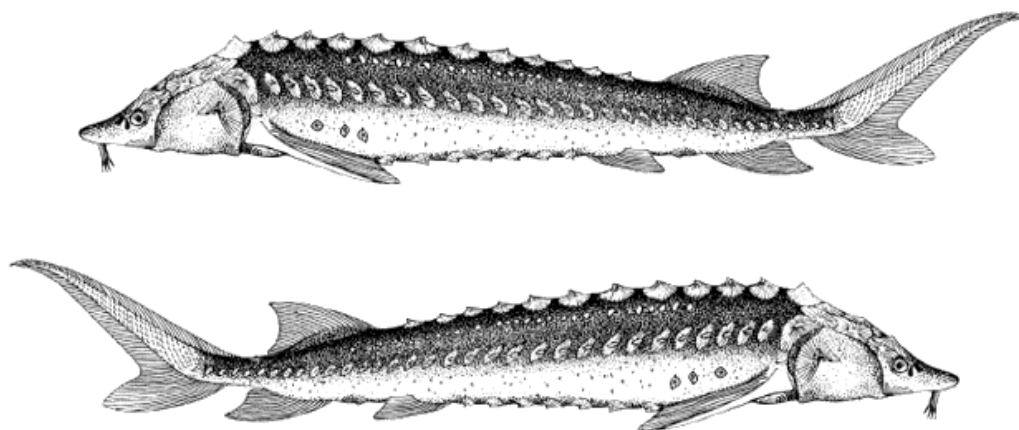


TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOQUÍMICA

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA INDUCIDA POR ESTRÉS TÉRMICO O COMPONENTES BACTERIANOS EN EL ESTURIÓN RUSO.



MARCIO AVERSA

TUTOR: VALERIA SILVA-ÁLVAREZ
CO-TUTOR: ANA MARÍA FERREIRA

MONTEVIDEO, URUGUAY

2018



Resumen	1
1) Introducción	2
1.1) Generalidades sobre el esturión	2
1.2) Historia de la pesca y acuicultura de esturiones	3
1.3) Inmunidad en los peces	5
1.3.1) Características generales del sistema inmune	5
1.3.2) Sistema inmune en peces	8
1.3.3) Sistema complemento.....	9
1.3.3.a) La vía alternativa del complemento	11
1.3.3.b) Sistema complemento en peces	12
1.3.4) Ceruloplasmina.....	13
1.3.5) Lisozima	14
1.3.6) Proteína amiloide A y proteína amiloide P del suero	15
1.4) Efectos del estrés sobre el sistema inmune	17
1.5) Hipótesis de trabajo	19
1.6) Objetivos	20
2) Materiales y Métodos	21
2.1) Reactivos generales	21
2.2) Esturiones	21
2.3) Experimentos in vivo	21
2.3.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta	22
2.3.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos	22
2.4) Obtención de muestras de suero de esturión ruso	23
2.5) Cuantificación de la actividad de la vía alternativa del complemento en suero de esturión ruso	23
2.6) Cuantificación de la actividad de ceruloplasmina en suero de esturión ruso	24
2.7) Cuantificación de la actividad de lisozima en suero de esturión ruso	25
2.8) Cuantificación de niveles de proteína total en suero de esturión ruso	25
2.9) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso mediante Western blot	25
2.10) Análisis estadístico general de los experimentos	26
3) Resultados	28
3.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta	28

3.1.1) Evolución de la masa corporal de los esturiones a lo largo del experimento	28
3.1.2) Cuantificación de los niveles de proteína total en suero de esturión ruso	28
3.1.3) Cuantificación de la actividad de componentes enzimáticos innatos en suero de esturión ruso	30
3.1.4) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso	30
3.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos	35
3.2.1) Evolución de la masa de los esturiones a lo largo del experimento	35
3.2.2) Cuantificación de los niveles de proteína total en suero de esturión ruso	35
3.2.3) Cuantificación de la actividad de componentes enzimáticos innatos en suero de esturión ruso	36
3.2.4) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso	36
4) Discusión	40
4.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta	40
4.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos	44
5) Conclusiones	47
6) Perspectivas	48
7) Bibliografía	49



RESUMEN



El esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) es criado en Uruguay en la granja acuícola “Esturiones del Río Negro” para la comercialización de sus huevos sin fertilizar (caviar). A pesar del éxito que esta actividad viene teniendo, los problemas no están ausentes. En los meses cálidos del año los esturiones se vuelven más susceptibles a infecciones bacterianas, sugiriendo que el aumento de la temperatura afecta sus defensas. Con el fin de comprender los procesos subyacentes a dicha problemática, nuestro grupo de investigación realizó estudios en donde se observó que la exposición de esturiones rusos a temperaturas $\geq 24^{\circ}\text{C}$ por varias semanas afectó la funcionalidad de componentes enzimáticos innatos del suero, conduciendo a la disminución en la actividad de la vía alterna del sistema complemento (VA) y la ceruloplasmina (Cp), y al aumento en los niveles de lisozima. En este trabajo buscamos profundizar en la caracterización de la respuesta del esturión frente al estrés térmico y a componentes bacterianos. Para ello, utilizamos dos modelos experimentales y analizamos los niveles séricos de la VA, Cp y lisozima, así como también de las proteínas amiloides A y P (SAA y SAP), recientemente identificadas como potenciales marcadores de fase aguda en el esturión ruso. El primer modelo implicó la exposición de esturiones juveniles a gradientes de temperatura de $18\text{-}24^{\circ}\text{C}$ (moderadas) o de $24\text{-}31^{\circ}\text{C}$ (altas) durante 27 días. Los peces expuestos a altas temperaturas mostraron alteraciones en los componentes enzimáticos innatos similares a las observadas en los esturiones cultivados en las granjas durante el verano. No se observaron alteraciones en los niveles séricos de la SAP en ningún caso; mientras que al día 7 los niveles de la SAA fueron significativamente mayores sólo en los peces expuestos a temperaturas altas, volviendo a los niveles basales al día 27. Los resultados del presente experimento constituyen una nueva evidencia de que el cultivo de esturiones rusos a temperaturas $\geq 24^{\circ}\text{C}$ provoca un debilitamiento general de sus defensas innatas. Además, tomando en cuenta datos previos obtenidos en condiciones de hacinamiento, se observó que una baja densidad de cultivo repercute favorablemente en la tolerancia de los esturiones a las altas temperaturas. Asimismo, los datos obtenidos para la SAA y la SAP reflejan la necesidad de identificar nuevos marcadores de estrés crónico en esta especie, lo cual es crucial para el diseño de estrategias de monitoreo del estado sanitario de estos peces durante su cría en establecimientos de piscicultura. El segundo modelo implicó la estimulación de esturiones juveniles con *Aeromonas hydrophila* inactivadas (10E^9 UFC/kg por vía intraperitoneal) usando PBS como control. No se observaron cambios significativos en ninguno de los componentes enzimáticos innatos analizados, así como tampoco en los niveles de SAP del suero. En contraste, al día 3 p.i. los niveles de SAA aumentaron significativamente tanto en el grupo inoculado con *A. hydrophila* como en el grupo control. Estos resultados muestran que incluso un daño menor como el provocado por la inyección podría inducir un aumento en la SAA, sugiriendo que puede comportarse como una PFA positiva. Asimismo, el modelo de estimulación empleado no resultó óptimo para el estudio de la respuesta de fase aguda en esturión ruso. Por este motivo, sería necesario realizar experimentos de infección para evaluar los niveles de SAA en forma individual y poder verificar el comportamiento de esta proteína durante la fase aguda de la infección. En suma, este trabajo contribuye a profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune innata del esturión ruso, un pez condrósteo cuyo sistema inmune es prácticamente desconocido.



1) INTRODUCCIÓN



1.1) Generalidades sobre el esturión

El esturión es un pez que pertenece a la clase de peces óseos actinoptergios -uno de los grupos más amplios de vertebrados que existen- a la subclase de los condrósteos y al orden de los acipenseriformes. Dicho orden está compuesto por dos familias: Polyodontidae (agrupa a los comúnmente llamados peces espátula) y Acipenseridae, la cual está formada por 27 especies de esturión¹ y constituye la más numerosa dentro del grupo de peces “fósiles vivos” (Figura 1.1)^{2,3}. La denominación fósiles vivos tiene una base genética, ya que se debe a las características únicas del cariotipo de los acipenseriformes: el bajo nivel de heterocigosis, la poliploidía y la presencia de una alta proporción de micro-cromosomas en asociación con cromosomas de gran tamaño se encuentran normalmente en grupos filogenéticamente muy antiguos como por ejemplo las lampreas (Petromyzontidae)⁴; de hecho se estima que este grupo de peces fue contemporáneo a los dinosaurios, habitando nuestro planeta alrededor de 200 millones de años atrás⁵.

La morfología general de los esturiones es muy característica; presentan un cuerpo alargado con una base ventral plana, un esqueleto cartilaginoso con branquiespinas y placas óseas que recubren la piel longitudinalmente. Su mandíbula es protractil al igual que la de los tiburones, los adultos no tienen dientes y la boca presenta una hilera de 4 bigotes al frente. En un principio algunos de estos rasgos eran considerados primitivos, pero más adelante se comprobó que en realidad surgieron a partir de estructuras definidas que revirtieron posteriormente en la evolución, como es el caso de la reducción de la osificación o la ausencia de dientes. El ciclo de vida de estos peces es bastante largo, alcanzando la madurez sexual en etapas tardías de la vida (5-8 años). Un hecho peculiar y poco frecuente en estos peces es que en general las hembras de esturión no desovan anualmente. Algunas especies pueden vivir durante 100 años y alcanzar un peso de más de 1000 kilogramos, su crecimiento no se detiene en ninguna etapa de la vida y tampoco se ve considerablemente disminuido luego de la primera reproducción⁴.

El hábitat natural de los esturiones es el hemisferio norte del planeta, en particular la mitad de las especies vive en la región de la estepa póntica en Europa, un tercio en América del Norte y el resto en el este asiático y Siberia⁴; la presente distribución biogeográfica de las distintas especies existentes refleja relaciones filogenéticas entre los peces de dichas localizaciones². Los requisitos térmicos para la maduración y el desarrollo temprano de los esturiones, procesos que generalmente ocurren a temperaturas menores a los 20°C, son la base crucial para comprender por qué habitan en dichas regiones septentrionales. Todos los miembros de la familia Acipenseridae desovan en aguas de baja concentración salina (menor al 0.1%), sin embargo muchas especies suelen migrar para la reproducción o para alimentarse hacia aguas de mayor contenido salino como el agua de mar (contiene aproximadamente un 35% de sal)⁵.

A pesar de que la investigación en esturiones ha exhibido un crecimiento continuo en cuanto a trabajos publicados en las dos últimas décadas¹, todavía queda mucho por descubrir y el volumen de investigaciones dedicadas a esta temática sigue siendo significativamente menor respecto a la gran mayoría de áreas de la ciencia. En la actualidad la investigación en esturiones sigue suponiendo un desafío debido a la escasa bibliografía disponible y a la carencia de datos

relevantes como estudios genómicos o proteómicos. Por lo tanto es necesario redoblar esfuerzos para lograr un alcance mucho más amplio promoviendo si es posible la cooperación tanto a nivel nacional como internacional.

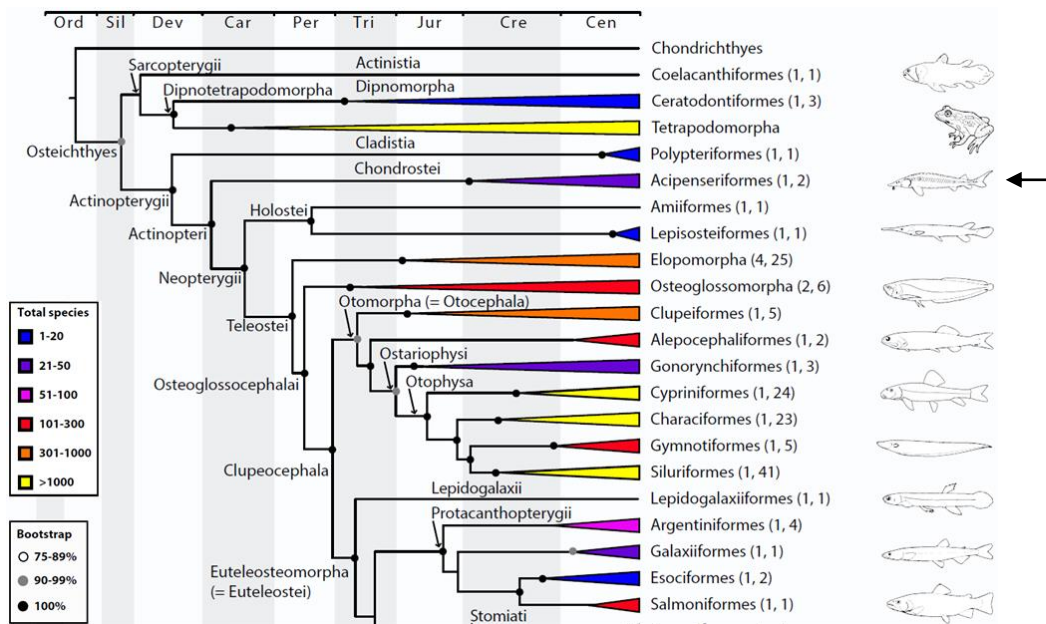


Figura 1.1 – Árbol filogenético parcial construido a partir de 1990 especies de peces óseos. Se exhiben clados colapsados que destacan las relaciones de los grupos principales. Los números entre paréntesis indican la cantidad de órdenes y familias incluidos en cada clado mayor, respectivamente. La flecha negra indica la posición del orden Acipenseriformes, compuesto por dos familias, como se describe en la sección 1.1). Figura adaptada de Betancur, Wiley & Arratia, 2017.

