

Estudio de dos componentes de las defensas innatas del esturión cultivado en un establecimiento de piscicultura en Uruguay.



Mauricio Castellano
Tutor: Dra. Ana Ferreira
Cotutora: Dra. Andrea Villarino

Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias

Julio 2015



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy

Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora Ana y cotutora Andrea que me abrieron las puertas de los laboratorios de Inmunología y Bioquímica. En este tiempo que llevo trabajando junto a ellas, han estado siempre presentes para orientarme, ayudarme, y permitirme que me sienta cómodo en el laboratorio. Ha sido sin duda un verdadero privilegio tenerlas en esta etapa de mi formación científica. Quiero agradecer a Valeria, quien además de ser una excelente compañera, realizó algunos de los experimentos que se muestran en este trabajo. Agradezco también a los compañeros de la 314 en facultad de ciencias y a mis compañeros del laboratorio de Inmunología que siempre me ayudaron cuando precisé una mano y con quienes compartir mis jornada de trabajo ha sido un placer. También agradezco a la ANII que me otorgó una beca de iniciación a la investigación, a Alltech que financió el proyecto de investigación que permitió la realización de esta tesina, a Biotech que brindó los suplementos alimenticio, a Esturiones del Río Negro que puso a disposición la infraestructura, personal y muestras, y en particular al Ing. Daniel Conijeski y a la Msc. Elena Fernández. Por último y no menos importante agradezco a mi familia por el apoyo y el cariño de siempre y en particular a mi abuelo, a quien he recordado mucho en estos últimos días.

Resumen.

El esturión (*Acipenser spp.*) es criado actualmente en nuestro país en la granja de piscicultura “Esturiones del Rio Negro” (localizada en el embalse de Baygorria) para la producción y comercialización de su carne y huevas sin fertilizar (caviar). Si bien este emprendimiento ha sido muy exitoso, en los meses cálidos del año ocurre un aumento en la mortalidad de los esturiones por una combinación de factores ambientales que posiblemente afecten el sistema inmune de estos peces, particularmente sus componentes innatos. Con el fin de comenzar a abordar esta problemática y contribuir al conocimiento de esta especie tan pobremente estudiada, se optimizaron dos técnicas que permiten determinar la funcionalidad de dos componentes esenciales de la inmunidad innata del esturión: la vía alternativa del sistema del complemento y la lisozima. Utilizando estas técnicas se evidenció que la funcionalidad de ambos componentes del sistema inmune innato fue significativamente diferente en verano respecto al invierno en hembras adultas mantenidas en las condiciones de cultivo de la granja. Estos resultados nos hicieron sospechar que la elevada temperatura que alcanza el agua en el verano, podría ser uno de los principales factores ambientales responsable de las alteraciones observadas sobre el funcionamiento de estos componentes de la inmunidad. Por lo tanto, estudiamos los efectos de la temperatura (18°C o 24°C) en esturiones cultivados en condiciones controladas (agua de pozo de muy alta pureza, pH, pO₂) buscando reflejar las temperaturas de cultivo a las que se enfrentan los esturiones en invierno y verano. En este experimento, el aumento de la temperatura afectó la funcionalidad de la vía alternativa del sistema del complemento y la lisozima reproduciendo los efectos observados en los esturiones mantenidos en las condiciones de cultivo. Esto apoya la idea de que la temperatura cumple un papel clave sobre la función de estos componentes de la inmunidad. Por otra parte, utilizamos las metodologías desarrolladas para estudiar el efecto de un suplemento alimenticio e inmunoestimulante (Biopack) sobre el estado sanitario global de los esturiones y sobre estos dos componentes de la inmunidad. Los resultados mostraron que este suplemento tuvo efectos benéficos muy modestos sobre el deterioro ocasionado por las temperaturas altas. En conjunto, el trabajo realizado permitió optimizar ensayos para la medición de la vía alternativa y la lisozima y mostró que estos parámetros de la inmunidad innata pueden ser útiles para el seguimiento del estado sanitario de los esturiones en granjas de piscicultura.

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
1. Introducción.....	7
1.1. Generalidades sobre el esturión.....	7
1.2. Acuicultura del esturión.....	8
1.3. Mecanismos de defensa en los peces.....	10
1.3.1. Generalidades del Sistema inmune.....	10
1.3.1.a. Sistema inmune en peces.....	12
1.3.2. Generalidades del Sistema del complemento.....	13
1.3.2.a. La vía alternativa.....	15
1.3.2.b. Sistema del complemento en peces.....	16
1.3.3. Lisozima.....	17
1.4. Inmunoestimulantes y suplementos alimenticios.....	19
2. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	20
2.1. Hipótesis de trabajo.....	20
2.2. Objetivos.....	21
3. Materiales y métodos.....	21
3.1. Reactivos.....	21
3.2. Esturiones (<i>Acipenser baeri</i> y <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>).....	22
3.3. Obtención de las muestras de suero de esturión.....	22
3.4. Determinación de la actividad funcional de la vía alternativa del sistema del complemento en suero de esturión.....	23
3.4.1. Condiciones generales del ensayo hemolítico.....	23
3.4.2. Optimización de la temperatura del ensayo hemolítico.....	24
3.5. Determinación de los niveles de lisozima en suero de esturión.....	24
3.5.1. Condiciones generales del ensayo cinético.....	25
3.5.1.a. Optimización del ensayo cinético.....	25
3.5.1.b. Optimización de la temperatura.....	25
3.5.1.c. Selección de la longitud de onda.....	26
3.5.1.d. Optimización de la concentración de sustrato <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	26
3.5.1.e. Limite de detección del ensayo cinético.....	26
3.5.2. Ensayo a punto final.....	27

3.5.2.a. Optimización del tiempo.	27
3.5.2.b. Diseño de la curva estándar.	27
3.5.3. Comparación del ensayo lisozima a punto final y cinético.	27
3.6. Cuantificación de proteínas.	28
3.7. Experimento en condiciones de cultivo: Evaluación de las defensas innatas en los esturiones criados en diferentes estaciones del año.	28
3.8. Experimento en el laboratorio húmedo: Efecto de la alta temperatura y del suplemento Biopack sobre la inmunidad innata.	29
3.9. Análisis estadístico general de los experimentos.	30
3.9.1. Análisis estadístico del experimento en condiciones de cultivo.	30
3.9.2. Análisis estadístico del experimento en el laboratorio húmedo.	31
4. Resultados.	31
4.1. Optimización de herramientas para evaluar en suero la funcionalidad de dos componentes de la inmunidad innata del esturión.	32
4.1.1. Optimización de un ensayo hemolítico para cuantificar la actividad de la vía alternativa del sistema del complemento.	32
4.1.1.a. Condiciones generales del ensayo hemolítico.	32
4.1.1.b. Optimización de la temperatura del ensayo hemolítico.	33
4.1.2. Optimización de un ensayo espectrofotométrico para cuantificar la actividad lisozima del suero de esturión.	34
4.1.2.a. Condiciones generales del ensayo cinético.	35
4.1.2.b. Optimización de la temperatura.	35
4.1.2.c. Optimización de la longitud de onda.	36
4.1.2.d. Optimización de la concentración del sustrato <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	37
4.1.2.e. Límite de detección del ensayo cinético.	38
4.1.3. Optimización del ensayo a punto final.	39
4.1.3.a. Optimización del tiempo y de la curva estándar del ensayo a punto final.	40
4.1.4. Comparación del ensayo lisozima a punto final y cinético.	42
4.1.5. Observaciones respecto al ensayo lisozima.	43
4.2. Experimento en condiciones de cultivo: Evaluación de las defensas innatas en los esturiones criados en diferentes estaciones del año.	44
4.2.1. Variación estacional en la funcionalidad de la vía alternativa.	44
4.2.2. Variación estacional en los niveles de lisozima.	45
4.2.3. Variación estacional en los niveles de proteína.	47

4.3. Experimento en el laboratorio húmedo: Efecto de la alta temperatura y del suplemento Biopack sobre la inmunidad innata.....	50
4.3.1. Efecto sobre la viabilidad y el crecimiento de los peces.....	51
4.3.2. Efecto sobre el nivel de proteínas totales.....	52
4.3.3. Efecto sobre la funcionalidad de la vía alternativa.....	53
4.3.4. Efecto sobre los niveles de lisozima.....	54
5. Discusión global de los resultados.....	55
6. Conclusiones.....	59
7. Perspectivas.....	60
8. Bibliografía.....	61

1. Introducción

1.1. Generalidades sobre el esturión.

La denominación esturión engloba unas 27 especies pertenecientes a la clase más abundante de peces óseos, los actinoptergios.[1] Esta clase constituye el grupo más diverso de vertebrados ya que contiene más del 99% de las especies de peces, lo cual representa unos 30.000 ejemplares. Los actinoptergios se dividen en dos subclases, los neoptergios y los condrósteos. La primera es la subclase más abundante de peces, dentro de la cual se encuentra la infraclase teleósteos que abarca unas 27.000 especies. Los esturiones están dentro de la subclase condrósteos, y pertenecen al orden acipenseriformes junto con los peces espátula.[2] (Figura 1.1.) Los esturiones tienen una morfología muy característica, cuentan con un cuerpo alargado, vientre plano, boca en posición ventral y poseen un esqueleto mayoritariamente cartilaginoso con cierto nivel de osificación, sobre todo a nivel de la piel. Además poseen una mandíbula morfológicamente similar a la de los tiburones.[3] La conjunción de caracteres morfológicos comunes a los peces óseos y a los cartilaginosos ha llevado a notorias confusiones de clasistas y sistemáticos que han clasificado en el pasado a este grupo junto a los tiburones y dentro de los peces cartilaginosos. Actualmente su pertenencia a los peces óseos (actinoptergios) está ampliamente aceptada por datos morfológicos y moleculares, y se cree que el ancestro de los esturiones poseía un esqueleto óseo completo que revirtió más tarde en la evolución.[4] Los acipenseriformes constituyen un grupo filogenéticamente antiguo que existe desde hace por lo menos 200 millones de años, lo cual los hace contemporáneos a los dinosaurios. Los esturiones son animales poiquilotermos (no regulan su temperatura corporal), originarios del hemisferio norte, la mitad de las especies habita en Europa, la tercera parte en América del Norte y el resto en Asia. En su hábitat natural son capaces de vivir por más de 100 años y alcanzar un peso aproximado de 1000 kg. Otras características destacadas de este grupo es que presentan un genoma y cariotipo único, con un número de cromosomas que oscila entre los 120 y 500 para diferentes especies.[3] Los esturiones son peces que han sido muy pobremente estudiados, habiendo escasa información sobre estos en la literatura científica.[5] El estudio de estos peces resulta complicado ya que no existe información del genoma nuclear, y existe escasa información a nivel de la expresión y función de las proteínas. Por lo tanto trabajar en este modelo biológico es un importante

desafío ya que prácticamente todo lo que se pretende hacer debe de ser puesto a punto y optimizado.

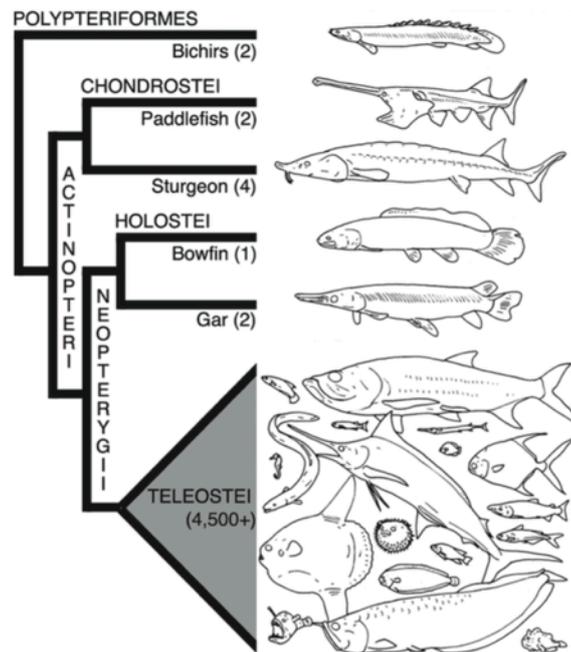


Figura 1.1.) Árbol filogenético de la clase actinopterigios basado en datos moleculares. Los números entre paréntesis indican los géneros vivos dentro de cada clado. Imagen tomada de Sallan, 2014

1.2. Acuicultura del esturión.

Los esturiones poseen un enorme valor comercial, principalmente porque sus huevas sin fertilizar (caviar) constituyen un manjar culinario. La palabra caviar proviene de la expresión persa mahii-xavi-yar que significa “pez que contiene huevas”, y desde hace varios siglos se asocia a este producto del mar con las clases adineradas de la sociedad, actualmente el caviar más raro puede llegar a costar unos 10000 euros el kg.[6] Las pesquerías rusas localizadas en el norte del Mar Caspio fueron entre los años 1950 y 1980 los mayores productores de carne de esturión y caviar, registrándose en 1977 la máxima pesca (32.078 toneladas). Desde entonces la combinación de factores como la sobrepesca y pesca ilegal, la fragmentación y contaminación de los ríos produjo el colapso de las reservas naturales de esturiones.[6] Actualmente todas las especies de esturión se encuentran en peligro de extinción y desde 1998 se incluyen en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, por sus siglas en inglés, ver sitio web <https://www.cites.org/esp/prog/sturgeon/history.shtml>). Esta institución las protege al

determinar la cantidad de carne y caviar proveniente de la pesca que cada país puede exportar.[6] Como consecuencia del colapso de las reservas de esturiones así como de las medidas regulatorias impuestas por la CITES, en 2007 solamente se pescaron 150 toneladas, lo cual representa un 0.5% de la pesca máxima registrada.[6] En los últimos 20 años la acuicultura del esturión ha cobrado gran relevancia y se ha vuelto esencial para la producción sustentable de caviar. El aumento exponencial en la acuicultura del esturión, coincidió con el impresionante declive en su pesca (Figura 1.2. A) y se atribuye a la necesidad de satisfacer la alta demanda mundial caviar y al deseo de diversificar los productos de la acuicultura. Se estima que la acuicultura del esturión produjo 29.300 toneladas de carne y 110-120 toneladas de caviar en el 2007 y 2008 respectivamente.[6] (Figura 1.2. B)

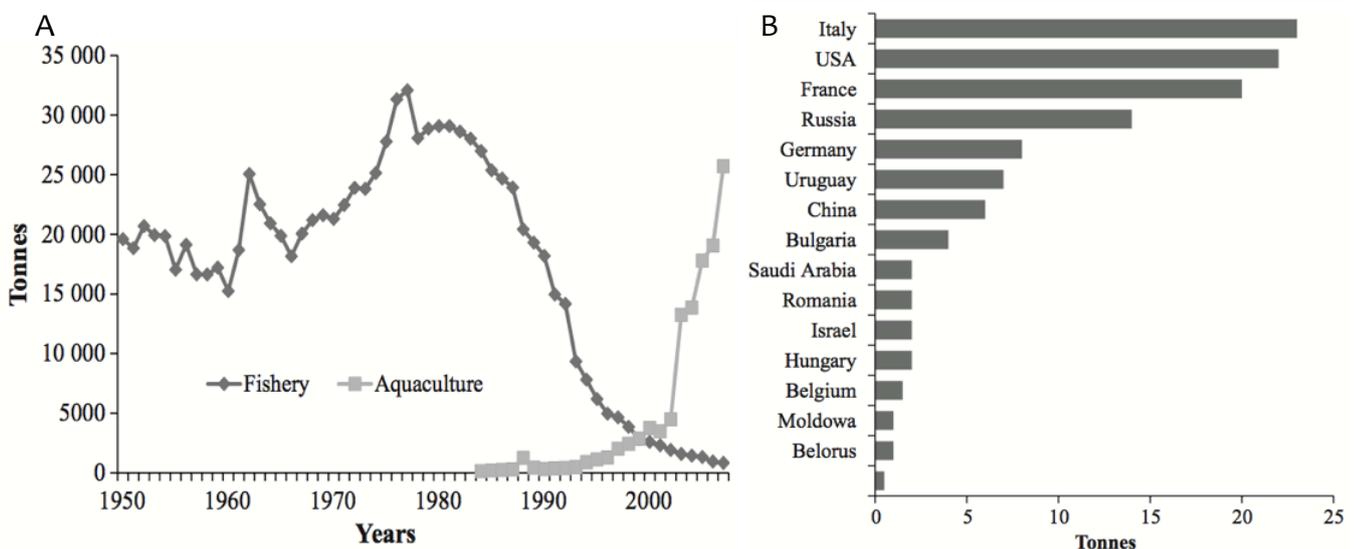


Figura 1.2.) Panel A. Comparación de las toneladas de esturiones pescado o cultivado en acuicultura en los últimos 60 años. Panel B. Toneladas de caviar producido en 2008 en los principales países dedicados a la acuicultura del esturion. Figuras tomadas de Bronzi, Rosenthal & Gessner, 2011.

Uruguay es uno de los principales productores de caviar a nivel mundial.[6] (Figura 1.2. B) En nuestro país, la granja de piscicultura “Esturiones del Río Negro” localizada en Baygorria ha logrado cultivar exitosamente dos especies de esturión: *Acipenser baerii* y *Acipenser gueldenstaedtii*, conocidos como esturión siberiano y esturión ruso (<http://www.blackrivercaviar.com.uy>). El caviar producido en este establecimiento ha sido reconocido como uno de los mejores caviars del mundo (<http://magazine.wsj.com/gatherer/the-specialist/caviar-dreams>). A pesar del éxito de este emprendimiento, en verano se produce un aumento en la mortalidad de los peces. Como las

hembras de esturión alcanzan la madurez sexual luego de 7-8 años de cultivo (dato provisto por Ing. Daniel Conijeski), este aumento en la mortalidad supone importantes pérdidas económica, debido al tiempo, esfuerzo e inversión que conlleva criar a estos animales antes de que pueda ser cosechado el caviar. Por esta razón atender y resolver esta problemática se ha vuelto un desafío fundamental para ERN. Este aumento en la mortalidad ocurre por infecciones bacterianas que se cree se ven facilitadas por una combinación de factores ambientales adversos que incluyen el aumento de la temperatura del agua (hasta 28°C) (la temperatura de crecimiento óptimo de los esturiones de la cepa rusa es entre los 15-22°C) [7] y la consecuente aparición de floraciones. Ese trabajo pretende contribuir a la comprensión de los mecanismos responsables de este fenómeno. Es posible que estos factores ambientales repercutan negativamente en el sistema inmunitario del esturión volviéndolo más susceptible a infecciones por microorganismos oportunistas y/o a compuestos tóxicos presentes en el agua.

1.3. Mecanismos de defensa en los peces.

A continuación se introducen los conceptos generales sobre la arquitectura y funcionamiento del sistema inmune de los mamíferos el cual se conoce con mayor profundidad que el de los peces. Además se acepta que muchas de las características de la inmunidad en los mamíferos son comunes a las de este grupo. Esta revisión está basada principalmente en el libro de inmunología general Janeway's Immunobiology[8] por lo cual no aparecen citas bibliográficas en esta sección.

1.3.1. Generalidades del Sistema inmune.

En mamíferos el sistema inmune involucra varios órganos, células y componentes solubles que actúan de forma conjunta y coordinada para reconocer, contener y en última instancia eliminar a los patógenos que ingresan al organismo. Este sistema es extremadamente eficaz y es la razón por la cual los diversos patógenos que nos rodean raramente nos enferman. Se distinguen dos grandes ramas del SI, el sistema inmune innato (SII) evolutivamente antiguo y presente tanto en vertebrados como en invertebrados y el sistema inmune adaptativo (SIA) que emergió hace aproximadamente 450 millones de años y es exclusivo de los vertebrados mandibulados.

El SII está integrado por macrófagos, neutrófilos, células NK y dendríticas y por componentes solubles como el sistema del complemento (SC), la lisozima y péptidos antimicrobianos. Estos componentes se encuentran circulando en sangre y en los sitios de entrada de patógenos. Una de las principales características del SII es que cuenta con un repertorio finito de receptores solubles y celulares invariables que han sido evolutivamente seleccionados para reconocer ciertos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Estos PAMPs como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, la flagelina y el ARN de doble hebra son comunes a muchos tipos de patógenos. Utilizando receptores de reconocimiento de estos patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) el SII es capaz de responder rápidamente ante el ingreso de patógenos y desencadenar mecanismos efectores para eliminarlos. Estos mecanismos incluyen en el caso de bacterias, la lisis celular por acción del SC, lisozima y péptidos antimicrobianos, y la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. En el caso de patógenos no fagocitables, como los gusanos parásitos, los basófilos y eosinófilos pueden desplegar mecanismos de citotoxicidad especializados en destruirlos. Por otra parte, frente a los virus, las células NK son capaces de reconocer y eliminar por apoptosis las células del propio organismo que han sido infectadas. Además, de activar estos mecanismos de eliminación, el reconocimiento de estos patógenos por parte del SII genera una variedad de mediadores químicos que dan lugar a una respuesta inflamatoria que tiene profundas consecuencias a nivel local y sistémico. La inflamación induce la producción y el reclutamiento de más células y proteínas del SI, desde la sangre al sitio de infección, para asistir a los componentes residentes en el combate contra el patógeno. La mayoría de las infecciones son controladas por la respuesta del SII sin causar enfermedad.

