elegir a los genes que serian cuantificados por RT-PCR en tiempo real.



## 6.6 Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real

### 6.6.1 Diseño de primers degenerados

En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos “primers” degenerados para Insulina Factor de Crecimiento (*IGF*) e interleucina 1  $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) para *L. peru*, la cual es una especie nueva de estudio y no se cuenta con información molecular.

Para el diseño de primers degenerados, se obtuvieron las secuencias (FASTA) de nucleótidos de nuestros genes de interés a través de la base de datos del National Center Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

En seguida, se realizaron alineaciones múltiples con diferentes especies de teleosteos preferentemente del orden Perciformes, utilizando la herramienta bioinformática ClustalW2-Multiple Sequence Alignment <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

A partir de la alineación de las secuencias codificantes, se diseñaron los primers inespecíficos con ayuda del programa OligoAnalyzer 3.1 <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. A continuación, para sustituir las bases degeneradas se utilizó la base de datos de codones (Codon Usage Database) <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, la cual nos proporciona las bases nucleotídicas que tienen la mayor probabilidad de alineamiento, se usó como referencia a *Sparus aurata*, dado que no existe información al respecto sobre ningún lutjanido.

Finalmente, se analizó cada uno de los primers diseñados con el programa <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>, OligoCalc:oligonucleotide Properties Calculator tomando en cuenta el porcentaje de guaninas y citocinas, la temperatura media de alineamiento, así como la complementariedad y la formación de harpins y dímeros. Los primers usados se muestran en la Tabla IV.

### 6.6.2 Diseño de primers específicos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -*Amy*), inmunoglobulina M (*IgM*), Factor de Elongación 1- $\alpha$  (*EF 1- $\alpha$* ) y Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (*GAPDH*) a partir de las secuencias reportadas en GenBank para nuestra especie, con ayuda del programa Primer3 (v.0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

<http://frodo.wi.mit.edu/>, además sus propiedades fueron analizadas en <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Para el caso del *TNF- $\alpha$* , se utilizaron los primers previamente diseñados por Macías, 2011 (trabajo no publicado). Los primers usados se muestran en la Tabla V.

**Tabla IV.** Primers degenerados *IL-1 $\beta$*  e *IGF* para *Lutjanus peru* utilizados en el experimento de alimentación con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6

Gen	Primers degenerados	
	Forward	Reverse
IGF (1)	CAGTGGCATTATGTGATGTC	CTTGTTTTTTGTCTGTCTGGC
IGF (2)	GATGTGYTGTAICTCTGTAGC	CTTGTTTTTTGTCTGTCTGGCTG
IL-1 $\beta$ (1)	CACYGAGYTCASAGAYGARMACCTGCCT	GAAGAGRAATCGYRCCATGTCGCTG
IL-1 $\beta$ (2)	CACGCDGTGATGCTSCAGGGGAGG	GTGCTGATGTACCAGYYGYTGAAGG

Insulina Factor de Crecimiento (*IGF*) e interleucina 1- $\beta$  (*IL-1 $\beta$* )

**Tabla V.** Primers específicos para *Lutjanus peru* utilizados en el experimento de alimentación con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6

Gen	Primers	
	Forward	Reverse
EF 1- $\alpha$	AGGAAATCACCAAGGAAGTGAG	CATCTTGTCACTGGTCTCCA
GAPDH	CCGTTACCATGGTGAGGTC	ACTCCAGTGGACTCGACAA
$\alpha$ - Amy	CTGCATTTGTGGTCATTGAAGT	AGAATGAGCTGAGGGACATGAT
TNF- $\alpha$	CTTCCGACTGGTGAACAACG	CATGAGGCCTTTCCCGCTC
<i>IgM</i>	CAGTGACCCTGACTTGCTATGT	CGCACACAGTCCTTGATGG

Inmunoglobulina M (*IgM*),  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -*Amy*), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), Factor de Elongación 1- $\alpha$  (*EF 1- $\alpha$* ) y Glicer aldehído-3-fosfato dehidrogenasa (*GAPDH*)

### 6.6.3 Evaluación de la expresión de genes del sistema inmune y digestivo

Para llevar a cabo la evaluación de la expresión de genes en los diferentes órganos (riñón cefálico, intestino y páncreas) se realizó la extracción de RNA total, utilizando el protocolo de extracción por TRIZOL (Invitrogen #15596-026). Las concentraciones de RNA fueron cuantificadas utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y tratados con DNasa QR 1 (Promega, USA) para remover la contaminación con DNA. La síntesis del DNA complementario (cDNA) fue realizada a partir de 5 µg de RNA total usando InProm II reverse transcriptase (Promega) y la cuantificación de la expresión de los genes por el método de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) usando SyBr Green, se usaron como controles endógenos los genes *EF1-α* y *GAPDH*. Los protocolos detallados son descritos en el ANEXO A.

Para cuantificar y normalizar la expresión relativa de los genes se utilizó la ecuación (7):  $2^{\Delta\Delta Cq}$ , donde Cq es el número de ciclo en los que comienza la amplificación del gen de estudio.

## 6.7 Experimento II. Ensayo de alimentación con β-glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp 11 adicionados en la dieta de *Sparus aurata*.

### 6.7.1 β-Glucano 1,3/1,6 y Pdp 11 *Shewanella putrefaciens*

El β-glucano 1,3/1,6 (Sigma #67138) derivado de algas café *Laminarina digitata* al 99% de pureza y ajustado a una concentración de 0.1% fue usado para preparar las dietas experimentales.

La cepa Pdp 11 *Shewanella putrefaciens*, probiótico aislado de la piel de *Sparus aurata* fue donada por cortesía del Dr. Moriñigo (Málaga, España). Las células bacterianas fueron puestas a crecer en agar nutritivo (Laboratorios Conda, Madrid) (pH 7.2; 30 °C) y después en placas por 1-2 días. Las colonias fueron cultivadas en placas y subcultivadas en 150 ml de TBS, en agitación continua durante 24 h. Una alícuota de 1 ml fue medida a 625 nm y después el cultivo bacteriano fue centrifugado a 6000g por 15 min a 4 °C, a continuación

fueron lavadas en buffer salino de fosfatos estéril (PBS; pH 7.4) y ajustadas a una concentración de  $10^{-9}$  UFC  $g^{-1}$  para preparar las dietas experimentales.

### 6.7.2 Peces y mantenimiento

El experimento de alimentación se llevo a cabo en el laboratorio de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia, España. Se obtuvieron 144 juveniles de *Sparus aurata* (peso de  $14.0 \pm 3.5$  g; longitud total de  $9.6 \pm 0.4$  cm) de Doramenor Acuicultura S. L. (Murcia, España), los peces fueron colocados en acuarios de vidrio (250 L), con un sistema de circulación cerrado, a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, con un flujo de  $1500$  L  $h^{-1}$ , salinidad de  $28$  ‰ y un fotoperiodo de 12L:12O. Los organismos fueron previamente aclimatados durante 15 días antes de comenzar el experimento. Los peces fueron alimentados diariamente con un alimento comercial (Skretting), una vez al día, de acuerdo al 2% de su biomasa total. Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Murcia.

### 6.7.3 Elaboración de las dietas

Fueron elaboradas diferentes dietas particuladas (Tabla VI), a partir del alimento comercial (Skretting, Stavanger, Norway).

**Tabla VI.** Dietas utilizadas en el bioensayo de alimentación para la dorada *Sparus aurata*.

Tratamiento	Dietas
<b>Dieta 1(Control)</b>	Alimento comercial Skretting
<b>Dieta 2</b>	Skretting + Pdp 11 <i>Shewanella putrefaciens</i> , probiótico aislado de piel de dorada) ( $10^9$ ufc $g^{-1}$ de alimento)
<b>Dieta 3</b>	Skretting + $\beta$ -glucano al 0.1%
<b>Dieta 4</b>	Skretting + $\beta$ -glucano al 0.1% + Pdp 11 ( $0.1\%$ y $10^9$ UFC $g^{-1}$ de alimento, respectivamente)

La dieta comercial fue pulverizada, se le adicionó agua (40%), fue enriquecida con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 (*Laminarina digitata* 99%) al 0.1% y/o con el probiótico Pdp11 (*Shewanella putrefaciens*) a una concentración de  $10^{-9}$  UFC  $g^{-1}$  de alimento, de acuerdo a los diferentes tratamientos.

Cada una de las dietas fue cuidadosamente homogenizada, se pasó por el extrusor y se cortó en trozos de 1 cm aproximadamente. El alimento se colectó en charolas para el secado y se almacenó en refrigeración a 4 °C para su posterior uso (Fig. 4).



**Figura 4.** Elaboración de las diferentes dietas usadas para alimentar a juveniles de dorada.

#### 6.7.4 Diseño experimental y muestreos

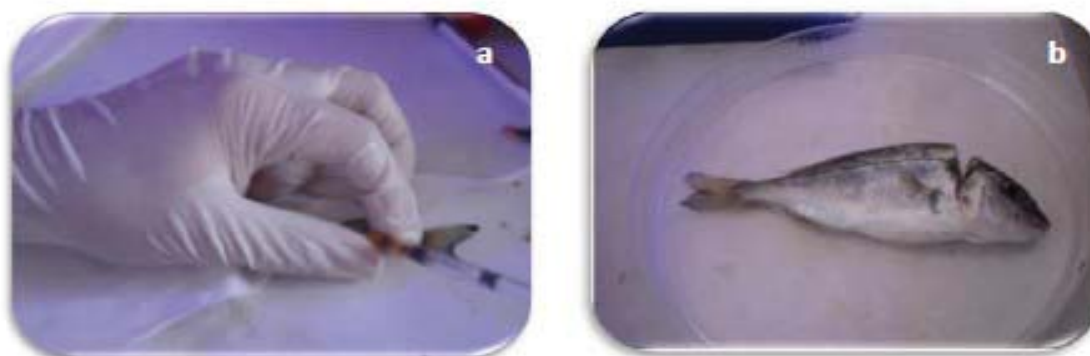
Los peces fueron distribuidos en cuatro grupos iguales y recibieron una de las siguientes dietas: (1) dieta control, alimento comercial Skretting; (2) dieta suplementada con Pdp 11; (3) dieta suplementada con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y (4) dieta suplementada con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y Pdp 11. Los peces fueron alimentados una vez al día, de acuerdo al 2% de su biomasa total, durante cuatro semanas. Los tiempos de alimentación y las dosis del  $\beta$ -glucano fueron basados en estudios previos (Guzmán *et al.*, 2013) y la concentración de la cepa Pdp 11 en trabajos realizados por Cordero *et al.*, 2013 (datos no publicados).

Se tomaron nueve organismos por cada uno de tratamientos en la semana 1, 2 y 4. Los peces se mantuvieron en ayuno un día antes de ser colectados. Se tomó el peso (g) y la longitud total (cm), se colectó sangre y se disectó el riñón cefálico. En el día 0 se tomaron los pesos y tallas iniciales de los peces. Las muestras fueron almacenadas y preservadas para posteriormente determinar parámetros inmunes y cuantificar la expresión relativa de genes relacionados al sistema inmune.

#### **6.7.5 Obtención de muestras**

En cada uno de los muestreos se extrajo la sangre total y se disectó el riñón cefálico (fig. 5). Las muestras de sangre fueron tomadas mediante punción en la vena caudal con una jeringa de 1 ml sin heparina, se dejó coagular a 4 °C durante al menos 4 horas y fueron centrifugadas a 10000g por 5 min. El suero se obtuvo con ayuda de una pipeta Pasteur y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

El riñón cefálico fue disectado en condiciones de esterilidad. Un pequeño fragmento de riñón cefálico fue reservado para el análisis de la expresión de genes (se detalla en el ANEXO A) el resto del órgano fue usado para hacer pruebas de inmunidad aislando sus leucocitos.



**Figura 5.** Extracción de sangre (a) y disección del riñón cefálico (b)

### 6.7.6 Crecimiento

Para medir el crecimiento, se tomaron la longitud y peso inicial y final, se calculó el factor de condición, la tasa específica de crecimiento y la ganancia en peso porcentual utilizando las ecuaciones (1), (2) y (3) descritas en el experimento I, para *L. peru*.

### 6.7.7 Aislamiento de leucocitos de riñón cefálico

El riñón cefálico fue cortado en pequeños fragmentos y colocado en 8 ml de medio de cultivo sRPMI-1640 [RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 0.35% de cloruro sódico, con el fin de ajustar la osmolaridad del medio (280 mOsm) a la del suero de dorada (366 mOsm), suplementado con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de penicilina (Flow), 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomina (Flow) y un 3% de suero bovino fetal (SBF, Gibco)], con 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de heparina (Sigma) (medio de aislado) (Esteban *et al.*, 1998). A continuación, se obtuvieron suspensiones celulares mediante el tamizado de los fragmentos de riñón cefálico a través de mallas de nylon con un tamaño de poro de 100  $\mu\text{m}$ . Las suspensiones celulares obtenidas fueron centrifugadas a 400g por 10 min a 25°C (Minifugue T, Heraeus) para concentrar los leucocitos. Dichas células fueron resuspendidas en medio sRPMI-1640 sin heparina (medio de lavado) y nuevamente centrifugados. Se realizaron tres lavados, después los leucocitos fueron resuspendidos, contados en un hemocitómetro de Neubauer y ajustados a una concentración de  $10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  en sRPMI-1640. La viabilidad celular fue siempre superior al 90% y se determinó mediante el test de exclusión del azul tripano (Sigma) (Phillips, 1973). Las suspensiones celulares obtenidas se emplearon en los ensayos funcionales posteriores.

## 6.8 Parámetros inmunes

Los parámetros del sistema inmunitario analizados correspondieron a actividades tanto de la respuesta humoral (niveles de IgM, antiproteasas y peroxidasa sérica) como de la respuesta celular (peroxidasa intraleucocitaria, y fagocitosis), para ello se emplearon las muestras de suero y suspensiones celulares de leucocitos de riñón cefálico.

### 6.8.1 Niveles de IgM en suero

Los niveles totales de IgM en suero se analizaron mediante un ensayo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Cuesta *et al.*, 2004). El suero obtenido en los muestreos se diluyó a 1/100 en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9.6). Se colocaron 100  $\mu$ l del suero diluido por triplicado en placas de 96 pocillos, y se fijaron las proteínas incubando la placa durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0.05% Tween 20, pH 7.3) y se bloquearon los sitios de unión a proteína mediante la incubación con tampón de bloqueo (PBS-T con 3% de albúmina de suero bovino) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente con PBS-T (tres lavados, 5 min, 200  $\mu$ l), las placas fueron incubadas durante 1 h con 100  $\mu$ l por pocillo del anticuerpo primario, un anti-IgM de dorada hecho en ratón (Aquatic Diagnostics Ltd.) (1/100 en tampón de bloqueo). Tras lavar nuevamente, se incubaron las placas con el anticuerpo secundario (anti-ratón IgG-HRP, 1/1.000 en tampón de bloqueo). A continuación, se lavó exhaustivamente con PBS-T, y se reveló con 100  $\mu$ l de una solución 0.42 mM de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) y 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparada en el momento de usar. La reacción se dejó incubar durante 10 minutos, y se paró mediante la adición de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Las placas se leyeron a 450 nm. Los controles negativos consistieron en muestras sin suero o sin anticuerpo primario, cuyos valores de absorbancia fueron restados del valor de cada muestra.

### 6.8.2 Actividad antiproteasas en suero

La actividad antiproteasa fue determinada como indicativo para medir la capacidad del suero para inhibir la actividad proteasa. Brevemente, 20  $\mu$ l de suero fue incubado con 20  $\mu$ l de solución estándar de tripsina (1000-2000 BAEE, 5 mg  $\mu$ l<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich T-7409) durante 10 min. a 22 °C en tubos Eppendorf. A continuación, se adicionaron 200  $\mu$ l de 0.1 M PBS (pH 7.0) y 250  $\mu$ l de azocaseína al 2% (w/v) (Sigma-Aldrich) en PBS y se incubó por 1 h a 22 °C. La reacción fue parada al adicionar 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 10% (v/v) (TCA, Sigma-Aldrich) se incubó 30 min. a 22 °C y después se centrifugó a 6000g por 5 min. Los sobrenadantes (100  $\mu$ l) fueron transferidos a placas de 96 pozos (Nalge Nunc) que 100  $\mu$ l pozo<sup>-1</sup> de hidróxido de sodio (NaOH, BDN). La DO fue leída a 450 nm usando



un lector de placas. Para el control positivo, el suero fue reemplazado (100%) con buffer y para el control negativo se reemplazó la tripsina con buffer y el suero. La habilidad inhibidora de la antiproteasa fue expresada en términos de porcentaje de acuerdo a la ecuación (8): % Inhibición Tripsina =  $\text{DO Tripsina} - \text{DO muestra} / \text{DO Tripsina} \times 100$ .

### 6.8.3 Actividad peroxidasa

El contenido de peroxidasa presente en el interior de los leucocitos de riñón cefálico de dorada fue determinado siguiendo la metodología de Quade y Roth (1997). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, para ello, se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de la suspensión de leucocitos por pocillo y cada muestra por triplicado. Los leucocitos fueron lisados mediante la incubación con 50  $\mu\text{l}$  de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma) en agitación a 40 ciclos  $\text{min}^{-1}$  en un agitador de placas (IUL) durante 10 min. En seguida, en cada pocillo se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de una solución 20 mM de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) y 5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma), ambos sustratos de la peroxidasa. Transcurridos 50 segundos, la reacción fue inmediatamente parada mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico (2 M). A continuación, se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (BMG, Fluoro Star Galaxy). Se incluyeron muestras control que contenían TMB y  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin leucocitos.

El contenido de peroxidasa presente en las muestras de suero se determinó mediante el mismo protocolo con algunas modificaciones. Se partió de un volumen inicial de 15  $\mu\text{l}$  y se omitió el paso de lisado de las células con CTAB.

### 6.8.4 Fagocitosis

La actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de dorada fue estudiada mediante citometría de flujo, siguiendo la metodología de Esteban *et al.*, (1998). Para estos ensayos se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) como partícula susceptible de ser fagocitada.

Las levaduras fueron liofilizadas e inactivadas por calor y fueron marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma). Para ello fueron colocadas en un tubo de 15 ml, que fue llenado con medio de cultivo sRPMI-1640, la solución fue homogenizada para

eliminar todos los grumos y se ajustó a  $10^8$  levaduras  $\text{ml}^{-1}$ . A continuación se preparó otro tubo con 15 ml de sRPMI-1640 a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de FITC (Sigma). Se unieron ambas soluciones en un tubo de 50 ml que se mantuvo en oscuridad, agitando a 40 ciclos por minuto, durante 15 minutos a  $22^\circ\text{C}$ . La concentración final de FITC fue de 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y la de la levadura  $0.5 \times 10^8$  levaduras/ml. Al concluir el tiempo de agitación, la muestra se centrifugó (858g, 5 min), se descartó el sobrenadante, se añadieron 40 ml de sRPMI-1640 y se resuspendió. Nuevamente se centrifugó, después se realizaron hasta cinco lavados. En el último lavado, tras descartar el sobrenadante se adicionaron 20 ml de medio y se resuspendió. Finalmente, se comprobó el marcado de las levaduras en el citómetro, se hicieron alícuotas y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para la realización de los ensayos de fagocitosis, se usaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de leucocitos en tubos de citómetro, a los que se adicionaron 60  $\mu\text{l}$  de la levadura marcada con FITC, en una proporción de 6.25 levaduras por cada leucocito.

Las muestras fueron centrifugadas (482g, 5 min), mantenidas en oscuridad por 5 min, resuspendidas e incubadas a  $25^\circ\text{C}$  durante 25 min. A continuación se detuvo el proceso de fagocitosis adicionando 500  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato salino (PBS) frío a cada muestra y se colocaron los tubos en hielo. La fluorescencia de las bacterias no ingeridas, es decir, libres o adheridas a la membrana de los fagocitos pero no interiorizadas, fue bloqueada por adición de 40  $\mu\text{l}$  de una solución de azul tripano al 4% en PBS. Todas estas muestras fueron adquiridas y analizadas mediante un citómetro de flujo (FACsort, Becton Dickinson), equipado con un rayo láser de argón ajustado a una longitud de onda de 488 nm.

Los datos fueron analizados mediante el programa FACScan (Becton Dickinson), donde los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad estructural (SSC) fueron representados en escala lineal, mientras que los de fluorescencia verde (FL1) y roja (FL2) lo fueron en escala logarítmica. Los datos fueron recogidos en diagramas de puntos (donde cada uno de ellos correspondería a una célula) o en histogramas. Se adquirieron 5000 células de cada muestra a una velocidad de 300 células/s. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Lysis Software Package (Becton Dickinson).

De cada muestra procedente de un ensayo de fagocitosis se analizó la habilidad fagocítica, definida como el porcentaje de leucocitos con una o más levaduras interiorizadas (leucocitos con fluorescencia verde) con respecto al total de células de la población, y la capacidad fagocítica, definida como el número medio de levaduras interiorizadas por leucocito (estimada como intensidad media de fluorescencia verde).

### 6.8.5 Cuantificación de la expresión de genes

Se cuantificó la expresión del gen *EF-1 $\alpha$*  como control endógeno y los genes *IgM*, *IL-1 $\beta$*  e Interferón gama (*IFN- $\gamma$* ) en riñón cefálico, los primers utilizados pueden observarse en la Tabla VII. La cuantificación de la expresión de los genes de interés (batería de genes de la dorada de la UM), se realizó por qPCR utilizando SyBr Green® (Applied Biosystems). La extracción de RNA total, el tratamiento de ADNasa y la síntesis de cDNA se describe en el ANEXO A.

**Tabla VII.** Primers específicos para *Sparus aurata* utilizados en el experimento de alimentación con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 y el probiótico Pdp 11.

Gen	Primers	
	Forward	Reverse
<i>EF 1-<math>\alpha</math></i>	CTGTCAAGGAAATCCGTCGT	TGACCTGAGCGTTGAAGTTG
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	GGGCTGAACAACAGCACTCTC	TTAACTACTCTCCACCCTCCA
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	ATGGACTGCAGGACCTCAAA	GACAATGAGCTCGCCTCTTC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	TCGTTCAAGAGTCTCCTGCAG	TCGCGCTACTCAGAGTCCATG

Factor de Elongación 1- $\alpha$  (*EF 1- $\alpha$* ), interleucina 1-beta (*IL-1 $\beta$* ), Interferon gama (*IFN- $\gamma$* ) y Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* )

### 6.9 Análisis estadístico

Para los dos experimentos, todos los parámetros experimentales fueron medidos por triplicado, a excepción de la expresión de los genes que fue medido por quintuplicado. Para determinar la normalidad de los datos, se uso la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos

de cada tratamiento fueron sujetos a una ANOVA de una vía con una significancia de  $P < 0.05$  usando el software estadístico SPSS 13.0 (IBM SPSS, Armonk, NY). Los resultados fueron presentados como media  $\pm$  DS o ES. Cuando se observaron diferencias significativas, se utilizó una prueba de rangos múltiples de Tukey o Duncan. Cuando los datos no presentaron una distribución normal se usó la prueba no paramétrica de Dunnett.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Experimento I. Ensayo de alimentación con $\beta$ -glucanos

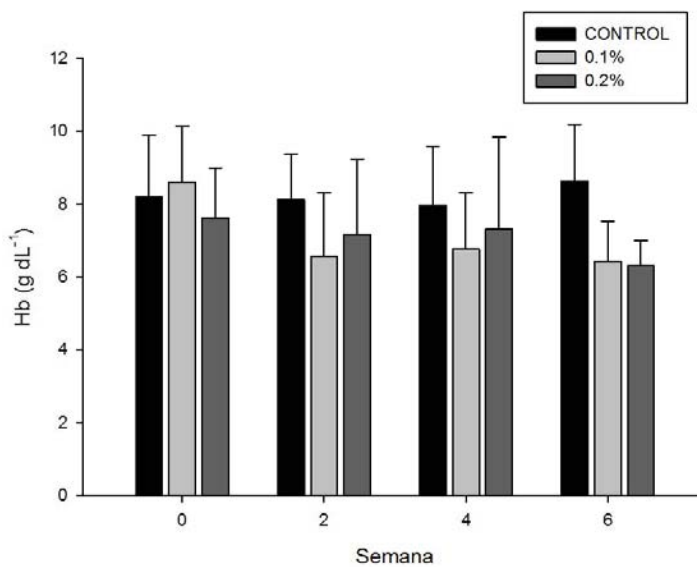
#### 7.1.1 Análisis hematológicos

Los datos relacionados a la hematología de los juveniles de *L. peru* ( $n = 27$ ) realizados en el laboratorio antes del experimento de alimentación se muestran en la Tabla VIII. En nuestro estudio, la hemoglobina (Fig. 6) y los niveles de proteína total en plasma (Fig. 7) no fueron afectados ( $P > 0.05$ ) por ninguno de las concentraciones de  $\beta$ -glucanos administrados.