1.2) Historia de la pesca y acuicultura de esturiones

Desde el punto de vista de su valor económico, los esturiones son peculiares debido a la calidad de su carne, y fundamentalmente a sus huevos sin fertilizar (caviar), alimento considerado un manjar gastronómico en todo el mundo. Además este pez es relativamente sencillo de atrapar en comparación con otros especímenes. Todo esto contribuyó a que la pesca del esturión creciera a un ritmo vertiginoso a mediados del siglo XX, fundamentalmente en las regiones linderas a los mares Caspio y Negro; dicho crecimiento se tradujo en la sobreexplotación de sus reservas naturales, un fenómeno de origen antiguo que se mantuvo a lo largo del tiempo. Sumado a esto, la actividad del hombre ha contribuido al deterioro del hábitat natural de estos peces, influyendo negativamente en el mantenimiento de las poblaciones porque impide el correcto desarrollo de los embriones o disminuye la biodisponibilidad de invertebrados bentónicos que forman parte esencial de la dieta de la gran mayoría de especies de esturión⁴. Entre otros factores antropogénicos que impactan directamente sobre la vida de los esturiones están las actividades que alteran los cursos de agua, como la construcción de represas o diques que modifican su cauce natural o las actividades productivas que conducen a la acumulación de sustancias tóxicas en el sedimento deteriorando la calidad de la misma. Como consecuencia, la esperanza de vida de los esturiones se ha reducido unos diez años en la última década y se estima que la población salvaje ha tenido un declive de más de un 90% en los últimos 45 años. Actualmente la mayoría de las especies de *Acipenser* están consideradas en peligro de extinción, de hecho la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) ha incluido a 16 especies de

esturión en la lista de especies en peligro crítico y pronostica la extinción de las poblaciones nativas remanentes en los próximos años^{6,7}.

En respuesta a esta situación se elaboraron regulaciones estatales que protegen la conservación de estas especies y se desarrollaron campañas para difundirlas, lo cual llevó a una significativa disminución en la pesca del esturión. La regulación de su comercio por parte de la Convención para el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción tuvo un fuerte impacto a nivel internacional a través de sus recomendaciones para asegurar un manejo efectivo de las poblaciones salvajes. Además, se impusieron topes anuales para la exportación de productos derivados de estos peces e incluso se ha prohibido su pesca en varios países⁴. A pesar de esto, la demanda de caviar en el mercado aumentaba en forma constante, por lo que la acuicultura de esturiones se convirtió en una alternativa ideal. Existen reportes que confirman, ya desde fines del siglo XIX, la aplicación de técnicas de reproducción artificial y procesamiento de caviar tanto en Rusia como en Norteamérica. Así fue que, a finales de la década de los 90, concomitantemente a la marcada disminución en la pesca, se dio el nacimiento de las granjas de cultivo de esturiones; a partir de allí el crecimiento de dicha actividad continúa en forma exponencial y parece no tener límite, tal como puede observarse en el panel A de la Figura 1.2. En los últimos quince años la producción de caviar a partir de esturiones pescados es prácticamente nula, mientras que el caviar producido a partir de esturiones cultivados ha aumentado, con una importante contribución al mercado global (ver panel B, Figura 1.2)⁸.

Nuestro país no ha sido ajeno a esta situación y de hecho se encuentra desde hace más de una década entre los primeros quince países productores de caviar, siendo uno de los pocos ubicados fuera del área del hábitat natural de los esturiones, junto con Arabia Saudita y Vietnam (panel C, Figura 1.2)⁸. En la actualidad existen tres granjas acuícolas en Uruguay, siendo la granja de piscicultura “Esturiones del Río Negro” (ERN) el primer establecimiento de esta índole y el de mayor envergadura; está localizada en las proximidades de la represa de Baygorria y actualmente se focaliza en el cultivo de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*). A pesar del éxito que esta actividad viene teniendo en nuestro país, los problemas y desafíos no están ausentes. El más relevante tiene que ver con la exposición de los esturiones a un rango muy amplio de temperatura, que puede ir desde los 10°C en invierno hasta los 30°C en verano, dependiendo de la temperatura del agua del Río Negro. Estas variaciones resultan críticas para los esturiones considerando su incapacidad para regular la temperatura corporal (poiquiloterma). En particular, durante los meses cálidos del año, cuando la temperatura promedio del agua es superior a los 24°C, se ha visto que los esturiones se vuelven más susceptibles a sufrir infecciones bacterianas, sugiriendo que el aumento de la temperatura afecta las defensas de estos peces (comunicación personal, Ing. Daniel Conijeski, ERN). El incremento en la mortalidad de los peces durante el verano uruguayo genera importantes pérdidas económicas para las granjas acuícolas. Por esta razón, comprender cómo el aumento de temperatura afecta el sistema inmune de los esturiones es fundamental para diseñar estrategias que permitan atender esta problemática. En este sentido, en el laboratorio de Inmunología (Facultad de Ciencias/Química, UdelaR) se han puesto a punto varias metodologías para analizar el efecto de la temperatura sobre algunos componentes séricos del sistema inmune del esturión ruso. En este trabajo se pretende profundizar en la caracterización de estos componentes, evaluando cómo se ven afectados cuando los esturiones se exponen a gradientes de temperatura o se estimulan con componentes bacterianos. En las secciones siguientes se

describirán los componentes del sistema inmune de los peces, con especial énfasis en aquellos analizados en el presente trabajo.

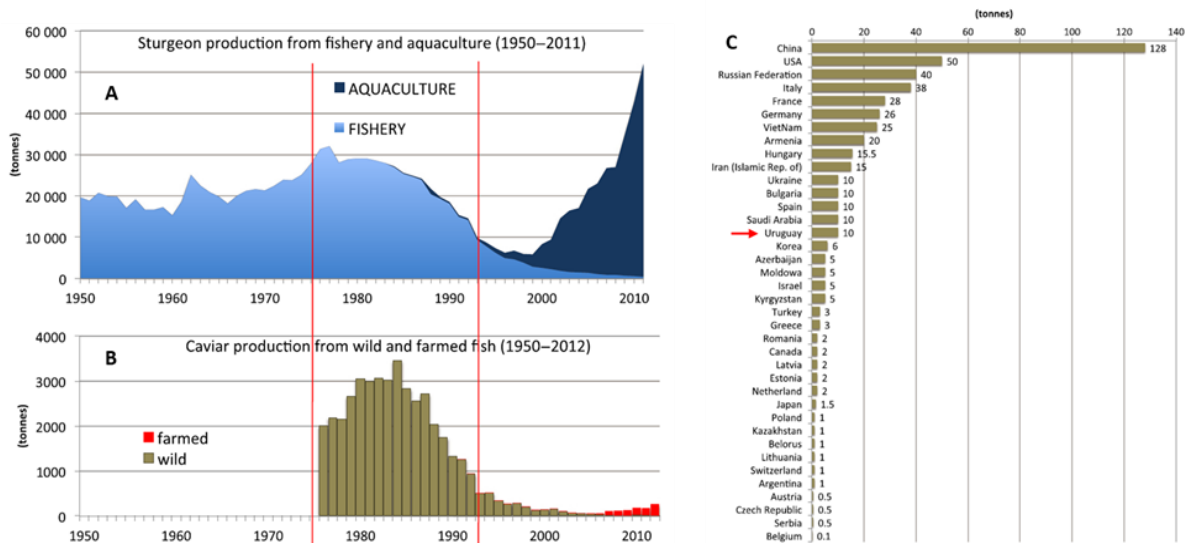


Figura 1.2 – Perspectiva general de la pesca y acuicultura de esturión en los últimos 65 años. La figura A muestra los niveles (en toneladas) de esturiones pescados (celeste) o cultivados en acuicultura (azul oscuro) en el período 1950-2011. En la figura B se exhiben las toneladas de caviar producido a partir de peces salvajes (verde oscuro) o cultivados (rojo) en el período 1950-2012. En C se presenta una lista con la producción anual de caviar (en toneladas) estimada en el año 2016 en los países donde hay granjas acuícolas operativas, la posición de Uruguay se indica con la flecha roja. Figuras adaptadas de Bronzi & Rosenthal, 2014.

1.3) Inmunidad en los peces

En la siguiente sección se describirán en primer lugar las características generales del sistema inmune de los mamíferos debido a que su conocimiento es mucho más exhaustivo respecto al sistema inmune de los peces y a que, además, se acepta que muchas de las propiedades del sistema inmune de ambos grupos son compartidas. Luego se describirán algunas particularidades específicas de la inmunidad en los peces, para continuar con la descripción de los distintos parámetros del sistema inmune analizados en este trabajo. Es importante aclarar que, a menos que se indique lo contrario, en esta sección el término peces referirá siempre a la infraclase teleósteos, ya que la información que se presenta deriva mayormente de estudios realizados en teleósteos y existen muy pocos estudios en condrósteos. A pesar de ello, aceptamos que la información general es válida y aplicable a los esturiones, dado que son grupos filogenéticamente cercanos, como puede apreciarse en la Figura 1.1.

1.3.1) Características generales del sistema inmune

Esta sección está basada fundamentalmente en el libro de inmunología general Janeway's Immunobiology⁹. La función principal del sistema inmune es mantener la integridad de los tejidos, desencadenando mecanismos que garanticen el reconocimiento y subsiguiente eliminación de organismos patógenos. Además, participa en los mecanismos de protección frente a un posible daño tisular, participando en las etapas de reparación del tejido dañado, que también sobrevienen luego de la eliminación del patógeno. Para cumplir dicha función, este sistema cuenta con componentes solubles y celulares, éstos últimos distribuidos en la sangre, tejidos y órganos, que actúan en forma orquestada para asegurar la homeostasis del organismo. El sistema inmune suele dividirse en dos ramas: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Esta división es en cierta medida artificial, ya que estas ramas no actúan en forma independiente, sino más bien todo lo contrario: la respuesta innata precede a la adaptativa, la

activa y determina su naturaleza, cooperando para lograr la protección del individuo. El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa y abarca mecanismos que permiten una respuesta inmediata ante el contacto con patógenos o ante un posible trauma. Incluye mecanismos que están muy conservados a lo largo de todo el reino animal, siendo más primitivos y simples, pero no por eso menos importantes. La primera estrategia innata consiste en limitar la entrada de los patógenos; en primera instancia con barreras físicas, como lo son los epitelios de la piel y las mucosas, y en segunda instancia con barreras químicas adicionales, que involucran, entre otros, componentes microbicidas como la lisozima y las defensinas, secretados por dichos epitelios. A nivel celular, la respuesta inmune innata está mediada por las mencionadas células epiteliales, por células fagocíticas como células dendríticas, neutrófilos, monocitos y macrófagos, y por células linfoides innatas, como por ejemplo las células NK (del inglés, *natural killer*). A nivel molecular, la respuesta celular o dirigida por componentes solubles depende de la presencia de receptores llamados PRRs (por sus siglas en inglés, *pattern recognition receptor*), capaces de reconocer patrones moleculares específicos y conservados en los patógenos denominados colectivamente PAMPs (por sus siglas en inglés, *pathogen associated molecular pattern*). Dentro de los PAMPs encontramos estructuras como la flagelina, lipopolisacáridos (LPS) o ácidos nucleicos bacterianos o virales. Los PRRs también pueden reconocer algunas moléculas del hospedero que constituyan señales de daño tisular denominadas DAMPs (por sus siglas en inglés, *damage associated molecular pattern*) como por ejemplo los depósitos de ATP, cristales de ácido úrico o proteínas de shock térmico. Estos receptores tienen por tanto una especificidad restringida a dichas señales de peligro, asegurando un discernimiento preciso entre componentes propios normales y componentes asociados a patógenos o a daño tisular. Los PRRs están codificados en la línea germinal por lo que son invariantes y comunes a varios tipos celulares. La activación de la respuesta inmune innata da lugar a diversos mecanismos efectores para lograr la eliminación efectiva de los patógenos. En el caso de las bacterias, particularmente aquellas de vida extracelular, la lisis mediada por el sistema de complemento (SC), la lisozima o péptidos antimicrobianos, y la fagocitosis por macrófagos o neutrófilos son los mecanismos principalmente utilizados. Para los patógenos de mayor tamaño, los basófilos y eosinófilos degranulan componentes de gran poder citotóxico, y en el caso de infecciones virales las células NK son capaces de inducir la apoptosis de las células infectadas. A su vez, dicha activación promueve la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias que median una serie de acciones que caracterizan el estado inflamatorio: activan células residentes como macrófagos o células dendríticas, promueven cambios en el endotelio vascular que favorecen el reclutamiento de células inmunes desde la sangre al sitio de infección e incluso inducen una respuesta sistémica conocida como respuesta de fase aguda. Durante esta respuesta se desencadenan mecanismos como fiebre, leucocitosis (aumento en número de leucocitos circulantes) y cambios metabólicos, como por ejemplo variaciones en la síntesis hepática de varias proteínas plasmáticas, denominadas proteínas de fase aguda (PFAs). Estas proteínas participan en la regulación de la respuesta inmune, la coagulación, la proteólisis y la reparación de tejidos; algunas de ellas pueden opsonizar microorganismos o activar el complemento, otras se encargan de colaborar en la eliminación de remanentes celulares y radicales libres, y algunas neutralizan enzimas proteolíticas. Los cambios inducidos por la respuesta de fase aguda son beneficiosos para el organismo ya que colaboran en la prevención del crecimiento microbiano y en la restauración de la homeostasis¹⁰. En la mayoría de los casos, estos mecanismos innatos logran la destrucción del patógeno, por lo que la respuesta se apaga

en pocos días. Sin embargo, cuando la inmunidad innata no es suficiente para eliminar al patógeno funciona como un gatillo para activar la respuesta inmune adaptativa. La conexión entre ambas ramas del sistema inmune está dada esencialmente por las células dendríticas y por la reacción inflamatoria generada por activación de la respuesta innata. En el tejido inflamado ocurre una acumulación de líquido que ejerce una presión local, dirigiendo el tránsito de las células dendríticas y de antígenos a través de la linfa hacia los ganglios linfáticos más próximos, sitios en donde se encuentran los linfocitos T y B, células del sistema inmune adaptativo.