En los casos en que la infección no pueda ser resuelta, la inflamación desencadenada por el SII permite que se monte una respuesta adaptativa contra el patógeno. Para este proceso son claves las células dendríticas; éstas son células fagocíticas especializadas que ingieren patógenos pero los degradan parcialmente, exponiendo en su superficie remanentes característicos de las macromoléculas que los componen. Estos remanentes moleculares son fundamentales para que ocurra la activación de las células del SIA: los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos B y T son capaces de generar un repertorio prácticamente ilimitado de receptores mediante la recombinación de segmentos variables en sus genomas, proceso mediado por recombinasas llamadas RAG1 y RAG2. Estos receptores son conocidos como receptor de la célula B o inmunoglobulina (BCR, por sus siglas en inglés) y de la célula T (TCR, por sus siglas en inglés). Ante un determinado patógeno se estimula la proliferación de los linfocitos B y T capaces de reconocer específicamente a dicho patógeno y no a otros. Por esta razón es que se dice que el SIA se adapta (valga la redundancia) al patógeno que se encuentra

causando la infección. La complejidad de este sistema hace que la respuesta adaptativa demore varios días en establecerse. Estas dos características del SIA son radicalmente diferentes al SII en donde los receptores se encuentran preformados y prontos para reconocer de forma inmediata los PAMPs comunes a varios patógenos. La acción conjunta de los linfocitos T y B permite dirigir y potenciar los mecanismos efectores innatos volviéndolos más eficientes en la eliminación del patógeno. Los linfocitos B que han sido activados por el patógeno, secretan su receptor (anticuerpos) específicos contra él, que facilitan la activación del SC y promueven la fagocitosis por parte de las células fagocíticas. Los linfocitos T colaboradores, como lo indica su nombre colaboran con otras células del SI, promoviendo los mecanismos propios que estas células tienen para eliminar a los patógenos. En el caso de los macrófagos y neutrófilos, estos linfocitos facilitan la degradación de los microorganismos que han sido fagocitados. Por otra parte los linfocitos T citotóxicos son capaces de reconocer las células del organismo infectadas con virus e inducir la apoptosis de las mismas. Otra característica diferencial del SIA, es que su activación genera linfocitos B y T de larga vida que permanecen en el organismo luego de que se resuelve la infección. La presencia de estas células permite que ante un segundo encuentro con el mismo patógeno, la respuesta adaptativa se monte mucho más rápido. Este mecanismo exclusivo del SIA se denomina memoria inmunológica y es el que permite generar protección contra un futuro patógeno mediante la administración de vacunas.

1.3.1.a. Sistema inmune en peces.

El SII innato está altamente conservado en el reino animal y actualmente se acepta que los peces poseen los mismos mecanismos innatos que los mamíferos ya que cuentan con células fagocíticas, NKs, basófilos y eosinófilos, PRRs capaces de reconocer PAMPs, SC, lisozima, péptidos antimicrobianos y los mediadores químicos necesario para inducir una respuesta inflamatoria.[9,10] Los peces óseos, como el esturión, son los primeros vertebrados que cuentan con un SIA completo, encontrándose linfocitos B y T y los genes RAG que permiten que ocurra la recombinación de los segmentos génicos que da lugar a los anticuerpos y TCRs.[11] Sin embargo, se ha observado que el SIA de los peces es menos robusto que el de los mamíferos ya que el establecimiento de una respuesta adaptativa puede demorar varias semanas, los anticuerpos que se generan son de baja afinidad y a su vez la memoria inmunológica es pobre.[12] Aunque no se conocen todos los factores que explican estas características del SIA de los peces, es probable que arquitectura del SI de los peces

caracterizada por la ausencia de ganglios linfáticos sea parte de la explicación.[13] En los mamíferos los ganglios linfáticos son un órgano central para la respuesta adaptativa. En estos se produce el encuentro de los linfocitos T y B con sus respectivos antígenos y la activación y proliferación de estas células. A su vez en dicho órgano se forma una estructura denominada centro germinal que da lugar a un proceso llamado maduración de la afinidad por el cual se seleccionan aquellos linfocitos B que mejor reconocen al patógeno. Esta misma estructura está implicada en la generación de los linfocitos de larga vida responsables de la memoria inmunológica.[8]

Esto ha llevado a plantear la hipótesis de que el SII en los peces cumple un rol central y preponderante en la inmunidad. Varios descubrimientos sobre la inmunidad en peces apoyan este argumento. Se ha observado que este grupo presenta una gran diversidad en los receptores innatos así como la presencia de varias isoformas de proteínas claves del SC, no presentes en mamíferos.[14] A su vez recientemente se ha encontrado que la mutación del gen RAG en pez cebra (que impide los eventos de recombinación necesarios para formar el BCR y el TCR y por tanto el funcionamiento del SIA) no afecta su sobrevivencia en condiciones no estériles. En contraste, en mamíferos esta mutación es deletérea.[15] Además en estos peces se observó que varios componentes del SII se sobreexpresan, probablemente compensando la falta de respuesta adaptativa. A continuación sintetizamos las principales propiedades de dos componentes de la inmunidad innata en los peces que son el centro de estudio de este trabajo: la vía alternativa del SC y la lisozima.

1.3.2. Generalidades del Sistema del complemento.

El sistema del complemento (SC) constituye uno de los principales y más antiguos componentes de la inmunidad innata. Fue descubierto en 1890 como un componente termo sensible del suero capaz de complementar la actividad bacteriolítica de los anticuerpos (de ahí su nombre).[16] En mamíferos este sistema está compuesto por más de 30 proteínas solubles y de membrana que incluye enzimas, moléculas de reconocimiento de PAMPs y proteínas reguladoras. Su acción conjunta y coordinada permite opsonizar y eliminar patógenos, desencadenar una respuesta inflamatoria en el sitio de infección, modular la respuesta adaptativa y contribuir a la homeostasis eliminando células necróticas y apoptóticas.[17-19] Para que se desencadenen estos efectos, el sistema debe primero activarse ya que la mayoría de sus componentes se encuentran inactivos en plasma y tejidos. La activación de este sistema involucra el reconocimiento de los patógeno seguido de una serie de reacciones

enzimáticas secuenciales. Estas reacciones permiten que ocurra la activación de los componentes inactivos y de las proenzimas del SC.[19] Existen tres vías de activación del SC, estas vías difieren en los mecanismos de iniciación pero convergen en la formación de complejos enzimáticos anclados a la superficie del patógeno, denominados convertasas. Las convertasas son enzimas dependientes de Mg^{2+} que median la proteólisis de los componentes inactivos C3 y C5, cuyos fragmentos activos desencadenan de forma directa o indirecta todas las funciones efectoras del SC.[20] La proteína C3 es el componente del SC más abundante del suero y cumple un papel central en este sistema.[21] Esta proteína globular posee un enlace tioéster escondido dentro de su estructura proteica que se expone cuando las convertasas cortan proteolíticamente a C3 en los fragmentos activos C3b y C3a.[22] Este enlace, que pertenece al fragmento C3b, es capaz de reaccionar con grupos nucleofílicos (como aminos e hidroxilos) en la superficie de los patógenos quedando unido covalentemente a los mismos.[23] El depósito de C3b facilita la fagocitosis por parte de los macrófagos y los neutrófilos lo cual constituye uno de los principales mecanismos efectores y de eliminación de patógenos del SC.

Al aumentar el depósito de C3b sobre la superficie del patógeno las convertasas de C3, mediante la unión de una molécula de C3b, pueden adquirir la capacidad de cortar al componente inactivo C5 en C5a y C5b. Este último es capaz de interactuar en forma secuencial con los componentes C6, C7, C8 y con varias moléculas del componente C9, formando un complejo macromolecular que se ensambla en la membranas externa de los patógenos, generando poros que conducen a la lisis celular (Figura 1.3.).[24] Este mecanismo lítico, que puede desencadenarse por cualquiera de las tres vías, es el resultado de la activación completa del SC y hace posible la determinación de la actividad funcional de toda esta cascada.[25] Por otra parte la acción de estas convertasas libera los fragmentos más pequeños C3a y C5a que tienen un potente efecto pro inflamatorio al actuar directamente sobre los epitelios vasculares y otras células del SI. La acción de estas moléculas da lugar al reclutamiento de más componentes del SC, anticuerpos y células fagocíticas desde la sangre al sitio de infección.[26]

Como ya fue mencionado la activación del SC ocurre por tres vías diferentes estas son la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA). La VC es activada principalmente por anticuerpos que reconocen la superficie del patógeno, por lo cual se la considera una rama adaptativa del SC. La VL es iniciada por PRRs como la lectina de unión a manosa (MBL, por sus siglas en ingles) y las ficolinas que reconocen motivos glucídicos exclusivos de patógenos.[27] En este trabajo nos vamos a focalizar únicamente en la activación del SC por parte de la vía alternativa, la cual pasamos a describir a continuación.

1.3.2.a. La vía alternativa.

A diferencia de las otras vías que se inician por moléculas de reconocimiento, la VA se inicia sobre los patógenos o células activadoras como consecuencia de la activación espontánea de C₃. [28] En solución el enlace tioéster de C₃ es capaz de hidrolizarse dando lugar a un cambio conformacional en esta proteína. Este cambio conformacional expone un sitio de unión para la proenzima factor B que al unirse es activada proteolíticamente por el factor D dando Bb. [21] El factor D tiene la particularidad de ser la única proteasa de serina del SC que circula en sangre de manera activa y no requiere ser activada por ningún otro componente del SC. [29] De esta manera se genera la convertasa de fase fluida C₃(H₂O)Bb cuya corta vida media permite mantener en circulación pequeñas cantidades de C₃b que actuarán como iniciadores de la VA. (Figura 1.4.) Cuando este C₃b se une covalentemente a grupos nucleofílicos sobre la superficie de una célula propia y sana, interactuará con factores reguladores solubles como el factor H o constituyentes de membrana como DAF y MCP. [21] Estos factores reguladores dificultan que la VA se inicie sobre una célula propia porque: impide que C₃b interactúe con los factores B y D, disocian las posibles convertasas que se puedan formar y facilitan la inactivación proteolítica de C₃b por el componente soluble factor I. [30] Sin embargo, si el C₃b se une covalentemente a la superficie de un patógeno o célula activadora que carezca de los mecanismos de control, podrá interactuar con los mismos factores B y D dando lugar a la convertasa de la VA, C₃bBb. Esta convertasa es estable y genera grandes cantidades de C₃b. Como el C₃b producido es parte del complejo enzimático, ocurrirá una rápida amplificación de la síntesis y depósito de C₃b por la formación de nuevas convertasas de la VA. Esta amplificación permite que se deposite un número adecuado de moléculas de C₃b, lo cual es esencial para que ocurran las funciones efectoras del SC como la opsonización y lisis de los patógenos por la activación de la vía lítica (Figura 1.4). A pesar de que esta vía se puede iniciar por sí sola dando lugar a todas las funciones efectoras del SC, la misma también puede amplificar el depósito de C₃b que se haya generado por la VC y VL lo cual la vuelve sumamente importante en el sistema inmune de los organismos.

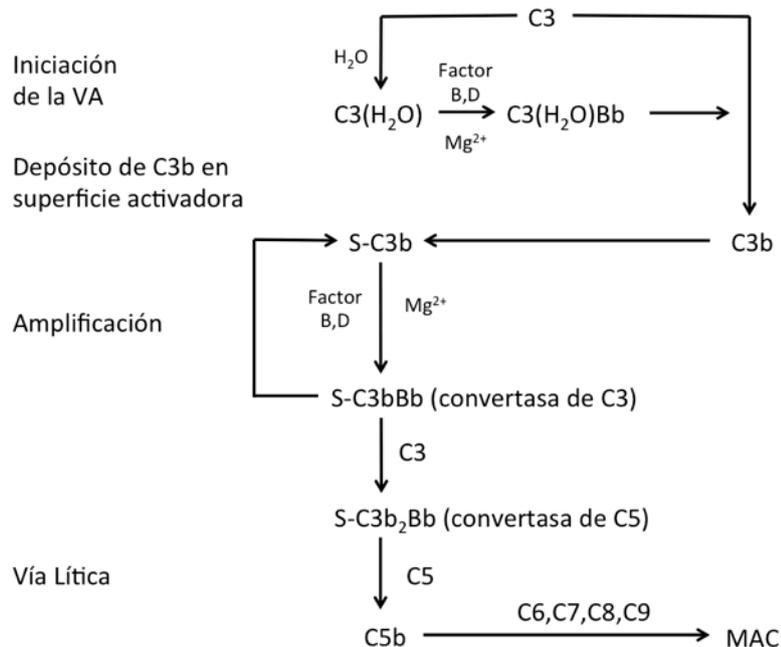


Figura 1.4.) Esquema de activación de la VA sobre una superficie activadora y formación de la vía lítica.

1.3.2.b. Sistema del complemento en peces.

Estudios realizados principalmente en teleósteos han permitido concluir que el SC en peces es muy similar al humano. Se sabe que están presentes las tres vías de iniciación y se han encontrado homólogos para casi todas las proteínas del SC.[31] De todas maneras existen diferencias entre los dos sistemas. En peces una proteína con homología tanto por factor B y C2 (proteasa de serina que participa en la activación de las VC y VL), designada B/C2 cumpliría el papel de estas dos proteasas de serina humanas, participando tanto en la formación de la convertasa de la VC/VL como en la convertasa de la VA.[32] Por otra parte, hasta el momento, sólo se han encontrado en teleósteos proteínas reguladoras solubles. De todas maneras, la principal y más llamativa diferencia fue el descubrimiento de múltiples isoformas de varios componentes del SC, tales como C3, C4, C5, C7, MBL y B/C2.[32] Esta diversidad apoya la idea previamente mencionada de que el SC y en general el SII en peces cumple un papel preponderante en la inmunidad. En dorada y carpa se han encontrado 5 isotipos diferentes de C3 que difieren en la composición aminoacídica cercana al enlace tioéster y, por lo tanto, se supone difieren en la capacidad de unirse a ciertas superficies. Se cree que estas diferencias le confieren a algunas isoformas mayor especificidad por grupos aminos o por grupos hidroxilos. Esta sería una estrategia de los peces para ampliar la capacidad de unirse a los patógenos y se ha visto que las diferentes isoformas difieren en la capacidad de unirse a distintos sustratos activadores del SC como los glóbulos rojos de conejo, oveja, bacterias y zymosan.[33,34]

Recientemente se ha encontrado en carpa dos isoformas homólogas a la MBL humana. Una de estas moléculas es una MBL genuina mientras que la otra, ausente en mamíferos, reconocería motivos galactosa. Ambas proteínas son capaces de activar la VL.[35] Al igual que en mamíferos, los hepatocitos del hígado son los principales productores de las proteínas del SC en peces[36], aunque también se ha detectado expresión en branquias, riñón anterior, bazo, músculo y piel. Resulta interesante que las distintas isoformas se expresan de forma diferente en estos tejidos.[37] Estos resultados sugieren que el SC no solo se encuentra circulando en sangre sino que también se localiza en los sitios de ingreso de patógenos. De todas maneras frente a un estímulo pro inflamatorio parecería ser que la mayor expresión de componentes del complemento ocurre en el hígado.[38] Nuevamente resaltando el papel del SC en peces, se ha visto que en trucha arcoíris ocurre la transferencia materna de C3, C4, C5, C7 factor B y D al huevo. Esto contribuiría a las defensas del embrión en un ambiente cargado de patógenos (como lo es el agua) previo al desarrollo de sus defensas innatas, incluyendo la capacidad de sintetizar estos componentes del SC.[39] A pesar de que todos los estudios mencionados han sido realizados en los peces teleósteos, la cercanía de este grupo con los esturiones nos hace suponer que los mismos poseen un SC completo. Esto se ve apoyado por el reciente descubrimiento de C1q (proteína iniciadora de la VC) y su homología con la mismas molécula en peces teleósteos.[40]

1.3.3. Lisozima

La lisozima fue descubierta en 1921 por el bacteriólogo Alexander Flemming al observar que las secreciones de su nariz, como consecuencia de un resfrío, que cayeron accidentalmente en una placa de agar produjeron la lisis de las bacterias que habían crecido en dicha placa. Posteriormente se evidenció que la lisozima es una enzima que cataliza la hidrólisis de las uniones beta (1,4) entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina que componen el peptidoglicano de la pared bacteriana.[41] Esto hace posible medir la actividad lisozima de una muestra al evaluar el descenso de la turbidez de una suspensión de bacterias producto de la actividad de esta enzima. Esta enzima ha tenido un profundo impacto en diversas áreas del conocimiento científico, fue la primer proteína en la que se resolvió la estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X, ha servido como proteína modelo en biología molecular y en enzimología y actualmente es ampliamente usada en la industria alimenticia y farmacéutica por sus propiedades conservantes.[41] En los vertebrados se han identificado 2 tipos de lisozima (tipo-c y tipo-g), que difieren en su composición aminoacídica,

propiedades bioquímicas y enzimáticas. Ambas son proteínas monoméricas pequeñas de unos 15 kDa con punto isoeléctrico entre 9-11 y actividad óptima a pH 5-8.[41] Se cree que la lisozima cumple un papel central en las defensas innatas de los organismos. En línea con estos argumentos se ha observado que algunas bacterias patógenas han evolucionado modificaciones en los glicanos que componen su pared bacteriana para evadir la acción bacteriolítica de esta enzima. Otras bacterias han adquirido la capacidad de producir inhibidores contra la lisozima. Estos descubrimientos realzan el papel de la lisozima en las defensas innatas.[41]

En los peces la lisozima es producida principalmente por neutrófilos, monocitos y en menor medida por macrófagos[42], a diferencia de los componentes del SC los cuales son sintetizados principalmente por los hepatocitos. Se ha visto que frente a un estímulo proinflamatorio los macrófagos de salmón atlántico son capaces de sintetizar y secretar esta enzima.[43] Se ha observado que la lisozima en peces, presenta una amplia distribución pudiendo encontrarse en el riñón, tracto digestivo, hígado, bazo, mucus de la piel, sangre/plasma, branquias e intestino. La abundancia relativa de esta enzima en los tejidos depende de la especie y tipo de lisozima que se estudie.[44,45] Se cree que la amplia distribución de esta enzima y los altos niveles en el intestino, branquias y mucus representa una adaptación en los peces para subsistir en un ambiente con abundante número de patógenos oportunistas como lo es el agua.[41] La lisozima es una enzima efectiva contra las bacterias gram positivas, las cuales poseen una gruesa capa de peptidoglicano en contacto con el exterior. Pero es menos eficiente a la hora de lisar bacterias gram negativas ya que la capa de peptidoglicano se encuentra recubierta por una membrana externa que dificulta su acceso. Sin embargo, en trucha arcoíris se aislaron dos isoformas de lisozima tipo c del riñón, y una de esta presentaba una alta actividad bacteriolítica contra bacterias gram negativas, poniendo de manifiesto la importancia de esta molécula en las defensas innatas de este pez.[46,47] Se cree que la lisozima sería capaz de facilitar la lisis de bacterias gram negativas al actuar de manera conjunta con otros componentes de las defensas innatas como el complemento. Estos desestabilizarían primero la membrana externa facilitando luego el acceso de la lisozima a la pared interna de peptidoglicano. Más evidencia de la importancia de la lisozima en la inmunidad innata de los peces, surge de experimentos realizados en el pez cebra en donde se observó la presencia de lisozima capaz de lisar *E. coli* en el citosol de huevos recién fertilizados, y se sospecha la enzima fue transferida de forma materna.[48] En otro trabajo realizado con pez cebra transgénico para la lisozima de gallina, se observó una mayor expresión de esta enzima en los epitelios y sobrevivió frente a desafíos con los patógenos *F. columnare* y *E. tardea* en comparación con peces no transgénicos.[49]

1.4. Inmunoestimulantes y suplementos alimenticios.

En la acuicultura hay un gran interés en contar con herramientas para prevenir y combatir a los patógenos que causan importantes pérdidas al sector, para esto existen tres grandes estrategias. La primera es el uso de antibióticos y antivirales de forma terapéutica cuando ocurre una infección que pone en riesgo la producción. Ambos se administran por un tiempo relativamente corto y actúan directamente sobre los patógenos. Las otras dos estrategias consisten en la administración profiláctica de vacunas e inmunoestimulantes, buscando reforzar el SI del pez previo a un encuentro con el patógeno. Estas estrategias posibilitarían una menor utilización de antibióticos, lo cual en el largo plazo tiene importancia debido a que disminuirían el desarrollo de resistencia por los agentes patógenos.[50]

Las vacunas, como ya se mencionó, actúan principalmente a nivel del SIA generando anticuerpos y linfocitos T efectoras contra un determinado patógeno. Si bien son específicas y proveen protección a largo plazo, en los peces esta protección parece ser débil y de corta duración. Así, ha sido difícil generar buenas vacunas contra algunas bacterias y en especial contra algunos virus.[50] Los inmunoestimulantes engloban un diverso grupo que incluye componentes de bacterias y levaduras (PAMPs), bacterias vivas no patogénicas o bacterias patógenas atenuadas, y vitaminas. La administración de inmunoestimulantes en dosis adecuadas potencia las funciones del SII, de forma directa o indirecta, ayudando a combatir un variado número de patógenos. Como esta rama de la inmunidad carece de memoria inmunológica, los efectos benéficos de los inmunoestimulantes son de corta o mediana duración.[50] Entre los inmunoestimulantes más comunes se encuentran los probióticos, microorganismos vivos que colonizan el tracto digestivo favoreciendo el crecimiento, digestión e inmunidad de los peces.[51] Por otro lado encontramos a los prebióticos que son fibras no digeribles, que muchas veces derivan de microorganismos, como los oligosacáridos de manosa (MOS) y los β -glucanos. Los prebióticos promueven el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo que son capaces de digerir estos componentes. La presencia de bacterias benéficas dificulta la colonización del tracto digestivo por otras bacterias patógenas, disminuyendo la incidencia de infecciones. Alternativamente, los prebióticos y probióticos pueden ser reconocidos directamente por PRRs en células del SII, induciendo la producción de mediadores solubles de la inflamación. Esta respuesta inflamatoria inducida potencia la actividad del SC, de la lisozima y de células fagocíticas.[51,52] En el caso de los prebióticos se han observado efectos estimulantes de los β -glucanos: en carpa (*Cyprinus carpio*) aumentan la expresión de componentes del SC, mientras que *in vitro* en

macrófagos de salmón atlántico (*Salmo salar*) aumentan la producción de lisozima.[43,53] La suplementación con MOS en trucha arcoíris mostró un aumento en la actividad serológica de la lisozima, y de las vías clásica y alternativa del SC.[54] Este mismo suplemento mejoró la sobrevivencia del gato americano (*Ictalurus punctatus*) sometido a un desafío con el patógeno *Edwardsiella ictaluri*. [55]

Por otro lado, en la industria de la acuicultura además de potenciar el SI de los peces, se busca optimizar su crecimiento, para lo cual es común complementar la dieta con micronutrientes como el zinc o el selenio. Estos minerales son importantes ya que son cofactores de enzimas así como componentes fundamentales en la estructura de otras proteínas. El selenio forma parte del aminoácido seleno-cisteína que cumple un papel fundamental en la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa. Esta enzima participa en el metabolismo redox de los animales, descomponiendo especies reactivas del oxígeno. Se ha visto que la suplementación de selenometionina en la dieta normal del esturión *Huso huso* dio lugar a un notorio aumento en el peso de los mismos.[56]

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo.