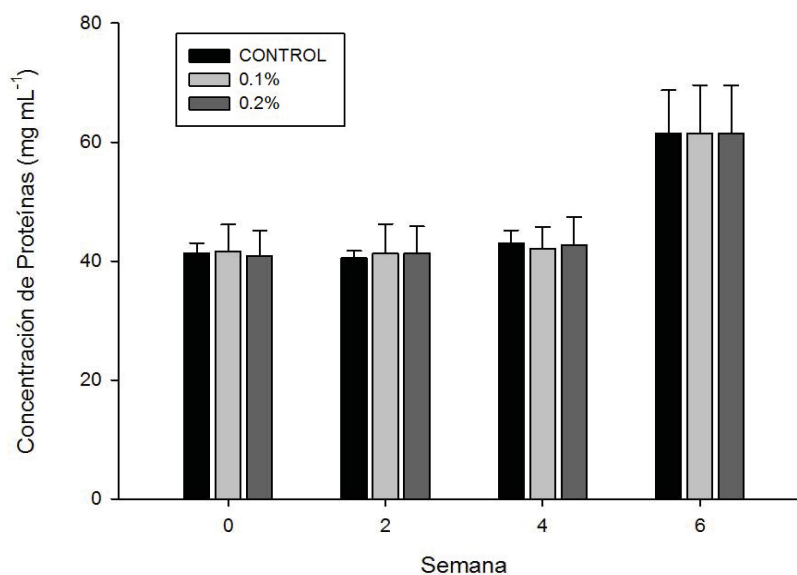
**Tabla VIII.** Valores hematológicos y enzimas antioxidantes de juveniles *Lutjanus peru* en cautiverio, antes del ensayo de alimentación ( $n = 27$ )

Componentes	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8.1 $\pm$ 2.32
Proteínas Plasmáticas (mg ml <sup>-1</sup> )	41.27 $\pm$ 0.51
CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)	1.70 $\pm$ 0.74
SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)	11.42 $\pm$ 5.69

Los valores son dados como medias  $\pm$  DE para 27 individuos  
*SOD* superóxido dismutasa, *CAT* catalasa



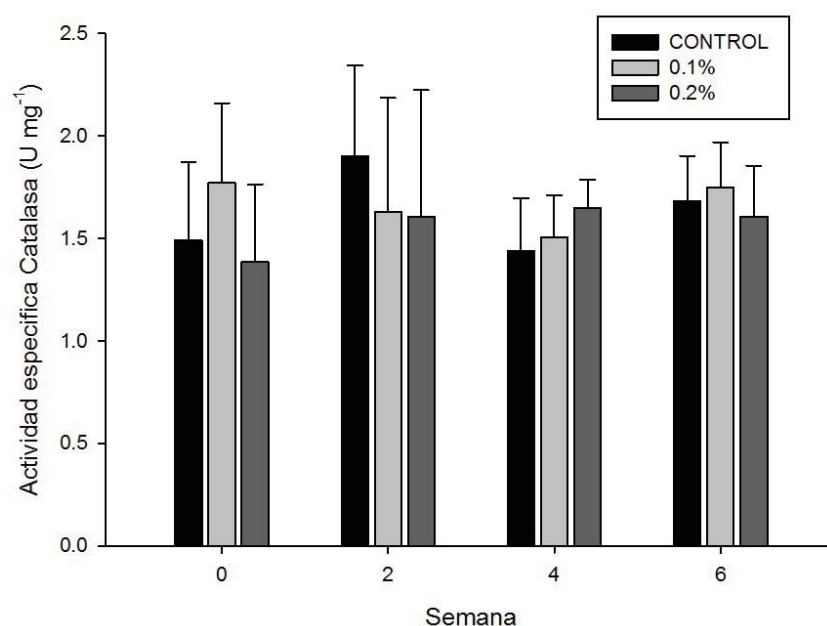
**Figura 6.** Efecto de la inclusión en la dieta del  $\beta$ -glucano al 0 control, 0.1 y 0.2% sobre la concentración de hemoglobina. Los datos representan la media  $\pm$  EE. No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ ).



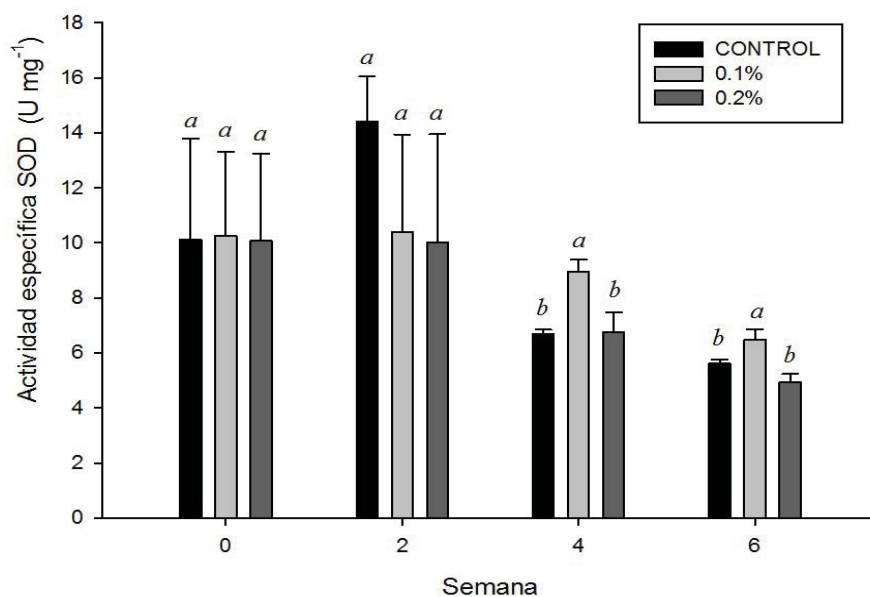
**Figura 7.** Efecto de la inclusión en la dieta del  $\beta$ -glucano al 0 (control), 0.1 y 0.2% sobre la concentración de proteínas totales en suero. Los datos representan la media  $\pm$  EE. No se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ ).

### 7.1.2 Actividad enzimática antioxidante

La actividad de las enzimas SOD y CAT fue evaluada como parte del análisis del sistema de defensa antioxidante en los juveniles de huachinango ya que ambas enzimas protegen contra patógenos (Barnes *et al.*, 1999). Durante el experimento, la actividad CAT no mostró diferencias significativas (Fig. 8). La actividad SOD fue significativamente más alta en las dietas que contenían  $\beta$ -glucano al 0.1% (Fig. 9), en las semanas 4 y 6, en comparación al grupo control.



**Figura 8.** Efecto de la inclusión en la dieta del  $\beta$ -glucano sobre la actividad enzimática antioxidante catalasa (CAT). Los datos representan la media  $\pm$  DE. No se observaron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ ).



**Figura 9.** Efecto del  $\beta$ -glucano1,3/1,6 sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD). Los datos representan las medias  $\pm$  DE. Diferentes letras indican significancia estadística entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

### 7.1.3 Crecimiento

En nuestro trabajo, los peces alimentados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 a diferentes concentraciones tuvieron un incremento en el crecimiento ( $P < 0.05$ ) en SGR y %WG en relación al grupo control (Tabla IX). El mayor crecimiento fue obtenido en los peces alimentados con el  $\beta$ -glucano al 0.1%, seguido por los alimentados al 0.2%. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo en el crecimiento en el huachinango tratados con  $\beta$ -glucano1,3/1,6.

**Tabla IX.** Crecimiento de juveniles de *Lutjanus peru* alimentados con las dietas suplementadas con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.0% (control), 0.1 y 0.2%

Dietas experimentales	Wi	Wf	SGR	WG (%)	FC
Control	350.08 $\pm$ 20.81a	405.68 $\pm$ 31.95b	0.34 $\pm$ 0.08b	15.83 $\pm$ 4.24b	2.89 $\pm$ 0.55a
$\beta$ -Glucano 0.1%	333.67 $\pm$ 51.41a	520.26 $\pm$ 58.21a	1.06 $\pm$ 0.11a	56.79 $\pm$ 7.64a	2.99 $\pm$ 0.22a
$\beta$ -Glucano 0.2%	337.40 $\pm$ 12.96a	493.56 $\pm$ 47.27ab	0.89 $\pm$ 0.15a	46.09 $\pm$ 9.61a	2.91 $\pm$ 0.05a

Los valores son expresados como medias  $\pm$  DE de observaciones por triplicado ( $n = 9$ )

Las medias en la misma columna con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

Wi peso inicial, Wf peso final, SGR tasa de crecimiento específica, WG (%) ganancia en peso porcentual y FC factor de condición



## **7.2 Actividad enzimática digestiva**

### **7.2.1 Métodos cualitativos**

Al determinar la actividad enzimática, se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos; en la semana seis se observó un incremento significativo de la esterasa (Fig. 10b), en los organismos alimentados con  $\beta$ -glucanos al 0.1 y 0.2%, así como un decremento significativo para la  $\alpha$ -quimiotripsina en comparación al grupo control (Fig. 10d). La fosfatasa alcalina, lipasa y la tripsina no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al grupo control (Fig. 10a, c, e).

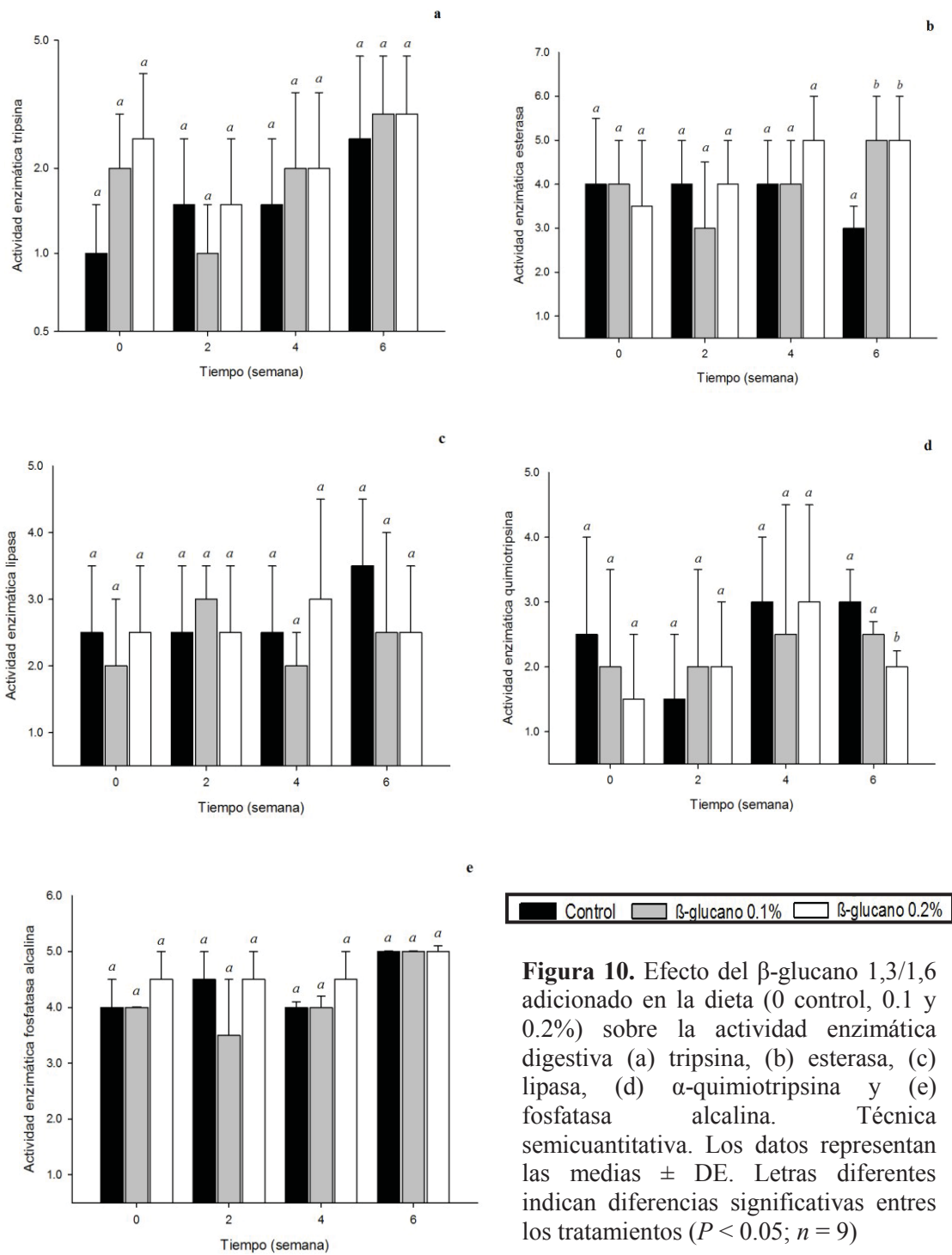
### **7.2.2 Métodos cuantitativos (espectrofotometría)**

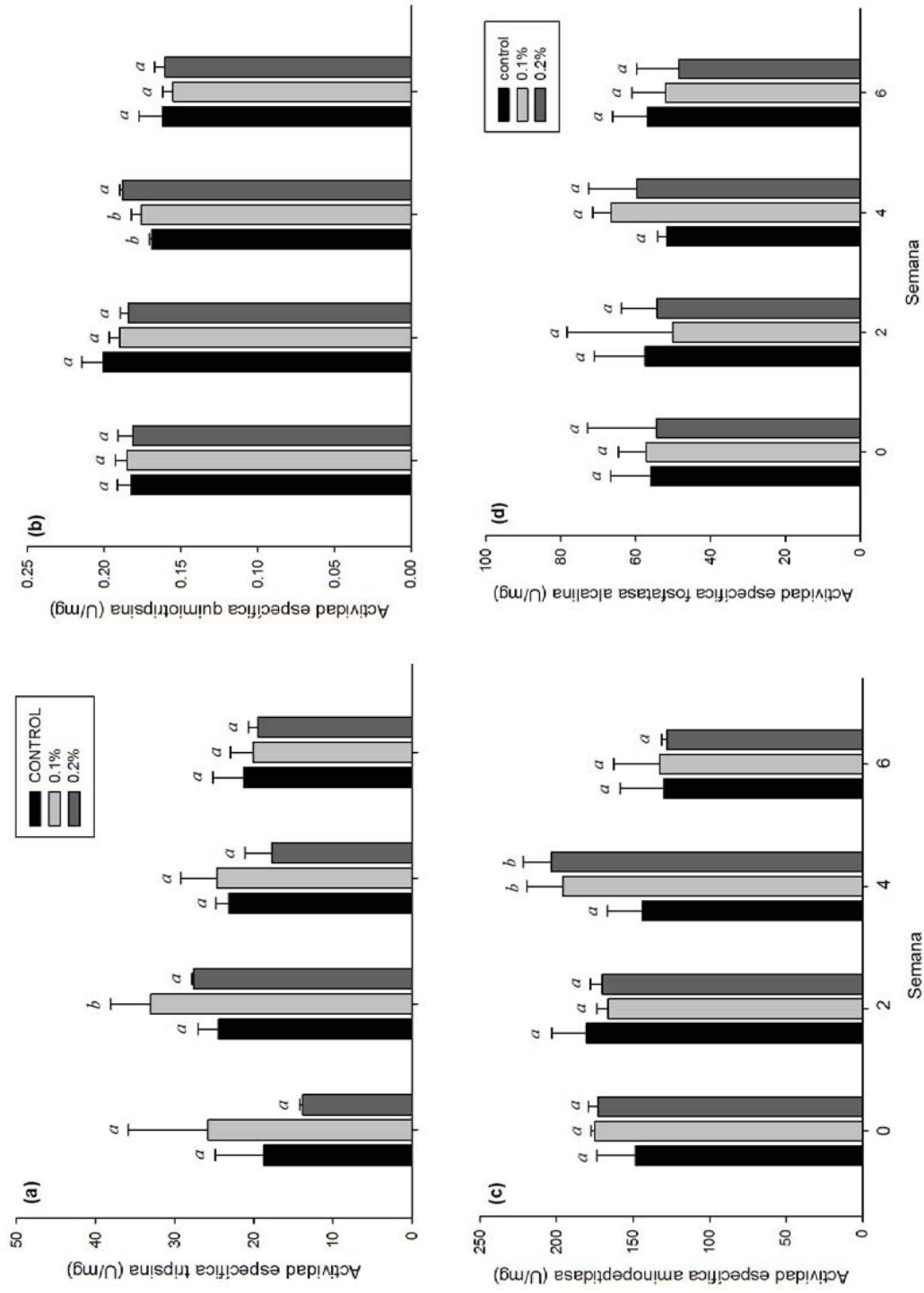
Los resultados mostraron un incremento significativo en la actividad enzimática tripsina, en los peces que recibieron la dieta suplementada con el  $\beta$ -glucano al 0.1% en la semana dos de alimentación (Fig. 11a); en la semana cuatro, la actividad quimiotripsina incrementó en peces que recibieron el  $\beta$ -glucano al 0.2% (Fig. 11b). La actividad aminopeptidasa incrementó en los peces que recibieron el  $\beta$ -glucano al 0.1 y 0.2% en la semana cuatro (Fig. 11c). La actividad fosfatasa alcalina no mostró diferencias con ninguno de los tratamientos (Fig. 11d) con respecto al grupo control.

## **7.3 Exposición a lipopolisacáridos (LPS)**

### **7.3.1 Ensayos hematológicos**

La hemoglobina en peces inyectados con LPS no mostró cambios significativos (Tabla X). La concentración de proteínas totales en suero no mostró diferencias a las 24 h (datos no mostrados), sin embargo, a las 72 h (Fig. 12) la concentración de las proteínas en plasma disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en peces alimentados con la dieta control e incrementó ( $P < 0.05$ ) en peces alimentados con  $\beta$ -glucano al 0.1% en comparación a los inyectados con SS (Fig. 12).





**Figura 11.** Efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta sobre la actividad enzimática digestiva de tripsina (a), quimiotripsina (b), aminopeptidasa (c) y fosfatasa alcalina (d). Los datos representan la media  $\pm$  DE. Diferentes letras indican significancia estadística ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

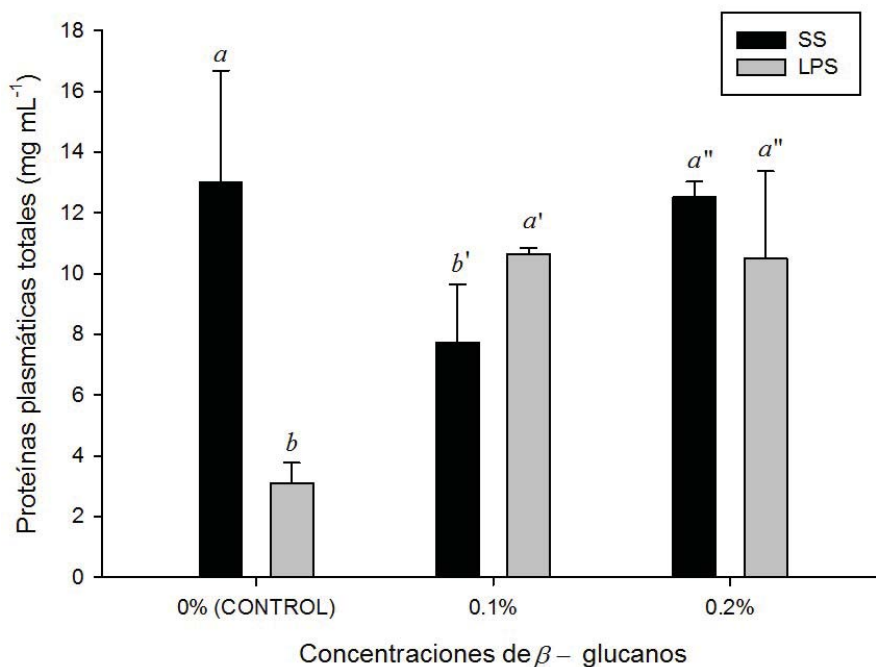
**Tabla X.** Concentración de hemoglobina (mg dL<sup>-1</sup>) en juveniles de *Lutjanus peru* alimentados con diferentes dietas experimentales suplementadas con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.0% (control), 0.1% y 0.2% después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS)

Dietas experimentales	0 horas		24 horas		72 horas	
	SS	LPS	SS	LPS	SS	LPS
Control (sin glucano)	5.23±1.09a	5.44±1.22a	4.9±0.57a	5.44±1.22a	5.89±0.95a	8.77±0.85a
$\beta$ -Glucano 0.1%	5.02±1.85a	5.39±0.24a	5.11±.58a	5.39±0.24a	7.33±1.12a	6.69±0.01a
$\beta$ -Glucano 0.2%	6.21±1.98a	5.69±0.49a	5.2±0.65a	5.69±0.49a	9.02±1.88a	6.50±0.88a

SS, solución salina fisiológica estéril; LPS, lipopolisacáridos

Los valores son expresados como media  $\pm$  EE, observaciones realizadas por triplicado ( $n = 6$ )

Medias en la misma columna con diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )



**Figura 12.** Efecto del β-glucano 1,3/1,6 sobre las proteínas totales plasmáticas a las 72 h, después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los datos representan la media ± DE. Diferentes letras indican significancia estadística ( $P < 0.05$ ) entre los peces inyectados con solución salina fisiológica estéril (SS) y los inyectados con LPS ( $n = 6$ ).

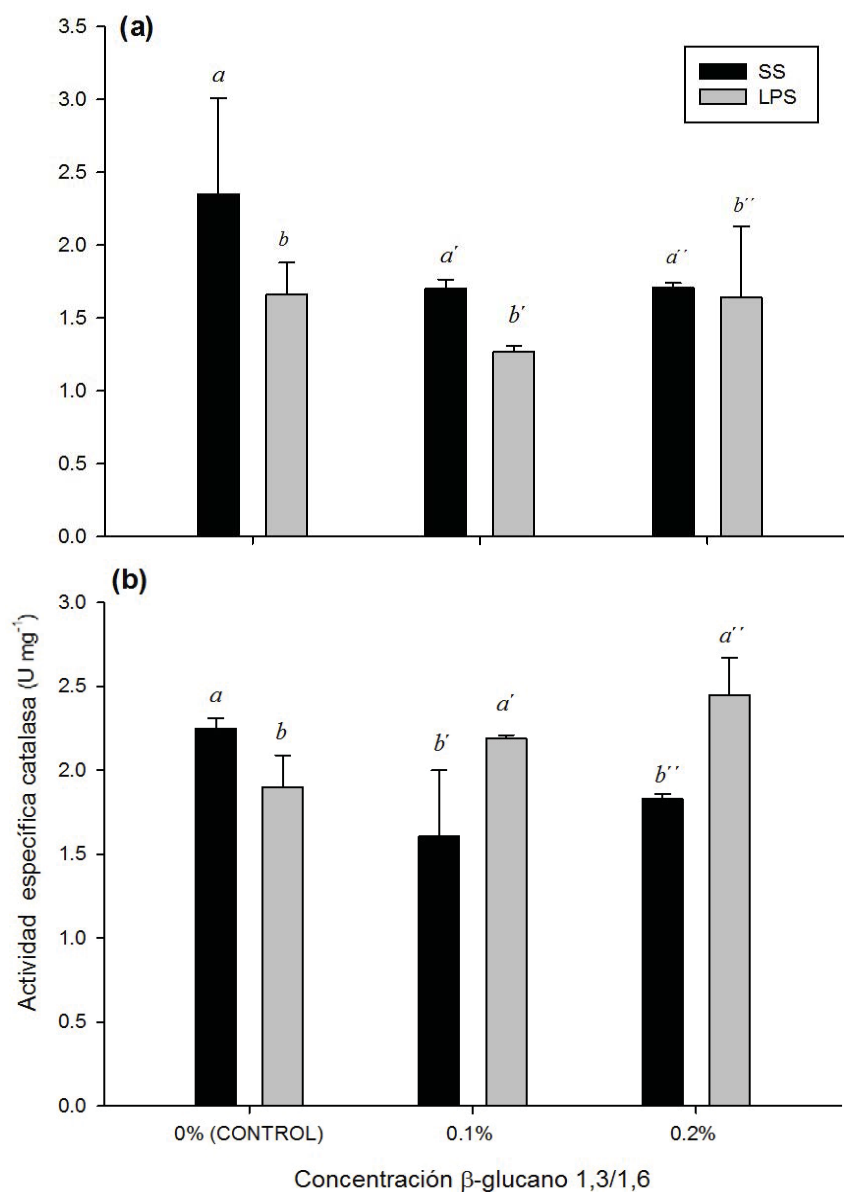
### 7.3.2 Actividad enzimática antioxidante

Después de la exposición a LPS, a las 24 h, los peces alimentados con la dieta control e inyectados con LPS mostraron un decremento significativo en la actividad CAT en comparación a los inyectados con SS (Fig. 13a). Sin embargo, a las 72 h, la actividad CAT incrementa en los peces que recibieron el β-glucano al 0.1 y 0.2% (Fig. 13b), en comparación a los inyectados con SS.

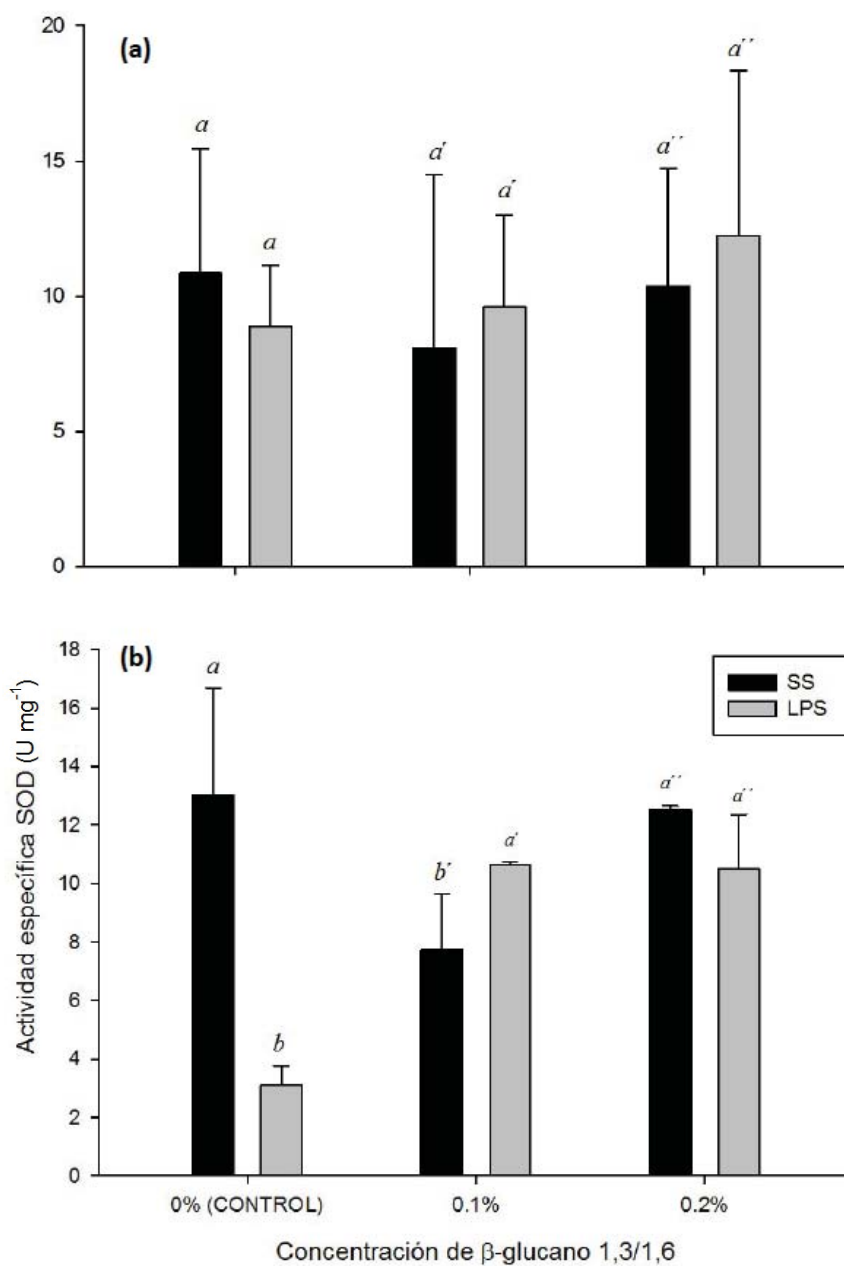
La actividad SOS a las 24 h no mostró cambios (Fig. 14a), sin embargo a las 72 h nuestros resultados mostraron un decremento significativo en SOD en peces alimentados con la dieta control e inyectados con LPS comparados a estos inyectados con SS (Fig. 14b).