El sistema inmune adaptativo o adquirido es exclusivo de los vertebrados y funciona mediante moléculas de reconocimiento que se expresan sobre los linfocitos con una distribución clonal, es decir que cada clon de linfocitos expresa receptores con una especificidad única y altamente diversa. Esto le confiere al sistema inmune adaptativo la capacidad de reconocer en forma específica casi cualquier estructura química que ingrese al organismo. La amplia diversidad de reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos se basa fundamentalmente en el proceso de recombinación somática, característico de dichas células; el mismo consiste en la combinación de segmentos génicos que dan lugar a exones que no estaban codificados en la línea germinal y que son diferentes para cada linfocito, además es un proceso completamente aleatorio y no dependiente del antígeno. Los receptores de los linfocitos B (BCR) o su forma secretada, los anticuerpos, reconocen antígenos de cualquier naturaleza química, mientras que los receptores de los linfocitos T (TCR) solamente pueden reconocer antígenos peptídicos presentados en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células que presentan estos complejos péptido-MHC se conocen como células presentadoras de antígeno. Entre ellas se destacan las células dendríticas, que como ya se comentó, participan mediando la conexión entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Inicialmente las células dendríticas residentes en los tejidos se encuentran en estado inmaduro y tienen la función de muestrear el tejido en busca de amenazas; presentan múltiples receptores para PAMPs, DAMPs y citoquinas inflamatorias, de forma que las señales de peligro local promueven su maduración y activación. Durante este proceso ocurre un aumento de la expresión de varias moléculas en su superficie, algunas responsables del cambio en su tropismo, mediando la migración hacia los ganglios linfáticos más próximos, y otras involucradas en la activación de aquellos linfocitos T que reconozcan los complejos péptido-MHC presentados en la célula dendrítica de forma específica. Estos linfocitos T se activan y, en diferentes contextos, pueden diferenciarse en linfocitos T citotóxicos que median la apoptosis de células infectadas o tumorales, linfocitos T_H1 que aumentan la capacidad fagocítica de los macrófagos, T_H2 que participan en la respuesta frente a parásitos helmintos, T_H17 que promueven el reclutamiento de neutrófilos, y linfocitos T_H foliculares que median la activación de los linfocitos B y la subsecuente secreción de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden neutralizar directamente un antígeno, opsonizar patógenos favoreciendo su fagocitosis por macrófagos o neutrófilos, activar la vía clásica del complemento o mediar la citotoxicidad de células NK o eosinófilos al unirse a células tumorales, infectadas o a la superficie de parásitos. En el proceso de diferenciación de los linfocitos se generan -además de células efectoras- células de memoria, las cuales tienen una vida media mayor a las efectoras y aseguran una respuesta más rápida y eficiente ante un segundo encuentro con el patógeno; este fenómeno se conoce como memoria inmunológica y es la base de la vacunación.

1.3.2) Sistema inmune en peces

Recientemente el interés en la inmunología de peces ha tenido un gran crecimiento por varias razones, entre ellas, las mencionadas pérdidas económicas que suponen las infecciones de dichos animales para la industria del cultivo de peces¹¹. Este heterogéneo grupo de organismos se encuentra en la encrucijada evolutiva entre la respuesta inmune innata y la aparición de la respuesta inmune adaptativa ya que son el primer ejemplo (en términos filogenéticos) de un vertebrado con un sistema inmune adaptativo; por este motivo el estudio del sistema inmune de los peces tiene un gran impacto en el entendimiento de la historia evolutiva del sistema inmune¹². Existe evidencia tanto funcional como genética de que los peces tienen una red de moléculas de señalización, citoquinas y quimioquinas que regulan y coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa. El sistema inmune innato tiene trascendental importancia a la hora de combatir infecciones en los peces dada la ineficiencia intrínseca de la respuesta adaptativa, la cual se debe a limitaciones en la maquinaria genética y a la tasa metabólica más lenta de los animales poiquilotermos. Además, a diferencia de los mamíferos, los peces no poseen ganglios linfáticos, por lo que en algunos aspectos la arquitectura del sistema inmune es diferente a la descrita para los mamíferos¹³. Esto se traduce en una memoria inmunológica y un repertorio de anticuerpos limitados, con una respuesta adaptativa mucho más lenta que podría extenderse sólo durante 12 semanas^{12,14}. Otra particularidad de los peces es que carecen de médula ósea, sin embargo la porción cefálica del riñón, denominada riñón anterior, asume las funciones hematopoyéticas por lo que es considerado un análogo de la médula ósea de mamíferos, además de ser el principal órgano inmune en los peces¹³. Otros órganos que participan en la respuesta inmune de los peces son el bazo, el timo, el tejido linfóide asociado a las mucosas del tracto intestinal, la piel y las branquias¹³. La inmunidad innata parece tener una funcionalidad potenciada en los peces respecto a los mamíferos¹¹, de hecho se ha comprobado que varios componentes del sistema inmune innato de peces exhiben mayor actividad y diversidad en comparación con distintas especies de mamíferos. Por ejemplo, en peces se ha descrito una mayor variedad de PRRs, tales como los receptores de tipo Toll (TLR), muchos de los cuales no tienen ortólogos en los mamíferos y posiblemente contribuyan al reconocimiento de otros PAMPs y/o DAMPs¹³. También se ha descrito la presencia de varias isoformas de ciertos componentes del SC, como C3 o el factor B (fB), y una alta actividad espontánea de la vía alternativa de dicho sistema¹⁵. La expansión de familias génicas vinculadas a la inmunidad innata en los peces sería la causa primordial del aumento en la diversidad y flexibilidad funcional de dicha rama, lo que apoya la idea de un sistema inmune innato con un rol protagónico en los mecanismos de defensa de estos animales^{11,14}.

Dada la relevancia del sistema inmune innato en los peces, en los últimos años ha tomado mayor interés analizar los efectos ocasionados por condiciones adversas (asociadas a cambios en el ecosistema natural o a las condiciones de cultivo) sobre los niveles y/o actividad de sus componentes. Estos estudios muestran un escenario complejo, donde distintos componentes innatos se comportan de forma diferente dependiendo del tipo de condición adversa y de la especie de pez en cuestión, haciendo muy improbable la posibilidad de utilizar un único parámetro como biomarcador universal¹⁶. Así, varios parámetros han sido utilizados como indicadores del efecto de distintos factores externos sobre el sistema inmune de peces, incluyendo la actividad del SC y de la lisozima, y en ciertos casos las variaciones en los niveles de proteínas asociadas a la respuesta de fase aguda¹⁴. Dichos factores incluyen rasgos genéticos¹⁷,

factores estacionales¹⁸, temperatura ambiente¹⁹, contaminación²⁰, así como también el estrés inducido por la manipulación o por el hacinamiento durante el cultivo de los peces¹⁴. A continuación se sintetizarán las principales características de los principales componentes innatos que han sido blanco de este tipo de estudios.

1.3.3) Sistema complemento

El SC es un componente fundamental de la inmunidad innata. Es una de las cascadas enzimáticas que pueden desencadenarse en el plasma e incluye un paso inicial de disparo vinculado a un reconocimiento selectivo de motivos asociados al peligro o a lo extraño, sucesivos pasos de activación proteolítica, mecanismos efectoros y sistemas de control que evitan su activación exacerbada (revisado por Kolev *et al.*²¹). En mamíferos está compuesto por cerca de 30 proteínas, gran parte de ellas circulan en el plasma en forma inactiva (incluyendo varias proteasas de serina), mientras que otras se encuentran en membranas celulares y actúan como moléculas reguladoras o receptores capaces de inducir o modular funciones celulares. Tras su activación el SC media varias funciones efectoras como la eliminación de patógenos, promoción de respuestas inflamatorias, la eliminación de restos de células apoptóticas y necróticas, pero además sus efectos pueden contribuir o influenciar el desarrollo de la respuesta adaptativa. Existen 3 vías distintas de activación: la vía clásica (VC), la vía de las lectinas (VL) y la vía alternativa (VA). Estas vías difieren en los mecanismos de iniciación, pero confluyen en la formación de complejos enzimáticos, denominados convertasas de C3, que se unen covalentemente a la superficie blanco (generalmente la superficie de patógenos) y median la proteólisis de C3, componente central del SC. El clivaje proteolítico de la molécula de C3 por cualquiera de las convertasas de C3 da lugar a la formación de dos fragmentos: C3a que permanece soluble, y C3b que es capaz de unirse covalentemente a la superficie blanco, principalmente a través de sus carbohidratos o glicoproteínas. Esto ocurre porque el fragmento C3b posee un grupo tioéster expuesto, que es susceptible al ataque nucleofílico de grupos hidroxilos o aminas, lo cual conduce a su anclaje mediante un enlace tipo éster, o amida, respectivamente.

La formación de la convertasa de C3 de la VC es mediada por una serie de reacciones donde intervienen los componentes C1, C2 y C4, que son disparadas principalmente por el reconocimiento de anticuerpos en complejos inmunes. Brevemente, el complejo C1 -en particular C1q- reconoce inmunocomplejos de IgM e IgG conduciendo a la activación proteolítica secuencial de C1r y C1s, que lleva finalmente a la formación del complejo C4bC2a que es la convertasa clásica de C3 (ver Figura 1.3). Dado que esta vía requiere de la presencia de anticuerpos, se la considera una rama adaptativa del SC, sin embargo debe tenerse en cuenta que durante la respuesta innata podrían formarse inmunocomplejos con participación de inmunoglobulinas naturales (en particular de tipo IgM). Además, se ha comprobado que C1q también puede unirse a complejos de pentraxinas con sus ligandos, como los formados por la proteína C reactiva que se sintetiza en un contexto innato a través de la respuesta de fase aguda. En el caso de la VL la señal que dispara su activación es la presencia de PAMPs, caracterizados por contener patrones repetidos de carbohidratos, incluyendo glúcidos ricos en mananos o fucosa, que están presentes en la superficie de los patógenos. Estas estructuras son reconocidas por colectinas (como la lectina de unión a manosa, MBL) o ficolinas del SC, que forman complejos con proteasas de tipo serina, conocidas como MASPs (por sus siglas en inglés, *MBL-associated serine protease*). En forma similar a la VC, la unión de MBL-MASPs o ficolina-MASPs a las

estructuras glucídicas activadoras desencadena la activación proteolítica secuencial de las MASPs, C4 y C2, conduciendo a la formación de la convertasa clásica de C3 (ver Figura 1.3). A diferencia de la VC y VL, donde el reconocimiento de componentes asociados a estructuras extrañas (antígenos) o a señales de peligro (PAMPs) opera como un disparador, en la VA, la activación se asocia con la pérdida de mecanismos de autorregulación que funcionan sobre las células del hospedero pero no sobre la superficie de los patógenos. En un organismo sano la activación de la VA podría ocurrir en forma espontánea en el plasma y sobre las células, dado que todos los componentes necesarios para iniciar la vía circulan en el plasma (C3, factores B y D). Sin embargo la vía no se activa gracias a la existencia de reguladores negativos en el plasma (factor H) y en membranas celulares, que impiden que dichas reacciones se desencadenen. La activación de la VA no sólo puede inducir por sí misma los efectos del SC, sino que puede funcionar como un potente ciclo de amplificación de su activación porque el C3b generado por la activación de cualquiera de las otras vías puede dar lugar a nuevas convertasas de C3 de la VA (notar que el fragmento C3b forma parte esta convertasa, ver Figura 1.3). Finalmente, vale la pena mencionar que las tres vías del SC requieren cationes divalentes para su activación. En particular la VC y la VL requieren la presencia conjunta de Ca^{2+} y Mg^{2+} para su activación mientras que la VA depende únicamente del catión Mg^{2+} . Por un lado, la presencia de Ca^{2+} es necesaria para la formación del complejo C1 y además activa a las MASPs e interviene en la unión MBL-ligando; por otro lado, el Mg^{2+} es imprescindible para la actividad de ambas convertasas de C3²². Estas características permiten controlar -a través del uso de agentes quelantes como EDTA o EGTA- la activación de las vías del SC para determinar la actividad específica de cada una de ellas en el laboratorio.

Tras la activación de cualquiera de las vías del SC, el C3b formado puede unirse en la proximidad de las convertasas de C3 para formar el siguiente complejo proteolítico, la convertasa de C5, que escinde al componente C5 en C5a y C5b. C5b es la molécula que da inicio al proceso de formación de un complejo macromolecular, llamado complejo de ataque a la membrana (MAC), a través de una secuencia de reacciones que involucran a los componentes C6 a C9 (ver Figura 1.3). El MAC genera un poro en la membrana celular del patógeno permitiendo el libre intercambio de iones entre los compartimientos intra y extracelular. Dicho intercambio genera una diferencia de concentraciones iónicas, lo cual promueve el ingreso de agua, derivando en la lisis osmótica del patógeno. El C3b unido a superficies celulares, así como también el iC3b, fragmento resultante del clivaje de C3b, son opsoninas, es decir que facilitan la eliminación de patógenos como bacterias o parásitos unicelulares por fagocitosis a través de su reconocimiento por receptores específicos presentes en células fagocíticas. Sumado a esto, los componentes C1q y C4b, al igual que las ficolinas y colectinas de la VL, también son opsónicos y contribuyen a la eliminación de este tipo de patógenos. Por otro lado, el C3a y principalmente C5a tienen una potente actividad como anafilatoxinas y además median la quimiotaxis y degranulación de leucocitos, promoviendo la inflamación.

Como el SC es un mecanismo potencialmente muy dañino dada su gran capacidad para amplificar la generación de mediadores biológicamente activos (opsoninas, anafilatoxinas, moléculas quimioatrayentes, complejos líticos), es necesario controlar finamente su activación para evitar que sus efectos se desplieguen sobre las células sanas del hospedero. Para ello cuenta con múltiples factores reguladores como el inhibidor de C1 (C1INH), la proteína de unión a C4 (C4bp), el fH, el factor I (fi), el factor de aceleración del decaimiento (DAF), la proteína cofactor de membrana (MCP) y el CD59 o protectina. Estos factores pueden actuar en distintos

niveles de la cascada: el C1INH es capaz de inactivar tanto a los componentes C1r y C1s de la VC como a las MASPs de la VL; DAF, MCP, fH o C4bp actúan inhibiendo la activación de C3, ya sea promoviendo la disociación de las convertasas de C3 o participando como cofactores del fI que cataliza la inactivación proteolítica de C3, mientras que CD59 impide la formación del complejo terminal^{9,23}.