Como fue descrito en la introducción la producción de esturiones en la planta uruguaya ERN se ve afectada por un aumento de la mortalidad en los meses de verano. Esto se acompaña con una mayor frecuencia de infecciones y consecuente aumento en la aplicación de antibióticos. En este contexto nos planteamos que las condiciones de verano pueden afectar los mecanismos de defensa de los esturiones, en particular el SII. Dado que los esturiones son peces de aguas frías que no regulan su temperatura corporal, resulta posible que el aumento de la temperatura constituya uno de los factores responsables de la disminución en la inmunidad.

2.2. Objetivos.

De acuerdo a la problemática de la granja ERN en esta tesina de licenciatura nos planteamos los siguientes objetivos:

- Generar herramientas para evaluar en suero la funcionalidad de dos componentes de la inmunidad innata del esturión: la VA del SC y la lisozima.
- Evaluar la actividad de estos componentes del SII en esturiones en condiciones de cultivo en la granja de piscicultura ERN, en distintas estaciones del año.
- Evaluar el efecto de la temperatura y de la administración del suplemento alimenticio Biopack en condiciones controladas de laboratorio sobre estos dos componentes de la inmunidad innata del esturión.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos.

Los reactivos químicos utilizados en esta tesis fueron: ácido etilen diamino tetra acético (EDTA), ácido etilen glicol tetra acético (EGTA) ambos de Applichem (Alemania); fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), gelatina de piel bovina, células de *Micrococcus lysodeikticus* y lisozima de gallina adquiridos de Sigma (USA); cloruro de sodio (NaCl) de Droguería Industrial Uruguaya (Uruguay); ácido 5,5-dietilbarbitúrico de Merk (Alemania); 5,5-dietilbarbitúrate de sodio de Fluka (Suiza); sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de Carlo Erba Reagents (Italia); ácido cítrico de Bakers Chemicals (USA); citrato de sodio de Chempapol (República Checa); reactivo de Bradford de Amresco (USA); albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) de New England Biolabs (Inglaterra). Los glóbulos rojos de conejo (GRC) fueron gentilmente cedidos por el bioterio del Instituto de Higiene.

3.2. Esturiones (*Acipenser baeri* y *Acipenser gueldenstaedtii*).

En esta tesis de licenciatura se trabajó con dos especies de esturión: *Acipenser baeri* y *Acipenser gueldenstaedtii*, que son criadas por el establecimiento de piscicultura ERN localizado en el embalse de Baygorria. La granja ERN cuenta con instalaciones diseñadas para el cultivo de esturiones con fines comerciales. Por lo cual, los mismos son criados en un sistema abierto de grandes piscinas de concreto (raceways) y piscinas más pequeñas en donde el agua del Río Negro circula de manera unidireccional, asegurando una renovación constante de la misma. Los esturiones son alimentados con una ración estándar que es preparada en la misma planta. Este establecimiento cuenta a su vez con un laboratorio húmedo de experimentación, que se encuentra separado de las unidades de cultivo de la granja. El mismo está equipado con varias piscinas de unos 300L aproximadamente, en las cuales es posible mantener en condiciones adecuadas entre 20-30 peces pequeños (300g). Aquí es posible realizar experimentos en condiciones controladas de temperatura, pH y nivel de O₂. Además, estas piscinas utilizan agua de perforación de muy alta pureza, según el análisis de contenido de Ca²⁺, dureza, amonio, nitrito, nitrato y fosfatos (laboratorio Skaphia-Montevideo). Esta agua se renueva varias veces al día de forma completa. A lo largo de mi trabajo utilizamos esturiones que provenían del sistema abierto de cultivo o del laboratorio húmedo, especificándose en cada caso.

3.3. Obtención de las muestras de suero de esturión.

Todas las muestras de sangre utilizadas en este trabajo fueron gentilmente donadas por la empresa ERN. Los esturiones fueron sangrados de la vena caudal por personal especializado de la granja ERN. La extracción de sangre se realizó en menos de 3 minutos para cada pez. La sangre se dejó coagular a 0°C durante 4 horas; el suero de esturión obtenido de cada individuo (SE) se separó por centrifugación a 2500g durante 20 minutos, se fraccionó y conservó a -80°C hasta su posterior utilización. Para la optimización de los métodos, se utilizó en algunos casos mezclas de sueros (pool, SEp), preparados a partir de volúmenes iguales de entre 5 y 10 individuos; los SEp se fraccionaron y conservaron en las mismas condiciones que las descriptas para los SE.

3.4. Determinación de la actividad funcional de la vía alternativa del sistema del complemento en suero de esturión.

3.4.1. Condiciones generales del ensayo hemolítico.

Para determinar la funcionalidad de la VA del suero de esturión se eligió un ensayo hemolítico. Este ensayo se basa en incubar al suero con GRC (como célula blanco del SC) en presencia de EGTA y Mg^{2+} . Estas condiciones aseguran la activación exclusiva de la VA. En una primera etapa, se siguieron protocolos descritos para el complemento humano[25] y otras especies de peces[57,58] que se adaptaron para el trabajo en microplaca de 96 pocillos. A tales efectos se trabajó con muestras de SE y SEp de las especies *Acipenser baeri* y *Acipenser gueldenstaedtii*. Previo a su utilización las muestras se centrifugaron por 20 minutos a 20.000g y 4°C para obtener una muestra límpida separando los posibles precipitados generados en el proceso de congelado y descongelado. La suspensión de GRC se preparó mezclando una relación de 2:6 volúmenes de sangre de conejo y citrato disódico al 3.8% (anticoagulante) respectivamente. Esta suspensión se lavó una vez con una solución 1:1 de citrato de sodio al 3.8% y NaCl150mM, dos veces con el tampón veronal 6.4mM, pH 7.4 conteniendo NaCl150mM, gelatina 0,1% y EDTA10mM (GVB-EDTA) y dos veces con el tampón veronal en el que se substituyó el EDTA por 10mM de EGTA y 10mM de Mg^{2+} (GVB-Mg-EGTA). Utilizando este último tampón se ajustó la suspensión de GRC a una concentración final de 0.8×10^8 cel/ml. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos y fondo en U en un volumen final de 200µl. En los pocillos de la placa se realizaron diluciones seriadas del suero, en un rango entre 1/10 – 1/640 y un volumen final de 50µl. Como control negativo se utilizó suero cuyo complemento fue inactivado por calor (30 minutos at 56 °C). En paralelo a las diluciones anteriores se ensayaron 50µl de tampón o 150µl de agua destilada para determinar el 0% y 100% de lisis respectivamente. Luego se agregaron 50µl de la suspensión de GRC 0.8×10^8 cel/ml a todos los pocillos y se incubó la placa durante 1hr en baño de agua para controlar la temperatura. De acuerdo con los antecedentes en otras especies de peces se utilizó en primera instancia una temperatura de 20°C.[58] Este tiempo de incubación permite que se active la VA y se forme el MAC sobre la superficie de los GRC, dando lugar a la lisis y liberación de hemoglobina al sobrenadante de reacción. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 100µl de la solución GVB-EDTA para detener la reacción, se centrifugó la placa 15 minutos a 800g y 4°C, se tomó el sobrenadante y se registró su absorbancia a 415nm. Para cada dilución del suero se determinó el porcentaje de lisis (Y) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$Y = \frac{Abs\ suero - Abs\ suero\ inactivado}{Abs\ 100\% - Abs\ 0\%}$, y se construyó el gráfico porcentaje de lisis en función del inverso de la dilución del suero. Los datos se ajustaron con la función sigmoidea Hill1 del programa Origin 8.5. (OriginLab Corp, USA) a partir de la cual se determinó la dilución del suero que provoca una lisis del 50% de los GRC. Este parámetro se denomina ACH50 (del inglés, *alternative complement pathway hemolytic titer*) y es el que indica la funcionalidad global de la VA de un suero determinado.

3.4.2. Optimización de la temperatura del ensayo hemolítico.

Con el objetivo de optimizar el ensayo se consideró importante examinar el comportamiento de la VA a diferentes temperaturas. Para esto se realizó el ensayo hemolítico descrito en el punto 3.4.1, en un rango amplio de temperaturas (8°C-37°C) para lo cual se utilizaron muestras de SEp de la especie *Acipenser baerii*. Los valores obtenidos de ACH50 se graficaron en función de la temperatura utilizando el programa Prisma 6.0 (GraphPad Sostware).

3.5. Determinación de los niveles de lisozima en suero de esturión.

La determinación de lisozima en suero de esturión se basó en un ensayo de actividad enzimática, y la optimización implicó adaptar y comparar la sensibilidad de dos variantes de este ensayo a las que llamaremos ensayo cinético y ensayo a punto final. El primero (ensayo cinético) es un ensayo en donde se evalúa el curso temporal de la reacción de la lisozima del suero, mientras que el segundo se registra la actividad luego de transcurrido un tiempo de incubación de varias horas (ensayo a punto final). En ambos ensayos se utilizó como sustrato o células blanco de la lisozima una suspensión de las bacterias gram positivas *Micrococcus lysodeikticus* (ML).[59] Esta suspensión presenta una turbidez inicial que disminuye al ser incubada con una muestra que contenga actividad lisozima, debido a la hidrólisis enzimática del polisacárido que compone la pared bacteriana. En ambas metodologías la actividad lisozima del suero se determina en función del descenso de turbidez.

3.5.1. Condiciones generales del ensayo cinético.

Como primera aproximación se siguieron protocolos para la determinación de la actividad lisozima en suero de peces teleósteos[60] y se adaptó el ensayo a una microplaca de 96 pocillos y fondo plano. Previo a su utilización las muestras de SE o SEp se centrifugaron por 20 minutos a 20.000g y 4°C para eliminar cualquier turbidez. Se preparó una suspensión de las células ML a 1_{mg/ml} en el tampón de actividad fosfato-citrato 180mM pH=5.80 (fosfato-citrato) a temperatura ambiente. Para realizar el ensayo se mezclaron 200µl de la suspensión de ML con 50µl de suero sin diluir. En paralelo, se ensayaron 50µl de tampón fosfato-citrato como control negativo, y 50µl de una solución de lisozima de gallina (10_{µg/ml} preparada en el mismo tampón) como control positivo. La disminución de la turbidez de estas muestras se registró cada 10 segundos durante 300 segundos a 450nm utilizando el equipo Varioskan Flash (Thermo Scientific). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado o triplicado. Se graficó la turbidez en función del tiempo y se determinaron las pendientes en las porciones lineales de los gráficos correspondientes a las muestras de SE y lisozima ensayadas, restando en cada caso la contribución del control negativo. Para esto se utilizó el programa Origin 8.5. Posteriormente se calcularon las unidades de actividad lisozima (UE) teniendo en cuenta que 1 UE corresponde a la disminución de 0.001 unidades de turbidez por minuto.[61] Se reporta la actividad lisozima por mililitro de muestra (UE/ml).

3.5.1.a. Optimización del ensayo cinético.

Para optimizar el ensayo cinético se mantuvieron las condiciones generales descriptas en el punto 3.5.1. variando algunos de los siguientes parámetros: temperatura, longitud de onda, concentración de sustrato (suspensión de ML).

3.5.1.b. Optimización de la temperatura.

Para mejorar la sensibilidad del ensayo cinético, se determinó la actividad lisozima de un SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* a tres temperaturas diferentes: 20°C, 25°C y 30°C. Las suspensiones de ML fueron preincubadas a la temperatura deseada durante 10 minutos en baño de agua y el espectrofotómetro en donde se siguió la reacción se colocó a la misma temperatura. Transcurrido este tiempo de incubación se registró la actividad de la muestra por triplicado como se indica en el punto 3.5.1.

3.5.1.c. Selección de la longitud de onda.

Se seleccionó la longitud de onda del ensayo para evitar que el suero aportara turbidez a la mezcla de reacción. Para esto, se registró la longitud de onda entre los 400-600nm de cada uno de los componentes del ensayo cinético. Los registros se efectuaron de manera simultánea en una microplaca de 96 pocillos y fondo plano utilizando el espectrofotómetro Varioskan Flash. El espectro de los sueros se determinó utilizando 250µl de una dilución al 1/5 de SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* o *Acipenser baerii* en tampón fosfato-citrato. Por otro lado, se registró el espectro de 250µl de una suspensión 0.8_{mg/ml} de ML en el mismo tampón. De esta manera las concentraciones finales de SE y ML fueron idénticas a las del ensayo cinético descrito anteriormente. Como controles negativos, se registró el espectro de 250µl del tampón fosfato-citrato o agua destilada.

3.5.1.d. Optimización de la concentración de sustrato *Micrococcus lysodeikticus*.

Se prepararon suspensiones de ML a una concentración de 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 y 1.0_{mg/ml} y se determinó la turbidez a 550nm de 250µl de cada una de estas suspensiones. Todas las medidas se realizaron por duplicado, en microplaca, de manera simultánea y a temperatura ambiente. Se construyó el gráfico turbidez en función de la concentración de ML y los datos fueron ajustados utilizando el programa Origin 8.5. a una función polinómica de tercer grado o a una función lineal en los rangos que se indican en resultados.

3.5.1.e. Limite de detección del ensayo cinético.

Para evaluar el límite de detección del ensayo cinético se ensayaron diluciones de SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* en el rango (1/1-1/80) paralelamente se ensayaron diluciones de la lisozima comercial en un rango (10-0.3125_{µg/ml}). El ensayo se realizó en las condiciones generales descritas en el punto 3.5.1., utilizando los parámetros optimizados en los puntos 3.5.1.2-4. En este caso, se evaluó el descenso de la turbidez cada 20 segundos, durante 450 segundos con el fin de aumentar la sensibilidad del análisis. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Siempre que fue posible se determinó la actividad de cada dilución tal como se describió en el punto 3.5.1.

3.5.2. Ensayo a punto final.

3.5.2.a. Optimización del tiempo.

Para ajustar un ensayo a punto final se utilizaron los parámetros optimizados para el ensayo cinético (temperatura, longitud de onda, concentración de ML, tampón, volúmenes de suero y ML). Con el fin de determinar el tiempo óptimo, se midió el descenso en la turbidez de la suspensión de ML (0.5_{mg/ml}) provocado por las diluciones 1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64 del SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* luego de 1; 2; 3; 4 y 5 horas de incubación en estufa a 30°C (Thermo Scientific). En paralelo se evaluaron las siguientes diluciones de lisozima comercial: 10; 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 y 0.15625_{µg/ml} y el tampón fosfato-citrato como control negativo. Cada medida se realizó por duplicado, efectuándose a su vez dos ensayos independientes. Con los resultados obtenidos se graficó el descenso de la turbidez en función del tiempo para las diluciones de SEp, lisozima comercial y el tampón fosfato-citrato como control utilizando el programa Origin 8.5.

3.5.2.b. Diseño de la curva estándar.

Una vez seleccionado el tiempo óptimo de la reacción (4 horas) se analizaron diferentes diluciones de la lisozima comercial (5; 4; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 y 0.15625_{µg/ml}) utilizando el tampón fosfato-citrato como control negativo. Se calculó la diferencia de turbidez para cada dilución y se construyó el gráfico diferencia de turbidez final respecto a la inicial en función de la concentración de lisozima. Éste se ajustó a una función polinómica de tercer orden utilizando el Origin 8.5.

3.5.3. Comparación del ensayo lisozima a punto final y cinético.

Se determinaron mediante el ensayo cinético y a punto final los niveles de lisozima en SE de 13 individuos de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* con un peso en el entorno de los 300g mantenidos en el laboratorio húmedo de la granja ERN. Los resultados obtenidos con cada metodología fueron graficados con el programa Origin 8.5. La existencia de correlación entre ambas metodologías se evaluó con el test de correlación de Pearson (Prisma 6.0) y se consideró estadísticamente significativa cuando el valor p fue menor a 0.05.

3.6. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron en las muestras de SE utilizando el método de Bradford.[62] Brevemente, las muestras de SE se diluyeron 1/100 en tampón fosfato-citrato. El ensayo se realizó con 7µl de dicha dilución y 140µl del reactivo de Bradford. Para determinar la curva de calibración, se mezclaron con el mismo reactivo, 7µl de diluciones seriadas de BSA en el rango 50-800_{µg/ml}. Se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 550nm. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en microplaca de 96 pocillos y fondo plano con un espectrofotómetro (Mrclab). Se graficó la Absorbancia en función de la concentración de BSA, ajustando los datos a una función polinómica de tercer grado con el programa Origin 8.5. A partir de ésta, se determinaron los niveles de proteína en las muestras.

3.7. Experimento en condiciones de cultivo: Evaluación de las defensas innatas en los esturiones criados en diferentes estaciones del año.

Con el objetivo de analizar el estado sanitario de los esturiones en distintos momentos del año, se realizó un muestreo de sangre en febrero y otro en julio de 2014 de esturiones hembras de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* mantenidos en las piscinas (raceways) de la granja. En dichos meses de muestreo se sangraron 10 esturiones hembras de la zafra 2005, y de la zafra 2010, de forma tal de realizar el estudio en peces de diferente edad. Los SE fueron procesados como se describió en el punto 3.3. y en ellos se analizó la funcionalidad de la VA mediante el ensayo hemolítico, y los niveles de lisozima mediante el ensayo de actividad a punto final. Ambas actividades se determinaron utilizando las condiciones optimizadas para cada ensayo las cuales se detallan en la tabla 3.1. A su vez se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

Parámetros	Funcionalidad de la VA: ensayo hemolítico	Actividad lisozima: ensayo a punto final
Tampón	GVB-Mg-EGTA	Fosfato-citrato
Células	GRC a 0.8×10^8 cel/ml	ML 0.5mg/ml
Temperatura	20°C	30°C
Longitud de onda	415nm	550nm
Tiempo	1 hora	4 horas

Tabla 3.1.) Condiciones óptimas para la actividad de la VA (ensayo hemolítico) y la actividad lisozima (ensayo a punto final).

3.8. Experimento en el laboratorio húmedo: Efecto de la alta temperatura y del suplemento Biopack sobre la inmunidad innata.

Para evaluar el efecto de la temperatura y la administración del suplemento alimenticio Biopack (Actigen+Se-plex+BioplexZn, Alltech, USA) sobre el estado sanitario de los esturiones se realizó un experimento en el invierno en conjunto con la empresa ERN utilizando el laboratorio húmedo de dicha empresa. Como ya se mencionó este laboratorio cuenta con piletas para el mantenimiento de los peces en condiciones controladas de O₂, pH y temperatura. En las piletas se colocaron peces de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* de 2 años de edad (zafra 2013) no sexados, de peso aproximado de 300g distribuyéndolos en 4 grupos de acuerdo con el siguiente detalle:

Control 18°C: 20 esturiones mantenidos a 18°C, con un régimen de alimentación con ración estándar.

Suplemento 18°C: 20 esturiones mantenidos a 18°C, con un régimen de alimentación con ración estándar suplementada con el complemento nutricional de Alltech.

Control 24°C: 20 esturiones mantenidos a 24°C, con un régimen de alimentación con ración estándar.

Suplemento 24°C: 20 esturiones mantenidos a 24°C, con un régimen de alimentación con ración estándar suplementada con el complemento nutricional de Alltech.

Los peces fueron individualizados mediante la colocación de un microchip (D.A.T.A.M.A.R.S, Uruguay) al inicio del experimento y se aclimataron durante 3 días en las

piletas a las temperaturas indicadas. Los esturiones fueron alimentados a una tasa de diaria del 2% de su peso corporal, que aseguró condiciones de crecimiento. El suplemento Biopack se administró, en una proporción de 0.25% en la ración. Para este estudio, a los días 0, 20 y 37 post-administración del suplemento se monitoreó el peso y se obtuvo suero de los esturiones como fue descrito en el punto 3.3. En el suero se analizó la funcionalidad de la VA, la actividad lisozima (utilizando las condiciones óptimas descritas en la Tabla 3.1) y los niveles de proteína plasmática total.

3.9. Análisis estadístico general de los experimentos.

Para comparar los pesos y los niveles lisozima, proteína y funcionalidad de la VA en los experimentos descritos en los puntos 3.7 y 3.8, se utilizaron los programas de análisis estadístico Prisma versión 6 y Minitab 17 (Minitab Inc. USA). En primer lugar se evaluó si los parámetros analizados en ambos experimentos seguían una distribución normal mediante el test de D'Agostino & Pearson. Cuando los datos no presentaron distribución normal se buscó transformar estos valores aplicando las siguientes transformaciones matemáticas $Y=\log(Y)$, $Y=\sqrt{Y}$ o una combinación de las anteriores $Y=\sqrt{\log(Y)}$, en donde Y representa ACH50, concentración de proteína, nivel de lisozima, o peso. Posteriormente se evaluó si el conjunto de datos poseía homogeneidad de varianza mediante el test de Brown-Forsythe.

3.9.1. Análisis estadístico del experimento en condiciones de cultivo.

Cuando los parámetros analizados tuvieron distribución normal y homogeneidad de varianza se aplicó el test ANOVA de una sola vía con post test de comparación múltiple de Tukey. Cuando los datos presentaron normalidad, pero no homogeneidad de varianza, se aplicó el test ANOVA con post test de Games-Howell. Estos dos test fueron aplicados sobre el total de los datos y las diferencias estadísticamente significativas (p valor < 0.05) se indican con * y *' respectivamente. Los subgrupos (hembras de 4 años y hembras de 9 años) fueron analizados con un t-test cuando los datos presentaron normalidad y homogeneidad de varianza o con un t-test con corrección de Welch cuando presentaron distribución normal sin homogeneidad de varianza. En este caso, las diferencias estadísticamente significativas (p valor < 0.05) se indican con # o #' respectivamente. Por otra parte, se construyeron los gráficos ACH50 y actividad lisozima en función de los niveles de proteína con el programa Origin 8.5. La existencia de correlación entre los parámetros graficados se evaluaron con el test de

correlación de Pearsons (Prisma 6.0) y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor p fue menor a 0.05.