También a las 72 h, la actividad SOD incremento en peces inyectados con LPS en comparación a los peces inyectados con SS y alimentados con las dietas suplementadas con

$\beta$ -glucano al 0.1% (Fig. 14b). La actividad SOD no presentó cambios significativos en peces tratados con o sin LPS y alimentados con  $\beta$ -glucano al 0.2% (Fig. 14a, b).



**Figura 13.** Efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la actividad catalasa a las 24 h (a) y 72 h (b) después de la exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los datos representan la media  $\pm$  DE. Diferentes letras indican significancia estadística ( $P < 0.05$ ) entre la solución salina fisiológica estéril (SS) y los tratamientos con LPS ( $n = 6$ )



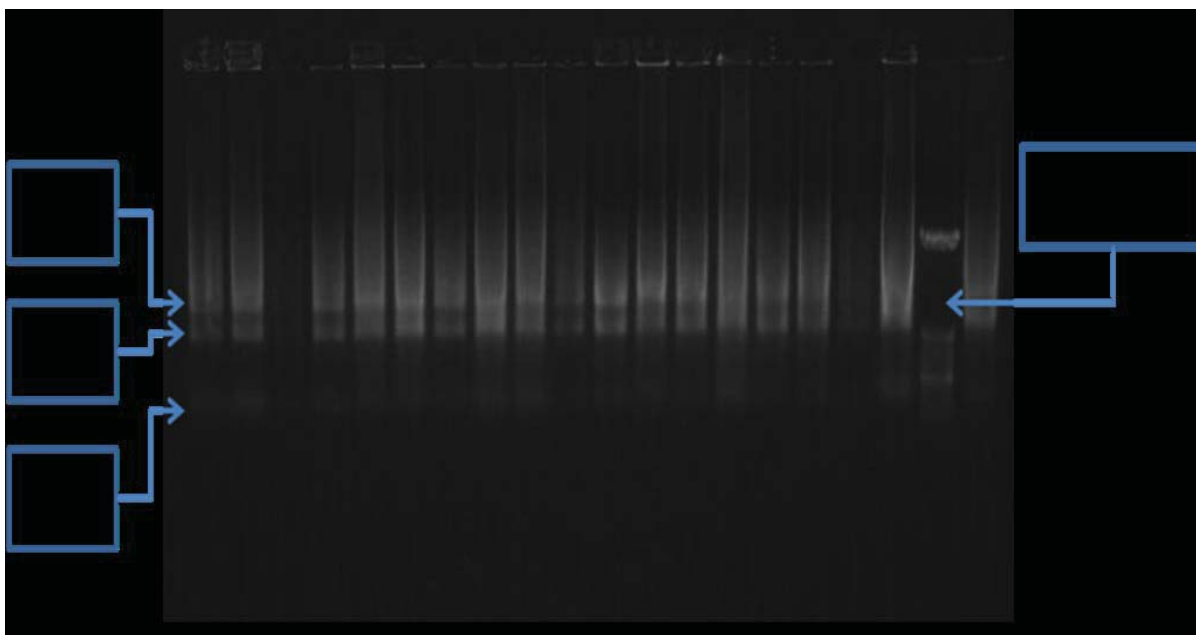
**Figura 14.** Efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la superóxido dismutasa (SOD) a las 24 h (a) y 72 h (b) después de la exposición a lipopolisacáridos LPS. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Diferentes letras indican significancia estadística ( $P < 0.05$ ) entre la solución salina fisiológica estéril (SS) y los tratamientos con LPS ( $n = 6$ )

## 7.4 Análisis transcriptómico de *Lutjanus peru* por un microarreglo heterólogo

### 7.4.1 Expresión de genes de peces alimentados con $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1%

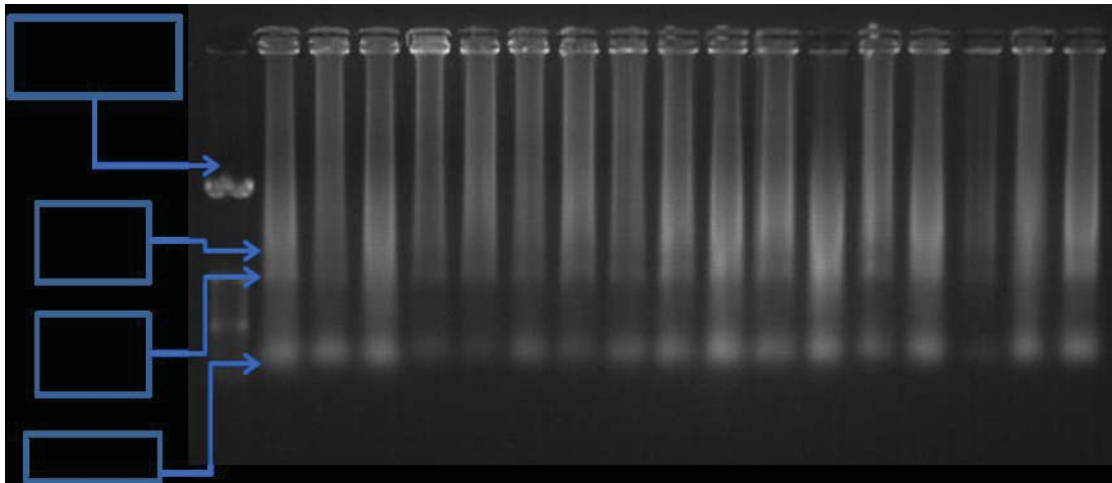
El análisis de los datos hematológicos, enzimas antioxidantes y digestivas mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la mayoría de estos parámetros evaluados a la semana cuatro y en los organismos alimentados con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1%. Por lo tanto, este grupo fue elegido para investigar el efecto del  $\beta$ -glucano sobre la expresión de genes del sistema inmune y digestivo, a través de un microarreglo heterólogo (*Mus musculus* y *L. peru*).

Para realizar la hibridación de nuestras muestras con el microarreglo se extrajo el ARN total de diferentes órganos, para asegurar que fuese de la calidad requerida se visualizó en geles de agarosa. En los cuales, se observaron las bandas 28s, 18s y 5s correspondientes a la presencia de ARN (Figuras 15-17).

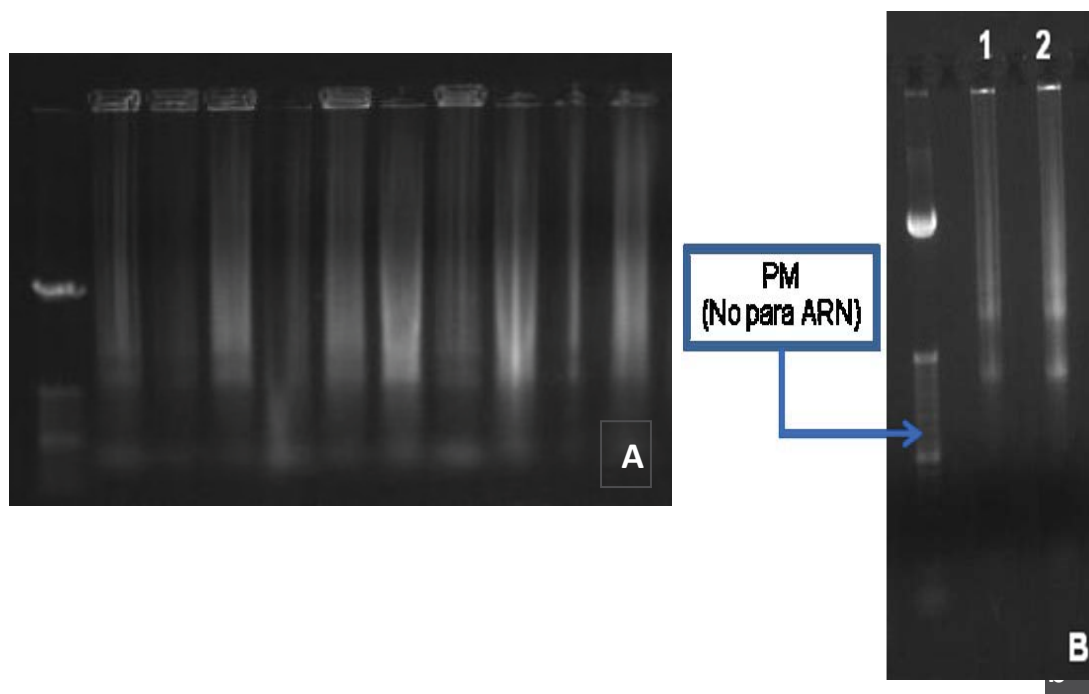


**Figura 15.** Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de riñón cefálico de juveniles de *Lutjanus peru* alimentados con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% durante cuatro semanas





**Figura 16.** Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de intestino de juveniles de *Lutjanus peru* alimentados con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% durante cuatro semanas.



**Figura 17.** Gel de Agarosa Nativo (0.8%). Muestras de ARN de páncreas de juveniles de *Lutjanus peru* (A) y pool de ARN (B) de intestino, riñón cefálico y páncreas. Carril (1) muestra el grupo control (27 muestras) y (2) grupo alimentado con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% (27 muestras).

#### 7.4.2 Análisis bioinformático y anotación

El análisis bioinformático mostró 1527 genes sobre expresados en los organismos alimentados con el  $\beta$ -glucano al 0.1%, de los cuales 1049 genes fueron examinados, 465 genes no se encontraron anotados en las bases de datos consultadas y 7 genes fueron ambiguos.

Las bases de datos utilizadas para hacer la anotación de los genes fueron elegidas de acuerdo al mayor número de genes presentes en las mismas (Tabla XI).

El análisis de anotación clasificó a los genes de acuerdo a su ontología, la cual se subdivide en procesos biológicos, componentes celulares y función molecular; además se anotaron las vías metabólicas y dominios de proteínas en las que participan dichos genes. De acuerdo a la ontología, se identificaron 139 procesos biológicos (Tabla XII), de estos, 22 están directamente relacionadas con el sistema inmune y digestivo (Tabla XIII), además de 37 funciones moleculares (Tabla XIV) y se ubicaron en 29 componentes celulares (Tabla XV).

**Tabla XI.** Bases de datos seleccionados para realizar la anotación en relación a 1227 genes

Anotación		Base de datos	Genes (%)	# Genes
Categorías funcionales		SP_PIR_KEYWORDS	73.8%	774
Ontología de Genes	Procesos Biológicos	GOTERM_BP_FAT	55.8%	585
	Componentes Celulares	GOTERM_CC_FAT	50.5%	530
	Procesos Moleculares	GOTERM_MF_FAT	54.2%	569
Vías Metabólicas		KEGG_PATHWAY	24.7%	259
Dominios de Proteínas		INTERPRO	72.5%	761

**Tabla XII.** Análisis del microarreglo heterólogo, mostró 139 procesos biológicos, asociados a 1527 genes anotados

<b>Procesos biológicos GOTERM_BP_FAT</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre de los genes</b>
Desarrollo celular	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
Homeostasis del calcio	GB_74769	Fosfainositol 3 fosfato
Respuesta a daño celular	NM_021443	Quimiocina (C-C motivo) ligando 8
	NM_011339	Quimiocina (C-X-C motivo) ligando 15
	U88684	IgG
	NM_019450	Interleucina 1
	NM_008489	Lipopolisacáridos
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
Transporte mediado por vesículas	AK003861	Factor de crecimiento transformante, beta receptor II
	U88684	IgM
	NM_008320	Interferon factor 8
	BC011277	Ras and Rab interactor 1
Regulación de la respuesta inmune	NM_011691	vav 1 oncogene
	NM_008339	CD79B antígeno
	NM_010386	Histocompatibilidad
	U88684	IgG
	AF054819	Receptor Lectin
Sistema de procesos	NM_008339	CD79B antígeno
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
	U88684	IgG
	NM_008372	Interleucina 7 receptor
	AF054819	Receptor lectin-like, miembro 1

Continuación Tabla XII. Análisis del microarreglo heterólogo mostró 139 procesos biológicos

<b>Procesos biológicos GOTERM_BP_FAT</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre de los genes</b>
Diferenciación mieloide de leucocitos	NM_007614	Catenina (cadherina asociada a proteínas), beta 1
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
	AK003861	Factor de crecimiento transformante, beta receptor II
	NM_011613	Factor de necrosis tumoral superfamilia, miembro 11
Desarrollo del sistema digestivo	X61453	NCK-asociado a proteínas 1
Morfogenesis del tracto digestivo	X61453	NCK-asociado a proteínas 1
	X61453	NCK-asociado a proteínas 1
Ensamble de complejos proteicos	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
	BC003483	Supresor de metástasis 1
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
Biogénesis de complejos proteicos	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
	BC003483	Supresor de metástasis 1
	NM_010386	Histocompatibilidad clase 2, class II, locus DMA
	M33422	Receptor 1 factor de crecimiento insulina
Procesamiento de antígenos	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
Morfogenesis embrionaria	NM_009372	Factor inductor TGFB
Procesos efectores inmunes	NM_008372	Interleucina 7
	U88684	Inmunoglobulina M
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
Complejo de ensamble macromolecular	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
Formación de órganos	AK003861	Factor de crecimiento transformante, beta receptor II
Desarrollo celular	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1

Continuación Tabla XII. Análisis del microarreglo heterólogo mostró 139 procesos biológicos

Procesos biológicos	ID	Nombre de los genes
Procesamiento de antígenos	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
	NM_010387	Histocompatibilidad 2, clase II, locus Mb1
Diferenciación celular	NM_009372	TGFB-inductor factor homeobox 1
	NM_008109	Factor diferencial de crecimiento
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
	NM_008372	Receptor interleucina 7
	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
Desarrollo epitelial	NM_009372	TGFB-inductor del factor homeobox 1
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta receptor I 1
Regulación de células T mediadoras de citotoxicidad	NM_008372	Interleucina 7
Homeostasis de iones	NM_011577	Factor de crecimiento beta 1
Regulación positiva de la transcripción	NM_010095	Células-factor B
	AJ249492	Interleucina 10 related T cell-derived inducible factor beta; interleukin 22
	NM_008320	Interferon regulatory factor 8
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
Regulación del factor de crecimiento transformante	U88684	Inmunoglobulina G
	NM_008372	Interleucina 7
	AF054819	Células asesinas <i>killer</i>
	NM_011577	Factor transformante, beta 1
Morfogénesis de tejidos	NM_011577	Factor transformante de crecimiento, beta 1
	NM_009372	TGFB-inductor del factor homeobox 1
Regulación de ARN	NM_008320	Interferon factor 8
	AJ249492	Interleucina 10 relacionado a células T-beta; interleucina 22
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1

Continuación Tabla XII. Análisis del microarreglo heterólogo mostró 139 procesos biológicos

<b>Procesos biológicos</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre de los genes</b>
Regulation positiva de nucleotides y procesos metabólicos	AJ249492	Interleucina 10 y 22
Regulación positiva de la expresión de genes	NM_010095	Factor celular B 2
	NM_008320	Interferon factor 8
	AJ249492	Interleucina 10 y 22
	NM_011577	factor transformante, beta 1
Efactor de procesos inmunes	U88684	Inmunoglobulina G
	AF054819	Receptor lectin
Desarrollo de órganos linfoides	NM_008372	Interleucina 7
	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
Procesamiento y presentación de antígenos via MHC clase II	NM_007799	Catepsina E
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, clase II, locus DMA
	NM_010387	Histocompatibilidad 2, clase II, locus Mb1
Diferenciación celular epitelial	NM_007614	Catenina (caderina asociada a proteínas), beta 1
Desarrollo de glándulas	NM_011577	Factor de crecimiento transformante, beta 1
	AK003861	Factor de crecimiento transformante, beta receptor II
	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
Regulation positiva del N en procesos metabólicos	NM_010095	Factor celular B
	NM_008320	Interferon factor 8
	AJ249492	Interleucina
	AF054819	Receptor lectin subfamilia K, miembro 1
	NM_011577	Factor transformante de crecimiento, beta 1

Continuación Tabla XII. Análisis del microarreglo heterólogo mostró 139 procesos biológicos

Procesos biológicos	ID	Nombre de los genes
Procesamiento de antígenos via MHC clase II	NM_007799	Catepsina E
	NM_010386	Histocompatibilidad 2, class II, locus DMA
	NM_010387	Histocompatibilidad 2, class II, locus Mb1
Angiogenesis	NM_007934	Aminopeptidasa
	AK003861	Factor de crecimiento transformante, beta receptor II
	NM_007614	Catenina, beta 1
Organización de membrana	BC011277	Ras and Rab interactor 1
	U88684	Inmunoglobulina G
	NM_011691	vav 1 oncogene
Morfología digestiva	X61453	NCK-asociado a proteína 1
Desarrollo ectodermal intestinal	X61453	NCK-asociado a proteína 1
Morfogénesis digestiva ectodermal	X61453	NCK-asociado a proteína 1
Fagocitosis	U88684	Inmunoglobulina G
	NM_008320	Interferon regulatory factor 8
	NM_011691	vav 1 oncogene
Invaginación de membranas	CD209d antigen	CD209d antígeno
	Ras and Rab interactor 1	Ras and Rab interactor 1
	U88684	Inmunoglobulina G
	NM_008320	Interferon regulatory factor 8
	NM_011691	vav 1 oncogene
Crecimiento	NM_008109	Factor de diferenciación de crecimiento 5
	NM_008372	Interleucina 7 receptor
	NM_011577	Factor de crecimiento, beta 1

Continuación Tabla XII. Análisis del microarreglo heterólogo mostró 139 procesos biológicos

Procesos biológicos	ID	Nombre de los genes
Maduración de proteínas	U88684	Inmunoglobulina M
	AK016346	Aminopeptidasa 2
Homodimerización de proteínas	NM_011613	Factor de necrosis tumoral
Desarrollo embrionario	GB_18803	Fosfolipasa C, gamma 1
Endocitosis	CD209d antigen	CD209d antígeno
	Ras and Rab interactor 1	Ras and Rab interactor 1
	U88684	Inmunoglobulina M
	NM_008320	Interferon regulador factor 8
	NM_011691	vav 1 oncogene
Proteolisis	BC010520	Arginil aminopeptidasa (aminopeptidase B)
	NM_025462	Endotelina enzima 2
	NM_011904	Tolloid-like 2
	AK016346	Aminopeptidasa 2
	BC006645	Manosa, alfa, clase 1B, miembro 1
	U88684	Inmunoglobulina M (suero IgG2b); Inmunoglobulina G

GOTERM\_BP\_FAT, base de datos usada para realizar la anotación

El patrón de expresión de los genes involucrados en los procesos biológicos fue visualizado basándose en la anotación ontológica usando un Z-score = 2. Las categorías funcionales de los genes sobre-expresados fueron determinados usando Ease score 0.5, el cual es un ajuste conservador de la probabilidad exacta de Fisher ( $P < 0.05$ ).



**Tabla XIII.** Procesos biológicos anotados, 17 relacionados al sistema inmune y 5 al sistema digestivo, asociados a 1527 genes analizados

<b>Procesos biológicos</b>	<b>GO ID</b>	<b># Genes</b>
Invaginación de membrana	GO:0010324	16
Endocitosis	GO:0006897	16
Fagocitosis	GO:0006909	7
Procesamiento y presentación de antígenos via MHC clase II	GO:0019886	4
Desarrollo del crecimiento involucrado en la morfogénesis	GO:0060560	4
Procesamiento y presentación de péptidos antigenicos via MHC clase II	GO:0002495	4
Procesamiento de antígenos y presentación de péptidos polisacáridos antigénicos via MHC clase II	GO:0002504	4
Efectores de procesos inmunes	GO:0002699	6
Expresión de genes	GO:0010628	30
Diferenciación leucocitaria mieloide	GO:0002573	5
Regulación positiva de procesos del sistema inmune	GO:0002684	15
Presentación de peptides antigénicos	GO:0048002	5
Regulación positiva de la respuesta inmune	GO:0050778	11
Procesamiento de antígenos y presentación de péptidos antigénicos exógenos	GO:0002478	4
Regulación de células T y mediadoras de citotoxicidad	GO:0001914	3
Regulación inmune procesos efectores	GO:0002697	8
Procesos efectores inmunes	GO:0002252	10
Morfogénesis ectodermal del tracto digestivo	GO:0048567	4
Proteólisis	GO:0006508	58
Morfogénesis del tracto digestivo	GO:0048546	5
Desarrollo del sistema digestivo	GO:0055123	5
Crecimiento	GO:0040007	17

---

GO ontología de genes

Se analizaron individualmente cada uno de los 139 procesos biológicos encontrados para conocer los genes sobre-expresados por efecto del  $\beta$ -glucano. A continuación se eligieron aquellos procesos relacionados al sistema inmune y digestivo que presentaron el mayor número de genes involucrados, donde destacan los procesos de fagocitosis, endocitosis, invaginación de membranas, procesamiento y presentación de antígenos, presentación de antígenos polisacáridos vía complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I), diferenciación de leucocitos mieloides, entre otros. El proceso biológico que mostró el mayor número de genes involucrados fue la regulación positiva de la expresión de genes, con 30 y el crecimiento con 17 (Tabla XIII).

Además, el análisis de anotación realizado con DAVID, identificó a los genes sobre-expresados por efecto del  $\beta$ -glucano que participan en 10 diferentes rutas metabólicas (Fig. 18), donde destacan la migración transendotelial de leucocitos, la vía de señalización de TGF- $\beta$ , la citotoxicidad mediada por células natural killer, vías de señalización de receptores de células T y mediadores de la fagocitosis; todos importantes procesos del sistema inmune.

También se observaron 28 dominios de proteínas relacionados a los genes sobre-expresados por efecto del tratamiento, donde destacan motivos relacionados al reconocimiento de ARN y dominios de peptidasas (Fig. 19).

**Tabla XIV.** Funciones moleculares anotadas y asociadas a 1527 genes analizados

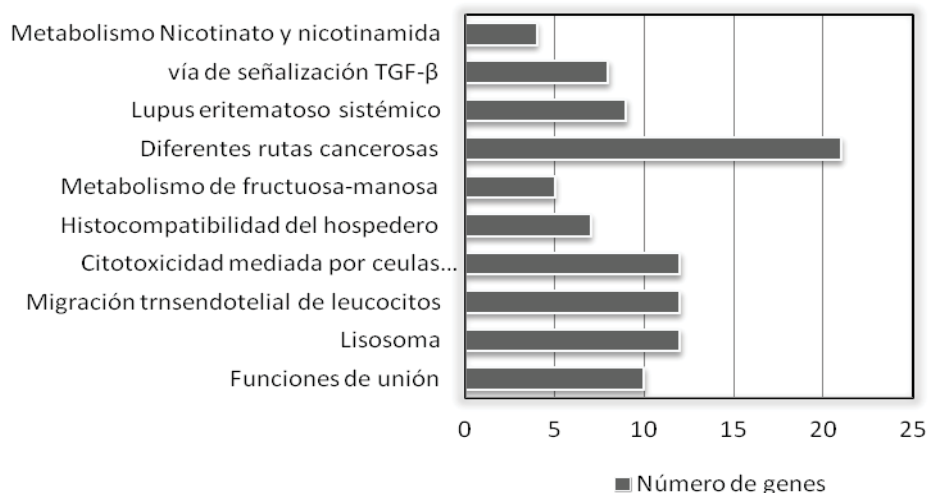
<b>GO Term (function molecular)</b>	<b>GO ID</b>	<b># Genes</b>
Actividad nucleotidasa	GO:0008252	5
Actividad factor de transcripción ARN polimerasa II	GO:0003702	13
Actividad amino receptor	GO:0008227	9
Unión a proteínas MHC clase I	GO:0042288	4
Actividad nucleotidasa 5'	GO:0008253	4
Actividad de homodimerización de proteínas	GO:0042803	17
Actividad receptor de histamina	GO:0004969	3
Unión a proteínas	GO:0042802	22
Actividad endopeptidasa	GO:0004175	29
Actividad fosfatasa	GO:0016791	19
Actividad deshidrogenasa esteroideal sobre el grupo donador CH-OH y aceptor NAD or NADP	GO:0033764	5
Unión a cromatina	GO:0003682	14
Actividad endopeptidasa Cisteína-tipo	GO:0004197	8
Actividad dimerización de proteínas	GO:0046983	24
Actividad fosfatasa tirosina	GO:0004725	10
Adhesión y unión celular	GO:0050839	4
Actividad peptidasa	GO:0008233	38
Actividad esteroide deshidrogenasa	GO:0016229	5
Actividad de transcripción factor II ARN polimerasa	GO:0016251	5
MHC unión de proteínas	GO:0042287	4
Actividad peptidase sobre peptides L-aminoácidos	GO:0070011	36
Transportadores de membrana di- tri-valentes inorgánicos catiónicos	GO:0015082	5
Unión a ARN de transferencia	GO:0000049	4
Actividad hormonal	GO:0005179	10
Deshidrogenasa-3-beta-hidroxi-delta5-esteroide	GO:0003854	3
Constituyentes estructurales del ojo	GO:0005212	4
Actividad mediadora de ARN polimerasa II transcripcional	GO:0016455	4
Unión a ARN	GO:0003723	38
Unión a ADN	GO:0003677	89
Actividad transportadora transmembranal de iones	GO:0046915	4
Actividad receptora de transferrina	GO:0004998	2
Actividad receptora de glutamato	GO:0001641	2
Unión a carbohidratos	GO:0030246	20
Unión a matrices extracelulares	GO:0050840	4
Actividad del factor de transcripción	GO:0003700	42

En relación a las funciones moleculares, las que mostraron el mayor número de genes presentes fueron las involucradas a procesos de unión al ADN con 89 y ARN con 38, los factores que activan la transcripción con 42, actividad peptidasa con 38 y endopeptidasa con 29, actividad fosfatasa con 19, entre otras (Tabla XIV).