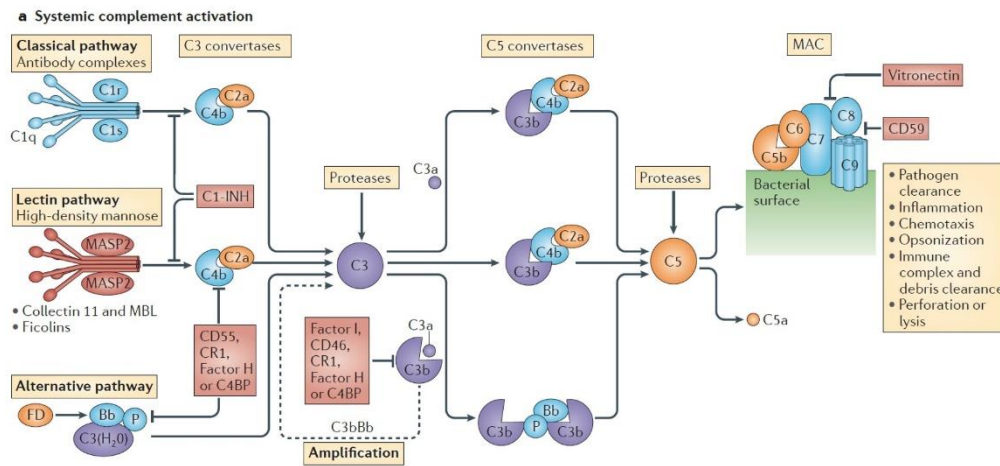


Figura 1.3 – Representación esquemática de las tres vías de activación, convertasas y vía lítica del sistema complemento. Figura adaptada de Kolev, Le Friec & Kemper, 2014²¹.

1.3.3.a) La vía alternativa del complemento

Dentro de los componentes innatos del esturión analizados en este trabajo está la actividad de la VA del SC, por lo cual dicha vía se detalla a continuación con más profundidad. Como ya se explicó, el disparo y la formación de la convertasa de C3 de la VA pueden ocurrir espontáneamente por las características bioquímicas del componente C3 y por sus interacciones con los factores B y D. El C3 es un componente muy abundante en el plasma sanguíneo, y posee un enlace tioéster altamente reactivo que puede hidrolizarse espontáneamente formando una molécula llamada C3(H₂O). Como consecuencia de esta hidrólisis, la estructura nativa de C3 se ve modificada, permitiendo la unión del factor B. Este factor cambia su conformación tras la unión al C3(H₂O), exponiendo ahora un sitio de clivaje para el factor D, una pequeña proteasa de serina constitutivamente activa. El clivaje del factor B por el factor D genera los fragmentos Ba y Bb²⁴. Ba es liberado a la solución mientras que Bb, fragmento catalítico del factor B, forma un complejo con el C3(H₂O) que constituye la convertasa de C3 de la fase fluida; esta convertasa tiene una vida media corta, pero conduce a la generación de moléculas de C3b que son potenciales iniciadores de la activación de la VA. Esto es así porque el C3b formado expone el enlace tioéster altamente reactivo que le permite unirse covalentemente a grupos nucleofílicos presentes en macromoléculas solubles o sobre superficies celulares. Cuando el C3b se une covalentemente a una superficie activadora de la VA carente de mecanismos de regulación (por ejemplo la superficie de los patógenos), interacciona con los factores B y D formando convertasas de C3 estables, C3bBb, que dan lugar a la formación de más moléculas de C3b y convertasas C3bBb²³. Además, este proceso se ve favorecido por la presencia de la properdina, una proteína sérica que estabiliza a la convertasa C3bBb, aumentando su vida media²⁴. En contraste, cuando el C3b se deposita sobre células propias sanas, existen mecanismos de control que evitan la amplificación de esta vía a través de reguladores de membrana, como MCP y DAF,

o solubles como el fH y el fI. Estos factores interactúan con los componentes de la convertasa ejerciendo diferentes efectos que incluyen la inhibición de la formación de la convertasa de la VA o la aceleración de la disociación de la misma. Finalmente, como ya se explicó, la VA desemboca en la activación de C5 cuando un fragmento adicional de C3b se une a la convertasa de C3 de la VA, dando lugar a la convertasa alternativa de C5 (C3bBbC3b). Globalmente, la VA es un mecanismo de gran importancia dentro de la inmunidad innata, en primer lugar por su capacidad para llevar a cabo todas las funciones del SC por sí misma, adquiriendo un papel esencial cuando no hay activación de la VC y VL; y en segundo lugar, por ser un poderoso amplificador de dichas vías dado que el C3b formado por cualquiera de ellas es utilizado para la generación de las convertasas de C3 y C5 de la VA, estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva²³ (ver Figura 1.3).

1.3.3.b) Sistema complemento en peces

El sistema complemento en los vertebrados más recientes tiene un rol importante como efector de las respuestas innata y adaptativa; en los más antiguos, por su parte, se activa principalmente por la VA y la VL, siendo importante su papel en la opsonización de material exógeno¹⁵. La aplicación de técnicas de clonado de homología junto con el creciente volumen de datos genómicos y transcriptómicos han permitido la identificación de distintos componentes del complemento en peces. Existen numerosos reportes que permiten afirmar con certeza que casi todos los componentes del complemento de mamíferos tienen homólogos en peces, de hecho se acepta que el complemento de los peces es equivalente o comparable al de los mamíferos tanto desde el punto de vista funcional como también estructural. En particular, un estudio del año 2010 reveló que distintos componentes del SC muestran una amplia distribución tisular en peces, estando presentes en riñón anterior, riñón, intestino, cerebro y gónadas²⁵. Además, muchos componentes como C3, C4 o el fB son transferidos desde la fuente materna a las huevas, por lo que los elementos del SC están presentes en los embriones incluso antes de que el organismo comience a sintetizarlos²⁶.

Las tres vías de activación del complemento estarían presentes en los peces, ya que moléculas de C1r, C3, C4, C5, C8, C9, fB, fH, MASP y proteínas tipo MBL han sido aisladas; incluso hay varios trabajos que indican que el MAC presente en los peces se asemeja mucho al de los mamíferos. Este sistema exhibe en peces muchas de las actividades efectoras conocidas para los mamíferos, como lisis de células blanco, opsonización, quimiotaxis y activación de leucocitos. A pesar de ello, las funciones del complemento en los peces presentan importantes diferencias respecto a la de los mamíferos, un ejemplo es la temperatura óptima de activación del complemento que, de acuerdo a lo establecido en ensayos experimentales, en peces está entre los 20°C y 25°C, mientras que en los mamíferos es de 37°C. Evidentemente esas diferencias se relacionan con la temperatura ambiente del agua en la que habitan estos animales y con su incapacidad para controlar su temperatura corporal^{15,27}. Otro ejemplo es lo que ocurre con la VA, que presenta una actividad varios órdenes de magnitud mayor que en mamíferos; además a través de esta vía el complemento de los peces es capaz de lisar eritrocitos de una gran variedad de especies animales, a diferencia de la VA humana cuya actividad lítica queda restringida a los glóbulos rojos de conejo (GRC)²⁸. Por otro lado, se ha comprobado que varias especies de poiquilotermos poseen múltiples isoformas de distintos componentes del SC que son estructural y funcionalmente más diversos que los encontrados en vertebrados superiores. C3, por ejemplo, posee varias isoformas en los peces que muestran diferente preferencia por la

unión a los grupos amino o hidroxilo sobre superficies activadoras del complemento. Es probable que la diversificación de C3 haya sido una estrategia evolutiva para expandir o potenciar el reconocimiento inmune innato y las funciones efectoras del complemento de los peces. Estas propiedades del SC de los peces sugieren que existe un espectro de reconocimiento de superficies foráneas mucho más amplio que en mamíferos^{15,23,27}. La actividad lítica del complemento se considera uno de los mecanismos claves del sistema para la eliminación de bacterias en peces²⁹. En general el blanco de este mecanismo son bacterias Gram negativas debido a que la gruesa pared de peptidoglicano que poseen las bacterias Gram positivas evita la inserción del MAC en sus membranas^{27,30}. Se ha visto que la actividad lítica mediada por SC en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se ve afectada por la aclimatación de los peces a distintas temperaturas¹⁹.

1.3.4) Ceruloplasmina

Los metales pueden persistir en el agua y los sedimentos de los cursos de agua durante largos períodos, lo cual contribuye a su acumulación en organismos acuáticos como los peces³¹. Las proteínas de unión a metales, tales como la ferritina y ceruloplasmina (Cp), participan en los procesos de detoxificación de metales pesados y además están implicadas en el metabolismo y homeostasis de los metales esenciales. Los efectos antioxidantes de dichas proteínas serían cruciales para la función protectora que ejerce el cobre contra el daño oxidativo causado por varios xenobióticos^{32,33}.

La Cp es una glicoproteína de 132 kDa abundante en el plasma que está altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva de los vertebrados³⁴. Esta proteína es fundamental en la homeostasis de los metales y se ha visto que las alteraciones séricas de dichos elementos suelen estar acompañadas de cambios en los niveles plasmáticos de la Cp. Tanto en los mamíferos como en los peces se sintetiza primariamente en el hígado y cuenta con múltiples dominios de unión a cobre; de hecho es la principal proteína transportadora del cobre plasmático, estimándose que contiene entre un 90-95% del cobre presente en el plasma. Sin embargo su función principal consiste en modular el flujo de metales en los tejidos, especialmente el del hierro en el hígado. Esta modulación está vinculada a su actividad ferroxidasa que le permite catalizar la conversión del ion ferroso (tóxico) al ion férrico, el cual es tomado por la transferrina para su transporte hacia el torrente sanguíneo. Además la Cp minimiza el estrés oxidativo promoviendo la inhibición de la formación de especies reactivas del oxígeno, por un lado a través del aporte de cobre a la superóxido dismutasa que reduce el anión superóxido y, por otro, mediante su capacidad para inhibir a la mieloperoxidasa, enzima productora de radicales oxidativos dañinos como el ácido hipocloroso³⁵⁻³⁸.

La Cp se considera una de las típicas PFA positivas. Existen registros de su inducción en animales infectados con bacterias patogénicas³⁹. Dichos registros también se han visto para el caso de los peces, por ejemplo salmones atlánticos (*Salmo salar*) infectados con *Saprolegia* spp. o peces rohu (*Labeo rohita*) infectados con *Aeromonas hydrophila* han exhibido niveles aumentados de Cp^{34,40}. Estos estudios apoyan la idea de que la Cp cumple un rol en la respuesta contra infecciones bacterianas, por lo cual la expresión de esta proteína podría utilizarse como marcador indirecto de dicha respuesta. Asimismo, Sahoo *et al.*⁴¹ encontraron una correlación positiva entre la resistencia al desafío con *A. hydrophila* y los niveles de Cp. Es interesante también que durante el inicio de una inflamación en mamíferos los niveles séricos de Cp aumentan en forma similar a los del C3 el cual es una PFA moderada⁴². Por otro lado, varios

reportes afirman que la Cp se sintetiza en células inmunes del hospedero bajo condiciones de estrés⁴³. A nivel funcional, de acuerdo con las propiedades bioquímicas que ya se mencionaron, la inducción de la Cp contribuiría a regular negativamente la respuesta inflamatoria y a modular la actividad fagocítica de neutrófilos y monocitos^{44,45}. También contribuiría a la reparación de tejido dañado⁴⁶ y tendría un efecto regulador a través de su capacidad de inactivar mediadores como epinefrina o dopamina⁴⁷. Todas estas funciones inmunes están estrechamente vinculadas con la capacidad transportadora de cobre de la Cp. A pesar de esto, el rol de la Cp en la inflamación todavía no está completamente dilucidado, debido a que en ciertos casos es capaz de actuar como molécula pro-inflamatoria⁴⁸.

1.3.5) Lisozima

La lisozima es una proteína constituida por una única cadena polipeptídica de unos 120 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 14 kDa. Esta enzima está ampliamente distribuida en bacteriófagos, plantas, invertebrados y vertebrados y también se ha encontrado en una gran variedad de secreciones animales como mucus, saliva y lágrimas^{49,50}. Su principal característica es la capacidad de escindir los enlaces β -1,4 establecidos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano de bacterias Gram positivas, contribuyendo a la lisis de estas bacterias. Las bacterias Gram negativas no son blanco directo de la lisozima, sin embargo, cuando su pared celular externa es degradada por acción del complemento y se expone la capa interna de peptidoglicano, la lisozima se vuelve efectiva. Además la lisozima tiene la capacidad de degradar estructuras que contengan ácido murámico e incluso puede hidrolizar la quitina (polímero lineal de N-acetilglucosamina), componente esencial de la pared celular de los hongos y del exoesqueleto de algunos invertebrados⁵¹. Por otro lado, se ha postulado que la lisozima contribuye al proceso de fagocitosis, ya que las bacterias degradadas por la lisozima son más fácilmente fagocitadas por macrófagos alveolares de rata que las bacterias intactas, proceso que es inhibido en presencia de anticuerpos anti-lisozima⁵². Similarmente, la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por monocitos humanos de una línea celular se vio potenciada en presencia de lisozima⁵³. Además, se ha reportado un aumento de la fagocitosis de levaduras por parte de neutrófilos humanos en presencia de concentraciones fisiológicas de lisozima humana⁵⁴. El mecanismo por el cual la lisozima contribuye a la fagocitosis no se ha establecido, pero podría deberse a su acción hidrolítica, mediante la cual podrían exponerse en la superficie de los patógenos residuos para receptores fagocíticos.