3.9.2. Análisis estadístico del experimento en el laboratorio húmedo.

Para este experimento los análisis se realizaron con los datos sin normalizar o con los datos de cada individuo normalizados por el día 0, lo cual fue posible gracias a la incorporación del microchip. Al igual que el experimento realizado en condiciones de cultivo, se aplicó el test ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey cuando los datos fueron normales y tuvieron homogeneidad de varianza o el ANOVA con post-test de Games-Howells cuando no presentaron homogeneidad de varianza. Cuando los datos no tuvieron distribución normal ni homogeneidad de varianza se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con el post test de comparación múltiple de Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05 y las mismas se indican con un * cuando el análisis correspondiente se efectuó utilizando la totalidad de los datos, o se indican con un # cuando el análisis se realizó dentro de un subgrupo (misma temperatura; mismo régimen de alimentación) del conjunto total de datos.

4. Resultados.

En esta sección se describen los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos específicos planteados:

- En 4.1. Optimización de herramientas para evaluar en suero la funcionalidad de dos componentes de la inmunidad innata del esturión.
- En 4.2. Experimento en condiciones de cultivo: Evaluación de las defensas innatas en los esturiones criados en diferentes estaciones del año.
- En 4.3. Experimento en el laboratorio húmedo: Efecto de la alta temperatura y del suplemento Biopack sobre la inmunidad innata.

4.1. Optimización de herramientas para evaluar en suero la funcionalidad de dos componentes de la inmunidad innata del esturión.

4.1.1. Optimización de un ensayo hemolítico para cuantificar la actividad de la vía alternativa del sistema del complemento.

4.1.1.a. Condiciones generales del ensayo hemolítico.

El ensayo hemolítico consiste en incubar diluciones de suero en presencia de GRC en condiciones que permitan la activación selectiva de la VA del SC. Como se mencionó previamente, la activación del SC sobre los GRC dará lugar a la formación del MAC, seguido de la lisis celular y liberación de hemoglobina. Como ya fue explicado en materiales y métodos, a partir de la liberación de hemoglobina se determina el ACH₅₀ que es el inverso de la dilución del suero capaz de producir el 50% de la lisis de los GRC. El ACH₅₀ es el parámetro que se utiliza para cuantificar la funcionalidad de la VA; cuanto mayor sea su valor mayor es la actividad o funcionalidad de dicha vía. Para evaluar exclusivamente la funcionalidad de la VA se aseguró que las otras vías de activación (VC y VL) permanecieran apagadas durante el transcurso del ensayo. Para esto se suplementó el suero con EGTA, el cual es un quelante muy eficiente del ion Ca²⁺, que es necesario sólo para la actividad de las vías clásica y de las lectinas. A su vez, el suero se debe suplementar con el ion Mg²⁺ que es necesario para la formación de la convertasa de la VA y es quelado en menor medida por el EGTA.

La puesta a punto de este ensayo hemolítico se realizó a partir de la información disponible del ensayo en otros peces, como se indica en materiales y métodos, en los cuales se utiliza como óptima una concentración de Mg²⁺ y EGTA de 10mM y una concentración 0.8×10^8 cel/ml de GRC. En primer lugar se adaptaron los protocolos descritos para realizar el ensayo en una microplaca y se ensayaron diluciones seriadas de 1/10 – 1/640 utilizando para la incubación una temperatura de 20°C. En estas condiciones se logró detectar actividad de la VA en SE y SEp.

Luego se buscó verificar la reproducibilidad del ensayo hemolítico, para lo cual se realizaron tres ensayos independientes utilizando SE de la especie *Acipenser gueldenstaedtii*, estos resultados se muestran en la Figura 4.1.1. A. Se obtuvo un valor medio de 132 Unidades de ACH₅₀ (U/ml) con un desvío estándar entre experimentos de 8 Unidades de ACH₅₀ (U/ml) (corresponde a un error relativo del 6%), mostrando que el ensayo ajustado en nuestro

laboratorio es una metodología reproducible que puede ser utilizada para determinar la funcionalidad de la VA del SC del esturión.

4.1.1.b. Optimización de la temperatura del ensayo hemolítico.

El hecho de que los esturiones sean peces originarios de climas fríos nos hizo sospechar que el SC del esturión podría ser más activo a temperaturas inferiores que las reportadas para el SC humano (37°C).[25] Por lo tanto, se evaluó la funcionalidad de la VA del esturión a distintas temperaturas. Estos resultados evidenciaron que la funcionalidad de la VA es máxima en el entorno de los 20°C y disminuye aproximadamente un 50% a 37°C (Figura 3.1.1.B). Se hace notar que la actividad no varió de forma significativa en el rango entre 8-20°C. En función de estos resultados, todos los ensayos hemolíticos posteriores se realizaron a 20°C ya que a esta temperatura se maximiza la sensibilidad del ensayo. La temperatura óptima de funcionamiento de la VA del esturión fue similar a la de otros peces teleósteos como la tenca (Tinca tina).[58] De la comparación de la Figura 4.1.1. A y 4.1.1. B se observa que la actividad a 20°C del SEp de *Acipenser baerii* fue aproximadamente 5 veces menor a la actividad del SE de *Acipenser gueldenstaedtii*. Una explicación para esta diferencia es que al mezclar los sueros individuales que dieron lugar al SEp se hayan formado inmunocomplejos que permitieran la activación y consumo de las proteínas del SC. Alternativamente esta diferencia podría deberse a que la funcionalidad de la VA es mayor en *Acipenser gueldenstaedtii* que en *Acipenser baerii*, o simplemente a que existe una variabilidad importante de este parámetro dentro de la población de esturiones y por azar contamos con muestras con actividad dispar.

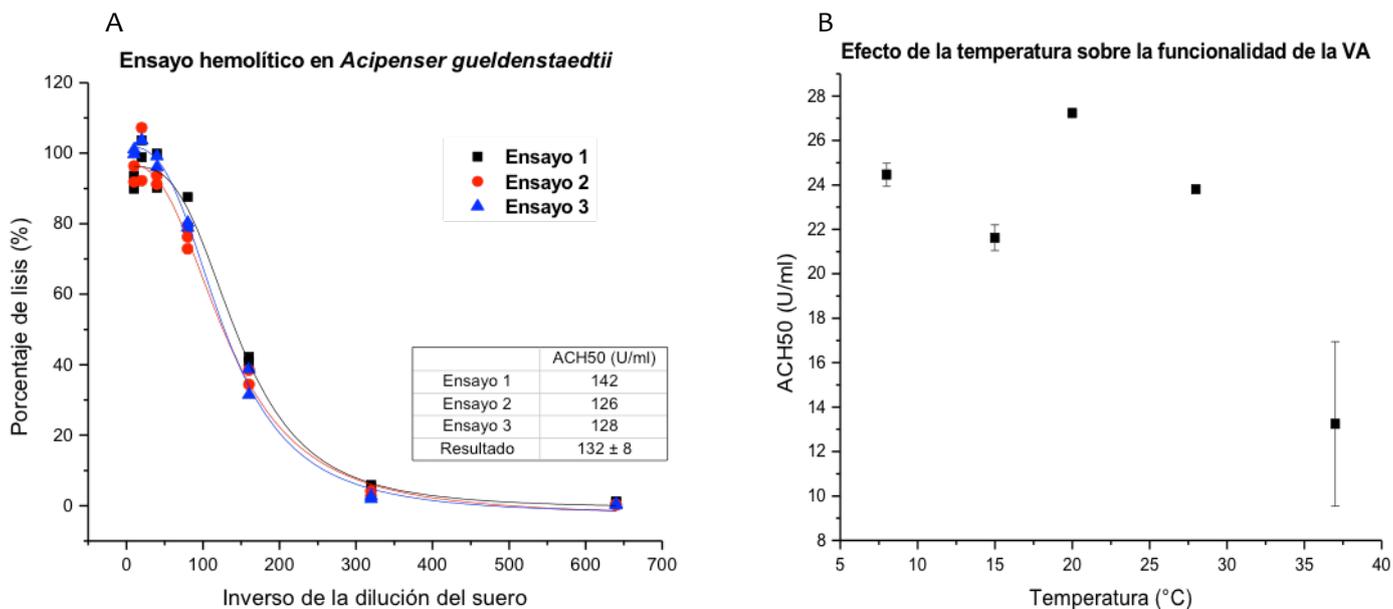


Figura 4.1.1.) Panel A. Reproducibilidad del ensayo hemolítico. Gráficos de porcentaje de lisis en función del inverso de la dilución del suero correspondientes a tres ensayos hemolíticos independientes con SE de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* sangrado en octubre de 2013. Se aplicó la función sigmoidea Hill1 (Origin 8.5.) a partir de la cual se determinó el ACH50. En la tabla de la misma figura se muestra el valor de ACH50 para cada ensayo junto con el valor medio y su error. Panel B. Efecto de la temperatura en la actividad de la VA del complemento de SEp de la especie *Acipenser gueldenstaedtii*. El ensayo se realizó incubando el SEp durante 1 hora a 8, 15, 20, 27 y 37°C. El valor de ACH50 reportado para cada temperatura representa la media de dos ensayos independientes y las barras de error la desviación estándar.

4.1.2. Optimización de un ensayo espectrofotométrico para cuantificar la actividad lisozima del suero de esturión.

Como se mencionó previamente, la lisozima es una enzima antimicrobiana capaz de catalizar la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina que conforman el peptidoglicano de la pared bacteriana. Por lo tanto, es posible determinar la actividad lisozima de una muestra biológica, como el suero de esturión, utilizando células gram positivas como sustrato de esta enzima. Básicamente el ensayo consiste en cuantificar el descenso de la turbidez de una suspensión de células de *ML* producido por la actividad lisozima de la muestra. Nos planteamos evaluar la actividad utilizando dos modalidades alternativas de este ensayo, que se diferencian básicamente en el tiempo de reacción. En la primera modalidad, ensayo cinético, se sigue la actividad de la enzima durante 300 segundos, mientras que en la segunda se registra la actividad luego de transcurrido un tiempo de incubación de varias horas (ensayo a punto final). En primer lugar se ajustó el ensayo cinético y los parámetros optimizados para esta modalidad se implementaron luego en el ensayo a punto final.

4.1.2.a. Condiciones generales del ensayo cinético.

Inicialmente el ensayo cinético se realizó en las condiciones descritas para otros peces como se especifica en la metodología adaptando el mismo a una microplaca de 96 pocillos, de forma tal de poder realizar varias medidas en simultáneo y por duplicado o triplicado. En la Figura 4.1.2. se muestran los resultados obtenidos para un SEp de *Acipenser gueldenstaedtii*. A partir de estos resultados se concluye que el método cinético permite determinar la actividad lisozima en las muestras de suero de esturión.

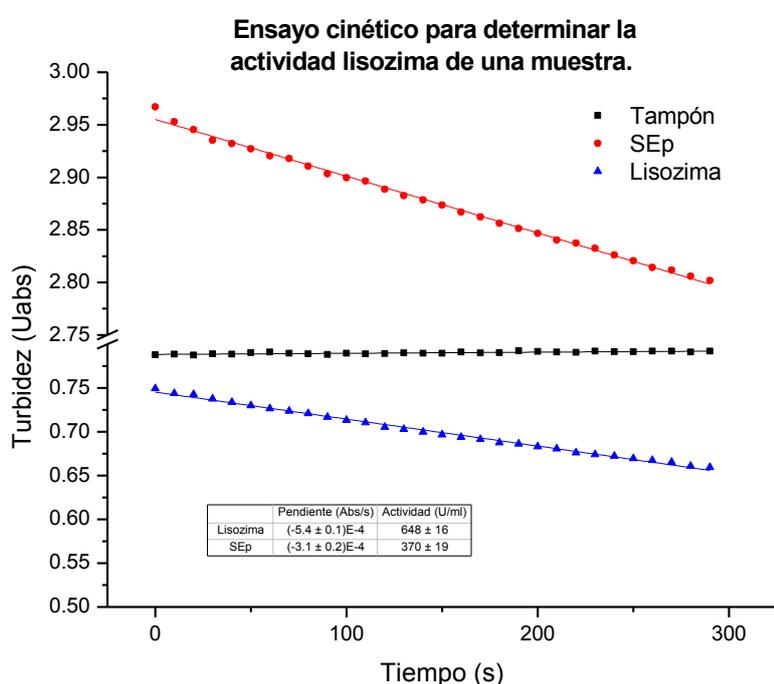


Figura 4.1.2.) Ensayo cinético. Se grafica el valor medio de tres réplicas analíticas correspondientes a la turbidez del sustrato ML en función del tiempo para un SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* (rojo), $10_{\mu\text{g/ml}}$ de lisozima de gallina (azul) y para el tampón fosfato-citrato (negro). En la tabla se reportan las pendientes (Abs/s) y la actividad lisozima (U/ml) obtenidas para el SEp y lisozima comercial, expresadas como el valor medio \pm el desvío estándar de tres réplicas analíticas.

4.1.2.b. Optimización de la temperatura.

Buscando mejorar el ensayo cinético, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad lisozima de un SEp de *Acipenser gueldenstaedtii*. Para esto se ensayaron tres temperaturas diferentes 20°C , 25°C , y 30°C . Estos resultados, que se muestran en la Figura 4.1.3., evidencian que la actividad lisozima del suero aumenta a medida que aumenta la temperatura. Esto está de acuerdo con resultados obtenidos para la lisozima de salmón (*Salmo gairdneri*) en donde se observó un aumento en la actividad de esta enzima con la temperatura.[46] De acuerdo a estos resultados, todos los ensayos futuros fueron realizados a una temperatura de 30°C ya que de esta manera se logra una mayor sensibilidad del ensayo e

independencia de las fluctuaciones de la temperatura ambiente, que introducirían variaciones entre ensayos realizados en diferentes días. El aumento en la actividad de la lisozima de esturión con la temperatura fue opuesto al comportamiento que presentó la VA del SC (disminuyó a 37°C). En el caso de la lisozima, el aumento de la temperatura dentro de un rango que no afecte su estructura conducirá probablemente al aumento de la actividad. En cambio en el caso del complemento se conoce que varios de sus componentes son termolábiles, particularmente el factor B.[21] En peces no se conoce exactamente a que temperatura el factor B se inactiva, pero sabemos que la actividad funcional de la VA es sensible a los 40°C lo cual explica nuestros resultados.[63]

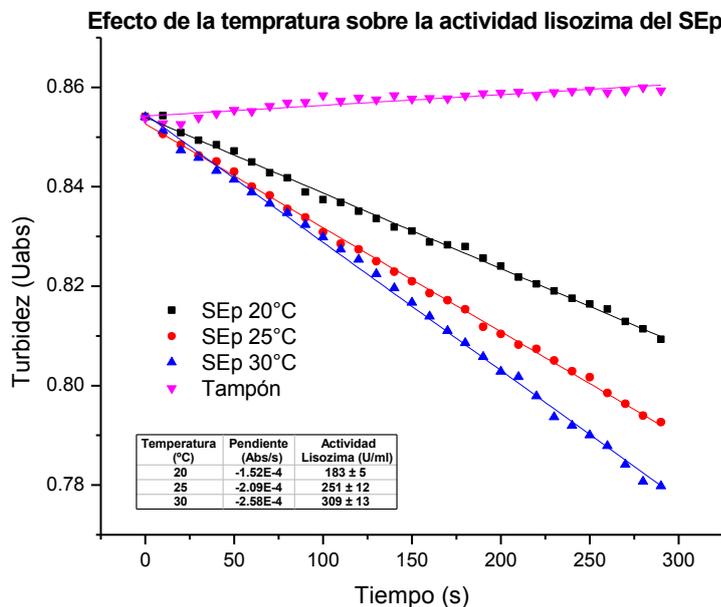


Figura 4.1.3.) Efecto de la temperatura sobre la actividad lisozima del SEp. Se cuantificó la actividad lisozima de un SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* a 20°C (negro), 25°C (rojo) o 30°C (azul). Como control negativo del ensayo se utilizó tampón (violeta) y como control positivo, lisozima comercial (no se muestra en el gráfico). Cada gráfico representa la media de tres réplicas analíticas de un único ensayo. En la tabla se reporta la actividad lisozima (U/ml) obtenida para cada temperatura, expresada como el valor medio \pm la desviación estándar de las tres réplicas analíticas.

4.1.2.c. Optimización de la longitud de onda.

Tradicionalmente la actividad lisozima en muestras biológicas se determina evaluando la disminución de la turbidez a 450nm. Sin embargo, como se puede ver en los resultados de la Figura 4.1.2., a dicha longitud de onda la coloración del suero contribuye a la turbidez inicial de manera significativa. Con el objetivo de maximizar la sensibilidad del ensayo y evitar registrar valores de turbidez superiores al límite de detección del espectrofotómetro, se realizó un espectro visible de los distintos componentes del ensayo. A partir de los resultados de la Figura 4.1.4. se observa que el suero de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* tiene un máximo

de absorbancia a los 450nm, y absorbe de forma importante entre los 400 y 500nm. Esta absorbancia posiblemente esté relacionada con el intenso color amarillo-anaranjado que presenta dicho suero. Por otro lado, el suero de la especie *Acipenser baerii* presenta menor absorbancia en este rango de longitudes de onda y un pico en el entorno de los 415nm posiblemente debido a su color rosado. En base a estos resultados, se decidió trabajar a una longitud de onda de 550nm ya que ambos sueros muestran una absorbancia despreciable en relación a la de la suspensión de células de ML, y esta última sigue siendo lo suficientemente alta como para seguir la lisis de las mismas.

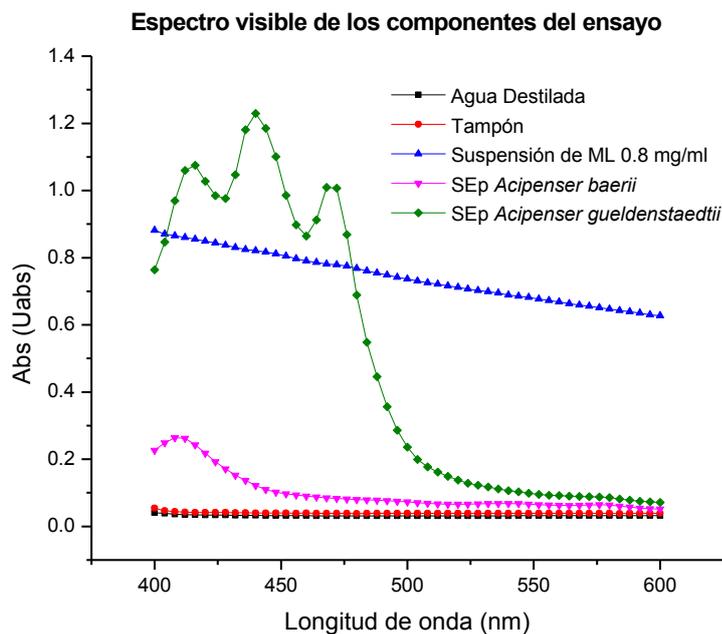


Figura 4.1.4.) Espectro Visible (400-600nm) de los componentes del ensayo para la determinación de la actividad lisozima. Se determinaron los espectros del SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* (verde) y de *Acipenser baerii* (rosado) diluidos 1/5 en tampón de actividad, y el de la suspensión de ML a una concentración final de 0.8_{mg/ml} (azul). Como control negativo se determinó el espectro del agua destilada (negro) y del tampón de actividad (rojo). Todos los espectros fueron realizados en simultáneo con el espectrofotómetro Varioskan Flash, en un volumen final de 250 µl utilizando las mismas concentraciones finales de células y SE que se emplea en los ensayos de actividad.

4.1.2.d. Optimización de la concentración del sustrato *Micrococcus lysodeikticus*.

Con el fin de optimizar la concentración de células a utilizar en el ensayo se evaluó la turbidez inicial a 550nm de la suspensión de ML en un rango de concentraciones de 0.1-1.0_{mg/ml}. Los resultados obtenidos Figura 4.1.5 mostraron que la turbidez no es lineal entre 0.1 y 1.0_{mg/ml} por lo cual trabajar con una concentración final de 0.8_{mg/ml}, como se hizo en los experimentos anteriores, hace posible que se esté subestimando la actividad lisozima, conduciendo a una pérdida de sensibilidad del ensayo. Para estimar esta pérdida se calcularon dos pendientes, la primera entre 0.1 y 0.4_{mg/ml} (0.71) y la segunda entre 0.6 y 0.8_{mg/ml} (1.04). Esta diferencia en las pendientes significa que realizar el ensayo con una concentración de ML final de 0.4_{mg/ml} en vez de 0.8_{mg/ml} permite aumentar la sensibilidad en un 32%. La segunda ventaja es que se logra

economizar el reactivo. Por estos dos motivos todos los ensayos futuros fueron realizados a dicha concentración final de células. Cabe remarcar que a estas concentraciones, el sustrato sigue estando en exceso respecto a la enzima lo cual es fundamental para asegurar que la reacción transcurra a velocidad máxima.

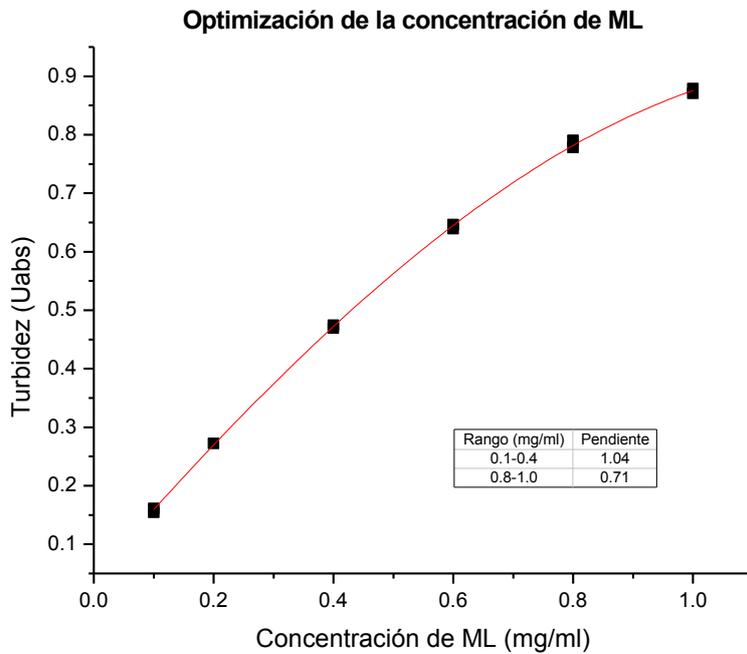


Figura 4.1.5.) Optimización de la concentración de sustrato ML. Se evaluó la turbidez de la suspensión de ML en un rango de concentraciones de 0.1-1.0_{mg/ml}. Los datos fueron ajustados a una función polinómica de tercer grado. Los mismos datos fueron ajustados a una recta en los rangos de concentración (0.1-0.4_{mg/ml}) y (0.6-0.8_{mg/ml}) determinando en cada caso las pendientes que se muestran en la tabla.