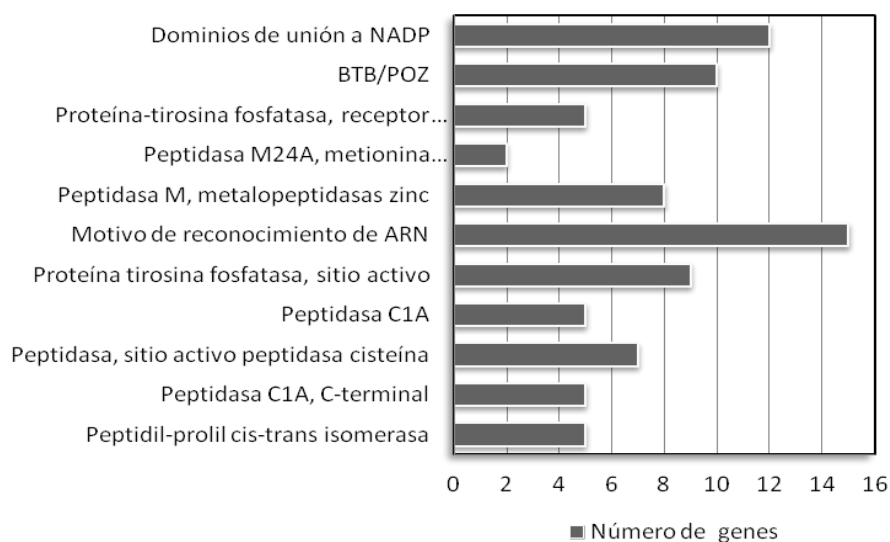
**Tabla XV.** Componentes celulares anotados y asociados con 1527 genes analizados

<b>Componentes celulares</b>	<b>GO ID</b>	<b># Genes</b>
Núcleo	GO:0031981	51
Endosoma	GO:0005768	19
Vacuola	GO:0005773	16
Complejo apical y uniones	GO:0043296	10
Complejos mediadores	GO:0016592	5
Membrana pre-sináptica	GO:0042734	5
Membrana plasmática apicolateral	GO:0016327	10
Fascias adherentes	GO:0005916	3
Sinapsis en neuronas	GO:0044456	16
Lisosomas	GO:0005764	14
Lumen de organelos intracelulares	GO:0070013	61
Complejos de factores de transcripción	GO:0005667	17
Adherencias célula-célula	GO:0005913	5
Vacuolas liticas	GO:0000323	14
Luz de organelos	GO:0043233	61
Partes del nucleosoma	GO:0044451	31
Nucleoplasma	GO:0005654	35
Sinapsis de células soma	GO:0045202	21
Células soma	GO:0043025	10
Complejo de histonas NuA4	GO:0035267	3
Membranas del lumen	GO:0031974	61
Cuerpo XY	GO:0001741	3
Discos intercalares	GO:0014704	3
Matriz extracelular proteica	GO:0005578	19
Axones	GO:0033267	4
Histonas H4/H2A	GO:0043189	3
Cromatina	GO:0000785	12
Dendritas	GO:0030425	9
Citoesqueleto actina	GO:0015629	14

El análisis del microarreglo ubicó a los genes sobre-expresados por el glucano en 29 diferentes componentes celulares (Tabla XV), mostrando que la mayoría de ellos se localiza en el lumen de organelos intracelulares con 61, lumen nuclear con 51, nucleoplasma con 35, endosoma con 19, entre otros.



**Figura 18.** Rutas metabólicas en las que participan los genes sobre-expresados por efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta de *Lutjanus peru*.



**Figura 19.** Dominios de proteínas predominantes, relacionados a los genes sobre-expresados por efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta de *Lutjanus peru*.

Finalmente, a partir de este análisis de anotación, se propusieron a los genes *IgM*, *TNF- $\alpha$* , *IGF*, *IL-1 $\beta$* ,  *$\alpha$ -Amy*, *GADPH* y *EF 1- $\alpha$*  para realizar la validación del microarreglo a través de la cuantificación de la expresión, utilizando la técnica de qPCR. Los primers usados pueden ser consultados en la Tabla IV. El criterio de elección fue basado en la participación de los genes en diferentes procesos relacionados al sistema inmune y digestivo, así también por estar involucrados en la cascada de señalización de los  $\beta$ -glucanos reportada en mamíferos (Latz y Fitzgerald, 2008).

#### **7.4.3 Evaluación de la expresión de genes por RT-PCR en tiempo real**

Se logro amplificar y cuantificar con éxito los genes endógenos *EF 1- $\alpha$*  y el *GADPH*, así como los genes  *$\alpha$ -Amy* y *TNF- $\alpha$* ; sus curvas de disociación se muestran en el ANEXO B. La cuantificación de la expresión mostró un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el gen  *$\alpha$ -Amy* en páncreas y *TNF- $\alpha$*  en riñón cefálico (Fig. 20), ambos por efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta al 0.1% después de cuatro semanas de alimentación, en comparación al grupo control. Esto valida y también concuerda con los resultados obtenidos en el microarreglo ya que el análisis bioinformático mostró a estos genes sobre-expresados por efecto del tratamiento ya mencionado. En cuanto a la expresión de genes en intestino no se observaron diferencias significativas.

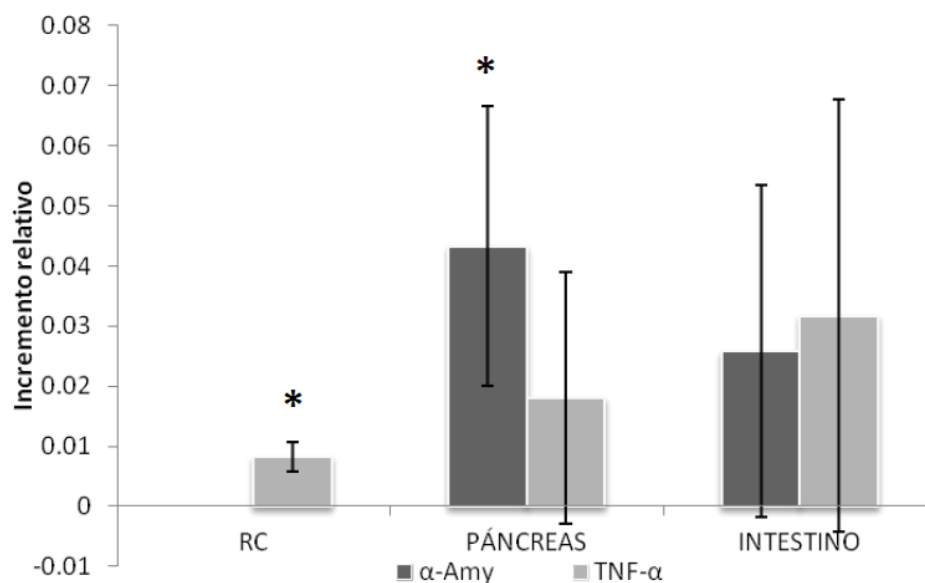
Por otra parte se logro amplificar con éxito el gen *IGF* a partir del diseño de primers degenerados, se pudo obtener una banda correspondiente a 232 pares de bases (ANEXO C), el siguiente paso será la secuenciación de dicho gen y después su cuantificación.

### **7.5 Experimento II. Efecto del $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la expresión de genes y parámetros inmunológicos de *Sparus aurata***

#### **7.5.1 Parámetros inmunológicos**

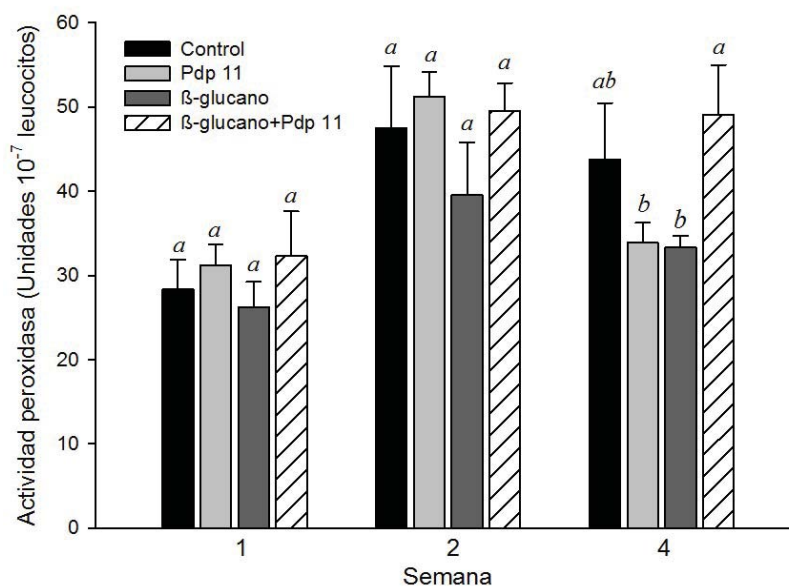
Los parámetros inmunológicos en la dorada fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) por efecto de los tratamientos administrados. La actividad peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico incremento significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 con respecto al grupo control (Fig. 21). En contraste, la actividad

peroxidasa en suero disminuyó significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con Pdp 11 and  $\beta$ -glucanos + Pdp11 con respecto al grupo control (Fig. 22).

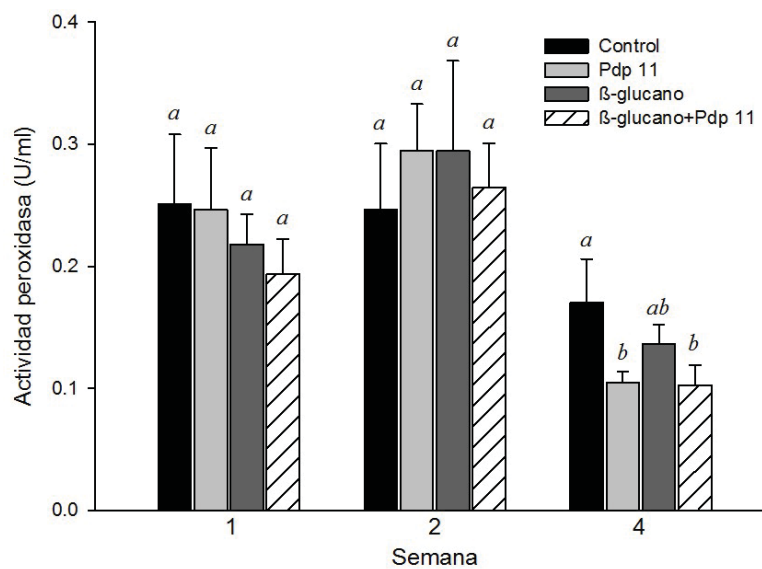


**Figura 20.** Efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta sobre la expresión relativa de los genes  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -Amy) y Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en riñón cefálico (RC), páncreas e intestino de *Lutjanus peru*. La cuantificación de la expresión se realizó con respecto a los genes endógenos *EF 1- $\alpha$*  y *GADPH*. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

La capacidad fagocítica incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) en la semana dos en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 y en la semana cuatro en los alimentados con  $\beta$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 en comparación al grupo control (Fig. 23a). La habilidad fagocítica incrementó significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 en relación al grupo control (Fig. 23b). Los niveles totales de IgM en suero mostraron un incremento significativo en la semana dos, en los peces alimentados con Pdp 11 pero disminuyó ( $P < 0.05$ ) en la semana cuatro en comparación al control (Fig. 24). Finalmente la actividad antiproteasa incremento significativamente en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 con respecto al grupo control (Fig. 25).

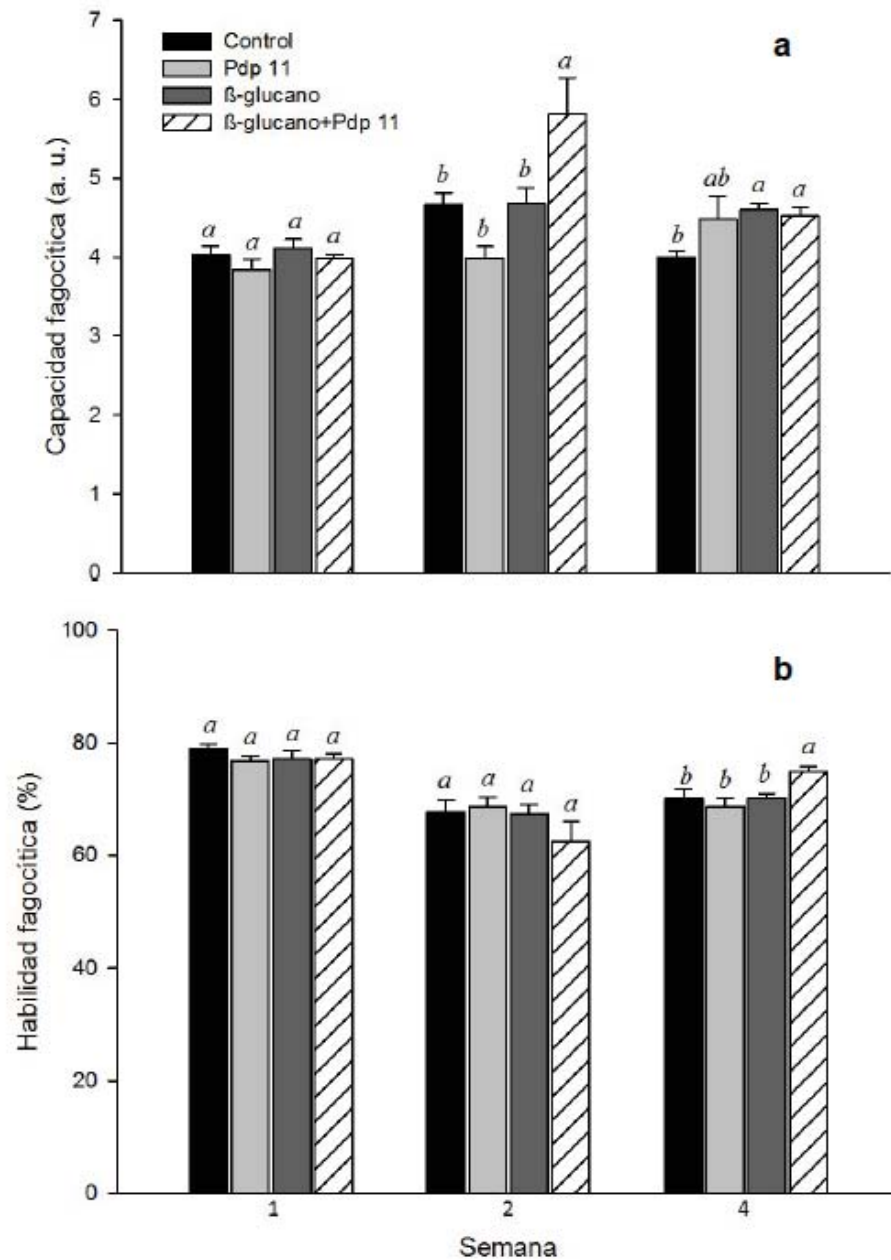


**Figura 21.** Actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico en juveniles de *Sparus aurata* por efecto de diferentes dietas experimentales. Los datos muestran las medias  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

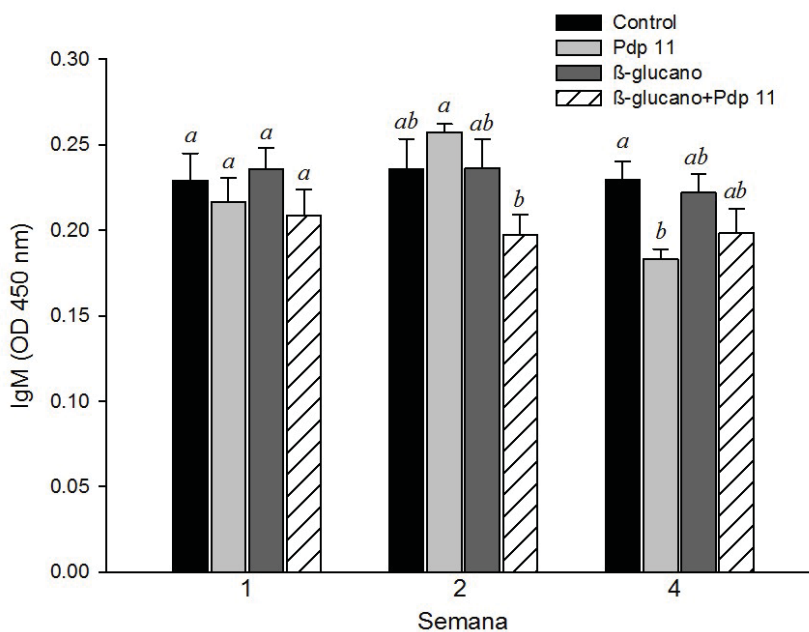


**Figura 22.** Actividad peroxidasa en suero de juveniles de *Sparus aurata* por efecto de diferentes dietas experimentales. Los datos muestran las medias  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

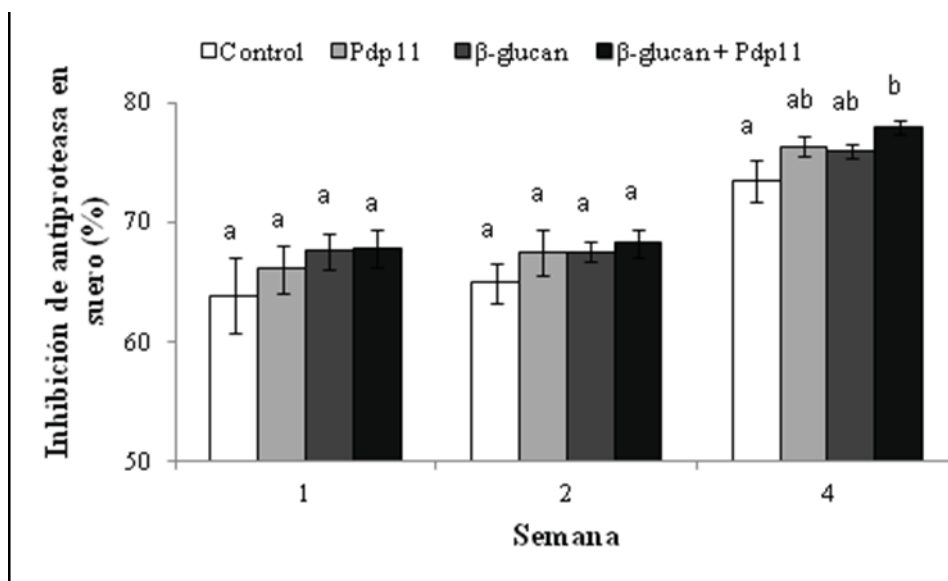




**Figura 23.** Capacidad fagocítica (a) y habilidad fagocítica de juveniles de *Sparus aurata* por efecto de diferentes dietas experimentales. Los datos muestran las medias  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )



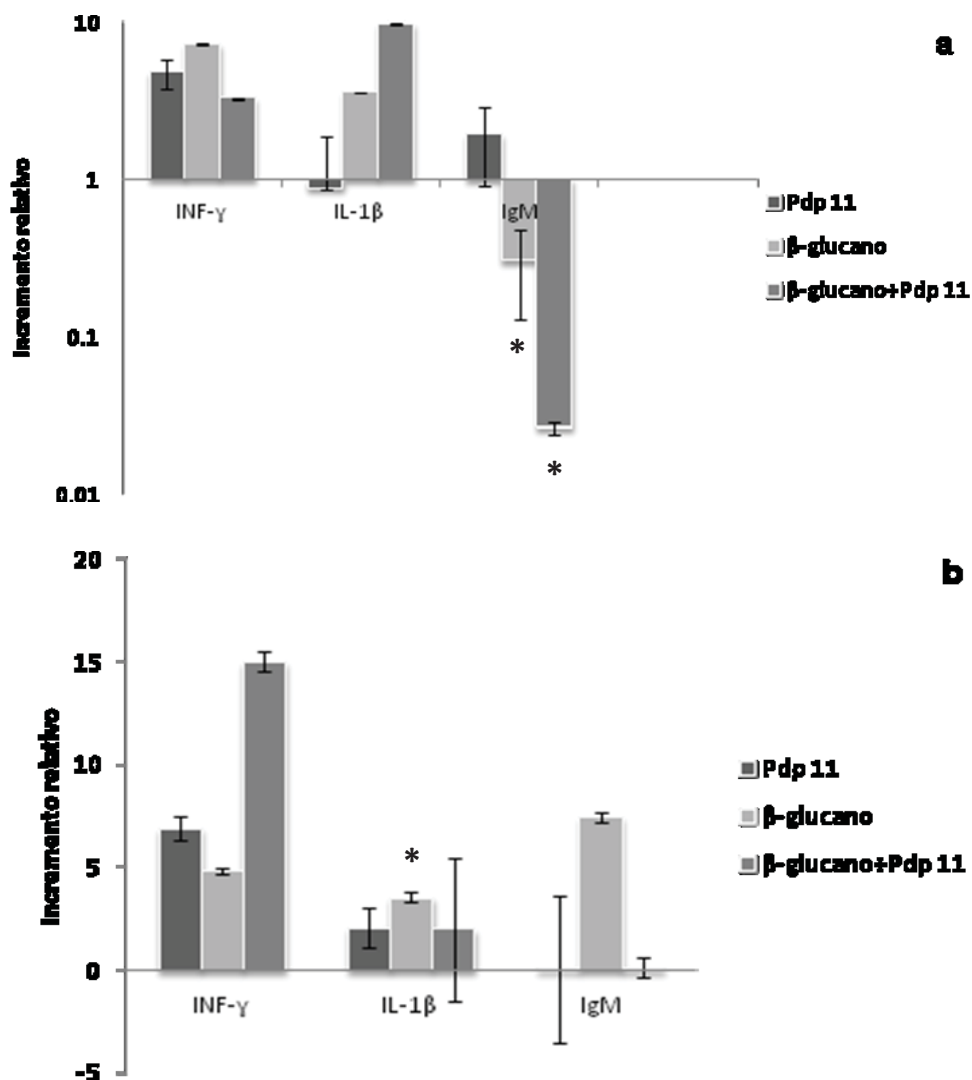
**Figura 24.** Niveles de IgM total en suero de juveniles de *Sparus aurata* por efecto de diferentes dietas experimentales. Los datos muestran las medias  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )



**Figura 25.** Actividad antiproteasa de juveniles de *Sparus aurata* por efecto de diferentes dietas experimentales. Los datos muestran las medias  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 9$ )

### 7.5.2 Expresión de genes

La expresión relativa del gen *IgM* en riñón cefálico de la dorada mostró un decremento significativo en los organismos alimentados con las dietas adicionadas con  $\beta$ -glucano y  $\beta$ -glucano + Pdp, en la semana uno (Fig. 26a). En la semana cuatro, se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la expresión relativa del gen *IL-1 $\beta$*  en los peces alimentados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 (Fig. 26b). No se observaron cambios significativos en la expresión del gen *IFN- $\gamma$* .



**Figura 26.** Expresión de genes relacionados con el sistema inmune en riñón cefálico de *Sparus aurata* alimentadas con diferentes dietas experimentales durante una (a) y cuatro semanas (b). Las barras representan la media  $\pm$  EE ( $n = 6$ ). Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $P < 0.05$ ).

### 7.5.3 Crecimiento

Se observó un incremento estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) en el peso final y en WG% de los juveniles de *Sparus aurata* alimentados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 (1.0 g kg<sup>-1</sup>) y con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 + Pdp 11 adicionados en la dieta en comparación al grupo control (Tabla XVI).

**Tabla XVI.** Crecimiento de juveniles de *Sparus aurata* alimentados con los diferentes tratamientos experimentales durante cuatro semanas

Dietas experimentales	Wi	Wf	FC	SGR	WG%
Control	12.18±1.30a	14.56±1.24b	1.52±0.03a	0.70±0.34a	19.54 ± 4.61c
Pdp 11(10 <sup>9</sup> ufc g <sup>-1</sup> )	12.83±1.13a	18.18±1.34ab	1.50±0.03a	1.27±0.46a	41.69 ± 6.56a
$\beta$ -Glucano 1,3/1,6 (1.0 g kg <sup>-1</sup> )	14.94±1.48a	19.51±1.34a	1.61±0.05a	1.03±0.31a	30.58 ± 2.76b
$\beta$ -Glucano 1,3/1,6 + Pdp 11	16.06±5.35a	20.8±1.15a	1.75±0.06a	0.95±0.37a	29.51 ± 4.21b

Los valores son expresados como medias  $\pm$  ES de observaciones realizadas por triplicado ( $n = 9$ )

Las medias en la misma columna con diferentes letras fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

Wi peso inicial, Wf peso final, SGR tasa de crecimiento específica, WG (%) ganancia en peso porcentual y FC factor de condición

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Experimento I

En este estudio se investigó el efecto de la administración del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en la dieta sobre el crecimiento, parámetros hematológicos, la expresión de genes, la actividad enzimática digestiva y antioxidante de *Lutjanus peru* antes y después de la exposición a LPS.