Existen por lo menos cinco tipos distintos de lisozima: la lisozima de pollo (tipo C), que abarca a la lisozima del estómago y a la de unión a calcio; la lisozima de ganso (tipo G); la lisozima de planta; la lisozima bacteriana y la lisozima del fago T4 (tipo fago)⁵¹. Diversos artículos han reportado la existencia de los isotipos de lisozima C y G en peces, a través del hallazgo de genes homólogos a los de vertebrados superiores^{55,56}. La lisozima en los peces es sintetizada a nivel hepático y, al igual que en los mamíferos, a nivel extra-hepático por neutrófilos, monocitos y en menor medida macrófagos⁵⁷. Los niveles más altos de esta proteína se registran en el riñón anterior, órgano rico en leucocitos. No obstante, el riñón no es el único órgano donde está presente, ya que se expresa en una amplia variedad de tejidos como las branquias, bazo, tracto gastrointestinal y huevas; además está presente en el plasma y es uno de los componentes principales del mucus de los peces. No es casual que la lisozima se encuentre en los principales sitios de entrada para los patógenos, lo que sugiere la importancia de esta enzima en la defensa

de los peces, organismos que deben subsistir en un ambiente abundante en patógenos oportunistas como lo es el agua^{51,58}. La lisozima tiene una actividad mucho mayor en los peces que en los mamíferos y a menudo se utiliza como indicador del estado del sistema inmune innato de estos animales⁵⁹. Se cree que los niveles de lisozima en peces son cruciales para contrarrestar la reducida diversidad y cantidad de péptidos antimicrobianos existentes en dichos organismos⁶⁰. En la búsqueda de factores que puedan repercutir sobre los niveles séricos de la lisozima en estos organismos, la temperatura ha sido uno de los más estudiados. En este sentido, se ha demostrado que dichos niveles pueden ser afectados por la aclimatación de los peces a distintas temperaturas y la mayoría de las especies de peces estudiadas han exhibido una correlación positiva entre la actividad de la lisozima y la temperatura del agua⁶¹⁻⁶⁴. Otros factores que pueden influir sobre los niveles de esta enzima en los peces son: el sexo, el estado de maduración sexual y la alimentación. Por otro lado estudios en salmón atlántico mostraron que las infecciones⁵¹ e incluso el contacto con componentes glucídicos derivados de patógenos, inducen un aumento en la concentración de lisozima en suero que estaría asociado a la activación de macrófagos⁶⁵.

1.3.6) Proteína amiloide A y proteína amiloide P del suero

La proteína amiloide A del suero (SAA) y la proteína amiloide P del suero (SAP) pertenecen al grupo de las PFAs, que como se comentó en la sección 1.3.1, son un conjunto de proteínas plasmáticas que varían su concentración durante la respuesta de fase aguda. Como se explicó en dicha sección, la respuesta de fase aguda es una reacción sistémica compleja del organismo que ocurre como consecuencia de alteraciones en su homeostasis causadas por infección, daño tisular, trauma, o desórdenes inmunológicos; varias de estas situaciones son potencialmente posibles durante una cirugía. Esta respuesta se asocia con la producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios que difunden al fluido extracelular y circulan en la sangre^{10,66}. Algunos de los cambios inducidos durante esta respuesta pueden ser cuantificados en el laboratorio, como es el caso de la activación del SC o las variaciones en los niveles de las PFAs^{10,66}. Las PFAs son proteínas con un alto grado de conservación y son producidas por los hepatocitos. Por definición una proteína es considerada una PFA si su concentración sérica se modifica en un porcentaje mayor al 25% en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias⁶⁷. Las PFAs se clasifican como positivas o negativas, según si aumentan o disminuyen su concentración plasmática. Las PFAs positivas se subdividen de acuerdo al grado de aumento en sus niveles sanguíneos en tipo I, II y III (también conocidas como leves, moderadas y fuertes), con aumentos en su concentración de 1.5 veces, entre 2 y 5 veces, y más de 5 veces, respectivamente. En humanos, por ejemplo, las principales PFAs tipo III son la proteína C reactiva (CRP) y la SAA, que registran un aumento de hasta mil veces en su concentración durante la inflamación. Sin embargo, las proteínas que funcionan como PFAs en determinada especie no necesariamente lo son en otras especies, por ejemplo la CRP no funciona como PFA en ratón, mientras que la SAP es una PFA en ratón, pero no en el ser humano^{10,66}. Si bien es cierto que no existen estudios acerca de las PFAs de esturión, numerosos trabajos han establecido que los teleósteos poseen PFAs homólogas a la de los mamíferos, lo cual tiene sentido dado que es probable que la respuesta de fase aguda de los peces sea más robusta para compensar un sistema inmune adaptativo menos evolucionado^{57,68,69}. El nivel de estas proteínas es normalmente alto en los peces en comparación con los mamíferos⁷⁰. Debido a las propiedades mencionadas, es claro que las PFAs constituyen excelentes marcadores de situaciones de estrés y/o infección en varios animales,

siendo importantes candidatas para mejorar el estudio de modelos animales y para evaluar objetivamente su estado sanitario. De hecho, el monitoreo de PFAs en los peces podría ser utilizado como un indicador no sólo de su salud, sino también de la presencia de toxinas, contaminantes u otro tipo de perturbaciones medioambientales^{10,57,71}. Tomando en cuenta estos antecedentes y analizando las PFAs de especies de peces filogenéticamente cercanas al esturión ruso, en el laboratorio de Inmunología se lograron identificar varias PFAs potenciales en dicha especie. La identificación de estas proteínas permitió obtener cebadores específicos para analizar su expresión mediante PCR en tiempo real en hígado de esturiones estimulados con componentes bacterianos. Este análisis sugirió que la SAA podría ser una PFA positiva (M. Castellano, comunicación personal) mientras que la SAP podría funcionar como PFA negativa en el esturión ruso (V. Silva, comunicación personal). Sin embargo, aún resta analizar si los cambios en la expresión de SAA y SAP en el hígado se ven reflejados como variaciones en la concentración de estas proteínas en el plasma.

Respecto a la SAA, es una proteína de aproximadamente 14 kDa que se asocia a las lipoproteínas de alta densidad en plasma⁷¹. Se ha comprobado que es capaz de unirse específicamente a la proteína A de la membrana externa de las bacterias Gram negativas⁷². Por otro lado, estudios *in vitro* mostraron que posee actividad quimiotáctica sobre distintas células inflamatorias y puede inhibir el estallido respiratorio de los neutrófilos, por lo cual se asume que es importante en la regulación del proceso inflamatorio^{10,71}. Se han visto aumentos drásticos en los niveles plasmáticos de la SAA en respuesta a distintas condiciones inflamatorias en diversas especies incluyendo humanos, conejos, ratones y suinos⁷³. Los estudios centrados en los niveles séricos de la SAA en peces son muy escasos, posiblemente debido a la falta de reactivos comerciales específicos para proteínas de peces. Por ello, la mayoría de los estudios se han focalizado en analizar la expresión hepática de dicha proteína en estos animales, como es el caso del trabajo de Jensen *et al.*⁷⁴ donde observaron un aumento en la expresión de transcritos de SAA en truchas árticas (*Salvelinus alpinus*) infectadas con *Aeromonas salmonicida*, o el de González *et al.*⁷⁵ donde se evidenció una fuerte inducción de la expresión de SAA en carpas europeas (*Cyprinus carpio*) infectadas con el parásito *Ichthyophthirius multifiliis*. Estos antecedentes sugieren una participación crucial de la SAA en la respuesta de fase aguda en los peces, por lo que resulta interesante analizar cómo cambian los niveles de esta proteína en el suero de los peces en respuesta al desafío con organismos patógenos.

Por otra parte, la SAP es una proteína de aproximadamente 25 kDa que pertenece a la familia de las pentraxinas, ya que adquiere una estructura cuaternaria pentamérica, al igual que la CRP. La SAP se une a fosforiletanolamina de forma Ca²⁺-dependiente y puede ser purificada dada su afinidad por la agarosa⁷⁶. Se ha visto que tanto la SAP como la CRP pueden interactuar con el componente del complemento C1q, dando inicio a la vía clásica del SC tras el reconocimiento de sus ligandos¹⁵. Dado que son reconocidas por los receptores Fc de las células fagocíticas, también pueden actuar como opsoninas favoreciendo la fagocitosis de patógenos o de células apoptóticas. Algunas especies de peces parecen presentar exclusivamente la pentraxina CRP (como el comúnmente llamado bacalao), otras solo tienen la pentraxina SAP (como el salmón), mientras que algunas (como la trucha) tendrían ambos tipos de pentraxinas al igual que los vertebrados superiores. Este hallazgo concuerda con el hecho de que la SAP es considerada análoga de la CRP en ciertas especies y apoya la teoría que afirma que dichas proteínas se originaron a partir de la duplicación de un gen de pentraxina ancestral⁷⁶. En este sentido, un artículo reciente reveló la presencia de cinco proteínas tipo SAP en el salmón

atlántico; en dicho trabajo se observó un aumento en la expresión génica de una esas cinco proteínas en células de riñón anterior estimuladas con citoquinas recombinantes. Sin embargo, el desafío con *Aeromonas salmonicida* no indujo cambios en los niveles de ninguna de las proteínas tipo SAP del salmón atlántico⁷⁷. El rol de la SAP como PFA en los peces todavía no se comprende con claridad, por este motivo es relevante estudiar qué ocurre con los niveles plasmáticos de la SAP en situaciones que promuevan una respuesta de fase aguda para cada especie en particular.

1.4) Efectos del estrés sobre el sistema inmune

Como se comentó en la sección 1.2 el cultivo de esturiones en Uruguay es un emprendimiento exitoso, pero aun así debe enfrentar desafíos, como el hecho del aumento en las infecciones por microorganismos oportunistas durante los meses cálidos del año. Para afrontar esta problemática es fundamental profundizar en el conocimiento del efecto del estrés producido por diversos factores, como en este caso el aumento de la temperatura, sobre el sistema inmune de los esturiones. En esta sección se describe la relación entre el sistema inmune y el estrés, y como éste puede afectar algunos de los factores vinculados al sistema inmune innato en los peces.

Hans Selye definió en 1953⁷⁸ al estrés como un término descriptivo de las situaciones donde un animal se ve sometido a un desafío que podría resultar en un peligro real o simbólico para su integridad. La respuesta de estrés abarca un vasto rango de mecanismos fisiológicos que involucran cambios a nivel de la expresión génica, proteínas, metabolismo, sistema inmune y hasta en el comportamiento, con el objetivo de sobreponerse a la situación y compensar el desbalance generado. Las características generales de esta respuesta se mantienen a lo largo de todo el árbol filogenético⁷⁹. En términos moleculares, el incremento en las proteínas de shock térmico se observa desde los invertebrados hasta los peces y humanos; otras propiedades características de la respuesta de estrés son la inducción de la síntesis de PFAs y la activación de mecanismos energéticamente demandantes como la respuesta de lucha o huida (conocida como “*fight or flight*” en inglés)⁵⁷. Dado que se destinan una gran cantidad de recursos para hacer frente a esta situación, algunos mecanismos del sistema inmune se ven inhibidos o retrasados, haciendo más vulnerable al organismo frente a las distintas amenazas presentes en el ambiente. Los tres sistemas reguladores principales –el sistema inmune, el sistema endócrino y el sistema nervioso- tienen un rol clave en el inicio de la respuesta de estrés y mediante su interacción se controla dicha respuesta para asegurar que no haya una activación excesiva⁷⁹. Existe abundante evidencia que confirma la participación conjunta de dichos sistemas en la respuesta de estrés en peces, como es el caso de varias células del sistema nervioso y del sistema endócrino que pueden producir distintas citoquinas capaces de regular la respuesta inmune y el metabolismo⁸⁰. En este sentido, el riñón anterior tiene un papel fundamental en la organización de la respuesta ya que allí se concentran componentes de los tres sistemas mencionados, lo que permite una activa comunicación entre los mismos⁸¹. El desenlace de este complejo evento está estrechamente vinculado al agente estresor que lo genera y fundamentalmente a su intensidad y al tiempo en el que el estímulo se mantiene. De acuerdo a su origen, los estresores pueden clasificarse en estresores físicos, ambientales o sociales. Aquellos que derivan de lesiones provocadas por interacciones naturales o por manipulación en prácticas de acuicultura son los estresores físicos, y en este caso el tiempo y la intensidad son factores cruciales. Los estresores ambientales están relacionados a la calidad del agua y otros parámetros asociados como la

temperatura, el oxígeno disuelto, la presencia de contaminantes o de patógenos, así como las condiciones de salinidad y pH; aquí el factor más influyente es el grado de variación que existe entre la situación normal y la que involucra al estresor. Aunque no han sido tan estudiados como el resto, está claro que los estresores sociales también afectan a los peces; fenómenos como la dominancia, la agresividad o el aumento en la densidad de los cultivos que suele ocurrir en granjas de piscicultura generan cambios significativos en la fisiología de dichos organismos. Por otra parte, de acuerdo a su extensión temporal los estresores también pueden clasificarse en agudos y crónicos. En la naturaleza la mayoría de los estresores son agudos, ya que se extienden por un corto período de tiempo y tienen alta intensidad. La respuesta de estrés aguda se da exclusivamente en presencia del estresor y se disipa rápidamente cuando éste desaparece. En cambio, la situación de estrés crónico se produce cuando la intensidad del estresor es baja pero sostenida en el tiempo; algo poco frecuente en las poblaciones salvajes, pero muy habitual en peces cultivados. Durante la respuesta de estrés agudo hay una activación del eje hipotalámico-pituitario-interrenal que conlleva a un aumento en la secreción de glucocorticoides^{79,82}. Al igual que en otros animales, el cortisol es uno de los principales glucocorticoides secretados en peces y su aumento ha sido utilizado como marcador de respuestas de estrés agudo tanto en teleósteos como en condrósteos⁸³. Los episodios de estrés agudo tienen baja repercusión sobre el sistema inmune, ya que las respuestas musculares y cardiovasculares son las principales implicadas; de hecho el estrés agudo está normalmente asociado a consecuencias beneficiosas para el organismo, como ocurre con el ejercicio. Por el contrario, el estrés crónico induce importantes cambios a nivel del metabolismo de manera de poder satisfacer el requerimiento energético necesario para resolver la situación. Esto genera que la energía se destine casi totalmente al proceso de estrés y que otros procesos muy dependientes de dicho recurso disminuyan su eficiencia, como ocurre con el sistema inmune, el cual sufre importantes desregulaciones que lo conducen a un estado de supresión general^{79,84}. Incluso la propia respuesta de glucocorticoides es regulada durante el estrés crónico, ya que el cortisol ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa sobre su propia secreción⁸², llevando a que sus niveles no estén necesariamente aumentados durante la respuesta de estrés crónico.