4.1.2.e. Límite de detección del ensayo cinético.

Para utilizar este ensayo en el monitoreo del estado sanitario de los esturiones es importante conocer su límite de detección de forma tal de que sea posible detectar actividad lisozima en las muestras individuales que se pretende analizar. A tales efectos, utilizando las condiciones generales del análisis y los parámetros optimizados en los puntos anteriores, se determinó la actividad lisozima de diluciones seriadas (1/1-1/80) de un SEP de la especie *Acipenser gueldenstaedtii*. Paralelamente, se determinó el límite de detección de diluciones seriadas de 10_{µg/ml} de lisozima comercial como control. A partir de los resultados de la Figura 4.1.6. se concluye que es posible detectar actividad lisozima hasta una dilución 1/5 del SEP y hasta 5.0_{µg/ml} de lisozima comercial, ya que a diluciones mayores no se logran distinguir caídas en la turbidez respecto al tampón. Es importante notar que este análisis se realizó con un SEP que presentaba una elevada actividad lisozima (355U/ml), respecto a otras muestras evaluadas

a lo largo del trabajo. Esto sugiere que la sensibilidad del método cinético podría no ser suficiente para cuantificar la actividad lisozima en muestras de suero individuales.

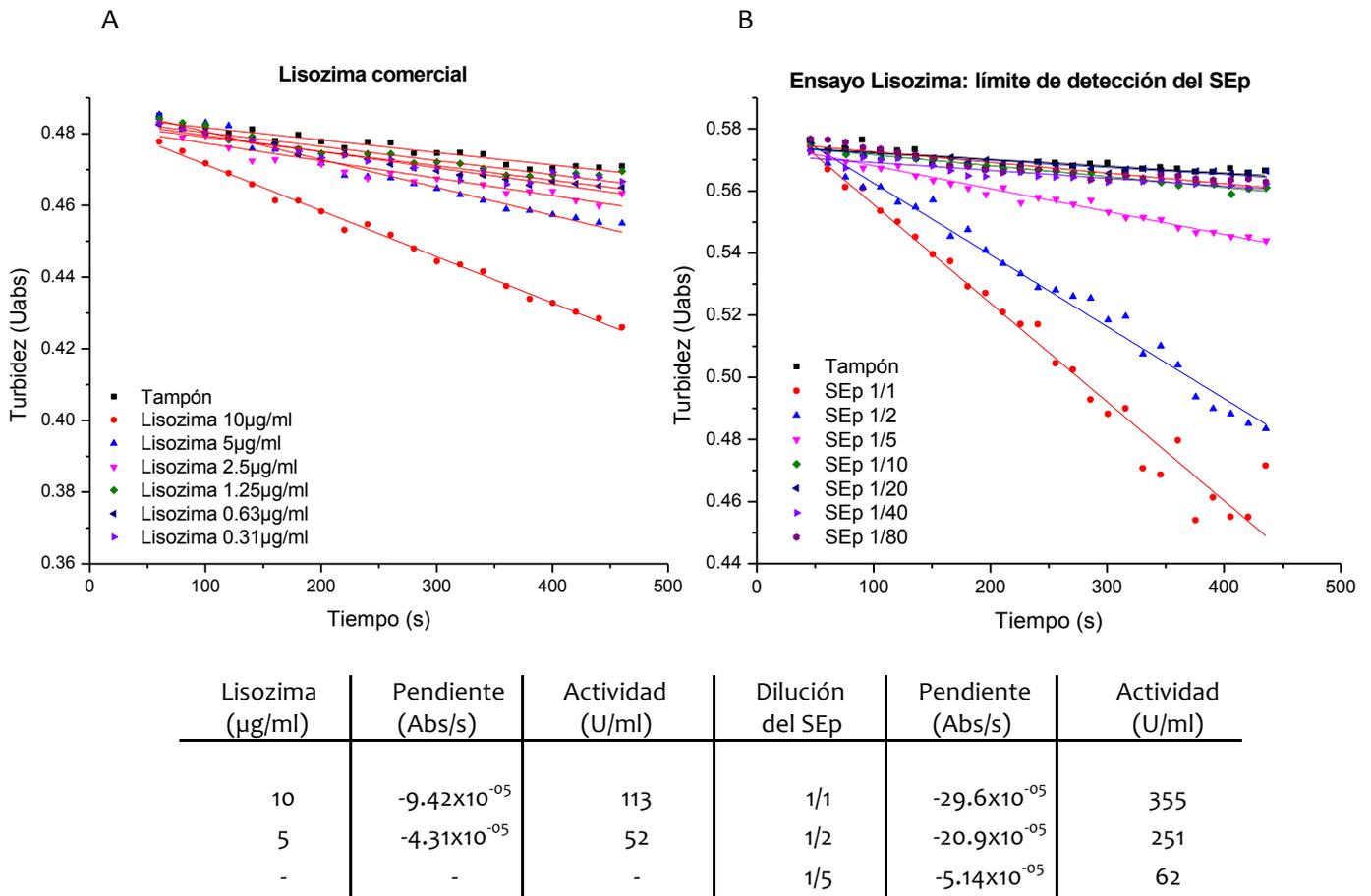


Figura 4.1.6.) Determinación del límite de detección de la actividad lisozima en el ensayo cinético. Se evaluaron las concentraciones 10; 5; 2.5; 1.25; 0.63 y 0.31 µg/ml de lisozima comercial (panel A) y las diluciones 1/1; 1/2; 1/5; 1/10; 1/20; 1/40 y 1/80 de SEp de *Acipenser gueldenstaedtii* (panel B). Cada gráfico representa la media de dos replicas analíticas de un único experimento. El tiempo total del ensayo fue de 450 segundos y se registró la turbidez en intervalos de 15 segundos. Las rectas fueron ajustadas entre los 50 y 450 segundos. En la tabla se muestran los valores de pendiente y actividad para las diluciones de SEp y lisozima comercial en donde se detectó actividad lisozima (por comparación con el valor obtenido para el control negativo, que mostró una pendiente de $3.6 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ (Abs/s)).

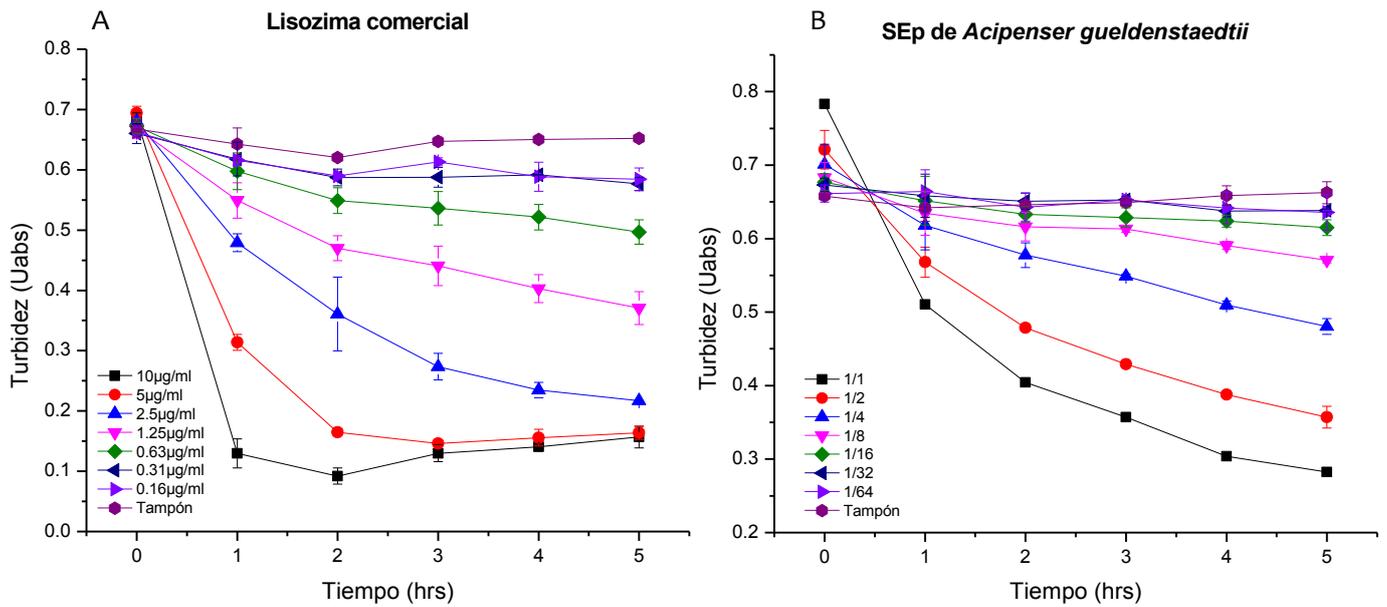
4.1.3. Optimización del ensayo a punto final.

Cuando se comenzó a utilizar el ensayo cinético se detectaron dos grandes problemas. En primer lugar, debido a la baja sensibilidad del método, muchas veces fue difícil reportar un valor de actividad lisozima para muestras de SE y SEp. En segundo lugar la manipulación se volvió tediosa a la hora de analizar múltiples muestras. Buscando solucionar estas dos

problemáticas, se optimizó un ensayo a punto final, que consistió en incubar el suero con la suspensión de ML y determinar la actividad como la diferencia de turbidez de la muestra respecto a su valor inicial luego de transcurrido un período prolongado de incubación (medido en horas) con el sustrato ML. En paralelo se corrió un estándar de lisozima comercial que se utilizó para asignarle un valor en $\mu\text{g/ml}$ de lisozima a las muestras de SE analizadas. Debido a la similitud con el ensayo cinético, los parámetros optimizados anteriormente como la temperatura, la longitud de onda, la concentración de ML, los volúmenes de suero y de células, fueron conservados.

4.1.3.a. Optimización del tiempo y de la curva estándar del ensayo a punto final.

La optimización del ensayo a punto final implicó en primer lugar hallar el tiempo de incubación al cual se logra una buena sensibilidad del ensayo, y en segundo lugar determinar las concentraciones de lisozima a utilizar para preparar una curva estándar. Con el fin de determinar el tiempo óptimo, se evaluó el descenso en la turbidez de diluciones del SEp de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* y de la lisozima comercial luego de transcurridas 1, 2, 3, 4 y 5 horas de incubación. (Figura 4.1.7.) A partir de estos resultados se aprecia que prolongar el tiempo de la reacción repercute en un aumento en la sensibilidad del ensayo, de acuerdo con la medida de actividad de diluciones de la lisozima comercial (Figura 4.1.7. A) o del SEp (Figura 4.1.7. B). En concreto, luego de transcurridas 4 horas de incubación se distinguió actividad respecto al tampón en la dilución 1/16 del SEp y en una solución $0.31\mu\text{g/ml}$ de lisozima comercial (Tabla Figura 4.1.7.). Recordando que para el ensayo cinético (Figura 4.1.6.) los límites de detección fueron de $5.0\mu\text{g/ml}$ para la lisozima comercial y una dilución 1/5 para SEp, se desprende que utilizar el ensayo a punto final significa un aumento de entre 4 y 16 veces en la sensibilidad, dependiendo de la muestra analizada; esta diferencia en el aumento podría deberse a la turbidez y complejidad inherente del suero, que está presente en la solución de lisozima. En función de estos resultados se seleccionó un tiempo de 4 horas de incubación el cual representa el mejor balance entre sensibilidad y duración del ensayo.



Lisozima comercial		SEp	
µg/ml	Δturbidez (UAbs)	Dilución	Δturbidez (UAbs)
10	0.54 ± 0.01	1/1	0.48*
5	0.54*	1/2	0.33 ± 0.03
2.5	0.45 ± 0.02	1/4	0.19 ± 0.02
1.25	0.27 ± 0.01	1/8	0.09 ± 0.02
0.63	0.15 ± 0.01	1/16	0.05*
0.31	0.07 ± 0.02	1/32	0.04*
0.16	0.07 ± 0.03	1/64	0.02 ± 0.01
Tampón	0.02 ± 0.02	Tampón	0.01*

Figura 4.1.7.) Determinación del límite de detección de la actividad lisozima en el ensayo a punto final. Se evaluó el descenso de la turbidez inicial de la suspensión de ML luego de 1, 2, 3, 4 y 5 horas de incubación ensayando diluciones de lisozima comercial (10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 y 0.16_{µg/ml}) (Panel A) o deSEp de *Acipenser gueldenstaedtii* (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) (Panel B). Los datos de las figuras A y B corresponden a la media y las barras de error a la desviación estándar obtenida a partir de los dos ensayos independientes, cada uno realizado por duplicado. En la tabla se muestra para las diluciones de lisozima comercial y SEp la diferencia de turbidez media y su desviación estándar correspondientes a 4 horas de incubación. Cuando el error fue menor a 0.01 se indica con *

Para determinar las concentraciones óptimas de lisozima comercial a utilizar como estándar del ensayo, se construyó el gráfico de actividad en función de las concentraciones de lisozima comercial empleando los datos anteriores. (Figura 3.1.8. A). A partir de este resultado se observó que el rango de concentraciones de lisozima utilizadas no permite construir una buena curva estándar cuando el ensayo transcurre por 4 horas. Con el fin de contar con un buen ajuste, se ensayaron las siguientes diluciones de lisozima comercial: 5, 4, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31_{µg/ml} a un tiempo de incubación de 4 horas. Estas concentraciones elegidas permitieron

construir una buena curva que fue ajustada a una función polinómica de tercer grado (Figura 4.1.8. B).

Todos los ensayos a punto final futuros se realizaron a las mismas condiciones optimizadas para el ensayo cinético, utilizando un tiempo de incubación de 4 horas y una curva estándar con las concentraciones de lisozima comercial indicadas arriba.

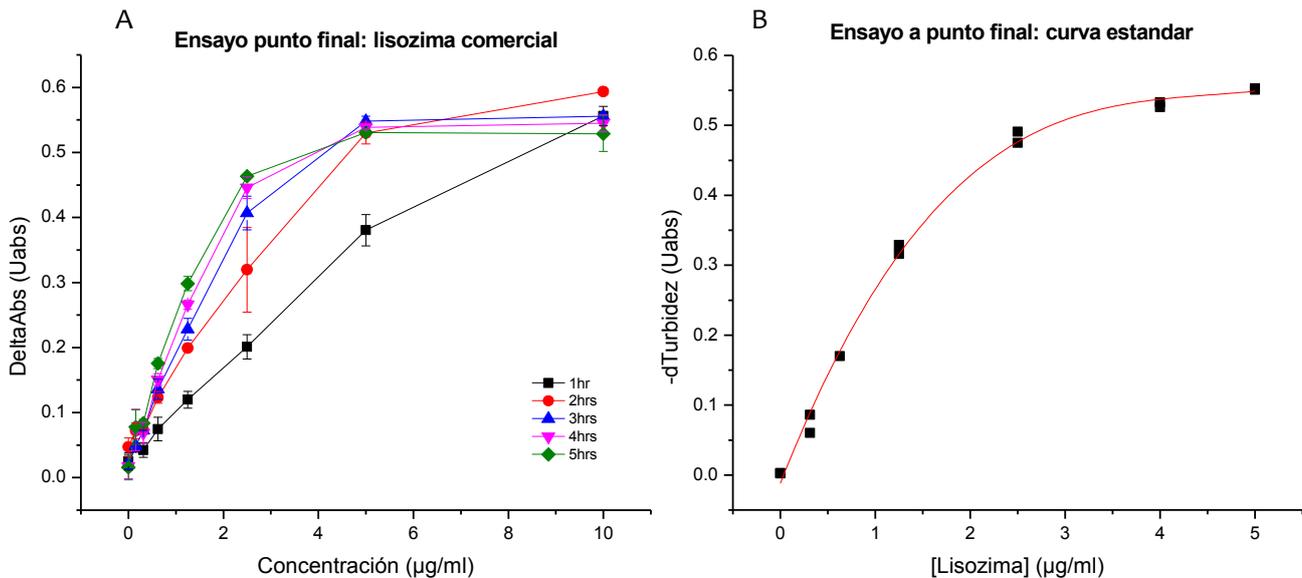


Figura 4.1.8.) Ajuste de la curva estándar del ensayo a punto final. En el panel A se grafica la diferencia de turbidez en función de la concentración de lisozima comercial (10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 y 0.16 µg/ml) a tiempos de 1, 2, 3, 4 y 5 horas de incubación. Cada punto representa la media y las barras de error la desviación estándar de los dos ensayos independientes. En el panel B se grafica la diferencia de turbidez en función de la concentración de lisozima comercial (5, 4, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 y 0.16 µg/ml) a un tiempo de incubación de 4 horas. Las medidas se realizaron por duplicado y se ajustaron los datos a una función polinómica de tercer grado.

4.1.4. Comparación del ensayo lisozima a punto final y cinético.

Con el fin de evaluar ambas metodologías, se cuantificó la actividad y concentración de lisozima mediante el ensayo cinético y a punto final de 13 muestras correspondientes a 13 individuos de la especie *Acipenser gueldenstaedtii*. Como puede verse en la Figura 4.1.9 existe una correlación positiva (valor $p < 0.0001$) entre los niveles de lisozima determinados por el ensayo cinético y a punto final. Este resultado demuestra la utilidad de ambas estrategias para el análisis de los niveles de lisozima en suero. Sin embargo, por las ventajas que presenta el ensayo a punto final (mayor sensibilidad y manipulación más sencillas) por sobre el cinético, todos los análisis posteriores que se muestran en este trabajo fueron realizados utilizando dicha metodología.

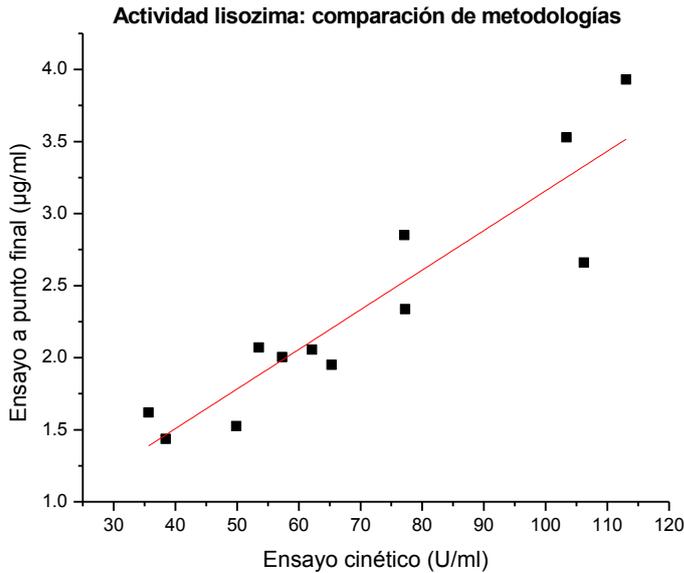


Figura 4.1.9.) Correlación de los ensayos cinético y a punto final. Se determinaron los valores de actividad lisozima de 13 SE de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* utilizando los ensayos cinético y a punto final. Cada SE se analizó por duplicado. Se graficaron los valores obtenidos para los dos ensayos. Los datos fueron ajustados a una recta y se obtuvo un valor $p < 0.0001$ al aplicar el test de correlación de Pearson.

4.1.5. Observaciones respecto al ensayo lisozima.

La actividad lítica del suero con las células ML que nosotros atribuimos en un 100% a la lisozima podría verse afectado por la actividad de otros componentes que presente el suero. El principal candidato que podría contribuir a la lisis observada sería el SC. Sin embargo se ha visto que el SC es ineficiente a la hora de lisar bacterias gram-positivas como ML ya que la presencia de una pared gruesa de peptidoglicano dificulta el ensamblado del MAC sobre la membrana plasmática interna[64]. Por otro lado estudios sobre la VA en la tenca (*Tinca tina*) [58] y en la vía clásica de tilapia (*Tilapia nilotica*)[65] evidenciaron que el SC en estos peces no es activo a $pH < 6.5$, cabe recordar que el ensayo de actividad lisozima se realiza a $pH = 5.80$. Estos dos argumentos sugieren que probablemente el SC del esturión no interfiera con el ensayo de actividad lisozima. De forma de corrobora experimentalmente esto, nos propusimos realizar el ensayo lisozima en presencia de 10 mM de EDTA para inactivar al SC. La presencia de EDTA afectó la turbidez del ensayo lo cual impidió sacar conclusiones respecto a la contribución del complemento. En ensayos futuros pensamos evaluar la actividad lítica del suero en las condiciones optimizadas para el ensayo lisozima utilizando un anticuerpo anti lisozima comercial recientemente obtenido. Esto nos permitirá concluir definitivamente si existe algún otro componente lítico del suero capaz de actuar sobre las células ML.

4.2. Experimento en condiciones de cultivo: Evaluación de las defensas innatas en los esturiones criados en diferentes estaciones del año.

Una vez optimizadas las metodologías para medir la funcionalidad de la VA y los niveles de actividad lisozima en suero, se estudió el comportamiento de estos componentes del SII en esturiones criados en las unidades de cultivo (raceways) de la granja de piscicultura. Como se mencionó previamente los meses cálidos del año representan un desafío importante para los peces de la granja en donde el aumento de la temperatura del agua, junto con la aparición de floraciones, favorecen infecciones oportunistas que se traducen en un aumento en la mortalidad de los peces. Por esta razón nos interesó comparar los niveles de actividad de la VA (ACH50) y de la lisozima en hembras de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* en las estaciones de verano e invierno. A tales efectos se analizaron muestras de suero de 10 individuos de 4 y 9 años de edad. La elección de peces de estas edades se fundamenta en valorar eventuales diferencias entre hembras de diferente madurez sexual que han padecido durante distinto tiempo las condiciones adversas de cría.