#### 8.1.2 Análisis hematológicos

Los datos relacionados a la hematología de los juveniles de *L. peru* ( $n = 27$ ) realizados en el laboratorio antes del experimento de alimentación (Tabla VIII) pueden ser usados para detectar cambios fisiológicos, como lo indican otros estudios en peces (Atamanalp y Yanik, 2003). Los valores de los parámetros sanguíneos, en los tres tratamientos no indicó ningún aspecto adverso sobre la salud de *L. peru* (Fig. 6 y 7) y fueron similares a los reportados en otras especies clínicamente sanas y de climas tropicales como el pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* alimentado con  $\beta$ -glucanos al 0.1% (Del Río-Zaragoza *et al.*, 2011).

#### 8.1.3 Actividad enzimática antioxidante

Los glucanos de alto peso molecular activan leucocitos, estimulando su actividad fagocítica, citotóxica, y antimicrobiana, así como la producción de ROS (Akramiene *et al.*, 2007).

La actividad SOD fue significativamente más alta en las dietas que contenían  $\beta$ -glucano al 0.1% (Fig. 9), en las semanas 4 y 6, en comparación al grupo control. Nuestros resultados son similares a otros experimentos donde se observa un incremento en SOD en peces que fueron alimentados con dietas que contenían diferentes tipos y concentraciones de  $\beta$ -glucanos (Kumari y Sahoo, 2006a) o métodos de administración (Selvaraj *et al.*, 2005) para especies, como rohu *Labeo rohita* (Sahoo y Mukherjee, 2001; Misra *et al.*, 2006), pez gato asiático *Clarias batrachus* (Kumari y Sahoo, 2006b) y la carpa común *Cyprinus*

*carpio* (Selvaraj *et al.*, 2005). El incremento de la actividad SOD podría ser explicado debido a que el  $\beta$ -glucano incrementa el número de neutrófilos circulantes en sangre (Del Río *et al.*, 2011) y activa las células fagocíticas asociadas a la respuesta de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Swain *et al.*, 2008) incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes que confieren protección contra los efectos nocivos de ROS (Kumari y Sahoo, 2006a; Muñoz *et al.*, 2000).

Para algunos autores, la CAT y la SOD son consideradas enzimas antioxidantes muy importantes en organismos acuáticos (Perendija *et al.*, 2007; Pérez-Campo *et al.*, 1993) ya que todos los tejidos aerobios continuamente producen ROS durante su actividad respiratoria. El flujo de ROS puede inducir varios disturbios celulares tales como la despolimerización de polisacáridos y ácidos nucleicos, oxidación de proteínas o peroxidación de ácidos grasos. Las enzimas antioxidantes eliminan o transforman radicales en sustancias menos reactivas. Además las actividades de las enzimas antioxidantes y el nivel de los radicales libres han sido relacionados con varias condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo el estrés generado por presencia de patógenos, exposición a medios anóxicos e incluso a la mala alimentación (Czene *et al.*, 1997).

Con respecto a SOD, nuestros resultados también concuerdan con los encontrados por Reyes (2008), quien al trabajar con la cabrilla sardinera, observó un aumento significativo de la actividad SOD, en peces alimentados con levaduras completas durante dos semanas. Este autor sugiere que este aumento en la actividad se debió a que esta es una de las principales enzimas antioxidantes que responde a los estímulos de estrés oxidativo.

#### **8.1.4 Crecimiento**

En este trabajo, los peces alimentados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 a diferentes concentraciones tuvieron un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento al evaluar el SGR y %WG en relación al grupo control (Tabla IX). En una amplia revisión sobre estimulantes (Dalmo y Børgwald, 2008) describen los efectos del  $\beta$ -glucano sobre el crecimiento de peces. Los  $\beta$ -glucanos probados y obtenidos a partir de las paredes de levaduras incrementa el crecimiento en diferentes especies de peces bajo condiciones específicas de temperatura

(Sealey *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2006); sin embargo, en otros estudios bajo diferentes condiciones no se encontraron diferencias significativas en diversos niveles de  $\beta$ -glucanos administrados (Welker *et al.*, 2007; Whittington *et al.*, 2005).

El incremento del crecimiento es dependiente en la cantidad de  $\beta$ -glucanos en la dieta, duración de la alimentación, temperatura ambiental y las especies bajo estudio (Dalmo y Bøgwald, 2008). Nuestros resultados mostraron un incremento significativo en el crecimiento en juveniles de huachinango tratados con  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 por lo que tiene potencial para reducir los costos de alimentación en granjas de peces marinos.

#### **8.1.5 Actividad enzimática digestiva**

La mayoría de los estudios relacionados con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en peces se enfoca en los efectos inmunoestimulantes (Dalmo y Bøgwald, 2008); pocos reportes exploran los procesos digestivos, incluyendo la absorción y la digestibilidad del  $\beta$ -glucano en el intestino de peces, así como su efecto sobre la microbiota o cambios en la morfología intestinal (Krogdahl *et al.*, 2005; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pedrotti *et al.*, 2013).

Al determinar la actividad enzimática digestiva, se encontró un incremento significativamente diferentes por efecto de los tratamientos en la actividad esterasa en la semana seis (Fig. 10b) en los organismos alimentados con  $\beta$ -glucanos al 0.1 y 0.2%; en tripsina, en los peces que recibieron la dieta suplementada con el  $\beta$ -glucano al 0.1% en la semana dos (Fig. 11a); en quimiotripsina con  $\beta$ -glucano al 0.2% (Fig. 11b) en la semana cuatro y aminopeptidasa con el  $\beta$ -glucano al 0.1 y 0.2%, también en la semana cuatro (Fig. 11c) con respecto al grupo control.

Estos resultados concuerdan con Xu *et al.*, (2009), donde carpas que fueron alimentadas con xylo-oligosacáridos ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) muestran un incremento significativo en la actividad enzimática proteasa. Esta mejoría es asociada con cambios benéficos en la flora intestinal de la carpa. Tovar *et al.*, (2004) reporta un aumento en la actividad de tripsina en larvas de lubina europea *Dicentrarchus labrax* por adición a la dieta de levaduras vivas *Debaryomyces hansenii*.

En este trabajo, el efecto benéfico del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 sobre la actividad enzimática digestiva podría ser debido a una alteración de la microbiota intestinal, ya que los polisacáridos no digeribles pueden ser metabolizados por algunas de las poblaciones bacterianas benéficas presentes en el tracto digestivo, las cuales pueden producir enzimas digestivas exógenas. Sin embargo, un estudio a detalle de esta microbiota es necesario para confirmar esto.

Desde otro punto de vista, Anguiano *et al.* (2012) reporta un incremento en la digestibilidad de nutrientes por la suplementación de prebióticos aparentemente relacionados a cambios morfológicos del tracto gastrointestinal, pero no encontró un incremento en la actividad enzimática digestiva.

En otros estudios no relacionados con peces, como el de Gaggia *et al.*, (2010) reporta que en cerdos alimentados con  $\beta$ -glucanos se incrementa la actividad enzimática digestiva amilasa y proteasa. Iji *et al.* (2001) observó que en pollos de engorda, las dietas suplementadas con polisacáridos no digeribles comerciales, incrementan la actividad aminopeptidasa N en el íleon. Este reporte coincide con nuestros resultados, concerniente al incremento en la actividad aminopeptidasa en el intestino de peces alimentados con  $\beta$ -glucanos en la semana cuatro.

Dimitrioglou *et al.* (2011) sugiere que algunas poblaciones bacterianas contribuyen a modificar la actividad enzimática digestiva del hospedero. Otros estudios (Ringø y Olsen, 1999; Li y Gatlin, 2005) encontraron que los polisacáridos usados como prebióticos estimulan el crecimiento de la microbiota benéfica en peces. Otro estudio realizado por Bairagi *et al.* (2002) en nueve especies de teleósteos, encontró que la microbiota es una fuente de enzimas digestivas exógenas en adición a las enzimas endógenas producidas por el tracto gastrointestinal del hospedero e identificó estas bacterias por su habilidad para producir lipasas, proteasas, celulosas y tripsina. Ellos no identificaron estas bacterias por métodos moleculares.

En adición, el incremento del crecimiento de *L. peru* en nuestro experimento podría ser atribuido a la producción de estas enzimas extracelulares por la microbiota en el tracto digestivo tal como lo sugiere Dimitrioglou *et al.* (2011) en trabajos relacionados al uso de polisacáridos como prebióticos.



## 8.2 Exposición a lipopolisacáridos (LPS)

Las endotoxinas LPS son los componentes que se encuentran en mayor cantidad en las membranas externas en las bacterias Gram negativas, es uno de los más conocidos blancos de reconocimiento innato induciendo una robusta respuesta inflamatoria mediada por células fagocíticas (Wright, 1999). Los peces, tal como otros vertebrados activan su sistema inmune ante la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son identificados por receptores que reconocen patógenos (PRRs), aquí se incluyen los receptores de la familia Toll like (Iliev *et al.*, 2005a).

Los LPS, los peptidoglicanos de bacterias Gram negativas, los  $\beta$ -glucanos de hongos y el ARN de doble cadena son considerados como típicos PAMPs. El reconocimiento inicial de patógenos y sustancias que contienen PAMPs involucra la activación de PRRs. El resultado de esto desencadena procesos complejos del sistema inmune innato y lleva a una reacción inflamatoria, así como el comienzo de la propia respuesta adaptativa (Aderem *et al.*, 2000).

En esta parte del experimento, se expuso a juveniles de *Lutjanus peru* a LPS (lipopolisacáridos de la pared celular de *E. coli*) a través de una inyección intraperitoneal, usando como grupo control a peces inyectados con solución salina fisiológica estéril (SS) después de seis semanas de alimentación con  $\beta$ -glucanos a diferentes concentraciones (0.0 control, 0.1 y 0.2%).

La administración intraperitoneal de LPS ha sido extensivamente usada en mamíferos como un modelo para imitar la infección bacteriana y para estimular el sistema de defensa. Es conocido que algunos vertebrados, notablemente los peces y los anfibios, son probablemente los organismos más resistentes a los efectos tóxicos de los LPS (Berczi *et al.*, 1996). Los retos *in vivo* usando altas concentraciones de LPS en peces, en varias ocasiones no resultan en una mortalidad mediada por la toxina (Iliev *et al.*, 2005a).

### 8.2.1 Ensayos hematológicos

En general, los lipopolisacáridos bacterianos son un fuerte activador de varias respuestas inmunes y estimula a los macrófagos/monocitos para liberar una variedad de citocinas

inflamatorias (Brubacher *et al.*, 2000). En este estudio no se observaron signos de enfermedad en los peces expuestos a LPS, así como cambios significativos en la concentración de hemoglobina (Tabla X). Sin embargo, a las 72 h la concentración de las proteínas en plasma disminuyó significativamente en peces alimentados con la dieta control e incrementó en peces alimentados con  $\beta$ -glucano al 0.1% en comparación a los inyectados con SS (Fig. 12).

Los LPS afectan parámetros hematológicos e inducen estrés agudo (Swain *et al.*, 2008), causando proliferación hematopoyética (MacKenzie *et al.*, 2008). Nuestros datos sobre las proteínas totales en suero son una respuesta del sistema inmune innato (Wiegertjes *et al.*, 1996).

El decremento en las proteínas plasmáticas en peces alimentados con la dieta control puede ser debido a que estas respuestas fisiológicas y bioquímicas varían dependiendo de la especie y de la dosis de la endotoxina administrada (Huttenhuis *et al.*, 2006; Selvaraj *et al.*, 2005). Recientemente se ha postulado que la tolerancia de los peces a los LPS es mediada por receptores de reconocimiento diferentes a los de mamíferos como TLR4. TLR4 está asociado a moléculas que participan en la regulación del motivo endotóxico, en mamíferos puede ser ausente o puede tener diferentes funciones en peces (Iliev *et al.*, 2005a). Sin embargo, en trucha arcoiris los macrófagos cultivados con LPS provocan una secreción de TNF- $\alpha$  similar a la que se observa en mamíferos, lo que indica la conservación de la vía de los LPS y la conservación de la principal vía de la respuesta inflamatoria (Mackenzie *et al.*, 2003; Iliev *et al.*, 2005a).

Por lo mencionado anteriormente, serán necesarios estudios más profundos para determinar el efecto de los LPS sobre los parámetros hematológicos en el huachinango.

### **8.2.2 Actividad enzimática antioxidante**

Los LPS son ampliamente conocidos por estimular la respuesta inflamatoria, activando a células fagocíticas y rápidamente (en horas) la producción de ROS (Braulio *et al.*, 2004). Estas moléculas son altamente reactivas, pueden producir poderosos oxidantes tales como el súper óxido y el peróxido de hidrogeno. ROS producido durante una infección ayudará a

eliminar a los agentes patógenos tales como bacterias, protozoarios u hongos (Stevenson y Riley, 2004). Sin embargo la toxicidad de ROS no solo se restringe a organismos extraños (Nathan y Shiloh, 2000). La sobreproducción de ROS durante la respuesta inflamatoria puede por lo tanto llevar al daño a estructuras del hospedero o al fenómeno conocido como estrés oxidativo (Coleman, 2001), intentando evitar este daño intervienen las enzimas antioxidantes.

En este estudio, se observó que después de exposición a LPS, a las 24 h, los peces alimentados con la dieta control e inyectados con LPS tuvieron un decremento significativo en la actividad CAT en comparación a los inyectados con SS (Fig. 13a). Esto no concuerda con otros reportes, donde la actividad enzimática antioxidante incrementa en peces sujetos a un estrés agudo o expuestos a toxinas tales como LPS (Swain *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 2008; Guttvika *et al.*, 2002). Sin embargo, a las 72 h, la actividad CAT incrementa en los peces que recibieron el  $\beta$ -glucano al 0.1 y 0.2% (Fig. 13b), en comparación a los inyectados con SS. Esto confirma que estos polisacáridos específicos incrementan la actividad antioxidante en peces (Dalmo y Børgwald, 2008).

A las 72 h, nuestros resultados mostraron un decremento significativo en SOD en peces alimentados con la dieta control e inyectados con LPS comparados a estos inyectados con SS (Fig. 14b). Se ha reportado que la actividad y expresión de SOD es dependiente del tejido y de la dosis, cuando un organismo es expuesto a LPS. Por ejemplo, la expresión de Mn-SOD del hígado y riñón son positivamente modulados por LPS inyectados, pero los niveles de transcripción son inversamente relacionados a la exposición bacteriana en *Hemibarbus mylodon* (Cho *et al.*, 2009).

Algunos estudios muestran que los LPS son el mayor factor de virulencia y responsables de los efectos letales y manifestaciones químicas de enfermedades en humanos y animales; sin embargo, en peces, ellos son frecuentemente resistentes al choque endotóxico (Brandtzaeg *et al.*, 2001). Esto puede explicar nuestros resultados relacionados con el efecto de LPS en *L. peru*; aunque los efectos inmunoestimulantes de esta endotoxina, mediante la activación de células relacionadas con el sistema inmune, tales como linfocitos T y B y macrófagos, se han establecido en varios teleósteos (Swain *et al.*, 2008).

Diferentes autores mencionan que aunque los LPS son conocidos como uno de los más potentes moduladores de las funciones inmunes de los mamíferos; en algunas especies de peces (salmón, carpa, trucha, lenguado japonés y bagre) el efecto biológico de la inoculación de ciertas dosis de LPS, que serían letales para cualquier mamífero, en algunos casos en los peces, no inducen cuadros clínicos (Cahill, 1990; Dalmo y Bøgwald, 1996; Iliev *et al.*, 2005a; Penagos *et al.*, 2008).

En el salmón del Atlántico *Salmo salar* se inocularon dosis de LPS de 2 mg kg<sup>-1</sup> y 50 mg kg<sup>-1</sup> por las vías intraperitoneal e intragástrica respectivamente y a pesar de la movilización de la molécula por diferentes tejidos internos y de superficie, no se evidenció ningún tipo de signos clínicos o mortalidad (Dalmo *et al.*, 1997).

En cuanto a los efectos de  $\beta$ -glucano sobre la actividad antioxidante, a las 72 h, la actividad SOD incremento en peces infectados con LPS en comparación a los peces inyectados con SS y alimentados con las dietas suplementadas con  $\beta$ -glucano al 0.1% (Fig. 14b), lo cual no es sorprendente porque esta enzima es requerida para remover radicales libres que pueden dañar a los peces (Harikrishnam *et al.*, 2010). Adicionalmente, el incremento de la actividad SOD puede resultar de la estimulación de macrófagos por el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6, el cual posee una conformación química conservada que estimula el sistema inmune (Uchiyama, 1982) y enzimas antioxidantes (Dalmo y Bøgwald, 2008; Selvaraj *et al.*, 2006).

Cook *et al.*, (2001) en un estudio *in vitro* con *Pagrus auratus*, usando macrófagos de riñón cefálico pre-incubados con un  $\beta$ -glucano comercial (EcoActiva™) y posteriormente inducidos, ya sea con acetato de forbol miristato o LPS, estimuló significativamente la producción del anión superóxido en comparación a la inducción de macrófagos realizada solo con el  $\beta$ -glucano (EcoActiva™). El resultado de este estudio demostró que el  $\beta$ -glucano puede incrementar el reconocimiento de LPS presentes en la pared de bacterias Gram negativas.

El incremento en la producción de aniones superóxido ocurre en varios peces expuestos a LPS (Gutsmann *et al.*, 2001) como fue observado en nuestro trabajo y en diferentes especies, tales como salmón del Atlántico *Salmo salar*, la dorada *Sparus aurata*, trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, lubina europea *Dicentrarchus labrax*, carpa *Cyprinus*

*carpio*, y el pez dorado *Carassius auratus* (Doñate *et al.*, 2007; Goetz *et al.*, 2004; Sarmiento *et al.*, 2004; Saeij *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2002; Engelsma *et al.*, 2001).

La respuesta inmune se ve afectada por numerosos procesos que dependen del hospedero, del medio o del patógeno *per se*. Entre los factores que dependen del hospedero se presentan diferencias en la respuesta inmune humoral y celular que son propios de la especie y que pueden variar entre individuos de una misma población (Penagos *et al.*, 2008). Por lo anterior es un gran reto, conocer y entender los mecanismos de defensa en la protección innata de peces y su posible modulación por el uso de inmunoestimulantes, tales como los  $\beta$ -glucanos.

En este estudio nosotros observamos que los  $\beta$ -glucanos adicionados en la dieta a diferentes concentraciones pueden incrementar la actividad enzimática antioxidante antes y después de la exposición a LPS en juveniles de *Lutjanus peru*.

### **8.3 Análisis transcriptómico de *Lutjanus peru* por un microarreglo heterólogo**

#### **8.3.1 Expresión de genes de peces alimentados con $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1%**

La revolución genómica en las ciencias biológicas ha abierto nuevos campos de investigación y ha permitido innovar estrategias que lleven a incrementar el conocimiento de procesos biológicos básicos (Higgs *et al.*, 2005). La inversión en nuevas tecnologías aplicadas a la acuicultura puede ayudar a incrementar la producción de peces.

Elucidar los cambios en la expresión de genes asociados a procesos biológicos es un problema central en biología. Los avances en biología molecular y bioinformática han llevado al desarrollo de métodos de alto rendimiento para el análisis de la expresión diferencial de genes (Carulli *et al.*, 1998). En este momento la posibilidad de aplicar tecnologías transcriptómicas en acuicultura ha comenzado a convertirse rápidamente en una realidad con el desarrollo de microarreglos y la anotación de genes (Krasnov *et al.*, 2005b; Rise *et al.*, 2004).

El análisis de microarreglos genera grandes cantidades de datos que en su mayoría son cuidadosamente analizados para observar tendencias y características estadísticamente significativas. El estudio del genoma de peces podría aportar importantes características sobre la resistencia innata a enfermedades y proveer nuevos enfoques para mejorar la salud de peces en cultivo (Thorgaard *et al.*, 2002).

En este estudio se utilizó un microarreglo heterólogo (*Mus musculus* & *L. peru*) para realizar el análisis transcriptómico, ya que no hay un chip disponible de nuestra especie de interés. Esta estrategia, de utilizar un microarreglo desarrollado para otras especies ya ha sido realizada con éxito en otros peces (Kassahn *et al.*, 2007).

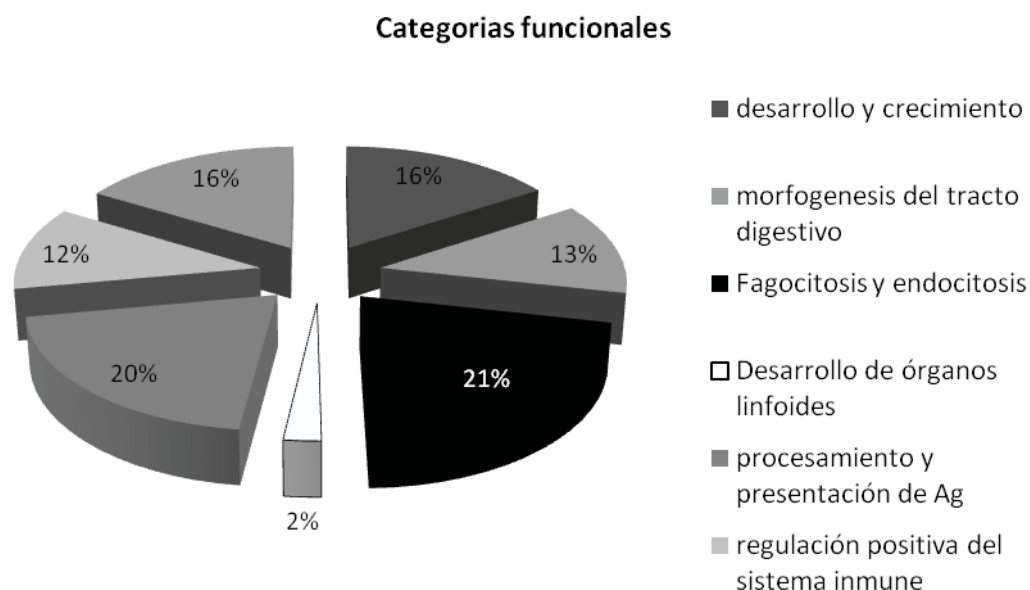
El análisis bioinformático del microarreglo mostró 1527 genes sobre expresados por efecto del  $\beta$ -glucano al 0.1%, de los cuales el 68.69% (1049 genes) fue anotado y examinado. El análisis de anotación clasificó a los genes de acuerdo a su ontología, se identificaron 139 procesos biológicos (Tabla XII), 37 funciones moleculares (Tabla XIV) y se ubicaron en 29 componentes celulares (Tabla XV).

Se encontraron 22 procesos biológicos relacionados al sistema inmune y digestivo (Tabla XIII), al dividirlos de acuerdo a categorías funcionales destacan los procesos de fagocitosis y endocitosis, desarrollo de órganos linfoides, procesamiento y presentación de antígenos, desarrollo y crecimiento y la morfogénesis del tracto digestivo (Fig. 28).

Nuestros resultados concuerdan con diferentes autores, donde mencionan que los  $\beta$ -glucanos son responsables de múltiples acciones relacionadas al sistema inmune (Meena *et al.*, 2012) además de que diversos estudios con polisacáridos no digeribles ha demostrado su efecto sobre el sistema digestivo (Dimitroglou *et al.*, 2011). Los  $\beta$ -glucanos estimulan al sistema inmune y proporcionan resistencia óptima a los posibles agresores de salud debido a su habilidad de unirse directamente con macrófagos y otras células blancas en la sangre (neutrófilos y células NK) activándolas (Gantner *et al.*, 2003; Herre *et al.*, 2004). Los macrófagos son una de las principales tipos celulares involucrados en la inmunidad natural.

Cuando los receptores de los  $\beta$ -glucanos reconocen estas moléculas, todas las funciones inmunes son mejoradas, incluyendo la fagocitosis; así como el procesamiento de antígenos y la expresión de genes (Raa, 2000).

Por otra parte se ha reportado que diferentes polisacáridos no digeribles por el hospedero pueden modular la morfología intestinal en peces (Cerezuela *et al.*, 2012a), modificar las poblaciones benéficas la microbiota presente en el tracto digestivo (Merrieffield *et al.*, 2010a) y con ello incrementar la actividad enzimática digestiva (Xu *et al.*, 2008; Guzmán *et al.* 2013), además la expresión de genes (Rawls *et al.*, 2004).



**Figura 27.** Categorías funcionales de los genes sobre expresados por efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% después de cuatro semanas, de acuerdo al análisis bioinformático utilizando DAVID.

Los métodos de genómica funcional se expanden rápidamente hacia nuevas especies, lo cual es importante para ampliar el conocimiento de la fisiología y la respuesta inmune de peces (Higgs *et al.*, 2005; Koskinen *et al.*, 2004; Scapigliati *et al.*, 2002), dado que uno de los principales problemas en la acuicultura son las mortalidades causadas por

agentes infecciosos (Kiron *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2012), así también la respuesta inicial frente a patógenos es fundamental para la supervivencia y la salud de los organismos en cultivo (Ribas, 2006).

El análisis de genes a través de un microarreglo puede brindar información sobre la resistencia a patógenos o las condiciones adecuadas de bienestar en peces sometidos a cultivo, por lo que es de interés creciente este tipo de investigaciones (Thorgaard *et al.*, 2002).

De acuerdo al análisis bioinformático, nosotros decidimos cuantificar la expresión de los genes *IgM*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IGF* y  *$\alpha$ -Amy*, los cuales fueron sobre-expresados por efecto del  $\beta$ -glucano al 0.1%. Se usaron como genes de referencia a *GADPH* y *EF 1- $\alpha$* . Los genes seleccionados tienen relevante interés biológico y sus procesos contribuyen directamente a funciones del sistema inmune y digestivo. Información referente a estos genes puede ser consultada en el ANEXO D.