Existe una amplia lista de estudios en donde se ha constatado que generalmente las enfermedades aparecen en los peces cuando éstos estuvieron expuestos previamente a una situación de estrés, como en el caso del pez gato (*Ictalurus punctatus*) sometido a estrés por bajo nivel de agua, que resultó en un aumento de la actividad lisozima así como también en su mortalidad⁸⁵. Tort *et al.*⁸⁶ observaron una mayor susceptibilidad a la infección por *Pseudomonas anguilliseptica* en doradas (*Sparus aurata*) afectadas por las bajas temperaturas del invierno; mientras que Mauri *et al.*⁸⁷ evidenciaron una disminución del título del complemento y una reducción en la actividad del componente C3 en pez róbalo (*Dicentrarchus labrax*) como consecuencia del estrés inducido por una alta densidad de cultivo. Uno de los estudios pioneros en este campo fue el de Yin *et al.* en 1995⁸⁸, allí se sometieron carpas europeas a estrés por hacinamiento a alta densidad de cultivo durante un lapso de 30 días y se demostró que los peces estresados sufrieron descensos significativos en los niveles de actividad lisozima y del complemento, así como también en los niveles de proteína total, parámetro que resultó ser un valioso indicador del efecto del estrés crónico en los animales. Dichas disminuciones se observaron al día 7 del experimento para los tres parámetros y luego los niveles de proteína total se mantuvieron bajos hasta el final del mismo, mientras que la actividad lisozima y del complemento tuvieron un leve aumento al día final con respecto al día 7. Los autores aseveran

que los peces estresados crónicamente por hacinamiento tendrían cierta capacidad de adaptación a nuevos estresores, aunque igualmente son más vulnerables a las infecciones, sobre todo si la intensidad del estresor aumenta repentinamente. Dicho análisis podría explicar lo que sucede en los establecimientos de piscicultura, donde el hacinamiento en los cultivos generaría cierto grado de estrés crónico y posibles cambios drásticos en otros estresores (por ejemplo la calidad del agua o la temperatura) podrían derivar en brotes de enfermedades infecciosas.

Existen pocos estudios sobre la relación entre el estrés y el funcionamiento del sistema inmune en esturiones. Recientemente en el laboratorio de Inmunología se realizó un estudio en el esturión ruso para analizar de qué forma las variables estacionales afectan a componentes séricos de la inmunidad innata⁸⁹. Cabe mencionar que este estudio se enfocó solamente en componentes innatos que pueden cuantificarse mediante métodos enzimáticos debido a la falta de reactivos especie-específicos para estudios inmunológicos en *Acipenser* spp. De ese modo, se encontró que durante el verano los esturiones mostraron niveles disminuidos en la funcionalidad de la VA y la Cp, y al mismo tiempo un pequeño aumento en la actividad lisozima con respecto al invierno. Además los niveles séricos de proteína total también disminuyeron en verano con respecto al invierno. Esta reducción en la cantidad total de proteínas apoya la idea de la inducción de una respuesta de estrés crónico, como se evidenció en el trabajo de Yin *et al.*⁸⁸ con la exposición a largo plazo de las carpas a una alta densidad de cultivo. Para corroborar si la respuesta inducida se debió al aumento en la temperatura del agua, se realizó un experimento en donde se aclimataron esturiones juveniles a 18°C o 24°C durante 37 días. Los esturiones aclimatados a mayor temperatura experimentaron variaciones similares en sus defensas innatas a las observadas en los esturiones durante el verano; además se observó una reducción en el crecimiento de dichos peces y en sus niveles séricos de proteína total, e incluso aumentó su mortalidad. Este trabajo aportó importante información acerca de la incidencia del estrés crónico sobre el sistema inmune del esturión ruso, reforzando el concepto de la fuerte interconexión entre los sistemas reguladores en las respuestas de estrés, y siendo uno de los pocos trabajos disponibles que han estudiado la temperatura óptima del agua para la acuicultura de esturión ruso. Resulta interesante profundizar en estos estudios y evaluar cómo se afecta la funcionalidad del sistema inmune innato frente a gradientes de temperatura similares a los que ocurren durante los cambios de estación, en especial durante la primavera y el verano, o frente a estimulación con componentes derivados de patógenos.

1.5) Hipótesis de trabajo

A partir del conocimiento actual sobre la inmunidad innata y del precedente descrito en la sección 1.4, nos planteamos como hipótesis que la exposición de esturiones juveniles a temperaturas mayores a 24°C durante un período prolongado induce una respuesta de estrés crónico que afecta los niveles de componentes séricos asociados a la respuesta inmune innata, incluyendo componentes de la VA, la Cp, lisozima y, eventualmente, de proteínas candidatas a PFAs como la SAA y la SAP.

Por otra parte, de acuerdo a lo descrito en la sección 1.3, planteamos que la estimulación con componentes derivados de patógenos promueve la activación de la respuesta inmune innata en los esturiones, que conduce a cambios en los niveles de la SAA y la SAP, posibles PFAs positiva y negativa, respectivamente.

1.6) Objetivos

En este trabajo se pretende profundizar en la caracterización de la respuesta inmune innata de los esturiones, evaluando cómo responden frente a gradientes de temperatura similares a los que pueden darse durante los cambios estacionales en los establecimientos de piscicultura o frente a estímulos con componentes bacterianos. Para ello propusimos un objetivo general y dos objetivos específicos:

Objetivo general: estudiar cómo responden las defensas innatas del esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) frente al estrés térmico o a la presencia de señales de peligro derivadas de bacterias.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar parámetros de la respuesta inmune innata y de estrés crónico en esturiones rusos sometidos a gradientes de temperatura. Esta evaluación se basó en la medición de las actividades de la VA, Cp y lisozima, y los niveles de la SAA, SAP y proteínas totales en suero.
- 2) Evaluar parámetros de la respuesta inmune innata en esturiones rusos inyectados por vía intraperitoneal con bacterias *Aeromonas hydrophila* inactivadas, a través de la determinación de los parámetros descritos para el objetivo 1.



2) MATERIALES Y MÉTODOS



2.1) Reactivos generales

Los reactivos generales utilizados en esta tesina fueron los siguientes:

- Sales inorgánicas, solventes y otros reactivos químicos: cloruro de sodio (NaCl), alcohol metílico y alcohol isopropílico adquiridos de Droguería Industrial Uruguay; ácido acético, ácido cítrico, ácido 5,5-dietilbarbitúrico, 5,5-dietilbarbiturato de sodio, citrato de sodio y acetato de sodio de Merck (Alemania); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), acrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS) de Applichem (Alemania); p-fenilendiamina (PPD), sulfato de magnesio (MgSO₄), bisacrilamida, persulfato de amonio (APS), tetrametiletildiamina (TEMED) y tris(hidroximetil)aminometano (Tris) de Sigma-Aldrich (EEUU); azida de sodio adquirida de Mallinckrodt (Alemania), fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) de Carlo Erba (Italia), ditiotreitól (DTT) de Bio Basic (Canadá), reactivo Micro™ BCA Assay kit y solución de revelado para *Western blot SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de Thermo Scientific (EEUU).
- Reactivos biológicos: seroalbúmina bovina (BSA) de Applichem; gelatina de piel bovina tipo B, lisozima de gallina y bacterias *Micrococcus lysodeikticus* de Sigma-Aldrich; bacterias *Aeromonas hydrophila* aisladas a partir de una infección ocurrida en la granja ERN por el veterinario Alejandro Perretta (GenBank MF629003); anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano de Calbiochem (Alemania) y marcador de peso molecular de proteínas pre-teñido de rango 10-180 kDa de Thermo Scientific. Además se emplearon los siguientes reactivos biológicos obtenidos en la Cátedra de Inmunología (Facultad de Ciencias/Química, UdelaR): SAA de esturión ruso recombinante producida por Mauricio Castellano, SAP de esturión ruso purificada de suero por Valeria Silva, glóbulos rojos (GRC) y sueros policlonales de conejo que reconocen el péptido 58-71 de la SAA o la SAP purificada de suero de esturión ruso.

2.2) Esturiones

El modelo animal empleado en este trabajo fue el esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*); los peces fueron gentilmente cedidos por la granja de piscicultura ERN, establecimiento en el cual estos animales son criados con fines comerciales.

2.3) Experimentos *in vivo*

Los experimentos *in vivo* que se describen a continuación fueron realizados en un laboratorio húmedo -adaptado para el cultivo de esturiones juveniles- ubicado en el Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) de Montevideo. Dicho laboratorio consta de una sala con 5 piscinas de 500 litros cada una en donde es posible controlar las condiciones de temperatura, pH y nivel de O₂. Para abastecer dichas piscinas se utilizó agua de red a un flujo de 1L/min, previamente filtrada por un filtro de partículas (20 x 2.5 " 05 micras, Siam Cast Nylon Co. Ltd, Tailandia) y un filtro de carbón activado (20 x 2.5 " , Siam Cast Nylon Co., Ltd) para remover las

partículas y el cloro, respectivamente. El filtro de carbón activado se cambió cada 20 días para evitar su contaminación con bacterias.

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron esturiones juveniles (2 años de edad) de entre 300-500 gramos, mantenidos a una densidad de entre 7-9 kg/m³ y alimentados diariamente con una ración diseñada por la empresa ERN (compuesta por 47% de proteína, 12.5% de lípidos y 3% de fibra) en cantidades correspondientes al 2% del peso vivo de los animales. Previo a cada experimento los peces fueron aclimatados durante dos semanas a la temperatura correspondiente a cada ensayo. El mantenimiento, manejo, extracción de sangre y eutanasia de los peces fue llevado a cabo por el veterinario Alejandro Perretta, siguiendo las normas establecidas por el Comité de Ética de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, N° de Expediente 240011-001213-16) para minimizar el estrés en los peces.

2.3.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta

Tal como puede apreciarse en la Figura 2.3.1, los esturiones se distribuyeron en cuatro piscinas de 500 litros con 12 o 13 peces cada una. Se realizaron dos gradientes de temperatura distintos: en dos piscinas la temperatura varió entre 20°C y 24°C (lotes 1 y 2), mientras que en las otras dos varió entre 24°C y 31°C (lotes 3 y 4). Los cuatro lotes permanecieron los últimos 20 días del experimento a la mayor temperatura alcanzada en cada caso. Las muestras de sangre se obtuvieron al inicio y a los 7 y 27 días del experimento.

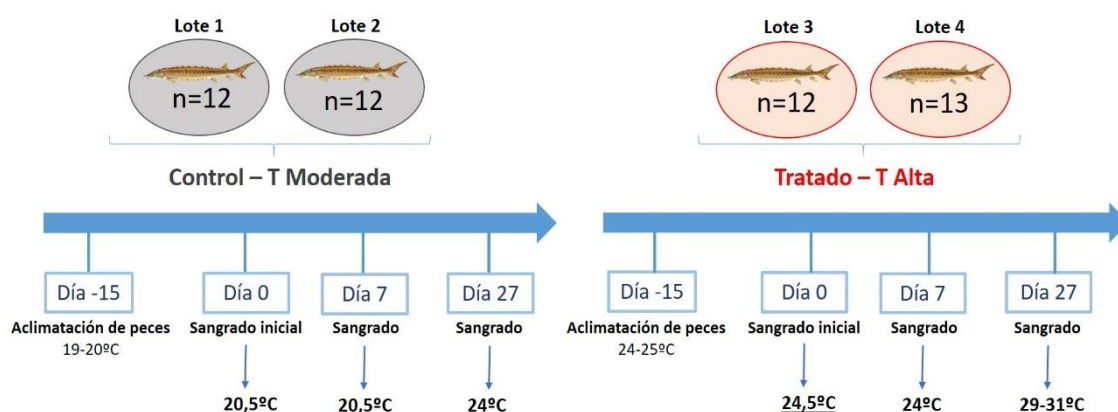


Figura 2.3.1 – Representación esquemática del diseño del experimento de gradiente de temperatura.

2.3.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos

La Figura 2.3.2 esquematiza el diseño del presente experimento, donde puede advertirse que en este caso los esturiones se distribuyeron en cuatro piscinas de 500 litros con 11 o 12 peces cada una. Las piscinas fueron mantenidas a una temperatura de entre 18°C y 20°C durante todo el experimento. La mitad de los peces fueron inyectados con tampón fosfato salino (PBS) estéril y la otra mitad con bacterias *A. hydrophila* inactivadas (10⁹ UFC/kg). En particular el aislamiento empleado para este experimento fue el H2, caracterizado por Perretta y colaboradores⁹⁰. Las muestras de sangre se obtuvieron 7 días previos a la inyección y a las 24 y 72 horas post-inyección.

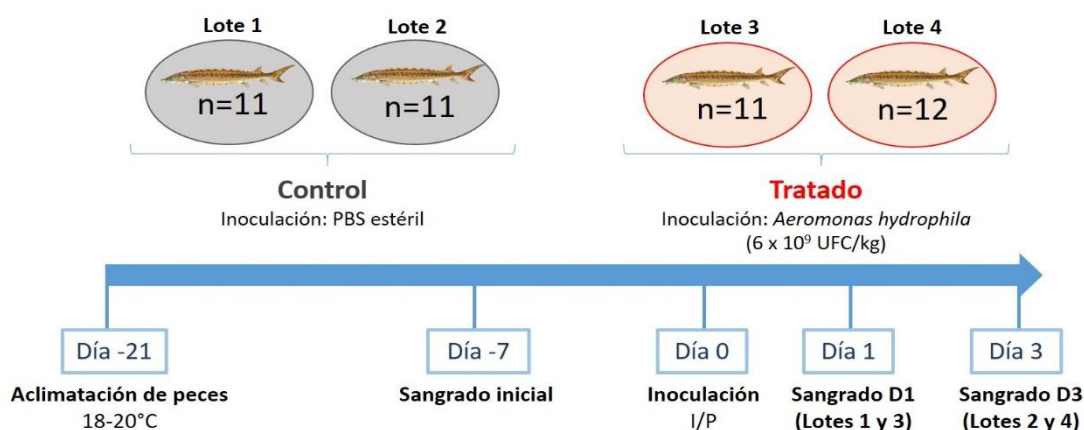


Figura 2.3.2 – Representación esquemática del diseño del experimento de estimulación con componentes bacterianos.