4.2.1. Variación estacional en la funcionalidad de la vía alternativa.

De acuerdo a los resultados de la Figura 4.2.1, se observa que tanto en las hembras de 4 años como de 9 años de edad, los niveles de la VA del SC se encuentran significativamente deprimidos en verano respecto al invierno. Para interpretar estos resultados es importante tener presente que en la VA participan varias proteínas, de síntesis hepática mayoritariamente, y que el ensayo hemolítico utilizado evalúa la funcionalidad de toda la VA. Esto significa que cualquier cambio en los niveles séricos de estas proteínas repercutirá en el ACH50. Una posible explicación para los resultados es que durante el verano los esturiones se encuentren cursando una infección. Ante la presencia de una infección los componentes de la VA se pueden consumir como consecuencia de su activación sobre la superficie del patógeno, dando lugar a una disminución de la concentración de los componentes nativos en la sangre, y en consecuencia, del nivel de ACH50. Sin embargo, como ya se comentó en 1.3.2.a. frente a una infección los componentes humorales y celulares del SII son capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria que genera una cantidad de mediadores químicos para facilitar el combate de dicha infección. Entre ellos, se encuentran las interleuquinas, las cuales son producidas en el sitio de infección y volcadas a la circulación sistémica. Estas actúan en el hígado y otros órganos. En el hígado inducen la síntesis de varias proteínas, entre ellas las del

SC de forma tal de contrarrestar el consumo previamente mencionado; esta respuesta es conocida como fase aguda. De acuerdo con lo anterior, una infección podría dar cuenta de estos resultados si el descenso generado por el consumo de los componentes del SC es más importante que el posible aumento que provocaría la inducción de la respuesta de fase aguda durante la infección. Esto parecería depender de la especie de pez y patógeno en cuestión ya que se ha reportado descenso en los niveles de ACH50 en dorada (*Sparus aurata*) infectada con *Vibrio*[66], mientras que un estudio en la carpa india (*Labeo rohita*) infectada con el hongo *Aphanomyces invadans* mostró aumento en los niveles de ACH50.[67]

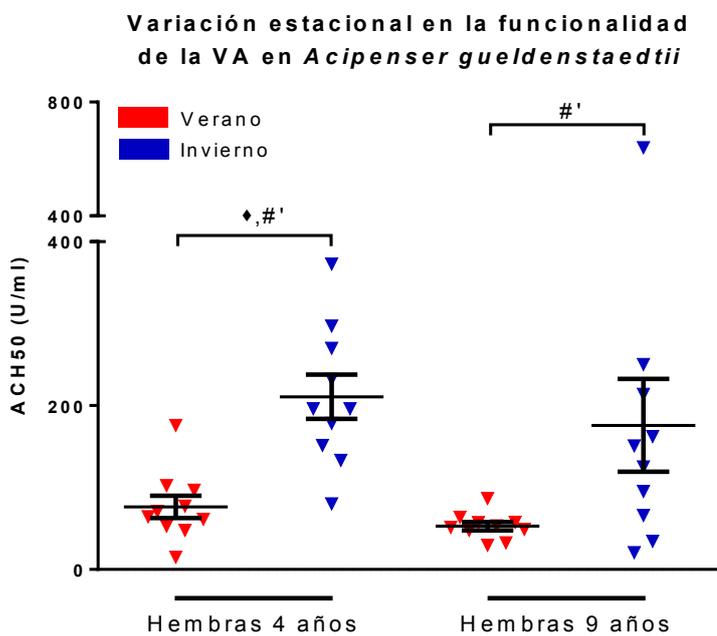


Figura 4.2.1.) Variación estacional en la funcionalidad de la VA del suero de *Acipenser gueldenstaedtii*. Se determinaron en las mismas unidades de cultivo los niveles de ACH50 en 10 hembras de 4 y 9 años de edad en verano (rojo) e invierno (azul). Cada punto representa el promedio de las réplicas analíticas de un individuo y en negro se representa la media y SEM de cada grupo. Para el análisis estadístico, se aplicó la transformación sqrt que permitió normalidad pero no homogeneidad de varianza en los datos. Se efectuó un análisis ANOVA con test de Games-Howell sobre todos los datos, las diferencias significativas (p valor < 0.05) se indican con *. A su vez se aplicó dentro de los grupos (línea horizontal negra) el t-test con corrección de Welch; en este caso las diferencias significativas (p valor < 0.05) se indican con #'.

4.2.2. Variación estacional en los niveles de lisozima .

Los resultados de la Figura 4.2.2. muestran que los niveles de lisozima aumentan en verano respecto al invierno para las hembras de 4 años y siguen esta misma tendencia para las hembras de 9 años aunque en este último caso no se llega a la significancia estadística.

Buscando explicar estos resultados, a la luz de lo observado en relación con el complemento, es lógico preguntarnos si sería razonable esperar un aumento en los niveles de lisozima como consecuencia de infecciones. La literatura en peces teleósteos parece ser consistente respecto a esto, mostrando que una infección generalmente da lugar a un aumento en los niveles de expresión y niveles de actividad lisozima en varios tejidos del

pez.[42,44] En estudios de desafío con *Aeromonas hydrophila* en tilapia azul (*Oreochromis aureus*)[45] y en el pez shoropunti (*Puntius sarana*)[68] se observó aumento en la expresión de lisozima en hígado y riñón anterior que se mantuvo por varios días. Trabajos en el pez de pico rayado (*oplegnathus fasciatus*) y en la lúbrina europea (*Dicentrarchus labrax*) demostraron aumento en la expresión de lisozima en riñón anterior luego de inocular LPS.[69,70] Por otra parte un estudio *in vitro* en salmón atlántico (*Salmo Salar*) mostró aumento en la secreción de lisozima por macrófagos cultivados en presencia de LPS.[43] Este aumento en la expresión de lisozima en varios tejidos, aumentaría los niveles de esta proteína en suero, como lo demuestra un estudio de desafío con *Aeromonas salmonicidae* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).[71] Sin embargo, en la carpa india (*Labeo rohita*) infectada con el hongo *Aphanomyces invadans* los niveles serológicos de lisozima descendieron.[67]

A pesar de que la literatura en esturión es escasa, un estudio reciente de desafío con *Aeromonas hydrophila* en el esturión gigante (*Huso huso*) reportó aumento en los niveles de lisozima en bazo e hígado que se mantuvo por 36 y 50 días respectivamente.[72] Otro estudio en esturión siberiano (*Acipenser baerii*) mostró aumento en los niveles serológicos de lisozima luego de inocular LPS.[73] Por lo tanto la mayoría de estos estudios sugieren que el aumento que nosotros observamos en los niveles de lisozima en verano puede deberse a un foco infeccioso.

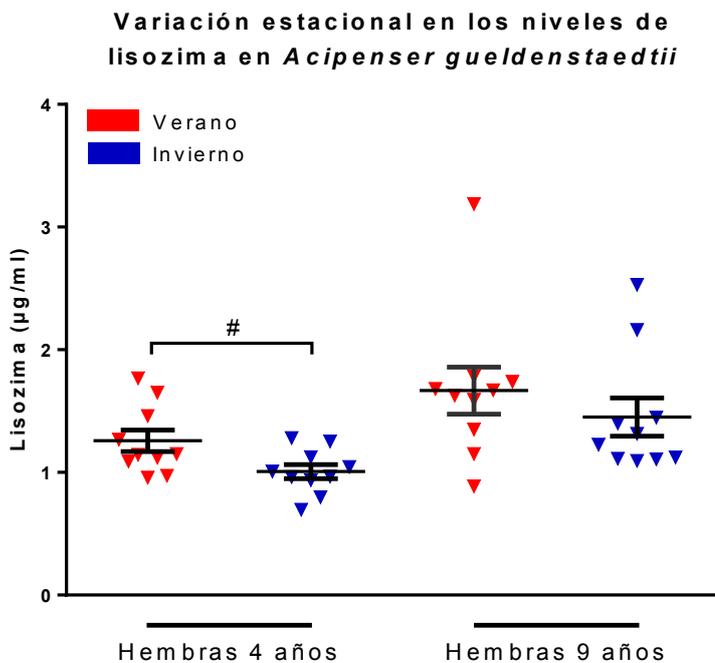


Figura 4.2.2.) Variación estacional en los niveles de lisozima del suero de *Acipenser gueldenstaedtii*. Se determinaron en las mismas unidades de cultivo la concentración de lisozima en 10 hembras de 4 y 9 años de edad en verano (rojo) e invierno (azul). Cada punto representa el promedio de las réplicas analíticas de un individuo y en negro se representa la media y SEM de cada grupo. Para el análisis estadístico, se aplicó la transformación sqrt que permitió normalidad y homogeneidad de varianza en los datos. Se efectuó en el conjunto de los datos un análisis ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Tukey, no encontrando diferencias significativas. A su vez se aplicó dentro de los grupos (línea horizontal negra) el t-test, las diferencias significativas (p valor < 0.05) que se indican con #.

4.2.3. Variación estacional en los niveles de proteína.

Los cambios medioambientales que ocurren en el verano, como el aumento en las temperaturas del agua y la aparición de floraciones, probablemente sean un factor de estrés para los esturiones. El estrés es un término que fue definido por Hans Selye en 1953 y aplica a situaciones en donde existe un riesgo real o percibido para la integridad del organismo. Para hacer frente a este riesgo los organismos montan una respuesta que conocemos como estrés- que tiene profundos efectos a nivel celular (alterando la expresión de diversos genes), a nivel metabólico (dando lugar a la redistribución de recursos) y a nivel neurológico. Esta respuesta tiene como objetivo compensar el desbalance que el agente de estrés haya generado en el organismo, combatir el mismo y en última instancia contribuiría al retorno al estado de homeostasis.[74] En peces se ha visto que los efectos del estrés sobre el SI dependen del tipo, intensidad y sobre todo de la duración del agente de estrés. Es importante distinguir dos tipos de estrés, el estrés agudo y el estrés crónico. El estrés agudo o de corta duración en peces teleósteos, tiene un efecto inmunoestimulante viéndose aumentada la síntesis de proteínas del SC, la actividad lisozima y la capacidad fagocítica de macrófagos y neutrófilos.[60,74-76] El estrés crónico o de larga duración en cambio tiene el efecto contrario sobre estos componentes y da lugar a una depresión general del SI. Las altas demandas metabólicas para hacer frente a éste, relegan a un segundo plano el funcionamiento del SI. Esto ocasiona disminución de los niveles de lisozima, proteínas del SC, la capacidad fagocítica de las células innatas, lo cual conduce a una disminución en la respuesta adaptativa y la capacidad de generar anticuerpos.[74] Como consecuencia los organismos se vuelven más propensos a contraer infecciones.[74,77]

Durante el proceso de acuicultura los peces se ven sometidos a una combinación de agentes de estrés por periodos prolongados (alta densidad de cultivo, cambios de temperatura, salinidad, pH y niveles de O₂). Por lo tanto un estrés crónico en los esturiones de la granja podría explicar, junto con la presencia de infecciones, los cambios en los niveles de lisozima y funcionalidad de la VA que observamos en verano.

De acuerdo con lo anterior, nos propusimos determinar algún parámetro que evidenciara la presencia de estrés en los esturiones. Tradicionalmente el estrés se cuantifica midiendo los niveles de cortisol o glucosa en sangre[78], sin embargo al momento de realizar este trabajo de licenciatura no contábamos con ninguna herramienta para evaluar estos dos indicadores. En la literatura está reportado que los niveles de proteína plasmática disminuyen en carpa (*Cyprinus carpio*) frente al estrés crónico por alta densidad de cultivo.[77] Estos resultados nos sugirieron que los niveles de proteína podrían ser un indicador de estrés

crónico en los esturiones. Por lo tanto cuantificamos los niveles de proteína total en las muestras de SE colectadas en verano e invierno, buscando evidencias del desarrollo de una respuesta de estrés.

Los resultados mostraron , que los niveles de proteína del suero en las hembras de 4 y 9 años disminuyeron significativamente en verano respecto al invierno (Figura 4.2.3). Esto sugiere que las condiciones medioambientales del verano podrían ser un factor de estrés para los esturiones.

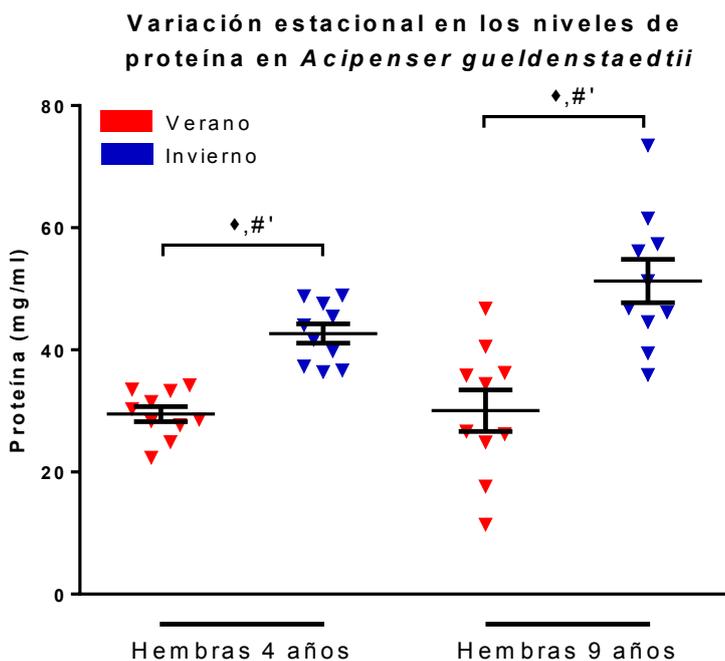


Figura 4.2.3.) Variación estacional de los niveles de proteína del suero de *Acipenser gueldenstaedtii*. Se determinó en las mismas unidades de cultivo los niveles de proteína en 10 hembras de 4 y 9 años de edad en verano (rojo) e invierno (azul). Cada punto representa el promedio de las réplicas analíticas de un individuo y en negro se representa la media y SEM de cada grupo. El conjunto de los datos fue analizado con el ANOVA de una vía con test de Games-Howell, las diferencias significativas (p valor < 0.05) se indican con \bullet . A su vez se aplicó dentro de los grupos (línea horizontal negra) el t-test con corrección de Welch, en este caso las diferencias significativas (p valor < 0.05) se indican con $\#$.

Como fue mencionado previamente, el estrés prolongado en el tiempo produce inmunosupresión, y por lo tanto, podría explicar la disminución observada en la funcionalidad de la VA. (Figura 4.2.1) En línea con este argumento, al graficar los niveles de proteína en función del ACH50 (Figura 4.2.4. A) se observó una correlación positiva entre estos parámetros, lo cual sugiere que tanto la síntesis de proteínas globales como la síntesis de las proteínas del SC se ven afectadas en verano. Por lo tanto, la disminución en los niveles de proteína plasmática y la correlación positiva entre estos niveles y el ACH50 refuerza la idea de que el deterioro en la funcionalidad de la VA en verano pueda deberse, al menos parcialmente, al estrés crónico que sufren los esturiones. Esto está de acuerdo con estudios en carpa (*Cyprinus carpio*)[77] y en dorada (*Saprus aurata*)[66,79] en donde el estrés prolongado en el tiempo produjo disminución en el ACH50 o en la capacidad bacteriolítica general del suero.

Al graficar los niveles de proteína en función de los niveles de lisozima (Figura 4.2.4. B) se observa que estos dos parámetros no se encuentran correlacionados. Esto indica que el estrés no daría cuenta del aumento en los niveles de lisozima observados en verano, lo cual tiene sentido ya que el estrés crónico es generalmente inmunosupresor. Como fue mencionado previamente, el aumento en los niveles de lisozima posiblemente se deba a la ocurrencia de infecciones. En línea con los resultados anteriores, estas infecciones se verían facilitadas por la depresión en el SI, causada por el estrés medioambiental al que se ven sometidos los esturiones en esta época del año.

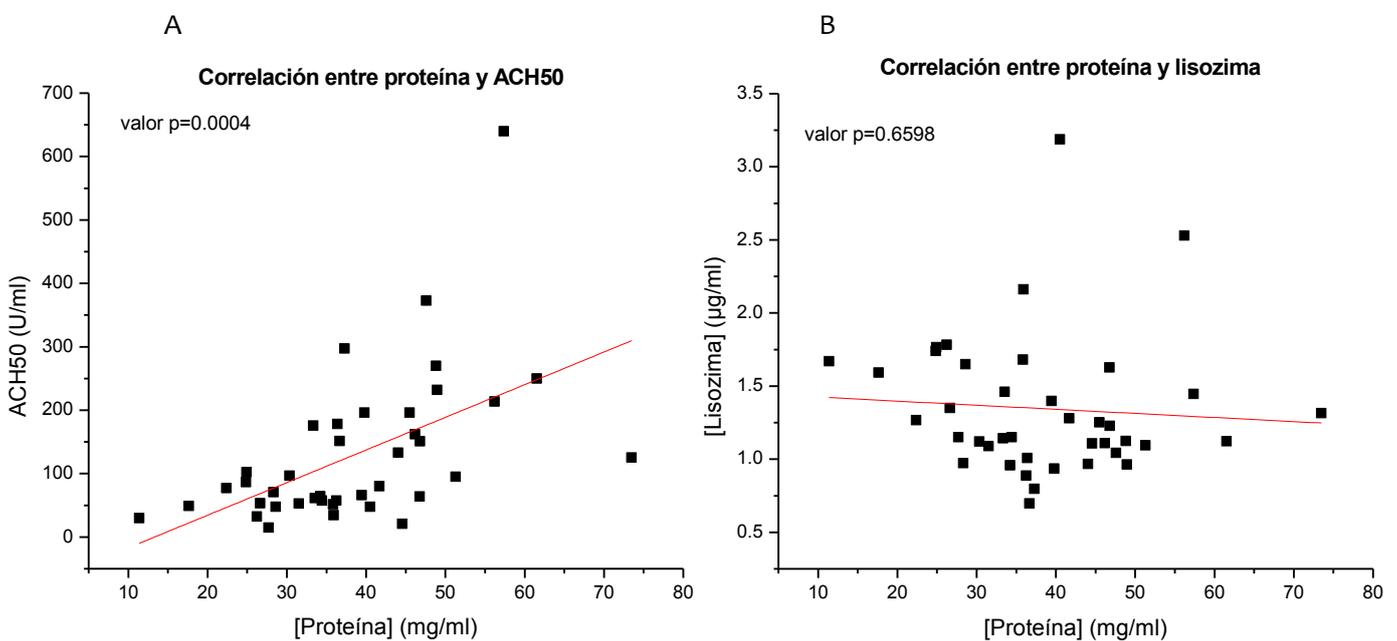


Figura 4.2.4.) En el panel A se graficó el ACH50 en función de los niveles de proteína del suero utilizando el conjunto global de datos obtenidos para dichos parámetros. Se aplicó el test de correlación de Pearson obteniendo un valor de $p=0.0004$ que confirma existe una correlación positiva entre la funcionalidad de la VA y los niveles de proteína séricos. En el panel B se graficó la concentración de lisozima en función de los niveles de proteína en suero, nuevamente utilizando la totalidad de los datos obtenidos para estos parámetros. Se aplicó el test de correlación de Pearson obteniendo un valor de $p=0.6598$ el cual confirma que no existe correlación entre estos parámetros

De acuerdo a los resultados obtenidos para el experimento realizado en condiciones de cultivo podemos concluir que:

- haber detectado diferencias en la funcionalidad de la VA, y en los niveles de lisozima en suero de esturión en distintos momentos del año, sugiere que estos dos parámetros podrían ser utilizados para monitorear el estado sanitario de los esturiones.
- la disminución en los niveles de proteína plasmática sugiere que en verano los esturiones se ven sometidos a estrés de tipo crónico.
- la generación de una respuesta de estrés en los peces durante el verano se asociaría a la disminución en la funcionalidad de la VA. Esta disminución facilitaría la ocurrencia de infecciones que deprimirían en mayor medida los niveles funcionales de la VA. Además, estas infecciones explicarían el aumento en los niveles de lisozima que se registra en los peces durante la estación de verano.

4.3. Experimento en el laboratorio húmedo: Efecto de la alta temperatura y del suplemento Biopack sobre la inmunidad innata.

La diferencia en los niveles de ACH₅₀ y lisozima que se registraron en las unidades de cultivo durante las estaciones de verano e invierno, sugiere que existen factores del medioambiente que podrían afectar estos componentes del SII. El aumento en la temperatura del agua que ocurre en verano probablemente sea uno de estos factores. Por lo tanto con el objetivo de esclarecer los resultados obtenidos para el experimento realizado en las condiciones de cultivo, se planteó estudiar el efecto del estrés por alta temperatura (24°C) sobre la funcionalidad de la VA del SC, y los niveles de lisozima y proteínas totales en suero de esturión. A su vez, se evaluó el efecto de administrar junto con la ración normal, un suplemento nutricional que contiene componentes de levaduras, Se y Zn (Biopack, Alltech), con el fin de estudiar su potencial efecto inmunoestimulante. Con estos objetivos se diseñó un experimento en condiciones controladas de laboratorio utilizando peces de la especie *Acipenser gueldenstaedtii* que fueron mantenidos a 18°C o 24°C, y alimentados durante 37 días con la ración normal con o sin el suplemento alimenticio Biopack. Los peces fueron sangrados al día 0, 20 y 37, y se determinó a cada tiempo el peso, la funcionalidad de la VA, y los niveles de lisozima y de proteína total en suero. Cabe señalar que en el transcurso del experimento fue

observado que el sistema de calentamiento del agua posiblemente generase vibraciones no pudiendo descartar que las mismas hayan tenido un efecto sobre la fisiología del pez y sobre los parámetros aquí estudiados.