El gen de referencia *EF 1- $\alpha$*  está relacionado a la traducción del ADN y el *GADPH* en el metabolismo energético (Bustin, 2002), las citocinas pre-inflamatorias *IL-1 $\beta$*  y el *TNF $\alpha$*  contribuyen a los mecanismos de defensa del hospedador en respuesta a la invasión o colonización bacteriana (Kim y Austin, 2006), *IgM* es el factor humoral más importante en la respuesta adaptativa (Bengtén *et al.*, 2000), *IGF* está involucrado en el desarrollo y crecimiento y  *$\alpha$ -Amy* modula la hidrólisis de carbohidratos (Chen *et al.*, 2011)

Se logró cuantificar la expresión  *$\alpha$ -Amy* y *TNF- $\alpha$*  en diferentes órganos. Se observó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en el gen  *$\alpha$ -Amy* en páncreas y *TNF- $\alpha$*  en riñón cefálico (Fig. 20) por efecto del tratamiento. Esto valida los resultados obtenidos en el microarreglo, ya que el análisis bioinformático mostró a estos genes sobre-expresados.

En relación a la cuantificación de la expresión de estos genes, nuestros resultados concuerdan con diferentes trabajos donde se demuestra que el  $\beta$ -glucano induce la expresión de *TNF- $\alpha$* . La administración oral del  $\beta$ -glucano 1,3 en tilapia *Oreochromis niloticus* durante cinco días estimuló la producción de citocinas como *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-10*,



*IL-12* en plasma de peces (Chansue *et al.*, 2000). Varios autores han reportado la presencia *TNF- $\alpha$*  en peces (Zelinkoff *et al.*, 1990; Ahne, 1993). También, Hardie *et al.*, (1994) ha reportado que el receptor específico de *TNF- $\alpha$*  en linfocitos de la trucha arcoiris tratadas con baños de  $\beta$ -glucanos, a dos diferentes dosis, por 45 min, cuatro veces con un intervalo de una semana, mostró un incremento en la expresión de genes de las citocinas pre-inflamatorias *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y las anti-inflamatorias *IL-10* y *TGF- $\beta$*  en el primer baño. En contra parte, Rodríguez *et al.* (2009) no encuentra diferencias en la expresión de *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos (*S. cerevisiae*) a una concentración de 5 mg ml<sup>-1</sup>, sin embargo observa un efecto significativo sobre la modulación de *c* y la expresión de quimiocinas en riñón.

En cuanto al gen  $\alpha$ -Amy, los reportes relacionados a la expresión y cuantificación de este gen por efecto de glucanos son escasos en peces, además de ser éste el primer trabajo relacionado en el huachinango. Tovar *et al.*, (2004) menciona que el uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* incluida en el alimento de lubina, incrementa la expresión de este gen y lo atribuye a la presencia de  $\beta$ -glucanos presentes en la pared celular de estos microorganismos.

Por otro lado, Cerezuela (2012) al adicionar prebióticos en la dieta de juveniles de dorada, no encuentra diferencias significativas al cuantificar la expresión de este gen, esto lo atribuye al hecho de que solo estudio el intestino anterior.

Existen algunos trabajos relacionados con el uso de oligosacáridos usados como prebióticos, los cuales reportan un incremento en la producción de amilasa. Xu *et al.*, (2009) reporta que *Carassius auratus* alimentada con el prebiótico xilo-oligosacárido tiene efecto sobre la actividad proteasa y amilasa pero no cuantifica los niveles de expresión de los genes de dichas enzimas. En otros estudios no relacionados con peces, como el de Gaggia *et al.* (2010) reporta que en cerdos alimentados con  $\beta$ -glucanos se incrementa la actividad enzimática digestiva amilasa y proteasa.

En este trabajo, el análisis del microarreglo nos mostró un panorama general y una visión integrativa de la respuesta fisiológica/inmunológica de *Lutjanus peru* por efecto del  $\beta$ -glucano al 0.1%, lo cual permitirá ampliar el conocimiento sobre esta especie.

#### **8.4 Experimento II**

En este experimento se evaluó el efecto del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% y/o el probiótico Pdp 11 (*Shewanella putrefaciens*) adicionados en la dieta de *Sparus aurata* sobre el crecimiento, la expresión de genes y diferentes parámetros del sistema inmune.

Se ha reportado el efecto del  $\beta$ -glucano sobre el crecimiento y el sistema inmune en diferentes especies de peces, además de que tiene gran potencial para ser usado como prebiótico (Meena *et al.*, 2012).

Por otra parte, entre los posibles mecanismos de acción de los probióticos se encuentran: la competencia por nutrientes y la energía disponible (Gram *et al.*, 1999) o por los puntos de adhesión a la superficie del huésped (Olsson *et al.*, 1992; Nikoskelainen *et al.*, 2001; Chabrillón, 2004; Ringo *et al.*, 2010), la estimulación de la respuesta inmune (Irianto y Austin, 2003; Salinas *et al.*, 2005; Balcázar *et al.*, 2006), la mejora del estado nutricional del huésped mediante el aporte de enzimas, aminoácidos esenciales, péptidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc. (Sugita *et al.*, 1996; de Moura *et al.*, 2009) y la inhibición de la expresión de genes de virulencia ó ruptura del “quorum sensing” (Defoirdt *et al.*, 2007).

##### **8.4.1 Crecimiento**

Los resultados mostraron que la administración del  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 solo y en combinación con el probiótico Pdp 11 incrementan el crecimiento significativamente ( $P < 0.05$ ), en función del aumento en peso (Tabla XVI) seguida de la dieta con Pdp 11 y finalmente el tratamiento control.

Estos resultados concuerdan con diferentes trabajos. Rodregeuz *et al.* (2007) menciona que el  $\beta$ -glucano ha mostrado un efecto positivo sobre el crecimiento, la supervivencia y la respuesta inmune de diferentes especies de peces contra patógenos infecciosos solo o en combinación con otros inmunoestimulantes o probióticos.

(Ortuño *et al.*, 2002) reporta que los glucanos presentes en levaduras, tienen la capacidad de aumentar la respuesta inmune y el crecimiento (Lara-Flores *et al.*, 2002).

En otro estudio, el  $\beta$ -glucano 1,3 fue suplementado en la dieta de *Paralichthys olivaceus* para mostrar el efecto de los aditivos en el alimento, concluyen que el óptimo nivel de  $\beta$ -glucano 1,3 podría ser aproximadamente 0.1% lo cual propicia un incremento del crecimiento y supervivencia (Yoo *et al.*, 2007).

En cuanto a al efecto de Pdp 11, se tiene informes que este probiótico administrado en la dieta del lenguado senegalés, propicia un incremento en el crecimiento significativamente mayor, al evaluar el SGR (García de la Banda *et al.*, 2012, 2011). Díaz-Rosales *et al.* (2009) utilizando este mismo probiótico a una dosis de  $10^9$  ufc  $g^{-1}$  también observa un incremento en el crecimiento de esta misma especie y de la dorada.

Pdp 11 bioencapsulado en rotífero o Artemia promueve un mayor crecimiento y calidad a nivel larvario, así como la deshabitación alimenticia en lenguado senegalés (Lobo *et al.*, 2010).

En un nuestro trabajo, el crecimiento de los peces alimentados con las dietas adicionadas con  $\beta$ -glucano y  $\beta$ -glucano + Pdp 11 fueron las que presentaron el mayor crecimiento, entre ellas fueron iguales estadísticamente, seguidas de la dieta Pdp 11 (solo) y finalmente el grupo control.

El incremento en el crecimiento por efecto del probiótico Pdp 11 concuerda con estudios similares, con el empleo de otras especies de probióticos en peces marinos (De Schrijver y Ollevier, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Tovar-Ramírez *et al.*, 2002; Carnevali *et al.*, 2006) y de agua dulce (Ghosh *et al.*, 2007; Aly *et al.*, 2008b).

Una posible explicación de esta mejora en el crecimiento podría ser a que los probióticos producen o estimulan enzimas digestivas (Buts *et al.*, 1999; El-Haroun *et al.*, 2006), que favorecen la utilización del alimento (De Schrijver y Ollevier, 2000).

Saenz de Rodrigañez *et al.* (2009) añadiendo la misma dosis de Pdp11 liofilizado, detectaron un efecto estimulador de la enzima leucina aminopeptidasa en el intestino distal en juveniles de lenguado senegalés en cultivo. Trabajos similares con aporte probiótico en la dieta han descrito el incremento de la digestibilidad aparente (Lin *et al.*, 2004) y la estimulación de la actividad enzimática de la membrana del borde de cepillo de los enterocitos en larvas de lubina y en alevines de trucha arcoiris (Tovar-Ramírez *et al.*, 2002; Waché *et al.*, 2006).

Otras investigaciones reportan que los probióticos modulan la microbiota y la histología del tracto digestivo lo que contribuye a una mejor nutrición del huésped (Merrifield *et al.*, 2010a; Cerezuela *et al.*, 2012a). Además se ha observado que los probióticos ensayados *in vitro* son capaces de producir una mejora en la histología de los enterocitos de salmón (Ringo *et al.*, 2010; Salinas *et al.*, 2008a), ayudando en los procesos de absorción y de eficiencia digestiva. De este modo, algunos aditivos y probióticos contribuyen a una mayor digestibilidad y aprovechamiento nutritivo de la dieta (Lin *et al.*, 2004).

Por otra parte, existen diferentes estudios que reportan un incremento en el crecimiento en peces por efecto de los  $\beta$ - glucanos (Meena *et al.*, 2012), además en este mismo trabajo de tesis se reportó que el  $\beta$ -glucano 1,3/ 1,6 adicionado en la dieta incrementa la actividad enzimática digestiva y el crecimiento del huachinango (Guzmán *et al.*, 2013).

### **8.5 Parámetros inmunológicos**

La respuesta inmune innata en los peces es más importante que la observada en otros grupos animales (Magnadóttir, 2006). Una vez detectado un patógeno bacteriano es fagocitado, digerido y destruido en el interior de las células mediante el estallido

respiratorio (Secombes, 1996) o mediante acción enzimática, o de otras sustancias antimicrobianas (Neumann *et al.*, 2001). También, los macrófagos son capaces de producir lisozimas, que pueden ser estimuladas por lipopolisacáridos bacterianos o por  $\beta$ -glucanos presentes en los hongos (Paulsen *et al.*, 2001).

Además, se ha observado que la adición de probióticos en dieta estimula el sistema inmune innato y adaptativo de los peces (Nikoskelainen *et al.*, 2001, 2003; Balcázar *et al.*, 2006a, b; Kim y Austin, 2006; Panigrahi *et al.*, 2007; Brunt *et al.*, 2008, Pieters *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010a, b).

Irianto y Austin (2002), describen un incremento de parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocitos y macrófagos y aumento de la actividad lisozima de salmón del Atlántico, trucha arco-iris y rodaballo alimentados con diferentes probióticos.

En este experimento se evaluaron diferentes parámetros inmunitarios humorales y celulares de doradas alimentadas con diferentes dietas durante una, dos y cuatro semanas de tratamiento.

### **8.5.1 Fagocitosis y actividad peroxidasa**

En el presente estudio, se encontró que la actividad peroxidasa en leucocitos de riñón cefálico incrementó significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 con respecto al grupo control (Fig. 21). En contraste, la actividad peroxidasa en suero disminuyó significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con Pdp 11 y  $\beta$ -glucanos + Pdp11 con respecto al grupo control (Fig. 22).

El decremento de la actividad peroxidasa en suero concuerda con otros trabajos. (Rodríguez *et al.*, 2003), realizó un ensayo con la dorada *Sparus aurata* L., las cuales fueron alimentadas con 0 y 10 g de levaduras del pan vivas silvestres o levaduras mutantes cepa fks-1 por  $\text{kg}^{-1}$  durante 2, 4 y 6 semanas, mostrando un decremento en la actividad peroxidasa en suero después de seis semanas, aunque la fagocitosis fue incrementada significativamente durante todo el tiempo, pero solo con la cepa fks-1 suplementada en la dieta.

La actividad fagocítica es un aspecto clave de la inmunidad innata, y forma parte de la primera línea de defensa celular. Diversos inmunoestimulantes han mostrado ser capaces de incrementar esta actividad en peces (Dügenci, 2003; Amar *et al.*, 2004).

Nosotros observamos que la capacidad fagocítica incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) en la semana dos en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 y en la semana cuatro en los alimentados con  $\beta$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 en comparación al grupo control (Fig. 23a). La habilidad fagocítica incrementó significativamente en la semana cuatro en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 en relación al grupo control (Fig. 23b).

Diferentes estudios con  $\beta$ -glucanos destacan su efecto sobre el incremento de la fagocitosis, debido a que son reconocidos por células macrófagas estimulándolas y activándolas (Meena *et al.*, 2012). Por otra parte diferentes probióticos han demostrado el incremento de la fagocitosis en diferentes especies (Salinas *et al.*, 2005; Geng *et al.*, 2011).

El efecto de Pdp11 inactivado por calor, produce un aumento significativo en la capacidad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico en la dorada *S. aurata* (Díaz-Rosales, 2006). Sin embargo, esta misma cepa, inactivada por calor, no promueve *in vitro* un aumento significativo en los parámetros de la respuesta inmune innata, tales como son el contenido de la leucocito peroxidasa y del estallido respiratorio de los leucocitos del riñón cefálico en esta especie (Salinas *et al.*, 2006).

En relación a los estudios con simbióticos; Geng *et al.* (2011) estudiaron el efecto del probiótico *B. subtilis* y el quitosán solos y en combinación de ambos, encontrando que juntos ejerce un efecto estimulante sobre la fagocitosis de cobia, mayor que el observado con quitosán solo; lo que también concuerda con nuestros resultados.

Sin embargo, Cerezuela *et al.* (2012b) al probar inulina y *B. subtilis* adicionadas en la dieta de dorada, no observa una potenciación de la fagocitosis, este autor propone que la administración combinada de estos aditivos (probiótico-prebiótico) anula el efecto observado con la administración individual. En este estudio se reporta que los niveles de las

respuestas inmunitarias decrecieron con el tiempo, sugiriendo una respuesta rápida a la dieta, fenómeno que concuerda con otras investigaciones previas (Sharifuzzaman y Austin, 2010).

### **8.5.2 Niveles totales de IgM en suero**

La respuesta adaptativa en los peces puede llevar más de 15 días en manifestarse (Kollner y Kotterba, 2002). Existen numerosos factores humorales implicados en la activación de componentes clave en esta respuesta como son las citocinas. Sin embargo, el factor humoral más importante en la respuesta adaptativa son las inmunoglobulinas, producidas por los linfocitos B. En teleósteos el principal anticuerpo reportado es la IgM, producida en el suero (Bengtén *et al.*, 2000), aunque también existen otras inmunoglobulinas (Hirono *et al.*, 2003).

La IgM de peces puede estar presente en el suero en concentraciones relativamente altas, donde actúan como anticuerpos naturales, reflejando el estado del sistema inmunitario sin exponer al animal a un antígeno específico, y proporcionando protección instantánea contra patógenos de una amplia especificidad (Cuesta *et al.*, 2004; Magnadóttir, 2010).

Nuestros resultados muestran que los niveles totales de IgM en suero presentan un incremento significativo en la semana dos, en los peces alimentados con solo Pdp 11 pero un descenso ( $P < 0.05$ ) en combinación del Pdp 11 con el  $\beta$ -glucano. Además disminuye significativamente en la semana cuatro en comparación al control (Fig. 24).

Nuestros resultados confirman observaciones realizadas en estudios previos, donde se dice que los niveles de IgM son susceptibles a la inmunomodulación por un amplio rango de productos (Nikoskelainen, 2003; Cuesta *et al.*, 2004; Panigrahi *et al.*, 2004), siendo estimulados también por la administración de las dietas del presente estudio.

En relación al probiótico, García de la Banda *et al.* (2012) tras la adición durante dos meses de Pdp11 fresco y liofilizado en la dieta, no registró diferencias estadísticas en los niveles de inmunoglobulinas totales en suero de juveniles de lenguado.

Por el contrario, Pichiatti *et al.* (2007) observó un aumento de células Ig<sup>+</sup> y granulocitos acidófilos en el tubo digestivo de doradas con una alimentación temprana suplementada con *L. fructivorans* y *L. plantarum*.

Los resultados observados en el presente trabajo sugieren una respuesta rápida y una posterior adaptación al estímulo, que se refleja en la recuperación de la actividad a los niveles normales o incluso en el descenso. Esto concuerda con lo reportado por Cerezuela (2012) y Cerezuela *et al.* (2012b), donde menciona que esto puede deberse a la extenuación de las células tras una exposición continua y relativamente prolongada, aunque serían necesarios más estudios para constatar esta hipótesis.

### **8.5.3 Actividad antiproteasa**

En este trabajo, la actividad antiproteasa aumentó significativamente en peces alimentados con  $\beta$ -glucanos + Pdp 11 (Fig. 25), aunque los otros tratamientos fueron similares al grupo control, lo que concuerda con diferentes estudios donde no se han observado diferencias por el efecto de probióticos sobre este parámetro.

García de la Banda *et al.* (2010; 2011) no encontró diferencias significativas en la actividad antiproteasa en suero de juveniles de lenguado senegalés alimentados con Pdp11 fresco. Al igual que Brunt *et al.* (2007) en truchas arcoiris que fueron alimentadas con los probióticos *Bacillus* sp. o *Aeromonas sobria* aunque estas cepas promovieron la resistencia ante diversos patógenos de este pez

Estudios previos realizados con el probiótico Pdp11 demostraron que su efecto sobre el sistema inmune, depende de su modo de adición fresco o inactivado (Salinas *et al.*, 2005; Díaz-Rosales, 2006).

### **8.6 Expresión de genes**

El interferón se ha identificado asociado a la respuesta humoral innata en peces Secombes, 1996), La citocina pre-inflamatorias IL-1 contribuye a los mecanismos de defensa del hospedador en respuesta a la invasión o colonización bacteriana (Kim y Austin, 2006).

La expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario ha sido evaluada en diversos estudios como indicador de las propiedades inmunoestimulantes de diversos



factores. Los polisacáridos de plantas (Yuan *et al.*, 2008) o incluso polisacáridos sulfatados de algas marinas (Leiro *et al.*, 2007) son capaces de inducir la expresión de genes inmunitarios en diferentes especies.

Lo anterior, coincide con nuestros resultados, ya que se observó un incremento ( $P < 0.05$ ) en los niveles de expresión relativa del gen *IL-1 $\beta$* , en la semana cuatro en peces alimentados con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1%.

Este efecto puede deberse a que cuando los receptores de los  $\beta$ -glucanos reconocen estas moléculas, todas las funciones inmunes son mejoradas, incluyendo la fagocitosis, ocurriendo la liberación de ciertas citocinas como IL-1, IL-6, e interferones (Raa, 2000).

Por otro lado, existe la probable modificación de la microbiota intestinal por efecto de este polisacárido (Merrifield *et al.*, 2010a). Se ha demostrado que la microbiota intestinal está implicada en la regulación de la expresión de numerosos genes en el tracto digestivo que están involucrados tanto en el control de la proliferación del epitelio, como en el metabolismo de los nutrientes y en la respuesta inmune innata (Rawls *et al.*, 2004).

Por el contrario, en otros estudios, una dosis mínima (100 mg  $\beta$ -glucano y 10 mg LPS) por pez, tuvo un incremento significativo en el conteo total en sangre de leucocitos neutrófilos, monocitos y en la actividad del anión superóxido. Sin embargo, ni la dosis ni la vía de administración de los componentes tuvo un efecto significativo sobre el incremento de la expresión del ARNm de *IL-1 $\beta$*  (Selvaraj *et al.*, 2006).

Nosotros observamos un decremento de la expresión de *IgM* en la semana uno ( $\beta$ -glucano y  $\beta$ -glucano + Pdp 11) y en la semana cuatro no encontramos un incremento en la expresión de los genes *IFN- $\gamma$*  e *IgM* por efecto del probiótico Pdp 11, a diferencia de otros reportes con probióticos (Pirarat *et al.*, 2011), incluyendo la expresión de las citocinas pre-inflamatorias en la dorada (Cerezuela, 2012) y en trucha arcoiris (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011).

En esta investigación, el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta puede incrementar la expresión del gen *IL-1 $\beta$*  en la dorada.

## 9. CONCLUSIONES

### Experimento I

1. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en dieta al 0.1 y 0.2 % incrementa el crecimiento, así como la actividad enzimática digestiva esterasa, tripsina, quimiotripsina y aminopeptidasa en juveniles de *Lutjanus peru*.
2. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en dieta al 0.1 % incrementa la actividad enzimática antioxidante SOD de *Lutjanus peru*.
3. Los LPS de *E. coli* ( $3\text{mg Kg}^{-1}$ ) no tienen efectos sobre la concentración de hemoglobina en el huachinango.
4. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en dieta al 0.1 % incrementa la concentración de proteínas plasmáticas y la actividad SOD, a las 72 h después de la exposición a LPS en *Lutjanus peru*.
5. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 adicionado en la dieta al 0.1 y 0.2 % incrementa la actividad CAT, a las 72 h después de la exposición a LPS en *Lutjanus peru*.
6. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado a la dieta incrementa el nivel de expresión relativa del gen TNF- $\alpha$  en riñón cefálico y el gen  $\alpha$ -Amilasa en intestino de *Lutjanus peru*

### Experimento II

1. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado en la dieta incrementa el crecimiento, la actividad fagocítica y la expresión relativa del gen IL-1 $\beta$  en riñón cefálico en juveniles de *Sparus aurata*.
2. El probiótico Pdp 11 incrementa el crecimiento en juveniles de *Sparus aurata*.
3. El Pdp 11 adicionado en la dieta incrementa los niveles totales de IgM en suero en la semana dos y disminuye en la cuatro, en juveniles de dorada.
4. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 en combinación con el probiótico Pdp 11 adicionados en la dieta incrementan el crecimiento, la actividad antiproteasa, peroxidasa y la actividad fagocítica en leucocitos de riñón cefálico en juveniles de *Sparus aurata*.

## 9.1 Conclusiones generales

1. El  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 al 0.1% adicionado a la dieta modula la respuesta inmune incrementando la actividad de enzimas antioxidantes antes y después de la exposición a LPS, además incrementa los niveles de expresión de los genes TNF- $\alpha$  y  $\alpha$ -Amilasa, así como el crecimiento y la producción de enzimas digestivas en *Lutjanus peru*, por lo tanto el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 tiene gran potencial para ser usado en el cultivo de peces.
2. El análisis del transcriptoma nos mostró un panorama general y una visión integrativa de la respuesta fisiológica/inmunológica de *Lutjanus peru* por efecto del  $\beta$ -glucano al 0.1%, lo cual permitirá ampliar el conocimiento sobre esta especie.
3. El probiótico Pdp 11 adicionado en la dieta a una concentración de  $10^9$  ufc g<sup>-1</sup> solo o en combinación con el  $\beta$ -glucano 1,3/1,6 es una opción viable para mejorar el cultivo de *Sparus aurata* ya que incrementan el crecimiento y diferentes parámetros inmunológicos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aakre, R., H. Wergeland, P. Aasjord, C. Endresen. 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon *Salmo salar* L. to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing  $\beta$ -1,3-M-glucan as adjuvant. *Fish Shellfish Immunol.* 4:47-61.
- Aderem, A., R. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 406:782-7.
- Ahne, W. 1993. Presence of interleukins (IL-1, IL-3, IL-6) and the tumor necrosis factor (TNF  $\alpha$ ) in fish. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 13:106–107
- Ai, Q., K. Mai, L. Zhang, B. Tan, W. Zhang, W. Xu. 2007. Effects of dietary  $\beta$  -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* 22:394-402.
- Ainsworth, A. 1994. A  $\beta$ -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet. Immunol Immunopathol.* 41:141-152.
- Allen, G. 1985. FAO Species Catalogue. Vol. 6. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. *FAO Fish.Synop.*125(6):208.
- Allen, G.R. 1987. Synopsis of the cicutropical fish genus *Lutjanus Lutjanidae*. En: J.J. Polovina y S. Ralston (eds.), *Tropical Snappers and Groupers: Biology and Fisheries Management*. Westview Press, Boulder, Colorado 33–87 pp.
- Allen, G.R., D.R. Robertson. 1994. *Fishes of the Tropical Eastern Pacific*. Univ. Hawaii Press, Honolulu. 332p.
- Aly, S.M., M. Fathi, G. John. 2008b. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oerochromis niloticus*). *Aquacult Res.* 39:647-656.
- Amar, E. C., V. Kiron, S. Satoh, T. Watanabe. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellfish Immunol* 16:527–537.
- Anon, A. 1995. More tsipoura on our table. *Foods and Drinks* 179:71-72.
- Aoki, A., H. Hirono, H. Kondo, J. Hikima, T. Sung-Jung. 2011. Microarray technology is an effective tool for identifying genes related to the aquacultural improvement of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics.*6:39–43.
- Bagni, M., N. Romano, M.G. Finoia, L. Abelli, G. Scapigliati, P.G. Tiscar, M. Sarti, G. Marino. 2005. Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.*18:311-325.
- Balcázar, J.L., I.D. Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, J.L. Múzquiz. 2006a. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.*114:173-786.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I.D. Blas, I. Ruíz-Zarzuela, O. Gironés, J.L. Múzquiz. 2006b. Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using a radiolabelling assay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29:335-343.