En el presente trabajo se utilizaron las muestras de suero obtenidas en los experimentos *in vivo* descritos anteriormente para analizar distintos componentes séricos empleando los métodos previamente optimizados en el laboratorio de Inmunología⁸⁹, los cuales se detallan a continuación:

2.4) Obtención de muestras de suero de esturión ruso

Los peces tuvieron un ayuno de 24 horas previo a cada sangrado. Además antes de cada extracción se registró la masa de cada individuo para realizar un seguimiento de la evolución de la masa corporal de los esturiones a lo largo de ambos experimentos. Las muestras de sangre (alrededor de 2 mL) fueron extraídas por punción de la vena caudal en menos de 3 minutos y seguidamente transferidas a tubos tipo *ependorf* en hielo para permitir su coagulación. La sangre se dejó coagular durante 3 horas aproximadamente, luego el suero se separó del coágulo por centrifugación a 2800 g durante 20 minutos a 4°C. Los sueros de esturión (SE) se alicuotaron y almacenaron a -80°C para preservarlos. Para todos los ensayos descritos a continuación, todas las muestras de suero se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C previo a su uso, de manera de separar posibles precipitados que pudieran generarse en el proceso de congelado y descongelado.

2.5) Cuantificación de la actividad de la vía alternativa del complemento en suero de esturión ruso

Para medir la actividad de la VA del SC se utilizó un método hemolítico tradicional descrito para humanos⁹¹ con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la incubación del SE con GRC como célula blanco de la acción del sistema complemento. Dado que la activación de la VA requiere Mg^{2+} , el ensayo se realiza en presencia de EGTA y Mg^{2+} para evitar la activación Ca^{2+} dependiente de la VC y de la VL. La suspensión de GRC se obtuvo mezclando una relación 1:3 de volúmenes de sangre de conejo y citrato disódico al 3.8% (anticoagulante) respectivamente. Luego se procedió a lavar dicha suspensión una vez con una solución 1:1 de citrato de sodio al 3.8% y NaCl 150 mM, dos veces con el tampón veronal 6.4 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 150 mM, gelatina 0.1% y EDTA 10 mM (GVB-EDTA) y dos veces con el tampón GVB en el que se sustituyó el EDTA por 10 mM de EGTA y 10 mM de $MgSO_4$ (GVB- Mg^{2+} -EGTA). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo en U en las que se mezclaron 50 μ L de diluciones seriadas de SE (en un rango entre 1/10 – 1/640) en tampón GVB- Mg^{2+} -EGTA por duplicado, con

50 µL de una suspensión de GRC 0.8×10^8 eritrocitos/mL en tampón GVB-Mg²⁺-EGTA. Como control negativo del ensayo, los SE se incubaron durante 30 minutos a 56°C para inactivar el sistema complemento, y se analizaron en paralelo en la misma placa. En otros pocillos los GRC se mezclaron con 50 µL de tampón GVB-Mg²⁺-EGTA o 150 µL de agua destilada para determinar el 0% y 100% de lisis de GRC respectivamente. Las placas se incubaron durante 1 hora en baño de agua a 20°C para permitir la activación de la VA. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la lisis de los GRC mediante el agregado de 100 µL de la solución GVB conteniendo EDTA 50 mM. Luego se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1000 g y 4°C y se registró la absorbancia del sobrenadante a 415 nm para cuantificar la hemoglobina liberada. Para cada dilución de los SE se calculó el porcentaje de lisis (Y) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{Abs\ SE - Abs\ SE\ inactivado}{Abs\ 100\%\ lisis - Abs\ 0\%\ lisis}$$

Con dichos porcentajes se construyó una curva Y vs dilución de SE y se determinó la actividad de la VA, definida como el inverso de la dilución capaz de lisar el 50% de los glóbulos rojos (ACH50, del inglés *alternative complement pathway hemolytic activity*), aplicando la función sigmoidea de Hill mediante el programa SigmaPlot 10 (SPSS Inc., EEUU). En los casos donde no se obtuvo un buen ajuste se repitió el ensayo variando el rango de las diluciones de SE analizadas.

2.6) Cuantificación de la actividad de ceruloplasmina en suero de esturión ruso

La actividad Cp se determinó en base a su capacidad de oxidar al PPD⁹². Se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano en las que se mezclaron 100 µL de una dilución 1/10 de cada SE en tampón acetato de sodio/ácido acético 100 mM, pH 5.45, por duplicado, con 150 µL de una solución 0.1% de PPD (m/v) en tampón acetato de sodio 100 mM, 0.04 mM EDTA, pH 5.45 (placa medida). En paralelo se realizó el mismo procedimiento, pero con el agregado de 0.5% de azida de sodio (m/v) para inhibir la actividad de la Cp y tener un control de la oxidación del PPD no dependiente de la actividad Cp. Este control se realizó en una placa independiente (placa control) debido a que la vaporización de la azida en una placa afecta los pozos contiguos. Ambas placas se cubrieron con papel parafilm y se incubaron en baño de agua a 37°C durante 1 hora. Terminada la incubación, se determinó la absorbancia en lector de placas a 560 nm. Como no se dispuso de un estándar comercial, la actividad Cp se determinó en forma relativa, utilizando un SE con alta actividad -correspondiente a una hembra adulta del año 2014, como un *estándar* al cual se le asignó una actividad de 100 unidades arbitrarias/mL y se analizó por cuadruplicado en paralelo a las muestras. Para el cálculo de Cp de cada muestra se corrigieron los valores de absorbancia promedio de la placa medida restando los valores correspondientes obtenidos en la placa control, y se empleó la siguiente ecuación:

$$Cp = \frac{(Abs\ SE\ corregida * 100)}{Abs\ SEQ\ corregida}$$

En los casos en donde la dilución de SE analizada tuvo una densidad óptica inferior o superior al rango lineal del espectrofotómetro se repitió el ensayo utilizando diluciones menores o mayores de SE, respectivamente.

2.7) Cuantificación de la actividad de lisozima en suero de esturión ruso

La base de este ensayo radica en un método turbidimétrico reportado por Shugar en 1952⁹³ que utiliza células de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato de la lisozima, aunque con ciertas modificaciones según Castellano et al.⁸⁹. La suspensión de *M. lysodeikticus* 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. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano en donde se mezclaron 50 µL de cada SE sin diluir (por duplicado) o concentraciones decrecientes de una solución de lisozima de gallina (5, 4, 3, 2, 1.5, 1 y 0.5 µg/mL, por triplicado) en tampón fosfato-citrato, pH 5.8, con 200 µL de una suspensión de *M. lysodeikticus* 0.7 mg/mL en tampón fosfato-citrato, pH 5.8. Rápidamente se registró la absorbancia inicial a una longitud de onda de 560 nm, se cubrió la placa con papel parafilm y se incubó en baño de agua a 30°C durante 4 horas. Al cabo de este tiempo se volvió a medir la absorbancia a 560 nm para obtener los valores de absorbancia final. Para construir una curva de calibración se graficaron los valores de ΔAbs_{560nm} (Abs_{560nm} inicial promedio - Abs_{560nm} final promedio) obtenidos para el estándar en función de las concentraciones decrecientes de lisozima comercial. Los datos se ajustaron a una función polinómica de tercer grado utilizando el programa Origin 8.5 (OriginLab Corp, EEUU). A partir de dicha curva se obtuvieron las actividades de lisozima en las muestras de SE, expresadas en µg/mL.

2.8) Cuantificación de niveles de proteína total en suero de esturión ruso

La determinación de proteínas totales en SE se basa en el método del ácido bicinonínico y para ello se utilizó el reactivo comercial Micro™ BCA Assay kit y se siguieron las recomendaciones del fabricante. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano analizando las muestras y el estándar (BSA) por duplicado. Brevemente, se mezclaron 150 µL de una dilución 1/3000 de cada SE o de diluciones decrecientes de BSA (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.75 µg/mL) en PBS, con 150 µL del reactivo de trabajo. La placa se cubrió con papel parafilm y se incubó durante 2 horas en baño de agua a 37°C. Finalizada la incubación, se registró la absorbancia en lector de placas a 560 nm y se construyó una curva de calibración graficando los valores de absorbancia promedio del estándar en función de las concentraciones de BSA. Se realizó un ajuste lineal de la curva utilizando el programa Origin 8.5 (OriginLab Corp, EEUU) y se calculó la concentración de proteína total (mg/mL) de cada una de las muestras.

2.9) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso mediante Western blot

Debido al gran número de muestras de suero de cada experimento *in vivo*, el análisis se realizó utilizando pools de los SE (SEp), preparados mezclando alícuotas iguales (15 µL) de los SE individuales, obtenidos para un lote de peces (expuesto a diferente temperatura o tratamiento) a un tiempo determinado del análisis. Los SEp se alicuotaron y conservaron a -20°C para evitar el uso de muestras congeladas y descongeladas en sucesivas oportunidades. Las proteínas de los SEp se separaron mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, de acuerdo a lo descrito por Laemmli⁹⁴. Para ello se emplearon geles concentradores al 4% (m/v) y separadores al 15% (m/v) de 1.5 mm de espesor. Previo a la electroforesis 2 µL de cada muestra de SEp se llevaron a un volumen final de 40 µL con tampón muestra 6X (Tris-HCl 0.35 M, SDS 10 % (m/v), glicerol 30% (m/v), azul de

bromofenol 0.12 mg/mL, pH 6.8), 40 mM de DTT y cantidad suficiente de PBS y se calentaron a 80-90°C durante 5 minutos. En paralelo también se analizaron muestras de SAA de esturión ruso recombinante (0.1 µg de proteína), SAP de esturión ruso purificada de suero (5 µg de proteína) y un marcador de peso molecular (MPM). Los geles se corrieron en tampón de corrida Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS 1% durante 20 minutos a 80 V y luego durante 45 minutos a 150 V a temperatura ambiente en un sistema MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad, EEUU).

Una vez culminada la corrida electroforética, las proteínas de los SEp se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Thermo Scientific) mediante transferencia húmeda. Para ello las membranas fueron pre-hidratadas con metanol durante 10 minutos y luego las membranas y los geles a transferir se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v)) y se dispusieron en un casete de transferencia entre esponjas y papeles de filtro embebidos en la misma solución (en orden ánodo/esponja/papel de filtro/gel/membrana/papel de filtro/esponja/cátodo). Los casetes se montaron en un sistema MiniPROTEAN Trans-Blot (BioRad) y se transfirieron durante 2:30 h a 300 mA y 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0.2% (m/v), ácido acético 5% (v/v)) para corroborar que las proteínas de las muestras se hayan transferido correctamente. Las membranas se lavaron con PBS-Tween₂₀ 0.05% (v/v) y se dejaron bloqueando toda la noche con una solución PBS, BSA 0.2% (m/v), Tween₂₀ 0.05% (v/v) a 4°C. Al día siguiente las membranas se incubaron con los anticuerpos policlonales de conejo anti-SAA (dilución 1/1000) o anti-SAP (dilución 1/10000) en PBS, BSA 0.2%, Tween₂₀ 0.05% durante toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween₂₀ 0.05% y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (dilución 1/2000) en PBS, BSA 0.2%, Tween₂₀ 0.05% durante 1:30 horas a temperatura ambiente con agitación. Al cabo de ese tiempo las membranas se lavaron con PBS-Tween₂₀ 0.05% y se revelaron mediante agregado del sustrato quimioluminiscente para la enzima peroxidasa en un equipo G:BOX (Syngene, India) utilizando el programa SnapGene. Las variaciones en los niveles de SAA y SAP con la temperatura o tras la estimulación con componentes bacterianos se analizaron mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, EEUU). Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante densitometría cada ensayo de *Western blot* fue repetido dos o tres veces.

2.10) Análisis estadístico general de los experimentos

Para comparar las masas, la actividad de la VA, Cp y lisozima, y los niveles de potenciales PFAs y proteína total en los experimentos previamente descritos, se utilizó el programa de análisis estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad software, EEUU). En primera instancia se evaluó si los datos obtenidos de cada ensayo en ambos experimentos seguían una distribución normal mediante el test de D'Agostino & Pearson. Cuando los datos no presentaron dicha distribución, se buscó normalizarlos 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 los distintos parámetros evaluados en cada ensayo. Dado que no se obtuvieron distribuciones normales en ningún caso, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de una sola vía de Kruskal-Wallis, con un post test de comparación múltiple de Dunn's. Para la determinación de los niveles de potenciales PFAs, se aplicó un análisis de varianza paramétrico de una sola vía con un post test de comparación múltiple de Tukey (se asumió normalidad si bien no se pudo comprobar porque se dispuso solamente de triplicados en los ensayos por *Western blot*). Las diferencias

estadísticamente significativas (p valor < 0.05) se indican con asteriscos (*) en cada figura. En particular en el experimento donde se expusieron los peces a gradientes de temperatura, previo a evaluar las diferencias significativas entre los grupos mantenidos a 20-24°C o a 24-31°C se analizó si los datos de los dos grupos sometidos al mismo gradiente de temperatura podían ser unificados en un solo grupo, evaluando la existencia de diferencias significativas entre las medias y los desvíos estándares correspondientes a cada piscina mediante un t-test.



3) RESULTADOS



3.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta

Los problemas sanitarios que ocurren en las granjas de piscicultura de esturión durante el verano uruguayo sugieren que la funcionalidad de su sistema inmune se altera durante los meses cálidos del año, promoviendo la aparición de infecciones con patógenos oportunistas. Como se comentó en la introducción (sección 1.4), cuando los esturiones permanecen durante períodos prolongados a temperaturas $\geq 24^{\circ}\text{C}$ se induce una respuesta de estrés crónico que repercute en la funcionalidad de varios componentes de su sistema inmune innato⁸⁹. Para profundizar en este análisis, en este trabajo se realizó un experimento en el que dos grupos de esturiones rusos se sometieron a gradientes de temperatura de 20 a 24°C (lotes 1 y 2, temperatura moderada) o de 24 a 31°C (lotes 3 y 4, temperatura alta), simulando las variaciones térmicas que ocurren durante las estaciones cálidas en las granjas acuícolas de nuestro país (ver Figura 2.3.1). Se obtuvieron muestras de suero al día 0, 7 y 27 y se analizó el efecto del estrés térmico sobre componentes séricos de la respuesta inmune innata (VA del SC, Cp y lisozima) así como sobre los niveles de proteína total y de potenciales PFAs en el esturión como la SAA y SAP. Los resultados obtenidos se describen en esta sección. Salvo que se aclare lo contrario, los datos de los dos grupos experimentales sometidos a 20-24°C o a 24-31°C para cada tiempo se unieron en un único grupo, luego de corroborar que no existieran diferencias significativas entre las medias y los desvíos estándares de los datos entre los lotes 1 y 2 (expuestos a temperatura moderada) o 3 y 4 (expuestos a temperatura alta, ver Figura 2.3.1).