4.3.1. Efecto sobre la viabilidad y el crecimiento de los peces.

Se observó entre un 14-15% de mortalidad en los peces mantenidos a 24°C que no se observó en el grupo a 18°C, lo cual refleja que los esturiones no están adaptados a esta temperatura. Por otra parte la administración del suplemento no redujo la tasa de mortalidad observada en los peces mantenidos a 24°C. Además, esta inadaptación se verifica al analizar el crecimiento de los peces. Los peces mantenidos a 18°C (Figura 4.3.1, símbolos azules), aumentaron de peso de forma significativa durante el transcurso del experimento, mientras que no lo hicieron los que se mantuvieron a 24°C (Figura 4.3.1, símbolos rojos). Más aún los peces del grupo control mantenidos a 24°C mostraron una tendencia a disminuir su peso al día 37 respecto al día 0. La administración del suplemento no tuvo efecto sobre la ganancia de peso de los esturiones mantenidos a 18°C. Sin embargo, en los peces mantenidos a 24°C, la administración del suplemento revirtió parcialmente el efecto negativo observado en el grupo control. De todas maneras, al día 37 los pesos de los peces del grupo control y tratado mantenidos a 24°C fueron significativamente menores que los respectivos pesos de los grupos mantenidos a 18°C. Estos resultados demuestran que las elevadas temperaturas son un factor perjudicial para el crecimiento de los esturiones, sugiriendo que inducen una respuesta de estrés.

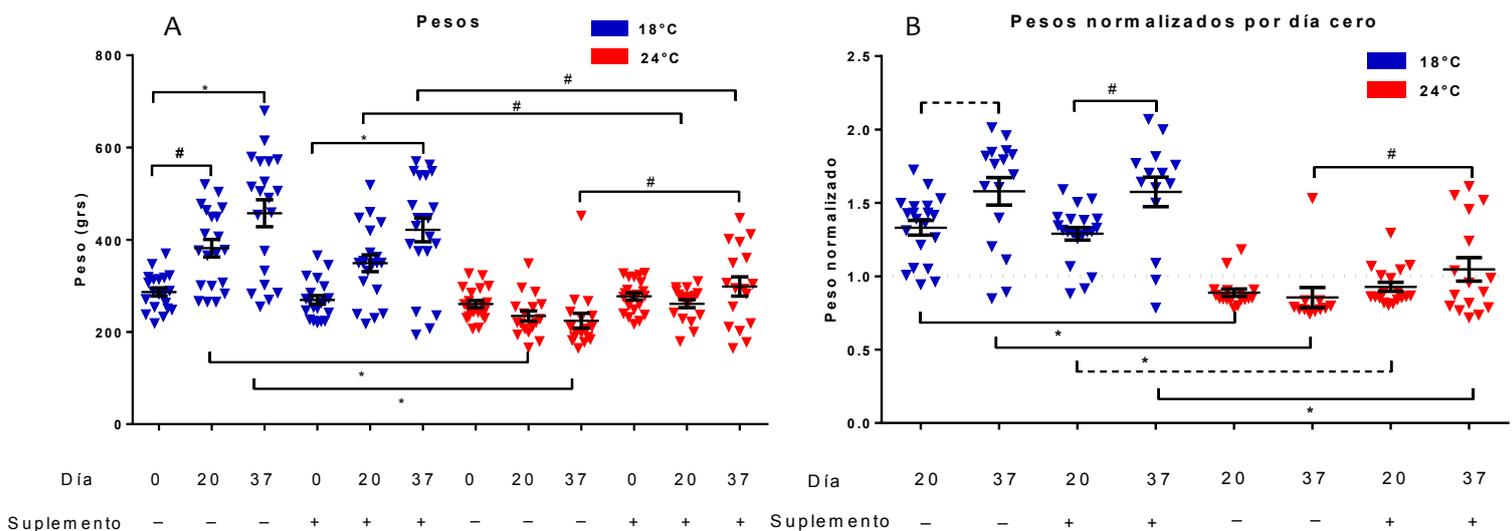


Figura 4.3.1. Efecto de la temperatura y el suplemento Biopack de Alltech sobre el peso de los esturiones mantenidos a 18°C (azul) o 24°C (rojo) que recibieron (+) o no (-) el Biopack de Alltech. En el panel A se muestran los valores absolutos de los pesos junto con la media y SEM de cada grupo. En el panel B se muestra la media y SEM de los valores de peso normalizados por el correspondiente valor al día 0. El análisis estadístico fue realizado con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn, la significancia estadística ($p < 0.05$) se indica con * cuando el análisis fue realizado con todos los datos, o con # cuando el análisis fue realizado dentro del mismo grupo (misma temperatura o misma condición de alimentación), las barras punteadas indican tendencias.

4.3.2. Efecto sobre el nivel de proteínas totales.

Debido a que la elevada temperatura (24°C) mantenida durante 37 días podría ser un factor de estrés crónico para los esturiones nos propusimos, al igual que para el experimento realizado en condiciones de cultivo, cuantificar los niveles totales de proteína en suero. Los niveles de proteína total en los peces mantenidos a 18°C (Figura 4.3.2. , símbolos azules), permanecieron constantes durante los 37 días tanto en el grupo control como en el grupo suplementado, no encontrándose ninguna diferencia producto del agregado del suplemento a la dieta. Para los peces mantenidos a 24°C (Figura 4.3.2. , símbolos rojos), los niveles de proteína plasmática disminuyeron progresivamente con el transcurso del experimento. La adición del suplemento parecería detener esta caída observada al día 37. (observar datos normalizados por los niveles iniciales de día 0, Figura 4.3.2.) Sin embargo, el suplemento no fue capaz de restituir los valores observados en los peces mantenidos a 18°C. Estos resultados apoyan la idea de que la elevada temperatura es un factor estresante para los esturiones.

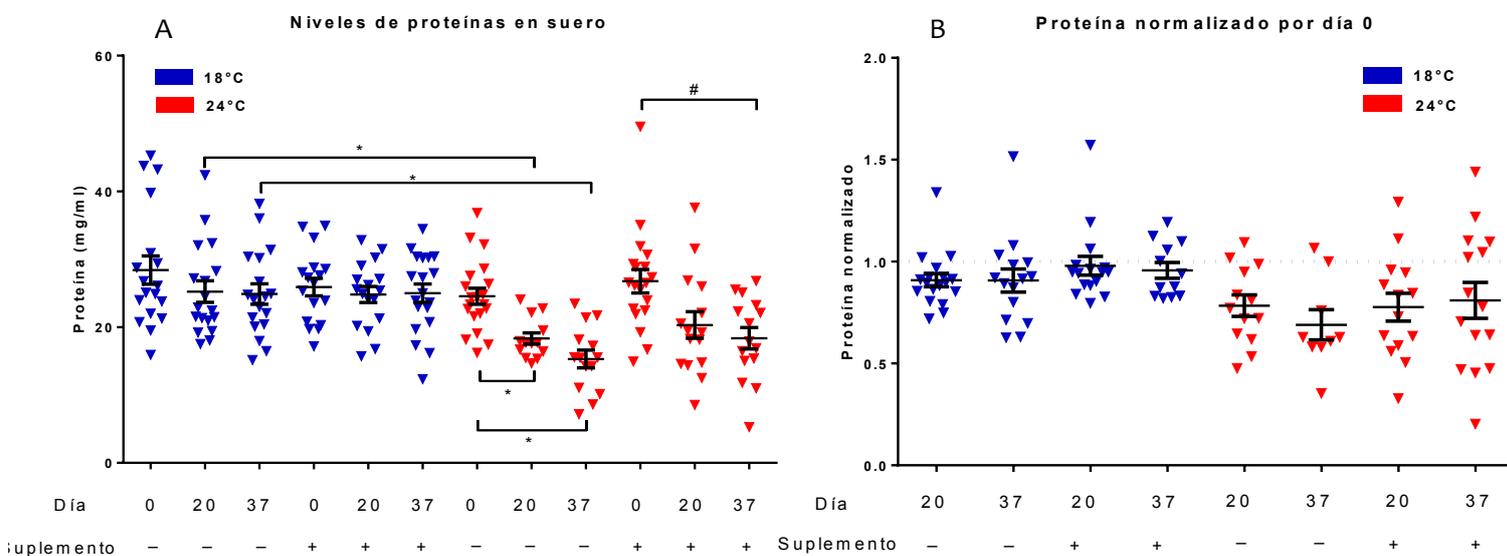


Figura 4.3.2.) Efecto de la temperatura y el suplemento Biopack de Alltech sobre la concentración de proteína total en suero de los esturiones mantenidos a 18°C (azul) o 24°C (rojo) que recibieron (+) o no (-) el Biopack de Alltech. En el panel A se muestran los valores absolutos de la concentración de proteína total en suero junto con la media y SEM de cada grupo. En el panel B se muestra la media y SEM de los niveles de proteína total normalizados por el correspondiente valor al día 0. Los datos sin normalizar (panel A), se les aplicó la transformación sqrt y se los analizó con el test ANOVA de 1 vía y post-test de Games-Howell. Los datos normalizados por el día 0 (Panel B) fueron analizados con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post test de Dunn para comparaciones múltiples. En ambos casos la significancia estadística ($p < 0.05$) se indica con * cuando el análisis fue realizado con todos los datos, o con # cuando el análisis fue realizado dentro del mismo grupo (misma temperatura o misma condición de alimentación).

4.3.3. Efecto sobre la funcionalidad de la vía alternativa.

La funcionalidad de la VA en los peces mantenidos a 18°C (Figura 4.3.3, símbolos azules) aumentó progresivamente con el transcurso del experimento. Al cabo de los 37 días se observó que este aumento fue mayor en el grupo tratado que en el grupo control. En los peces mantenidos a 24°C, no se observó aumento en los niveles de ACH50 y al día 37 estos se mantuvieron similares al día 0 tanto en el grupo no suplementado como en el suplementado. Sin embargo, se observa un leve aumento al cabo del día 37 en el grupo suplementado respecto al no suplementado que no llega a ser estadísticamente significativo. Estos resultados indican que el estrés por temperatura repercutió negativamente sobre la funcionalidad de la VA del SC. Por otra parte el suplemento de Alltech fue capaz de potenciar la actividad de este sistema a 18°C pero no a 24°C.

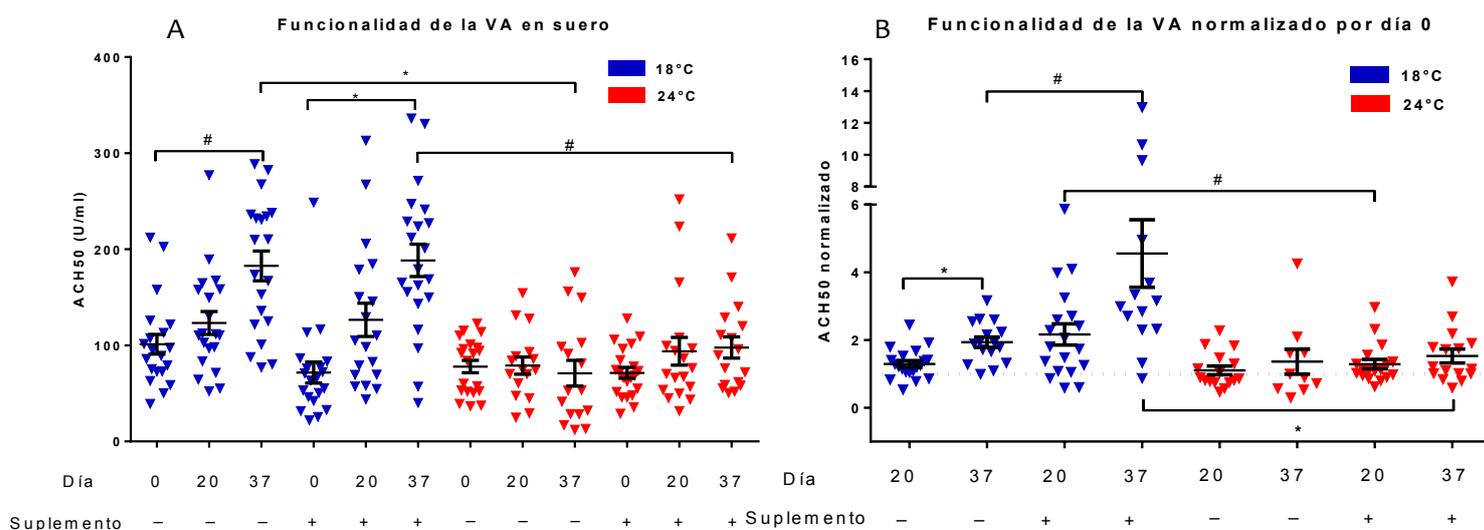


Figura 4.3.3.) Efecto de la temperatura y el suplemento Biopack de Alltech sobre la actividad funcional de la VA del SC en los esturiones mantenidos a 18°C (azul) o 24°C (rojo) que recibieron (+) o no (-) el Biopack de Alltech. En el panel A se muestran los valores absolutos de ACH50 juntos con la media y SEM de cada grupo. En el panel B se muestra la media y SEM correspondiente a los valores de ACH50 normalizados por el correspondiente valor al día 0. Para los datos no normalizados (Panel A), el análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. A los datos normalizados por el día 0 (Panel B) se les aplicó la transformación logarítmica y se los analizó con el test ANOVA de 1 vía con post-test de Games-Howell. En ambos casos la significancia estadística ($p < 0.05$) se indica con * cuando el análisis fue realizado con todos los datos, o con # cuando el análisis fue realizado dentro del mismo grupo (misma temperatura o misma condición de alimentación).

4.3.4. Efecto sobre los niveles de lisozima.

Los resultados obtenidos para la lisozima fueron menos claros y consistentes que los obtenidos para la VA, niveles de proteína y pesos. A primera vista se observó que globalmente los niveles de lisozima son mayores y más dispersos en los peces mantenidos a 24°C (Figura 4.3.4, símbolos rojos) que en los peces mantenidos a 18°C (Figura 4.3.4, símbolos azules). En los peces mantenidos a 18°C no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo suplementado, aunque al analizar los datos normalizados existe una tendencia hacia valores más altos de lisozima en el grupo tratado. Dentro del grupo tratado a 18°C los niveles de lisozima disminuyeron del día 0 al día 20 y volvieron a aumentar al día 37 de manera significativa. Al someter a los peces a una temperatura de 24°C se observó un aumento en los niveles de lisozima al día 20. Este aumento que no se observó en el grupo suplementado, sugiriendo que la administración del Biopack podría revertirlo.

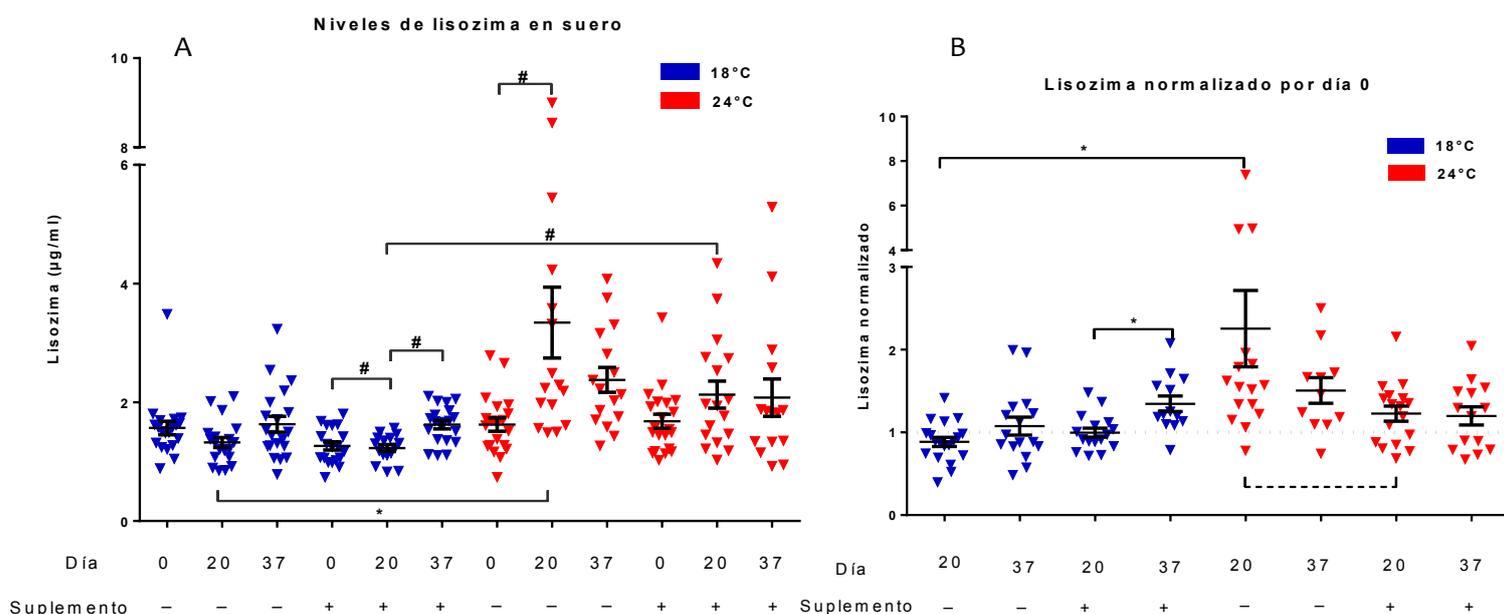


Figura 4.3.4.) Efecto de la temperatura y el suplemento Biopack de Alltech sobre los niveles de lisozima en suero de los esturiones mantenidos a 18°C (azul) o 24°C (rojo) que recibieron (+) o no (-) el Biopack de Alltech. En el panel A se muestran los valores absolutos de la concentración de lisozima en suero junto con la media y SEM de cada grupo. En el panel B se muestra la media y SEM correspondiente a los niveles de lisozima normalizados por el correspondiente valor al día 0. Para los datos no normalizados (Panel A), el análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. A Los datos normalizados por el día 0 (Panel B) se les aplicó la transformación logarítmica y se los analizó con el test ANOVA de 1 vía con post-test de Games-Howell. En ambos casos la significancia estadística ($p < 0.05$) se indica con * cuando el análisis fue realizado con todos los datos, o con # cuando el análisis fue realizado dentro del mismo grupo (misma temperatura o misma condición de alimentación), las barras punteadas indican tendencias.

5. Discusión global de los resultados.

En este trabajo se optimizaron dos ensayos bioquímicos para evaluar en suero de esturión la funcionalidad de la VA y la actividad lisozima. Una vez optimizadas estas metodologías, se decidió evaluar estos componentes en verano e invierno en peces mantenidos en las condiciones de cultivo en la planta ERN. Esto respondió a la necesidad de contar con parámetros que permitieran monitorear el estado sanitario de los esturiones en distintos momentos del año. Mediante este experimento se evidenció que los niveles de ACH50, que reflejan la actividad de la VA, estaban notoriamente disminuidos en las hembras durante el verano, mientras, que en la misma época de año, los niveles de lisozima aumentaron para las hembras de 4 años y siguieron la misma tendencia para las hembras de 9 años. Estos resultados indicaron en primer lugar que las metodologías optimizadas son útiles para evaluar estos componentes del SII, y por otra parte, que los cambios medioambientales que ocurren en las distintas épocas del año repercuten en los parámetros del SII.

Pensando que la temperatura podría ser un factor medioambiental clave, que explicara los cambios observados en los componentes del SII de los esturiones cultivados en las condiciones de la granja ERN, decidimos realizar un experimento en condiciones más controladas de cultivo, utilizando dos temperaturas diferentes durante 37 días y agua de pozo de alta pureza. Se trabajó en condiciones a una temperatura de 18°C y 24°C buscando reflejar las temperaturas de invierno y verano respectivamente. En los esturiones mantenidos a 24°C se observó una disminución en los niveles de ACH50 y proteína, y un aumento en los niveles de lisozima respecto a los esturiones mantenidos a 18°C. Estas variaciones/alteraciones en los niveles de ACH50 y lisozima fueron muy similares a las observadas para las hembras en condiciones de cultivo durante el verano. A su vez se evidenció que los peces mantenidos a 24°C fueron incapaces de aumentar de peso y además presentaron mayor mortalidad que los peces mantenidos a 18°C. A pesar de que no podemos descartar que el propio sistema de calentamiento haya sido un factor de estrés adicional para los esturiones, nuestros resultados sugieren que la temperatura sería uno de los principales factores del medioambiente que afecta el estado sanitario y el SII de los esturiones criados en la granja ERN. Esto tiene sentido ya que los esturiones se encuentran adaptados a climas fríos y probablemente el aumento en la temperatura sea un factor estresante para dichos peces.[7] En línea con estos argumentos se ha visto que el esturión adriático (*Acipenser naccarii*) mantenido a 25°C presenta niveles de cortisol en sangre más elevados que a 17°C.[80]

En nuestros estudios aún no hemos medido los niveles de cortisol en sangre, pero es uno de los análisis que valdría la pena realizar. Creemos que la marcada disminución en los niveles de proteína en suero que ocurrió en las hembras durante el verano y en los esturiones mantenidos a 24°C refleja una situación de estrés crónico. Esta respuesta de estrés induce probablemente un aumento en los niveles de cortisol[77] y de otras hormonas como las catecolaminas, que podrían estar implicadas en los cambios inducidos por el aumento en la temperatura sobre el SI y el crecimiento de los peces.[74] En estudios en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en donde se administró cortisol por 10 semanas simulando una situación de estrés crónico, se observó una marcada disminución en el crecimiento respecto a los peces que no recibieron cortisol.[81] Además, en otro trabajo realizado en el mismo pez, se observó que la presencia de cortisol en el hígado disminuye la señalización de la hormona de crecimiento, atenuando sus efectos.[82] Esta hormona es central para estimular los procesos de biosíntesis de macromoléculas así como para coordinar el crecimiento de los organismos. Por lo tanto, el efecto del cortisol en las vías de señalización de esta hormona podría explicar la disminución en los niveles de proteína plasmática y la pérdida de peso en los esturiones mantenidos a 24°C. Ambos efectos serían consecuencia de favorecer procesos catabólicos por sobre los anabólicos, de forma de contar con recursos energéticos para hacer frente a la situación de estrés generada por las condiciones medioambientales del verano, particularmente el aumento de la temperatura.[83]

Por otra parte, en general se acepta que la situación de estrés implica relegar a un segundo plano el funcionamiento de sistemas que demandan gran cantidad de recursos, como el SI. Por esta razón, la prevalencia del estrés se asocia a una mayor predisposición de los organismos a contraer infecciones.[84] En línea con estos argumentos nosotros observamos una disminución en los niveles de ACH50 en las hembras durante el verano y en los esturiones mantenidos a 24°C en el laboratorio húmedo. Estos resultados se ven apoyados por trabajos en carpa (*Cyprinus carpio*) y en barramudi (*Lates Calcarifer*) en donde el estrés crónico produjo aumento en los niveles de cortisol y disminución en el ACH50.[85,86] Siendo el hígado un órgano sensible al cortisol, y a su vez el principal sitio de síntesis de las proteínas del complemento en peces[38], es posible que el cortisol inhiba la expresión hepática de las proteínas del complemento. En cuanto al efecto sobre la lisozima, el aumento observado en las hembras de 4 años mantenidas en condiciones de cultivo en la granja y en los esturiones sometidos a un estrés por alta temperatura no parece ser consistente con una situación de estrés crónico ya que en su mayoría la bibliografía reporta que en estas situaciones ocurre una disminución en la expresión y en los niveles de lisozima plasmática.[86,87] Sin embargo, un aumento en la lisozima inducido por la temperatura también fue descrito en un trabajo en

rodaballo.[88] Así, estas aparentes inconsistencias podrían explicarse si consideramos que el aumento en los niveles de lisozima es producto de infecciones ocasionadas por el deterioro de la inmunidad innata por el estrés crónico, incluyendo la pérdida en la actividad de la VA. Como se discutió en el punto 4.2.2. la literatura en peces parece ser consistente en que una infección da lugar a aumentos en los niveles de lisozima en sangre. En conjunto, los resultados en los niveles de proteína, VA y lisozima obtenidos para los esturiones sometidos a elevadas temperaturas nos llevan a concluir que en estas condiciones los mismos probablemente estén sometidos a un estrés crónico que directa o indirectamente facilita la ocurrencia de infecciones. De esta manera, los efectos sobre los parámetros estudiados del SII serían consecuencia de la ocurrencia de estos dos fenómenos (estrés sumado a infecciones). Resulta interesante entender qué mecanismos dan lugar a que ante una misma situación estos parámetros del SII se comporten de forma diferencial.