- Bar-Or, C., M. Bar-Eyal, T.Z. Gal, Y. Kapulnik, H. Czosnek, H. Koltai. 2006. Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results. *BMC Genomics*. 7:110.
- Bayne, C.J., S. Levy. 1991. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrop hormone and catecholamines: mechanisms of action. *J. Leukocyte Biol.* 50:554-560.
- Beauchamp, C., I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 44:276-287.
- Bengten, E., M. Wilson, N. Miller, L.W. Clem, L. Pilstrom, G.W. Warr. 2000. Immunoglobulin isotypes: structure, function and genetics. *Curr Top Microbiol Immunol.* 248:189-219.
- Berczi, I., L. Bertok, T. Bereznai. 1966. Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can J Microbiol.* 12:1070-1071.
- Berg, A., Ø. Bergh, P. Fjelldal, T. Hansen, J. Juell, A. Nerland. 2006. Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fiskdeffekter og bivirkninger. [Animal welfare and fish vaccination deffects and side-effects]. *Fisk Havet.* 9:1-43.
- Bertrand, S., F. Criscuolo, B. Faivre, G. Sorci, V.B. Braulio, G.A.M. Ten Have, M. Vissers, Y.L.J Deutz. 2006. Immune activation increases susceptibility to oxidative tissue damage in Zebra Finches. *Funct Ecol.* 20:1022–1027.
- Beutler, B., A. Cerami. 1989. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 7:625-55.
- Blazer, V. 1991. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *J Aquat Anim Health.* 3:77-86.
- Blinkova, L.P., O.B. Gorobets, A.P. Baturu. 2001. Biological activity of *Spirulina platensis*. *Zh Mikrobiol, Epidemiol Immunobiol.* 2:114-118.
- Boehringer. 1975. *Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik*. Laboratory manual of Boehringer Company, Mannheim.
- Bouwmeester, T., A. Bauch, H. Ruffner, P.O. Angrand, G. Bergamini, K. Croughton, C. Cruciat, D. Eberhard, J. Gagneur, S. Ghidelli, C. Hopf, B. Huhse, R. Manfano, A.M. Mihon, M. Schiele, J. Schelgl, M. Schwab, M.A. Stein, A. Bauer, G. Casari, G. Drewes, A.C. Gavin, D.B. Jacson, G. Joberty, G. Neubauer, J. Rick, B. Kuster, G. Superti-Furga. 2004. A physical and functional map of the human TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6(2):97-105.
- Bradford, M. 1976. A rapid a sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bricknell, I., R. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19:457-472.
- Brock, J.A., B. Leamaster. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. En: Wyban j. (ed.). *Proceedings of the special session on shrimp farming*. World Aquac Soc USA. 212-226pp.
- Brubacher, J. L., C.J. Secombes, J. Zou, N.C. Bols. 2000. Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol.* 24(6-7):565-74.

- Brunet, L.R. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol.* 1:1457–1467.
- Brunt, J., R. Hansen, D.J. Jamieson, B. Austin. 2008. Proteomic analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum serum after administration of probiotics in diets. *Vet Immunol Immunopathol.* 121:199-205.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of  $\mu$ RNA using real-time reverse transcription PCR-(RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1):23-39.
- Cáceres, B., T. Masumoto, V. Galindo, H. Hosokawa. 2004. Efecto del levamisol mediante administración oral en la actividad de la respuesta inmune innata en juveniles de lenguado Japonés *Paralichthys olivaceus*. En: Comunicación Científica CIVA 2004. (<http://www.civa2004.org>). 625-634p.
- Caggiano, M. 2000. Quality in harvesting and post-harvesting procedures - influence on quality. Fish freshness and quality assessment for seabass and seabream. Global quality assessment in Mediterranean aquaculture Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, Cahiers Options Méditerranéennes 51:149. <http://www.ciheam.org>
- Carnevali, O., L. de Vivo, R. Sulpizio, G. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi, A. Cresci. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles *Dicentrarchus labrax*, L., with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258:430-438.
- Carulli, J.P., M. Artinger, P.M. Swain, C.D. Root, L. Ghee, C. Tulig, J. Guerin, M. Osborne, G. Stein, J. Lian, P.T. Lomedico. 1998. High throughput analysis of differential gene expression. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:286-96.
- Castro, R., N. Couso, A. Obach, J. Lamas. 1999. Effect of different  $\beta$ -glucans on the respiratory burst of turbot *Psetta maxima* and gilthead seabream *Sparus aurata* phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9:529-541.
- Cerezuela, R.C. 2012. Nuevos probióticos y prebióticos para dorada *Sparus aurata* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia, España. 222pp.
- Cerezuela, R., F.A. Guardiola, J. Meseguer, M.A. Esteban. 2012b. Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream *Sparus aurata* L. did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish Shellfish Immunol.* 32:1032–1040.
- Cerezuela, R., M. Fumanal, S.T. Tapia-Paniagua, J. Meseguer, M.A. Moriñigo, M.A. Esteban. 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. specimens. *Brit J Nutr.* 34(5): 1063-1070.
- Chabrilón, M. 2004. Estudio de la interacción de patógenos piscícolas y potenciales bacterias probióticas con las superficies mucosas de dorada *Sparus aurata* L. Tesis. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. 224pp.
- Chakravorty, D., M. Hensel. 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microb Infect.* 5:621–627.
- Chen, G., D.V. Goedel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 296 (5573):1634-1635.
- Chen, J., R. Seviour. 2007. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol Res.* 111:635-652.

- Clem, L.W., R.C. Sizemore, C.F. Ellsaesser, N.W. Miller. 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev Comp Immunol.* 9:803–809.
- Coleman, J.W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 1(8):1397–1406.
- Conceicao, L., J. Skjermo, G. Skjak-Braek, J. Verreth. 2001. Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae. *Fish Physiol Biochem.* 24: 207-212.
- Conroy, D.A. 1984. Agents: Bacteria. En: O. Kinne (Edit.), *Diseases of Marine Animals I*, 4, Biol. Asalt Helgol., Hamburgo, R.F.A.48-88pp.
- Consejería de Agricultura y Pesca. 2001. *Especies de Interés Pesquero en el Litoral de Andalucía*. Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Sevilla.
- Couso, N., R. Castro, B. Magariños, A. Obach, J. Lamas. 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture.* 219: 99-109.
- Cook M. T., P.J. Hayball, W. Hutchinson, B. Nowak, J.D. Hayball. 2001. The efficacy of a commercial b-glucan preparation, EcoActiva™, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper *Pagrus auratus*, Sparidae. *Fish Shellfish Immunol.* 1(8):661–672.
- Cook, M., P. Hayball, W. Hutchinson, B. Nowak, J. Hayball. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and growth rate of snapper *Pagrus auratus* Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. *Fish Shellfish Immunol.* 14:333-345.
- Cruz, E. y R. Mendoza. 2000. *Principios de Nutrición*. Madrid, España. Disponible en Internet, <http://www.principiosnutricion.com.ar>.
- Czene, S., M. Tiback, M. Harms-Ringdahl. 1997. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J.* 15:337-341.
- Cuesta, A, M.A. Esteban, J. Meseguer. 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream *Sparus aurata* L. specimens. *Vet. Immunol Immunopathol.* 101:203-210.
- Dalmo, R.A., R. Seljelid. 1995. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulfated laminaran [(1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro. *J Fish Dis.* 18:175–185.
- Dalmo, R., Ingebrigtsen, K., Bøgwald, J. 1997. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis* 20:241-273.
- Dalmo, R., J.J. Bøgwald. 2008.  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies *Fish Shellfish Immunol.* 25:384-396.
- Danilova, N., J. Bussmann, K. Jekosch, L.A. Steiner. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol.* 6:295–302.
- Dautigny, A., E.M. Prager, D. Pham-Dinh, J. Jolles, F. Pakdel, B. Grinde, P. Jolles. 1991. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *J Mol Evol.* 32:187–198.



- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) v6.7. 2012. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
- Dennehy, K., G. Brown. 2007. The role of the  $\beta$ -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukocyte Biol.*82:253-258.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.*25:472-479.
- De Moura, R.S., E.D.O.S. Saliba, F.Q. de Almeida, A.M.Q. Lana, V.P. Silva, A.S.C. de Rezende. 2009. Feed efficiency in Mangalarga Marchador foals fed diet supplemented with probiotics or phytase. *Eficiencia alimentar de potros da raza Mangalarga Marchador alimentados com dieta suplementada com probióticos ou fitase. R Bras Zootec.* 38(6):1045-1050.
- DeRise, J. L., V.R. Iyer. 1999. Genomics and array technology. *Curr Opin Oncol.* 11:76–79.
- De Schrijver, R., F. Ollevier. 2000. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture.* 186:107-116.
- De Vrese, M., J. Schrezenmeir. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng/Biotechnol.* 111:1–66.
- Díaz-Rosales, P., S. Arijo, M. Chabrilón, F.J. Alarcón, S.T. Tapia-Paniagua, E. Martínez-Manzanares, M.C. Balebona, M.A. Moriño. 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole *Solea senegalensis*, *Kaup* phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture.* 293:16-21.
- Díaz-Rosales, P., A. Burmeister, J. Aguilera, N. Korbee, M.A. Moriño, F.L. Figueroa, M. Chabrilón, S. Arijo, U. Lindequist, M.C. Balebona. 2005. Screening of algal extracts as potential stimulants of chemotaxis and respiratory burst activity of phagocytes from sole *Solea senegalensis*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 25:321-331.
- Díaz-Rosales, P., M. Chabrilón, S. Arijo, E. Martínez-Manzanares, M.A. Moriño, M.C. Balebona. 2006. Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *J Fish Dis.*29:355-364.
- Dostert, C., J. Tschopp. 2007. Detecting fungal pathogens. *Nat Immunol.* 8:17-18.
- Dügenci, S. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J Ethnopharmacol.*88:99–106.
- Duncan, P., R. Lovell. 1994. Influence of vitamin C on the folate requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, for growth, hematopoiesis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture.*127:233-244.
- El-Haroun, E.R., A.M.A.S. Goda, M.A. Kabir Chowdhury. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquacult Res.* 37:1473-1480.
- Ellertsen, L., G. Hetland, E. Johnson, B. Grinde. 2006. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. *Int Immunopharmacol.* 6:133-43.



- Ellis, A.E. 1998. Fish immune system. En: P.J. Delves, I.M., Roitt (Eds).Encyclopedia of Immunology. Academic Press,London 920-926 pp.
- Ellis, A. 2001. Innate host defense mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol.*25:827-839.
- Engstad, R.E., B.Robertsen, E. Frivold. 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 2:287–297.
- Engstad, R., B. Robertsen. 1994. Specificity of a  $\beta$ -glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon *Salmo salar L.**Dev Comp Immunol.*18:397-408.
- Esteban, M, V. Mulero, J. Muñoz, J. Meseguer. 1998. Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream *Sparus aurata L.* by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Tissue Res.*293:133-41.
- Ewart, K., J. Williams, R. Richards, J. Gallant, K. Melville, S. Douglas. 2008. The early response of Atlantic salmon *Salmo salar* macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Dev Comp Immunol.*32:380-390.
- FAO. 2006. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical.
- FAO. 2007. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2006.
- Firmansyah, A., P.G. Dwipoerwantoro, M. Kadim, S. Alatas, N.Conus, L. Lestarina, F. Bouisset, P. Steenhout. 2011. Improved growth of toddlers fed a milk containing synbiotics. *Asia Pac J Clin Nutr.* 20:69–76.
- Fletcher, T.C., A. White. 1973. Lysozyme activity in plaice *Pleuronectes platessa L.* *Experientia.* 29:1283–1285.
- Föngse, R., G.Lundblad, J.Lind. 1976. Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar Biol,* 36:277–282.
- Fredrickson, J.K., J.M. Zachara, D.W.Kennedy, H. Dong, T.C. Onstott, N.W. Hinman, S. Li. 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim Cosmochim Ac.*62: 3239–3257. Bibcode:1998GeCoA. 62.3239F. doi:10.1016/S0016-7037(98)00243-9.
- Galán, V. 2004. Prebióticos y Probióticos: Bacterias Saludables. D. Salud. Disponible en Internet, [http://www.dsalud.com/alimentacion\\_numero57.htm](http://www.dsalud.com/alimentacion_numero57.htm).
- Galindo-Villegas, J., H. Hosokawa. 2005. Immunostimulants in marine fish diets. *Int Aqua Feed.* 8:30-39.
- Gantner B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S.Akira, D.M. Underhill.2003.Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2.*J Exp Med.* 197:1107–1117.
- Garcia-Castillo, J., P. Pelegrin, V. Mulero, J.Meseguer. 2002 Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor  $\alpha$  from a marine fish reveal it's constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics.* 54(3):200-207.
- García de la Banda, I., C. Lobo, I. Martín, M.A. Moríñigo, S. Arijo, J.M. León-Rubio, S: Tapia-Paniagua, M. Chabrilón, G.Pazos, F.Linares, X. Moreno-Ventas, J.C. Canteras. 2008. Pdp11 probiotic use on *Solea senegalensis* (Kaup) larval and postlarval culture. IV International Sole Workshop, November 14-17 Faro (Portugal).

- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J. M., Tapia-Paniagua, S., Moriñigo, M. A., García-Millán, I., Arijo, S., Arce, F., Nicolás, M., Pazos, G., Moreno-Ventas, X. 2009. Administración de dos probióticos relacionados (Pdp11 y Pdp13) en preengorde de lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). In XII Spanish Aquaculture Society Meeting, November. Pp. 24-26, Madrid (Spain).
- García de La Banda, I., C. Lobo, J.M. León-Rubio, S.T. Tapia-Paniagua, M. Balebona, M.A. Moriñigo, X. Moreno-Ventas, L.M. Lucas, F. Linares, F. Arce, S. Arijo. 2010. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole *Solea senegalensis*, Kaup 1858 performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*. 306:281-288
- García de la Banda, G. I. 2011. Efecto de la adición de dos probióticos *Shewanella utrefaciens* y *Shewanella baltica* en el engorde del lenguado senegalés *Solea senegalensis senegalensis* Kaup, 1858). Tesis de Doctorado. Universidad de Malaga, España. 208pp.
- García de La Banda, I., C. Lobo, M. Chabrilón, J.M. León-Rubio, S. Arijo, G. Pazos, L.M. Lucas, M.A. Moriñigo. 2012. Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on Senegalese sole *Solea senegalensis*, (Kaup, 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquacult Res*. 43(5):662-669.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147-165.
- Geng, X., X.H. Dong, B.P. Tan, Q.H. Yang, S.Y. Chi, H.Y. Liu, X.Q. Liu. 2011. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol*. 31:400–406.
- Geordanis, M., I. Gardner, R. Hedrick. 2001. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev Vet Med*.48:287-302.
- Ghosh, S., A. Sinha, C. Sahu. 2007. Dietary probiotic supplementation in growth and health live-bearing ornamental fishes. *Aquacult Nutr*.14:289-299.
- Gibson, G.R, M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 125:1401–1412. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031
- Gildberg, A., A. Johansen, J. Bøgwald. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon *Salmo salar* fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*.138:23-34.
- Goetz, F.W., D.B. Iliev, L.A. McAuley, C.Q. Liarte, L.B. Tort, J.V. Planas, S. Mackenzie. 2004. Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages. *Mol Immunol*. 41(12):1199-1210.
- Grasman, K.A., M. Armstrong, D.L. Hammersley, P.F.Scanlon, G.A. Fox. 2000. Geographic variation in blood plasma protein concentrations of young herring gulls *Larus argentatus* and Caspian terns *Sterna caspia* from the Great Lakes and Lake Winnipeg. *Comp. Biochem Physiol., Part C: Pharmacol, Toxicol Endocrinol* 125:365-375.
- Gunimaladevi, I., R. Savan, M. Sakai. 2006. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish. *Fish Shellfish Immunol*. 21:393-403.

- Gupta, S. 2002. A decision between life and death during TNF- $\alpha$ -induced signaling. *J Clin Immunol.* 22(4):185-194.
- Guzmán-Villanueva, L.T., F. Ascencio-Valle, M.E. Macías-Rodríguez, D. Tovar-Ramírez. 2013. Effects of dietary  $\beta$ -1,3/1,6 glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper *Lutjanus peru* after exposure to lipopolysaccharides. *Fish Physiol Biochem.* doi 10.1007/s10695-013-9889-0
- Hardie, L., T. Fletcher, C. Secombes. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon *Salmo salar L.* *Aquaculture.* 95:201-214.
- Hardie, L.J., L.H. Chappell, C.J. Secombes. 1994. Human tumor necrosis factor  $\alpha$  influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 40(1):73–84
- Hansen, J. D., E.D. Landis, R.B. Phillips. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:6919–6924.
- Harifuzzaman, S. M., B. Austin. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.* 27:440–445.
- Hawlich, H., J. Köhl. 2006. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol.* 43:13-21.
- Herre, J., S. Gordon, G.D. Brown. 2004. Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Mol Immunol.* 40:869–876.
- Higgs, P.G., T.K. Attwood. 2005. *Bioinformatics and Molecular Evolution.* Oxford, Blackwell Publishing.
- Hikima, J., I. Hirono, T. Aoki. 1997. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 6:339–344.
- Hirono, I., B.H. Nam, J. Enomoto, K.Uchino, T. Aoki. 2003. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.* 15:63-70.
- Hirono, I., M. Takami, M. Miyata, T. Miyazaki, H. Han, T. Takano, M. Endo, T. Aoki. 2004. Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics.* 56(1):38-46.
- Iliev, D. B., C.Q. Liarte, S. Mackenzie, F.W. Goetz. 2005a. Activation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. *Mol Immunol.* 42(10):1215-23.
- Irianto, A., B. Austin. 2002. Probiotics in Aquaculture. *J Fish Dis.* 5:11-633.
- Irianto, A., B. Austin. 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 26:59-62.
- Irwin, D.M., M. Yu, Y. Wen. 1996. Isolation and characterization of vertebrate lysozyme genes. En: *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology* (P. Jollès, ed.) 225–227 pp. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Jeney, G., D. Anderson. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhances the non-specific defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 116:315.

- Kassahn, K., R. Crozier, A. Ward, G. Stone, M. Caley. 2007a. From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. BMC Genomics. 8:358.
- Kassahn, K.S., M.J. Caley, A.C. Ward, A.R. Connolly, G. Stone, R.H. Crozier. 2007. Microarrays for comparative and ecological Genomics: beyond single-species applications of array technologies. J Fish Biol. 72:2407–2434.
- Kassahn, K.S., M.J. Caley, A.C. Ward, A.R. Connolly, G. Stone, R.H. Crozier. 2007b. Heterologous microarray experiments used to identify the early gene response to heat stress in a coral reef fish. Mol Ecol. 16:1749–1763.
- Kato, Y., M. Nakao, J. Mutsuro, I. Zarkadis, T. Yano. 2003. The complement component C5 of the common carp *Cyprinus carpio*: cDNA cloning of two distinct isoforms that differ in a functional site. Immunogenetics.54:807-815.
- Kawakami, H., N. Shinohara, M. Sakai. 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin,  $\beta$ -glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. Fish Pathol. 33:287-292.
- Kim, D.H., B. Austin. 2006. Innate immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol.21:513-524.
- Kim, D. H., B. Austin. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. Vet Immunol Immunopathol.114:297–304.
- Kiron, V., H. Fukuda, T. Takeuchi, T. Watanabe. 1995. Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comp Biochem Physiol., Part A:Mol. Integr.111:361-367.
- Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. Anim Feed Sci Tech. 173:111– 133.
- Kollner, B., G. Kotterba. 2002. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol. 12:35-48.
- Konsman, J.P., P. Parnet, R. Dantzer. 2002. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci. 25:154–159.
- Krasnov, A., H. Koskinen, P. Pehkonen, C. Rexroad, S. Afanasyev, H. Molsa. 2005b. Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. BMC Genomics. 6(1):3.
- Koskinen, H., P. Pehkonen, E. Vehniainen, A. Krasnov, C. Rexroad, S. Afanasyev, H. Molsa, A. Oikari. 2004. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. Biochem Biophys Res Commun. 320(3):745-53.
- Kull, F.C., Jr. 1988. Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. Biochem Biophys Res Commun. 153(1):402-9.
- Kumari, J., P. Sahoo. 2006a. Non-specific immune response of healthy and immune-compromised Asian catfish *Clarias batrachus* to several immunostimulants. Aquaculture.255:133-141.
- Kumari, J., P. Sahoo. 2006b. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Dis Aquat Organ.70:63-70.

- Laing, K.J., T. Wang, J. Zou, J. Hollan, S. Hong, N. Bols, I. Hinoro, T. Aoiki, C.J. Secombes. 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur J Biochem.* 268(5):1315-1322.g
- Lall, S.P. 2000. Nutrition and health of fish. *Avances en Nutrición Acuícola. V Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México.* Pp.19-22.
- Lange, S., B. Gudmundsdóttir, B. Magnadóttir. 2001. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. *Fish Shellfish Immunol.* 11:523-535.
- Lara-Flores, M., M.A. Olvera-Novoa, B.E. Guzmán-Mendez, W. Lopez-Madrid. 2002. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.*216:193–201.
- Latz, E., A. Fitzgerald. 2008. Innate immunity: sensing and signaling. *Nature Review Immunology.* Poster.
- Leiro, J.M., R. Castro, J.A. Arranz, J. Lamas. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int. Immunopharmacol.* 7:879–888
- Lie, Ø., Ø. Evensen, A. Sørensen, E. Frøysadal. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Organ.* 6:1–5.
- Lin, H.Z., Z. Guo, Y. Yang, W. Zheng, Z.J. Li. 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquacult Res.* 35:1441-1447.
- Lobo, C., I. García de la Banda, J.M. León-Rubio, M.A. Moriñigo, S. Arijo, X. Moreno-Ventas, J.C. Canteras. 2010. Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture. En: *European Aquaculture Society Meeting, October 5-9 2010, Porto (Portugal).* Pp. 729-730.
- Locksley, R.M., N. Killeen, M.J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104(4):487-501.
- Løvoll, M., U. Fischer, G. Mathisen, J. Bøgwald, M. Ototake, R. Dalmo. 2007. The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription. *Vet Immunol Immunopathol.* 117: 284-295.
- Luckhart, S., Y. Vodovotz, L. Cui, R. Rosenberg. 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.*95:5700–5705.
- Macewan, D.J. 2002. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 14(6):477-792.
- Mackenzie, S., J.V. Planas, F.W. Goetz. 2003. LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Dev Comp Immunol.* 27(5):393-400.
- Magnadóttir, B. 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol.*12:361–379.
- McCord, J., I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244:6049-6055.
- Meena, D.K., D. Pronob, K. Shailesh, S.C. Mandal, A.K. Prusty, S.K. Singh, M.S. Akhtar, B.K. Behera, K. Kundan, A.K. Pal, S.C. Mukherjee. 2012.  $\beta$ -glucan: an ideal



- immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem.* 1-27. doi 10.1007/s10695-012-9710-5.
- Merrifield, D.L., A. Dimitrioglou, A. Foey, S.J. Davies, R.T.M Baker, J. Bøgwald, M. Castex, E. Ringø. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture.* 302:1–18.
- Merrifield, D.L., A. Dimitrioglou, A. Foey, S.J. Davies, R.T.M. Baker, J. Bogwald, M. Castex, E. Ringø. 2010a. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture.* 302:1-18.
- Merrifield, D.L., G. Harper, R.T.M. Baker, E. Ringø, S.J. Davies. 2010b. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* enterocytes. *Aquacult Res.* 41:1268-1272.
- Misra, C., B. Das, S. Mukherjee, P. Pattnaik. 2006. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture.* 255:82-94.
- Munro, J., C. Audet, M. Besner, J.D. Dutil. 1994. Physiological response of American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to low salinity. *Can J Fish Aquat Sci.* 51:2448-2456.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Van Der Knaap, E. Mialhe, E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 191:89-107.
- Nathan, C., M.U. Shiloh. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad USA.* 97:8841–8848.
- Neumann, N.F., J.L. Stafford, D. Barreda, A.J. Ainsworth, M. Belosevic. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol.* 25:807-825.
- Neves, C.A., E.A. Santos, A. C. Bairy. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* Decapoda, *Paleminedae*, infected by *Probopyrus ringueleti* Isopoda, *Bopyridae*. *Dis Aquat Organ.* 39:155-158.
- Nikoskelainen, S., A.C. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen, E.M. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Fish Shellfish Immunol.* 15:443-452.
- Nikoskelainen, S., A.C. Ouwehand, S. Salminen, G. Bylund. 2001. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture.* 198:229-236.
- Nova, E., B. Viadel, J. Wärnberg, J.E. Carreres, A. Marcos. 2011. Beneficial effects of a synbiotic supplement on self-perceived gastrointestinal well-being and immunoinflammatory status of healthy adults. *J Med Food.* 14:79–85.
- O'Hagan, D., M. MacKichan, M. Singh. 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng.* 18:69-85.
- Ortuño, J., M.A. Esteban, V. Mulero, J. Meseguer. 1998. Methods for studying the haemolytic, chemoattractant and opsonic activities of seabream *Sparus aurata* L. En: A.C. Barnes, G.A. Davidson, M. Hiney, D. McInthos (Eds.), *Methodology in Fish Diseases Research.* Albion Press. Pp. 97–100.

- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. Esteban, J. Meseguer. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol.* 85:41-50.
- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M.A. Esteban, J. Meseguer. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Vet Immunol Immunopathol.* 85:41-50.
- Ourth, D.D. 1980. Secretory IGM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dev Comp Immunol.* 4:65-74.
- Palacios, J., C. Santander, A. Zambrano, J. López. 2007. Evaluación comparativa de prebióticos y probióticos incorporados en el alimento comercial sobre el crecimiento y la supervivencia de una especie nativa, el sábalo amazónico *Brycon melanopterus* y una especie foránea, trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola.* año II.Vol. 2. 124-231pp.
- Palm, N.W., R. Medzhitov. 2007. Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol.* 8:549-51.
- Panigrahi, A., V. Kiron, T.Kobayashi, J. Puangkaew, S. Satoh, H. Sugita. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet Immunol Immunopathol.* 102:379-388.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh, I. Hirono, T. Kobayashi, H. Sugita, J. Puangkaew, T. Aoki. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol.* 31:372-382.
- Paulsen, S.M., R.E. Engstad, B. Robertsen. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 11:23-37.
- Penagos. 2008. Immune System and Vaccination In: *Fish Acta Biol Colomb.* 13(3):3-26.
- Perendija, B., S. Borković, T.Kovačević, S.Z. Bojana, D. Stojanović, M. Paunović, P.D. Cakić, S.B. Pajović, Z.S. Saičić. 2007. Activities of superoxide dismutase and catalase in the foot of three freshwater mussel species. *Arch Biol Sci Belgrade,* 59(2):17-18.
- Pérez-Campo, R., M. López-Torres, C. Rojas, C., S. Cadenas, G. Barja. 1993. *Comp. Biochem Physiol.* 105B:749-755.
- Pérez-Sánchez, T., J.L. Balcázar, D.L. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31:196-201.
- Pfaffl W., W. Graham, L. Horgan, Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* Vol. 30. Oxford University Press. Pp.10.
- Picchiatti, S., M. Mazzini, A.R. Taddei, R.Renna, A.M. Fausto, V. Mulero, O. Carnevali., A. Cresci, L. Abelli. 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* 22:57-67.