Una posible explicación para este resultado es que el estrés afecte de forma diferencial la respuesta a estímulos inflamatorios de hepatocitos y de células inflamatorias (macrófagos o neutrófilos) o epitelios que puedan ser fuente de lisozima. Se ha demostrado que el cortisol aumenta la expresión hepática de las proteínas SOCS en trucha arcoíris. En vertebrados, estas proteínas son capaces de inhibir las vías de señalización activadas por interleuquinas inflamatorias en hepatocito.[82] y en células inflamatorias como macrófagos.[89] Por lo tanto, para explicar nuestros resultados podríamos plantear como hipótesis que durante una respuesta de estrés la expresión de SOCS aumentara en mayor medida en los hepatocitos que en otras células inflamatorias como macrófagos o neutrófilos, disminuyendo en mayor medida la capacidad de los hepatocitos de sintetizar las proteínas del SC.

Otro factor que podría explicar el comportamiento diferencial de estos componentes es el consumo que ocurre de estas proteínas como consecuencia de una infección. Las proteínas de la VA se consumen como producto de su interacción con la superficie del patógeno, mientras que la lisozima una vez que corta el peptidoglicano de los patógenos vuelve a estar disponible para seguir funcionando. De esta manera el consumo de la lisozima es de por sí menor que el del complemento. Por lo tanto si la síntesis de las proteínas del SC y de la lisozima ante la presencia de una infección se ve afectada por la ocurrencia de estrés, sería más factible que el balance entre síntesis y consumo afecte en mayor medida a las proteínas del SC que a la lisozima. Esto podría explicar la disminución en la funcionalidad observada de la VA. Independientemente de cuáles sean los mecanismos detrás de estos resultados, es posible que el deterioro en la funcionalidad de la VA del SC, que cumple un papel esencial en el SII de los peces, favorezca la ocurrencia de infecciones y en consecuencia conduzca a un aumento en los niveles de lisozima.

Otro objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del suplemento alimenticio Biopack sobre el estado sanitario y el SI de los esturiones que fueron sometidos a baja temperatura (18°C) o a un estrés por alta temperatura (24°C). Logramos evidenciar utilizando los parámetros optimizados en esta tesis que el suplemento podría tener efectos beneficiosos sobre el estado sanitario de los esturiones. Este suplemento está compuesto por componentes de levadura y por Zn y Se. Los efectos que los suplementos alimenticios tienen sobre la fisiología del pez y en particular sobre el SI se atribuyen a la capacidad que estos componentes tienen de activar al SI o de promover el crecimiento de la flora intestinal.[52]

En trucha arcoíris se vio que la suplementación con componentes de pared bacteriana aumentó la superficie de absorción intestinal y el largo de las microvellosidades de los enterocitos[90], que daría lugar a una mayor absorción de nutrientes. Esto podría explicar la atenuación en la pérdida de peso de los esturiones que fueron mantenidos a 24°C y recibieron el suplemento, lo cual está de acuerdo con resultados en dorada (*Spaurs aurata*), donde la administración de componentes de levadura aumentó el tamaño de los peces[91]. En los peces mantenidos a 18°C, se observó un aumento en el ACH50 en el grupo suplementado respecto al grupo control, y también un aumento en los niveles de lisozima al cabo del día 37 respecto al día 20, que no fue observado en el grupo control. Como la temperatura de 18°C no representaría una condición estresante para los esturiones, el SI de éstos se encontraría más apto para responder ante la presencia de señales de peligro. En línea con estos argumentos, los receptores innatos del SI del esturión podrían estar reconociendo los componentes de levadura del suplemento, dando lugar a una respuesta inflamatoria que promueva la síntesis de lisozima y proteínas del complemento principalmente en el hígado.

Por otra parte, el agregado del suplemento a la dieta podría favorecer el crecimiento de la microbiota intestinal dificultando el crecimiento o colonización del intestino por parte de bacterias patógenas.[52] De esta manera habría una menor respuesta inflamatoria que explicaría la tendencia a menores niveles de lisozima que se observó en el grupo mantenido a 24°C y que recibió el suplemento al día 20. En línea con estos resultados se observó en el mismo grupo una tendencia hacia mayores niveles de complemento al día 37 respecto al día 0 que podrían deberse a un menor consumo de componentes del complemento, facilitado por la menor carga de bacterias patógenas en el intestino.

6. Conclusiones.

- En este trabajo se logró optimizar ensayos espectrofotométricos para determinar la funcionalidad de la VA del SC y la actividad de la lisozima en suero de esturión.
- Utilizando estas metodologías se encontró que los niveles de la VA del SC están notoriamente disminuidos en el verano respecto al invierno en hembras de 4 y 9 años, mientras que en la misma época de año los niveles de lisozima aumentaron para las hembras de 4 años y siguieron la misma tendencia para las hembras de 9 años. Además, estas alteraciones se asociaron con cambios en el estado sanitario de los peces y/o en su crecimiento, lo cual sugiere que la medida funcional de la VA como la actividad lisozima del suero pueden ser marcadores útiles para el monitoreo sanitario de los esturiones en establecimientos de cría.
- Los resultados obtenidos en el laboratorio húmedo sugieren que la temperatura sería uno de los principales factores del medioambiente que causa los cambios en los niveles de lisozima y funcionalidad de la VA del SC que ocurren en las distintas estaciones. Además, la utilización del suplemento alimenticio Biopack podría contribuir a revertir, al menos parcialmente, el deterioro en el estado sanitario que presentan los peces al ser sometidos a altas temperaturas.

7. Perspectivas.

Hemos adquirido recientemente los reactivos necesarios para medir cortisol y glucosa en suero, que son los principales indicadores de estrés. Medir estos dos parámetros en los esturiones en los meses de verano e invierno y en experimentos con temperatura controlada nos permitirá esclarecer el papel que el estrés por temperatura juega sobre el SII de los esturiones.

Los resultados de esta tesis indican que la temperatura parece ser uno de los factores críticos que repercute en el funcionamiento del SI y, en consecuencia, en la salud de los esturiones. Se ha visto en peces que la proteína Wap65, implicada en el metabolismo del hierro, aumenta su expresión con la temperatura y parece estar implicada en la aclimatación de los peces a las elevadas temperaturas.[92] En un futuro sería interesante estudiar la expresión de la proteína Wap65 en los distintos meses del año, así como también en experimentos en el laboratorio húmedo controlando la temperatura.

Con el fin de seguir estudiando el efecto del suplemento Biopack en los esturiones, podríamos realizar un experimento con hembras adultas en las condiciones de cultivo de la granja. Ya que el verano representa el principal desafío para los esturiones, este experimento se podría comenzar en primavera suplementado un grupo de hembras y luego evaluar si los parámetros del SI, el peso y su sobrevivencia durante el verano son mejores que un grupo de hembras que no haya recibido el suplemento.

Para seguir profundizando en el conocimiento del SII de los esturiones, nos encontramos actualmente estudiando la respuesta de fase aguda que presentan estos peces al ser sometidos a estímulos pro-inflamatorios (LPS y peptidoglicano). Para esto hemos adquirido kits comerciales que permiten determinar los niveles de algunas proteínas descritas como proteínas de fase aguda, como: la haptoglobina, la proteína amiloide P (SAP/CRP), la proteína amiloide A (SAA) y la ceruloplasmina. Un vez que determinemos cuál o cuáles de estas proteínas son mejores indicadores de la respuesta inflamatoria aguda en el esturión pensamos diseñar algunos inmunoensayos para detectarlas en suero. Así en conjunto con la determinación de cortisol y glucosa, esperamos que el estudio de los niveles de estas proteínas permita una mejor comprensión de la respuesta desencadenada en los esturiones durante el cultivo en la granja, y además nos permita analizar las hipótesis planteadas sobre los efectos del verano, y en especial de la temperatura, sobre las defensas innatas del esturión.

8. Bibliografía.

1. Bemis WE, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environmental Biology of Fishes*. 1997;48: 167–183. doi:10.1023/A:1007312524792
2. Sallan LC. Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2014;89: 950–971. doi:10.1111/brv.12086
3. Billard R, Lecointre G. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2000.
4. Bemis WE, Findeis EK, Grande L. An overview of Acipenseriformes. Sturgeon biodiversity and conservation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997;17: 25–71. doi:10.1007/0-306-46854-9_4
5. Jarić I, Gessner J. Analysis of publications on sturgeon research between 1996 and 2010. *Scientometrics*. 2011;90: 715–735. doi:10.1007/s11192-011-0583-7
6. Bronzi P, Rosenthal H, Gessner J. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*. 2011. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01757.x
7. Chebanov MS, Galich EV. Sturgeon Hatchery Manual. 2013;: 1–338.
8. Murphy KP. *Janeway's Immunobiology*. 8 ed. Murphy. 2011. doi:10.1038/nature10296
9. Magor BG, Magor KE. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 2001;25: 651–682.
10. Plouffe DA, Hanington PC, Walsh JG, Wilson EC, Belosevic M. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*. 2005;12: 266–277. doi:10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x
11. Flajnik MF, Pasquier Du L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*. 2004;25: 640–644. doi:10.1016/j.it.2004.10.001
12. Sunyer JO. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol*. 2013;14: 320–326. doi:10.1038/ni.2549
13. Zapata A, Amemiya CT. Phylogeny of lower vertebrates and their

- immunological structures. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;248: 67–107.
14. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 2006;20: 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
 15. Jima DD, Shah RN, Orcutt TM, Joshi D, Law JM, Litman GW, et al. Enhanced transcription of complement and coagulation genes in the absence of adaptive immunity. *Molecular Immunology*. 2009;46: 1505–1516. doi:10.1016/j.molimm.2008.12.021
 16. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2007;25: 1265–1275. doi:10.1038/nbt1342
 17. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11: 785–797. doi:10.1038/ni.1923
 18. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett*. 2011;138: 35–37. doi:10.1016/j.imlet.2011.02.014
 19. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011. doi:10.1007/s00441-010-1034-0
 20. Gros P, Milder FJ, Janssen BJC. Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 48–58.
 21. Law S, Reid K. *Complement*. 2nd ed. 1995. doi:10.1093/nar/27.8.1767
 22. Janssen BJC, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*. 2006;444: 213–216. doi:10.1038/nature05172
 23. Law SK, Dodds AW. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997;6: 263–274. doi:10.1002/pro.5560060201
 24. Tegla CA, Cudrici C, Patel S, Trippe R, Rus V, Niculescu F, et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res*. 2011;51: 45–60. doi:10.1007/s12026-011-8239-5
 25. Kazatchkine M, Hauptmann G, Nydegger U. *Techniques du complément*. 1st ed. INSERM, editor. 1985.
 26. Haas P-J, van Strijp J. *Anaphylatoxins*. *Immunol Res*. Humana Press; 2007;37: 161–175. doi:10.1007/BF02697367
 27. Degn SE, Thiel S. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. *Scand J Immunol*. 2013;78: 181–193. doi:10.1111/sji.12070
 28. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial

- C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med. Rockefeller Univ Press*; 1981;154: 856–867. doi:10.1084/jem.154.3.856
29. Volanakis JE, Narayana SV. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci.* 1996;5: 553–564. doi:10.1002/pro.5560050401
 30. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Publishing Group.* 2009;9: 729–740. doi:10.1038/nri2620
 31. Zhang S, Cui P. Complement system in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology.* 2014. doi:10.1016/j.dci.2014.01.010
 32. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology.* 2011;35: 1296–1308. doi:10.1016/j.dci.2011.03.003
 33. Nakao M, Mutsuro J, Obo R, Fujiki K, Nonaka M, Yano T. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. *European Journal of Immunology.* WILEY-VCH Verlag GmbH; 2000;30: 858–866. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<858::AID-IMMU858>3.0.CO;2-M
 34. Sunyer JO, Tort L, Lambris JD. Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem J.* 1997;326 (Pt 3): 877–881.
 35. Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, et al. Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *J Immunol.* 2006;177: 5471–5479.
 36. Abelseth TK, Stensvåg K, Espelid S, Nygaard R, Ellingsen T, Bøgwald J, et al. The spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) complement component C3: isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish and Shellfish Immunology.* 2003;15: 13–27. doi:10.1016/s1050-4648(02)00135-3
 37. Løvoll M, Dalmo RA, Bøgwald J. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology.* 2007;23: 721–731. doi:10.1016/j.fsi.2007.01.019
 38. Pushpa K, Gireesh-Babu P, Rajendran KV, Purushothaman CS, Dasgupta S, Makesh M. Molecular cloning, sequencing and tissue-level expression of complement C3 of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Fish and Shellfish Immunology.* 2014;40: 319–330. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.008

39. Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, Bøggwald J, Sunyer JO, Dalmo RA. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*. 2006;58: 168–179. doi:10.1007/s00251-006-0096-3
40. FAN C, WANG J, ZHANG X, SONG J. Functional C1q is present in the skin mucus of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Integr Zool*. 2015;10: 102–110. doi:10.1111/1749-4877.12100
41. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*. 2010;35: 127–160. doi:10.1182/blood-2014-07-587790
42. Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 2008. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x
43. Paulsen SM, Engstad RE, Robertsen B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 2001;11: 23–37. doi:10.1006/fsim.2000.0291
44. Wang R, Feng J, Li C, Liu S, Zhang Y, Liu Z. Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 2013;35: 136–145. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.014
45. Gao F-Y, Qu L, Yu S-G, Ye X, Tian Y-Y, Zhang L-L, et al. Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2012;32: 779–788. doi:10.1016/j.fsi.2012.01.031
46. GRINDE B, JOLLÈS J, JOLLÈS P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd; 1988;173: 269–273. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13994.x
47. GRINDE B. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *Journal of Fish Diseases*. 1989. doi:10.1111/j.1365-2761.1989.tb00281.x/abstract
48. Wang Z, Zhang S. The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol. *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd; 2010;29: 773–777. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.002
49. Yazawa R, Hirono I, Aoki T. Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic Res*. Kluwer Academic Publishers; 2006;15: 385–391. doi:10.1007/s11248-006-0009-0

50. Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999.
51. Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010;29: 2–14. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017
52. Song SK, Beck BR, Kim D, Park J, Kim J, Kim HD, et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish and Shellfish Immunology*. 2014;40: 40–48. doi:10.1016/j.fsi.2014.06.016
53. Pionnier N, Falco A, Miest JJ, Shrive AK, Hoole D. Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β -glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. *Fish and Shellfish Immunology*. 2014;39: 285–295. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.008
54. Staykov Y, Spring P, Denev S, Sweetman J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int*. 2007;15: 153–161. doi:10.1007/s10499-007-9096-z
55. Welker TL, Lim C, Yildirim-Aksoy M, Klesius PH. Effect of short-term feeding duration of diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents on immune function and disease resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2011;96: 159–171. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01127.x
56. Arshad U, Takami GA, Sadeghi M, Bai S. Influence of dietary l-selenomethionine exposure on growth and survival of juvenile *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*. 2011. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01639.x
57. Sunyer JO, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1995;45: 333–345.
58. Collazos ME, Barriga C, Ortega E. Optimum conditions for the activation of the alternative complement pathway of a cyprinid fish (*Tinca tinca* L.). Seasonal variations in the titres. *Fish and Shellfish Immunology*. 1994.
59. SHUGAR D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta*. 1952;8: 302–309.
60. Demers NE, Bayne CJ. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 1997;21: 363–373.
61. Eslamloo K, Falahatkar B, Yokoyama S. Effects of dietary bovine lactoferrin

- on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2012;32: 976–985. doi:10.1016/j.fsi.2012.02.007
62. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72: 248–254.
 63. Sakai DK. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 1992.
 64. Joiner K, Brown E, Hammer C, Warren K. ... on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial *The Journal of Immunology*. 1983.
 65. Yano T, Hatayama Y, Matsuyama H, Nakao MN. Optimum conditions for the assay of the classical pathway-complement titer of tilapia (*Tilapia nilotica*) serum. *九州大学農学部紀要*. 1988.
 66. Tort L, Gómez E, Montero D, Sunyer JO. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult Int*. 1996;4. doi:10.1007/BF00175219
 67. Yadav MK, Pradhan PK, Sood N, Chaudhary DK, Verma DK, Debnath C, et al. Innate immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* infected with oomycete pathogen *Aphanomyces invadans*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2014;39: 524–531. doi:10.1016/j.fsi.2014.06.005
 68. Das A, Sahoo PK, Mohanty BR, Jena JK. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011;142: 207–218. doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.017
 69. Whang I, Lee Y, Lee S, Oh M-J, Jung S-J, Choi CY, et al. Characterization and expression analysis of a goose-type lysozyme from the rock bream *Oplegnathus fasciatus*, and antimicrobial activity of its recombinant protein. *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd; 2011;30: 532–542. doi:10.1016/j.fsi.2010.11.025
 70. Buonocore F, Randelli E, Trisolino P, Facchiano A, de Pascale D, Scapigliati G. Molecular characterization, gene structure and antibacterial activity of a g-type lysozyme from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Molecular Immunology*. 2014;62: 10–18. doi:10.1016/j.molimm.2014.05.009
 71. Du Y, Yi M, Xiao P, Meng L, Li X, Sun G, et al. The impact of *Aeromonas salmonicida* infection on innate immune parameters of Atlantic salmon

- (*Salmo salar* L). *Fish and Shellfish Immunology*. 2015;44: 307–315.
doi:10.1016/j.fsi.2015.02.029
72. Rostami HK, Soltani M. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. *Journal of Fish Biology*. 2007.
doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01468.x
 73. Xie Z, Niu C, Zhang Z, Bao L. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol*. 2006;145: 152–157. doi:10.1016/j.cbpa.2006.05.015
 74. Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 2011;35: 1366–1375. doi:10.1016/j.dci.2011.07.002
 75. Eslamloo K, Akhavan SR, Fallah FJ, Henry MA. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. *Fish and Shellfish Immunology*. 2014;37: 147–153. doi:10.1016/j.fsi.2014.01.014
 76. Eslamloo K, Falahatkar B. Variations of some physiological and immunological parameters in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) subjected to an acute stressor. *J Appl Anim Welf Sci*. 2014;17: 29–42. doi:10.1080/10888705.2014.856243
 77. Yin Z, Lam TJ, Sin YM. The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 1995. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.111
 78. Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*; 2009.
 79. Montero D, Izquierdo MS, Tort L, Robaina L, Vergara JM. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers; 1999;20: 53–60. doi:10.1023/A:1007719928905
 80. Cataldi E, Di Marco P, Mandich A. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1998.
 81. Barton BA, Schreck CB, Barton LD. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org*; 1987.
 82. Philip AM, Vijayan MM. Stress-Immune-Growth Interactions: Cortisol Modulates Suppressors of Cytokine Signaling and JAK/STAT Pathway in Rainbow Trout Liver. Boudinot P, editor. *PLoS ONE*. 2015;10: e0129299–18.

doi:10.1371/journal.pone.0129299

83. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res.* 2014;58: 193–210. doi:10.1007/s12026-014-8517-0
84. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol.* 2005;5: 243–251. doi:10.1038/nri1571
85. Pijanowski L, Jurecka P, Irnazarow I, Kepka M, Szwejsler E, Kemenade BMLV-V, et al. Activity of the hypothalamus–pituitary–interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease. *Fish Physiology and Biochemistry.* Springer Netherlands; 2015;: 1–18. doi:10.1007/s10695-015-0084-3
86. Sadhu N, Sharma SRK, Joseph S, Dube P, Philipose KK. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry.* 2014;40: 1105–1113. doi:10.1007/s10695-014-9909-8
87. Cortés R, Teles M, Trídico R, Acerete L, Tort L. Effects of Cortisol Administered through Slow-Release Implants on Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Genomics.* 2013;2013: 619714. doi:10.1155/2013/619714
88. Huang Z-H, Ma A-J, Wang X-A. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *Journal of Fish Diseases.* 2011;34: 619–627. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01275.x
89. Wilson HM. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Front Immunol.* 2014;5: 357. doi:10.3389/fimmu.2014.00357
90. Dimitroglou A, Merrifield DL, Moate R, Davies SJ, Spring P, Sweetman J, et al. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Anim Sci.* 2009;87: 3226–3234. doi:10.2527/jas.2008-1428
91. GÜLTEPE N, SALNUR S, HOŞSU B, HISAR O. Dietary supplementation with Mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus ...*). *Aquaculture Nutrition.* 2011. doi:10.1111/j.1365-2095.2010.00824.x
92. Diaz-Rosales P, Pereiro P, Figueras A, Novoa B, Dios S. The warm temperature acclimation protein (Wap65) has an important role in the inflammatory response of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology.* 2014;41: 80–92. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.012