- Pieters, N., J. Brunt, B. Austin, A.R. Lyndon. 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *J Appl Microbiol.* 105:723-732.
- Pirarat, N., K. Pinpimai, M. Endo, T. Katagiri, A. Ponpornpisit, N. Chansue, M. Maita. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Sci.* 91:92-9.
- Quade, M.J., J.A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol.* 58:239-248.
- Quigley, E.M.M. 2011. Therapies aimed at the gut microbiota and inflammation: antibiotics, prebiotics, probiotics, synbiotics, anti-inflammatory therapies. *Gastroenterol Clin N.* 40:207-222.
- Raa, R., G. Rørstad, R. Engstad, B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. En: Shariff m, subasighe rp, Arthur jr, eds. *Diseases in Asian Aquaculture*. Vol.1. Manila: fish health Section, Asian fisheries society. pp. 39-50.
- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) *Advance en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*, vol Memorias. Merida, Yucatan. Pp. 47-56.
- Rawles, S.D., A. Kocabas, D. Gatlin, W.X. Du, C.I. Wei. 1997. Dietary supplementation of Terramycin and Romet-30 does not enhance growth of channel catfish but does influence tissue residues. *J World Aquac Soc.* 28:392-401.
- Rawls, J. F., B.S. Samuel, J.I. Gordon. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS* doi/10.1073/pnas.0400706101
- Reyes, B.M. 2008. Efecto de la levadura *Debaryomyces* CBS8339 en la dieta sobre la respuesta inmune y antioxidante de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosácea* y la dorada *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado. CIBNOR. pp. 52-81.
- Ribas, C. L. Funcional genomics in fish: towards understanding stress and immune responses at a molecular level. 2006. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España. Pp.1-223.
- Ringo, E., J.E. Lodemel, R. Myklebust, T. Kaino, T.M. Mayhew, R.E. Olsen. 2001. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. An electron microscopical study. *J Appl Microbiol.* 90:294-300.
- Ringo, E., L. Lovmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R.E. Olsen, T.M. Mayhew. 2010. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquacult Res.* 41:451-467.
- Robertsen, B, R.E. Engstad, J.B. Jorgensen. 1994.  $\beta$ -glucans as immunostimulants. En: J. Stolen, T.C. Fletcher(eds) *Modulators of fish immune response*. SOS Publications, Fair Haven. Pp. 83-99.
- Robertson, P.A.W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams, B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon *Salmo salar* L. and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture.* 185:235-243.
- Rocha-Olivares, A. 1998. Age, growth, mortality, and population characteristics of the Pacific red snapper, *Lutjanus peru*, off the southeast coast of Baja California, Mexico. *US Fish. Bull.* 96(3):562-574.



- Rocha-Olivares A, S. Sandoval-Castill. 2003. Mitochondrial diversity and genetic structure in allopatric populations of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Ciencias Marinas* 29(2):197–209.
- Rodregeuz, J., Y.Espinosa, F. Echeverrca, G. Cárdenas, R. RomcLn, S. Stern. 2007. Exposure to probiotics and  $\beta$ -1,3/1,6 glucan in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to WSSV challenge and pond culture. *Aquaculture*. 273,4:405–415.
- Rodríguez, A., A. Cuesta, J. Ortuño, M.A. Esteban, J. Meseguer. 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream *Sparus aurata L.* *Vet Immunol Immunopathol.* 96(3–4):183–192.
- Rodríguez, A., M.A. Esteban, J. Meseguer. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream *Sparus aurata L.* leucocytes in response to yeast cells. *Anat Rec A Discov in Mol Cell Evol Biol.* 272:415–423.
- Rodríguez, I., R. Chamorro, B. Novoa, A. Figueras. 2009.  $\beta$ -Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish *Danio rerio*. *Fish Shellfish Immunol.* 27(2):369–373.
- Romagne, F. 2007. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today.* 12:80-7.
- Rørstad, G., P.M. Aasjord, B. Robertsen. 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon *Salmo salar L.* *Fish Shellfish Immunol* 3:179-190.
- Rosado, J., B. Ondarza. 2003. Prebióticos y probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición. *Nutran el portal de la alimentación.* Disponible en Internet, [URL:http://www.principios nutrición.com.ar](http://www.principios nutrición.com.ar).
- Rothfuchs, A.G., A. Bafica, C.G. Feng, J.G. Egen, D.L. Williams, G.D. Brown. 2007. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12:40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol.* 179:3463-3471.
- Ruiz, Z. I., G.I. De Blas, V.J.L. Clavero, M. J. L. Muzquiz. 2002. Implementación eficaz de una estrategia en el control y erradicación de las enfermedades de los peces: el modelo de Aragón (España). *CIVA 2002* <http://www.civa2002.org>, 459-474 pp.
- Ruiz, I, A.B. Fernández, I. De Blas. 2003a. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Rev AquaTIC.* 18:33-38.
- Sáenz de Rodrigañez, M., P. Díaz-Rosales, M. Chabrilón, H. Smidt, S. Arijó, J. M. L., Rubio, F.J. Alarcón, M.C. Balebona, M.A. Moriñigo, J.B. Cara and F.J. Moyano 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole *Solea senegalensis*, *Kaup* 1858. *Aquacult Nutr.* 15:177-185
- Sahoo, P. K., S.C. Mukherjee. 2001. Effect of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on immune response and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu *Labeo rohita* Hamilton. *Fish Shellfish Immunol.* 11:683-95.
- Sahoo, P. K., S.C. Mukherjee. 2002. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.* 12:1-16.

- Salati, F., Hamaguchi, M., Kusuda, R. 1987. Immune response of reared sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol* 22:291–304.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172:63-92.
- Salinas, I., A.Cuesta, M.A.Esteban, J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol*. 19:67–77.
- Salinas, I., P. Díaz-Rosales, A. Cuestas, J. Meseguer, M. Chabrilón, M.A. Moriñigo, M.A. Esteban. 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish *Sparus aurata* L. *Vet Immunol Immunopathol*. 111:279-286
- Salinas, I., L. Abelli, F. Bertoni, S. Picchiatti, A. Roque, D. Furones, A Cuesta, J. Meseguer, M.A. Esteban. 2008a. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol*. 25:114-123.
- Santamaría, A. 1998. Hábitos alimenticios y ciclo reproductivo del huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1992) Pisces: *Lutjanidae* en Guerrero, México. Tesis de maestría, CICIMAR-IPN, México. Pp. 64.
- Savan, R., Aman, A., Sato, K., Yamaguchi, R., Sakai, M. 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Euro J Immunol* 35:3320–3331.
- Scapigliati, G., N. Romano, F. Buonocore, S. Picchiatti, M.R. Baldassini, D. Prugnoli, A. Galice, S. Meloni, C.J. Secombes, M. Mazzini, L. Abelli. 2002. The immune system of sea bass *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Dev Comp Immunol*. 26(2):151-160.
- Schijns, V.E.J.C. 2003. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine*. 21:829-31.
- Sealey, W.M., F.T. Barrows, A. Hang, K.A. Johansen, K. Overturf, S.E. LaPatra. 2008. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of  $\beta$ -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Anim Feed Sci Tech*. 141:115-128.
- Secombes, C.J., T. Fletcher. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis* 2:53–71.
- Secombes, C.J. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. En: *The Fish Immune System: organism, pathogen and environment* (Iwama, G. and Nakanishi, T., eds.), Pp. 63-105. San Diego - California (USA): Academic Press.
- Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. 19:293-306.
- Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol*. 114:15-24.
- Sherlock, G., 2000. Analysis of large-scale gene expression data. *Curr Opin Immunol*. 12: 201–205.
- Silva-Carrillo, Hernández C., W.R. Hardy, R.B. González, V.S. Castillo. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body

- composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner 1869. *Aquaculture*. 364, 365:180–185. doi: 10. 1016 /j.aquaculture. 2012.08.007
- Siwicki, A.K. 1989. Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol*. 13:87-91.
- Siwicki, A. K, D. P. Anderson, G.L. Rumsey. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 41:125-139.
- Shoemaker, C., P. Klesius. 1997. Streptococcal diseases problems and control: a review. In: Fitzsimmons K. *Tilapia Aquaculture*. Proc. Fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Florida. USA 2:671-680.
- Skjermo, J., T.R. Storseth, K. Hansen, A. Handa, G. Øie. 2006. Evaluation of  $\beta$ -(1-3,1-6)-glucans and high-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 261:1088-1101.
- Solem, S.T., J.B Jørgensen, B. Robertsen. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*. 5:475–491.
- Soszynski, D., M. Krajewska. 2002. Time-course of changes in plasma nitric oxide following lipopolysaccharide and turpentine injection in rats. *J Therm Biol*. 27:387–391.
- Stevenson, M.M., E.M. Riley. 2004. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 4:169–180.
- Stickney, R.R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc., Toronto, Canada. p1063.
- Sugita, H., K. Shibuya, H. Shimooka, Y. Deguchi. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145:195-203.
- Swain, P., S.K. Nayak, P.K. Nanda, S. Dash. 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish Shellfish Immunol*. 25:191–201. doi:10. 1016/j.fsi.2008.04.009
- Swamm, M.M. 1969. Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. H.S.M.S.O. London, U.K.
- Taylor, P.R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. Lin, G.D. Brown, S. Gordon. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 23:901-944.
- Thompson, I., G. Choubert, D.F. Houlihan, C.J. Secombes. 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture*. 133:91-102.
- Thorgaard, G. H., G.S. Bailey, D. Williams, D.R. Buhler, S.L. Kaattari, S.S. Ristow, I.D. Hansen, I.R. Winton, I.L. Bartholomew, J.J. Nagler, P. Walsh, M.M. Vijayan, R.H. Devlin, R.W. Hardy, K.E. Overturf, W.P. Young, B.D. Robison, C. Rexroad, Y. Path. 2002. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comp Biochem Physiol*. 133, 4:609-46.
- Tovar-Ramírez, D., J. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*. 204:113-123.

- Tsoi, S.C.M., J.M. Cale, I.M. Bird, V. Ewart, L.L. Brown, S. Douglas. 2003. Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection. *Mar Biotech.* 5:545–554.
- Uma, A.J., M. J. Abraham, J. Prince, V. Sundararaj. 1999. Effects of probiotics feed supplement on performance and disease resistance of Indian White Shrimp *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *J Aquac Trop.* 14:159-164.
- Valente, L.M.P., A. Gouvei, P. Rema, J. Matos, E.F. Gomes, I.S. Pinto. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture.* 252:85-91.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, W. Fiers. 1995. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* 5(10):392-399.
- Vandenberg, G.W. 2004. Oral vaccine for finfish: academic theory or commercial reality?. *Anim Health Res Rev.* 5:301-304.
- Van Kampan, E. J., W.G. Zijlstra, 1961. *Clin Chim. Acta*, 1961; 6:538-544.
- Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schuëp, R. Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 8:409-424.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:655-671.
- Vollstad, D., J. Børgwald, O. Gaserød, R.A. Dalmo. 2006. Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod *Gadus morhua* L. and spotted wolffish *Anarhichas minor Olafsen* fry. *Fish Shellfish Immunol.* 20:548-561.
- Waché, Y., F. Auffray, F.J. Gatesoupe, Zambonino, V. Gayet, L. Labbé, C. Quentel. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258:470-478.
- Wang, G.I.J. 1985. Feasibility of using catalase activity as an index of microbial loads on food surface. Tesis de maestría. Kansas State University. Manhattan, KS.
- Warner, H.R. 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 3:249-258.
- Warr, G.W., R.C. Simon. 1983. The mitogen response potential of lymphocytes from the rainbow trout *Salmo gairdneri* re-examined. *Dev Comp Immunol.* 7:379–384.
- Watson, W., M.W. Brogan. 1996. *Lutjanidae: Snappers*. In: H. G. Moser (ed.), *The Early life Stages of Fishes in the California Current Region*. CalCOFI Atlas 33. Allen Press, Lawrence, Kansas. Pp. 977–989.
- Watts, M., B.L. Munday, C. M. Burke. 2001. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. *Dev Comp Immunol.* 19:153-164.
- Wright, S.D. 1999. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity 7. *Exp Med.* 189(4):605-9.
- Welker, T.L, C. Lim, M. Yildirim-Aksoy, R. Shelby, P.H. Klesius. 2007. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. *J World Aquac Soc* 38:24–35. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00070.x

- Whittington, R., C. Lim, P.H. Klesius. 2005. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*.248:217-225.
- Xia, Y., G.D. Ross.1999.Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional  $\beta$ -glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* 162:7285-7293.
- Yano,T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. En: *Techniques in fish immunology*. FITC-2. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, S.L. Kaattari y A.F. Rowley. SOS Publications. Fair Haven, New Jersey. USA. pp.131-141.
- Yoo, G., S. Lee, C.Y. Kim, E.O. Okorei. 2007. Effect of dietary  $\beta$ -1,3 glucan and feed stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J World Aquac Soc* 38(1):138–145.
- Yousif, A.N., L.J. Albright, T.P.T. Evelyn. 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis Aquat Organ*. 19:15–19.
- Yuan, C., X. Pan, Y. Gong, A. Xia, G. Wu, J. Tang, X. Han. 2008. Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Int Immunopharmacol*. 8:51–58.
- Zelinkoff, J.T., N.A. Enane, D. Owser, K.S. Squibb. 1990. Fish macrophage 1: Development of a system for detecting immunomodulating effects of environmental pollutants. In: *Symposium at the society of environmental toxicology and chemistry, 11th annual meeting, Arlington*. 86pp.
- Zimmerman, J.W., J. Lindermuth, P.A. Fish, G.P. Palace, T.T. Stevenson, D.E. DeMong. 1998. A novel carbohydrate eglycosphingolipid interaction between a  $\beta$ -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem*.34:22014-22020.
- Zou, J., T. Wang, I. Hinoro, T. Aoki, H. Inagawa, T. Honda, G.I. Soma, M. Ototake, T. Nakanishi, A.E. Ellis, C.J. Secombes.2002. Differential expression of two necrosis factor genes in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 15(2):161-172.
- Zou, J., C.J. Secombes, S. Long, N. Miller, L.W. Clem, V.G. Chinchar. 2003. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dev Comp Immunol*. 27(10):845-858.
- Zou, J., S. Peddie, G. Scapigliati, Y. Zhang, N.C. Bols, A.E. Ellis, C.J. Secombes. 2003a. Functional characterization of the recombinant tumor necrosis factor in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 27(9):813-822.

## 11. ANEXOS

### ANEXO A. Evaluación de la expresión de genes

#### Extracción de ARN total (Trizol)

Se limpio cuidadosamente el área de trabajo con ARNzap (Sigma # R2020) para evitar cualquier tipo de contaminación. Se pesaron aprox. 50-100 mg de tejido de cada una de las muestras. Se homogenizo el tejido en 500  $\mu$ l de trizol, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente, después se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo, se agitaron vigorosamente los tubos por 15 segundos, se incubaron por tres minutos a temperatura ambiente y se centrifugó la mezcla homogenizada a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.

A continuación se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, aprox. el 60% del volumen total), se añadieron 250  $\mu$ l de isopropanol, se agitó nuevamente, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 12000g por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se mantuvo el pellet y se le adicionó 500  $\mu$ l de etanol al 75%, se centrifugó la mezcla a 12000g por cinco minutos a 4°C. Se retiró el exceso de alcohol (sin usar centrifuga de vacío), enseguida el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua DEPC y se almaceno a -80°C. Para verificar la calidad y conocer la concentración del ARN se utilizó un NanoDrop y para visualizar la integridad del ARN se elaboraron geles de agarosa.

#### DNasa RQ 1(Promega, USA)

Para remover la contaminación con DNA, tomamos una alícuota de ARN total correspondiente a una concentración de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, se le adicionó 1  $\mu$ l DNase Buffer 10x, 1  $\mu$ l RNase-Free y agua DEPC cuanto baste para tener un volumen final de 10  $\mu$ l. Se incubo a 37°C durante 30 minutos. A continuación se agregó 1  $\mu$ l de DNase Stop Solution y se incubo a 65°C por diez minutos.



### Síntesis de DNA complementario

El DNA complementario (cDNA) fue generado a partir de 5 µg de RNA total usando InProm II reverse transcriptase obteniendo un volumen final de 20 µl; para ello se adicionó al ARN 2 µl de oligo-dT (ó 1 µl de random primer) y se incubó a 70° C por 10 minutos y se puso en una cama de hielo. En seguida se agregó 1 µl de 10 mM dNTP, 2.4 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.0 µl buffer 5X, 0.5 µl de RNAsin, 0.8 µl de IMPROM II y 5.3 µl de agua DEPC. Posteriormente las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min, 45 °C durante 60 min y una incubación final de 5 min a 90 °C.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

La amplificación del cDNA se realizó en un termociclador (BioRad) con las muestras de cDNA obtenido previamente, la reacción se muestra en la Tabla (i), esto con la finalidad de intentar amplificar los genes de nuestro interés. Al término de la reacción, con los productos obtenidos se corrió una electroforesis en gel de agarosa nativo (1.0%) para observar la amplificación de cada uno de los genes.

Tabla (i) Mezcla para una reacción de PCR (50 µl volumen total)

<b>Primer</b>	<b>1 reacción (µl)</b>
Buffer 10X	5
Taq Polimerasa	0.4
cDNA	1
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
10 mM dNTP	1
Agua DEPC estéril	40.1
Primer Forward	0.5
Primer Reverse	0.5

### Gel de agarosa nativo al 1.0%

Se prepararon geles de agarosa al 0.8% utilizando buffer TAE al 1%, los geles se corrieron a 90 voltios durante 30 minutos, para confirmar que en el proceso no existiera degradación de los ácidos nucleicos.

### Cuantificación de transcritos.

Actualmente, la cuantificación de la expresión génica se lleva a cabo por qPCR, con sondas SYBR Green, utilizando un termociclador CFXq 6 Touch TM Real Time PCR Detection System. El análisis y cuantificación de los genes se realiza a través del software CFX Manager de BioRad.

Los componentes de la reacción son indicadas en la Tabla (ii) y los parámetros que se utilizan para la amplificación de las secuencias se muestran en la Tabla (iii).

Tabla ii. Mezcla para una reacción de RT-PCR empleando SYBR Green.

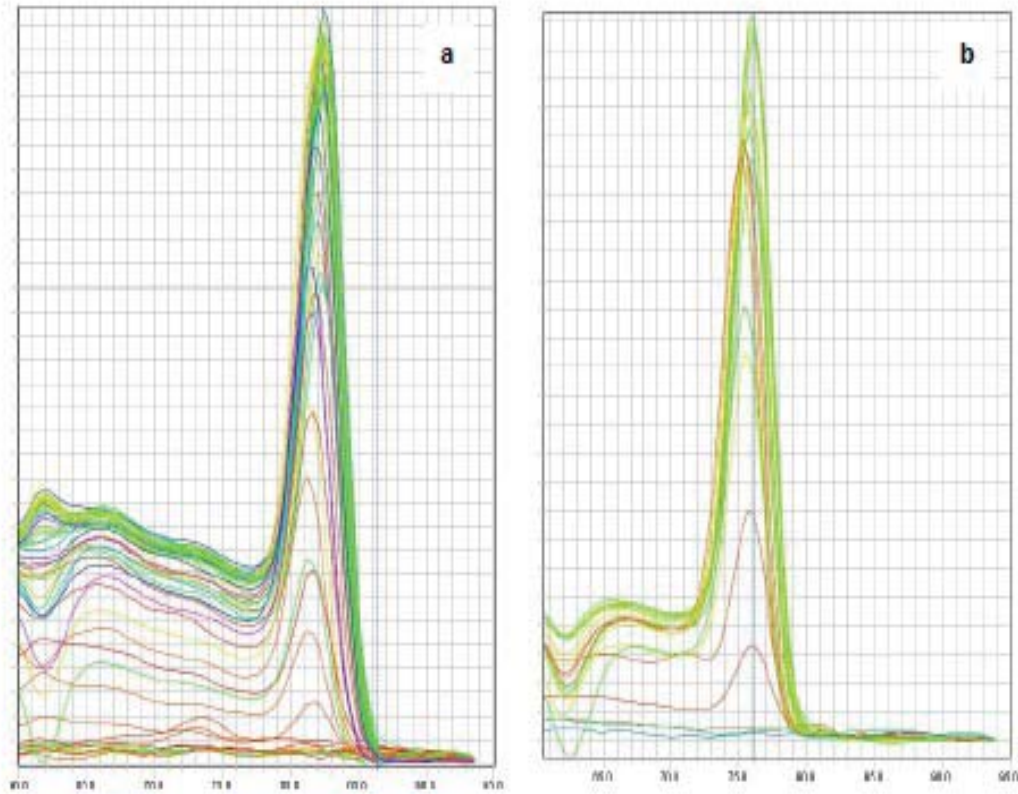
<b>Primer</b>	<b>1 reacción (µl)</b>
SYBR Green	7.5
Primers	0.25
Agua DEPC estéril	2.0
Volumen total	10

\*SYBR Green (dNTP'S, Taq, Mg<sup>++</sup>), Primers (fwd y rev).

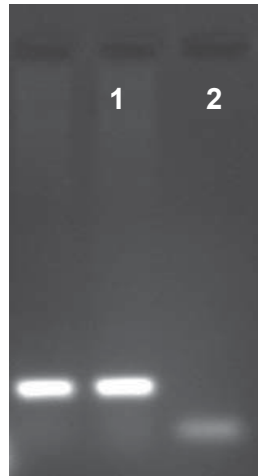


Tabla iii. Parámetros del ciclo térmico que se utiliza para la amplificar las secuencias.

<b>Cycling step</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (segundos)</b>	<b>No. de ciclos</b>
Activación enzimática	95	30	1
Desnaturalización inicial del ADN	95	5	35-40
Alineación de los primers y extensión de producto	60	10-30	35-40
Curva de disociación	65-95	2-5/paso	1

**ANEXO B. Curvas de disociación de los genes  $\alpha$ -Amy (a) y  $TNF-\alpha$  (b) por qPCR**

Alfa-amilasa ( $\alpha$ -Amy), Factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

**ANEXO C. Detección del gen Factor de crecimiento insulina (IGF)**

Gel de agarosa nativo (1.5%), productos de PCR correspondientes a la amplificación del gen *IGF* de *Lutjanus peru*. (1) banda correspondiente a 220 pb, producto correspondiente a IGF y (2) control negativo.

#### **ANEXO D. Información general sobre los genes de estudio**

El gen endógeno *EF 1- $\alpha$*  está relacionado a la traducción del ADN y el *GADPH* en el metabolismo energético (Bustin, 2002).

En relación al TNF, las proteínas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral juegan un rol central en el sistema inmune (Locksley *et al.*, 2001). *TNF- $\alpha$*  es una citocina multifuncional con pleiotrópicas funciones que van desde la respuesta de proliferación (Beutler *et al.*, 1989) hasta los efectos inflamatorios y la respuesta inmune (Locksley *et al.*, 2001) siendo el mayor mediador de la apoptosis (Chen *et al.*, 2002). *TNF- $\alpha$*  y  $\beta$  fueron aislados en 1984 en macrófagos humanos activados y células T (Kull, 1998). *TNF- $\alpha$*  solo tiene la habilidad de unirse a dos receptores TNFR1 (también conocido como p55TNFR, p60 y CD 12a) y TNFR2 (también conocido como p80 y CD120b) (Gupta, 2002; Macewan, 2002). La interacción de *TNF- $\alpha$*  con sus receptores desencadena una serie de eventos intracelulares que tienen como resultado la activación de dos importantes factores de transcripción, el factor nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$  B) y c-Jun (Chen *et al.*, 202) La red de interacción de proteínas de la vía *TNF- $\alpha$* /NF $\kappa$  B ha sido extensamente reportada (Bouwmeester *et al.*, 2004). TNFR1 difiere de TNFR2, no solo por su alta afinidad a unirse a TNF (Vandenabeele *et al.*, 1995) sino también por tener un dominio “muerto” el cual da la habilidad para inducir apoptosis (Tartaglia *et al.*, 1993; Thorburn, 2004). En peces, los TNF ha sido recientemente reportados (Goetz, *et al.*, 2003). Los ortólogos de *TNF- $\alpha$*  han sido aislados y caracterizados en diferentes especies de peces (Laing *et al.*, 2001; Garcia-Castillo *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003b) un gran número de estudios han provisto evidencia indirecta del papel biológico de TNF en peces (Zou *et al.*, 2002; Mackenzie *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2003a).

El gen  $\alpha$ -Amy regula la hidrólisis de la  $\alpha$ 1-4 del almidón y el glucógeno. La enzima  $\alpha$ -amilasa está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archival, 1987) ya que hidroliza indistintamente en laces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de maltosa y glucosa.

El gen *IL-1 $\beta$*  es una interleucina pleiotrópica, es considerada la citocina pre-inflamatoria más importante junto con el TNF- $\alpha$ , la acción de estas citocinas es en gran parte redundante. Tiene la habilidad para aumentar la expresión de la familia de genes de IL-1. Es responsable de los principales efectos biológicos de IL-1, que incluyen: aumento de expresión de moléculas de adhesión celular en los sitios de inflamación, activación de fagocitos, coestimulación de células presentadoras de antígenos y linfocitos T, proliferación de linfocitos B y hematopoyesis.

**ANEXO E. Artículo científico generado del experimento I**

Guzmán-Villanueva, LT, Ascencio-Valle, F, Macías-Rodríguez, ME, Tovar-Ramírez D. 2013. Effects of dietary  $\beta$ -1,3/1,6 glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper *Lutjanus peru* after exposure to lipopolysaccharides. Fish Physiol Biochem. doi 10.1007/s10695-013-9889-0

**ANEXO F. Artículo científico generado del experimento II**

Guzmán-Villanueva, LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Mesenger J, Ascencio-Valle, F, Esteban MA. 2014. Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6 glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. Fish Shellfish Immunol. En revisión.