3.1.1) Evolución de la masa corporal de los esturiones a lo largo del experimento

Para evaluar el estado general de los esturiones a lo largo del experimento los peces fueron masados previo a cada sangrado, tal como se describió en la sección 2.4. La evolución de la masa de los esturiones durante del experimento se muestra en la Figura 3.1.1, dónde puede observarse que los valores variaron entre 115 y 610 g, mostrando una importante dispersión. Como se verá en las secciones siguientes, esta dispersión también se observa en los otros parámetros analizados, y posiblemente es atribuible a múltiples factores incluyendo el hecho que los animales criados en las granjas de piscicultura no son endogámicos y por lo tanto presentan mayor variabilidad biológica entre sí. Al día inicial no se encontraron diferencias significativas en el peso de los animales para ambas condiciones de temperatura, como se observa en la figura las medianas de estos grupos son prácticamente iguales. En el transcurso del experimento las medianas de la masa corporal mostraron una sutil tendencia al aumento en las piscinas frías y a la disminución en las piscinas de alta temperatura, sin embargo dichas tendencias no resultaron estadísticamente significativas. Estos resultados permiten concluir que el estrés inducido por calor no afectó significativamente la masa corporal de los esturiones en el tiempo de exposición analizado.

3.1.2) Cuantificación de los niveles de proteína total en suero de esturión ruso

Tal como se comentó en la sección 1.4, la disminución en los niveles de proteína total en suero ha sido utilizada como un indicador del estrés crónico en los peces. Los niveles séricos de proteína total obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 3.1.2, donde no se

observan diferencias significativas en ninguno de los grupos. En el caso del grupo de alta temperatura es posible apreciar una tendencia al aumento en dichos niveles al día 7 en comparación con el día 0 y una posterior disminución al día 27. De todas formas dichas tendencias no mostraron significancia estadística, indicando que el mantenimiento de los peces a 20-24°C o 24-31°C no provocó alteraciones de ningún tipo sobre los niveles de proteínas totales en suero con el transcurso de los días. Por lo tanto, se puede concluir que este parámetro no evidenció el desarrollo de una respuesta de estrés crónico en los esturiones en el tiempo que duró este experimento.

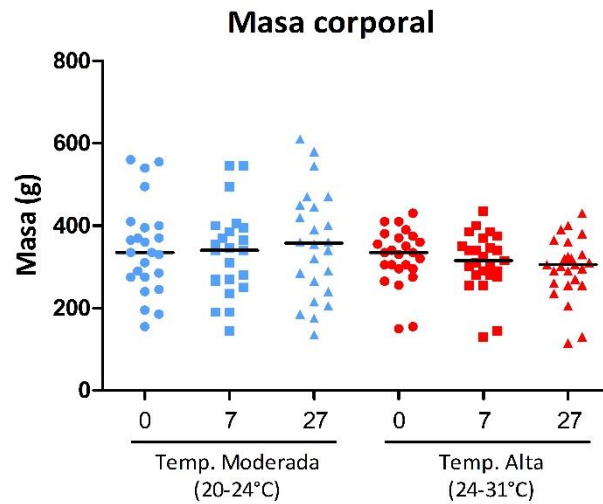


Figura 3.1.1 – Evolución de la masa corporal de *Acipenser gueldenstaedtii* durante su exposición a gradientes de temperatura moderada y alta. Los datos están organizados por condición (moderada o alta temperatura) y por día de extracción de sangre (0, 7 o 27); en azul se representan los peces expuestos a temperatura moderada y en rojo aquellos expuestos a temperatura alta. Se muestran los valores individuales y las medianas para cada grupo. El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, empleando el post test de comparación múltiple de Dunn's, no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

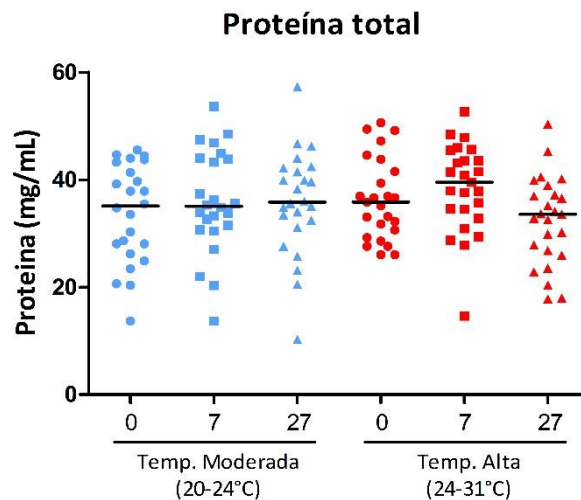


Figura 3.1.2 – Niveles séricos de proteína total en *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta. Los datos están organizados por condición (moderada o alta temperatura) y por día de extracción de sangre (0, 7 o 27); en azul se representan los peces expuestos a temperatura moderada y en rojo aquellos expuestos a temperatura alta. Se muestran los valores individuales y las medianas para cada grupo. El análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, empleando el post test de comparación múltiple de Dunn's, no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

3.1.3) Cuantificación de la actividad de componentes enzimáticos innatos en suero de esturión ruso

Para evaluar el efecto del estrés térmico sobre la respuesta inmune innata del esturión ruso se analizó la actividad de tres parámetros séricos diferentes vinculados a dicha respuesta: la VA del SC, la Cp y la lisozima, los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.1.3. En primer lugar se observa que la actividad de la VA del SC mostró una disminución en los peces mantenidos a 24-31°C al día 27 respecto al día 7 del experimento, a su vez al día 27 dicha actividad fue significativamente menor que la de los peces mantenidos a 20-24°C (Figura 3.1.3A). En segundo lugar se puede apreciar que la actividad de la Cp aumentó significativamente al día 7 respecto al día 0 en ambos grupos de esturiones. Estos aumentos no se sostuvieron a lo largo del tiempo, de hecho los niveles cayeron en forma significativa al día 27 en el caso de los peces expuestos a temperatura alta (Figura 3.1.3B). Con respecto a la actividad de la lisozima, se observaron cambios notorios en los peces sometidos a los dos gradientes de temperatura. De hecho, tanto la exposición a temperaturas entre 20-24°C como entre 24-31°C provocó un aumento significativo en la actividad lisozima al día 27 respecto al día 0, pero en el caso de la exposición al gradiente de temperatura alta, el incremento fue notorio al día 7; esto concuerda con el hecho que los niveles de lisozima al día 7 resultaron significativamente menores en los peces sometidos al gradiente de temperatura moderada respecto a los sometidos al gradiente de temperatura alta (Figura 3.1.3C).

En conjunto, los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con los resultados obtenidos en experimentos previos (comentados en la sección 1.4), dónde se observó que los niveles de la VA del SC y de Cp disminuyeron en peces mantenidos a temperaturas de 24°C, mientras que los niveles de lisozima aumentaron⁸⁹. Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que el aumento de la temperatura tiene un impacto notorio sobre las defensas innatas de los esturiones, que se ve reflejado en las variaciones de varios componentes séricos enzimáticos, reproduciendo el comportamiento que se observó previamente durante la respuesta de estrés crónico inducida por calor.

3.1.4) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso

Como se comentó en las secciones 1.3.1 y 1.3.6 de la introducción, las PFA son muy buenos marcadores de situaciones de estrés y/o infección en distintos animales, pero poco se conoce acerca de cuáles PFA podrían ser buenos marcadores en esturión. Estudios de expresión hepática de PFA en esturiones estimulados con bacterias *A. hydrophila* inactivadas realizados en nuestro laboratorio permitieron identificar a la proteína SAA y SAP como potenciales PFA en el esturión ruso. Sin embargo, aún no se ha determinado si estas variaciones en la expresión hepática se correlacionan con variaciones de las proteínas en suero, ni como el estrés inducido por calor afecta esta respuesta. Para profundizar en este análisis, se determinaron las variaciones en los niveles séricos de la SAA y SAP mediante la técnica de *Western blot*, empleando anticuerpos policlonales anti-SAA y anti-SAP de esturión ruso producidos en nuestro laboratorio. Para este análisis se utilizaron pools de sueros de los individuos de los grupos mantenidos a 20-24°C (lotes 1 y 2) y de los grupos mantenidos a 24-31°C (lotes 3 y 4) a los diferentes tiempos del experimento (día 0, 7 y 27). Las imágenes de las membranas reveladas con el sustrato quimioluminiscente y teñidas con solución de rojo Ponceau para la SAA y la SAP se exhiben en los paneles A y B de las Figuras 3.1.4 y 3.1.5, respectivamente.

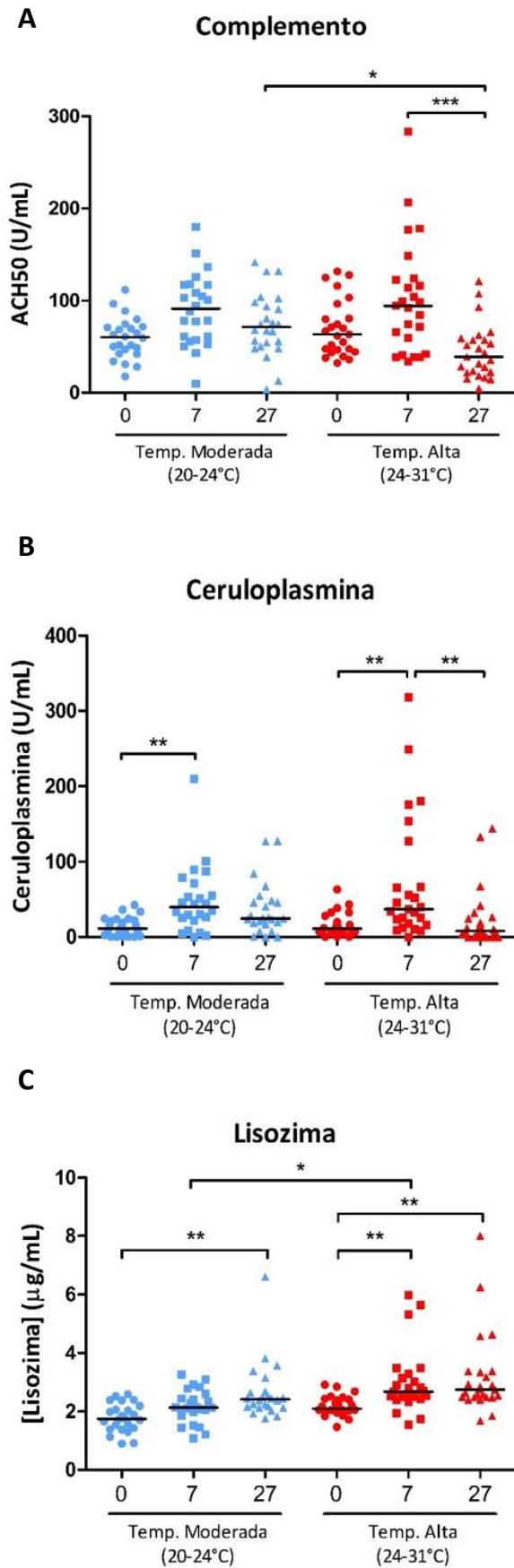


Figura 3.1.3 – Análisis de componentes enzimáticos innatos en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* sometidos a gradientes de temperatura moderada y alta. En A se grafican los niveles de actividad de la VA del SC (ACH50), en B los niveles de actividad de Cp y en C los niveles de actividad de lisozima. Los datos están organizados por condición (moderada o alta temperatura) y por día de extracción de sangre (0, 7 o 27), en azul se representan los peces expuestos a baja temperatura y en rojo aquellos expuestos a temperatura alta. Se indican los valores de las medianas y con asteriscos (*) las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el test de Kruskal-Wallis, y el post test de comparación múltiple de Dunn's.

La tinción con rojo Ponceau se realizó para verificar que las proteínas se hayan transferido correctamente a la membrana y, a su vez, se utilizó para normalizar los niveles de SAA y SAP cuantificados a partir del *Western blot* mediante densitometría, empleando la banda de aproximadamente 25 kDa como control de carga. El panel C de las Figuras 3.1.4 y 3.1.5 muestra los resultados obtenidos en dicha cuantificación. Como se observa en ambas figuras, en este caso los datos se encuentran organizados por lote y no por grupo experimental, esto se debe a que para este análisis los pools de cada uno de los lotes 1, 2, 3 y 4 a cada tiempo se sembraron en carriles separados en el SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 3.1.4 A, al día 0 no se observaron niveles detectables de SAA en el suero de los esturiones en ninguno de los grupos, mientras que si se logró detectar la banda correspondiente a la SAA para ambos grupos al día 7. A pesar de que se detectó la SAA en los peces sometidos a temperaturas moderadas, la cuantificación por densitometría mostró que este aumento fue significativo sólo para los dos lotes de alta temperatura, y que decayó significativamente al día 27 (Figura 3.1.4 C). Por otra parte, al día 7 los niveles de SAA fueron significativamente mayores en los lotes de alta temperatura con respecto a los de temperatura moderada (con excepción de la comparación entre los lotes 1 y 4). Esto puede explicarse considerando que a pesar de que la SAA aumentó significativamente al día 7 en los lotes expuestos a alta temperatura, los niveles fueron significativamente menores en el lote 4 respecto al lote 3 (Figura 3.1.4 C), mostrando que el aumento en la expresión de la SAA fue desigual entre estos lotes de peces. En resumen, los resultados obtenidos sugieren que al día 7 la expresión de la SAA se indujo en respuesta al estrés inducido por calor, sin embargo este aumento no fue sostenido a lo largo del experimento, ya que sus niveles disminuyeron al día 27. En el caso de la SAP, como se muestra en la Figura 3.1.5, no se observaron variaciones significativas en sus niveles séricos a lo largo del experimento. Esto indica que el aumento de temperatura no alteró los niveles de SAP en el suero de los esturiones, concluyendo que la SAP no es una proteína de respuesta al estrés térmico en esta especie.

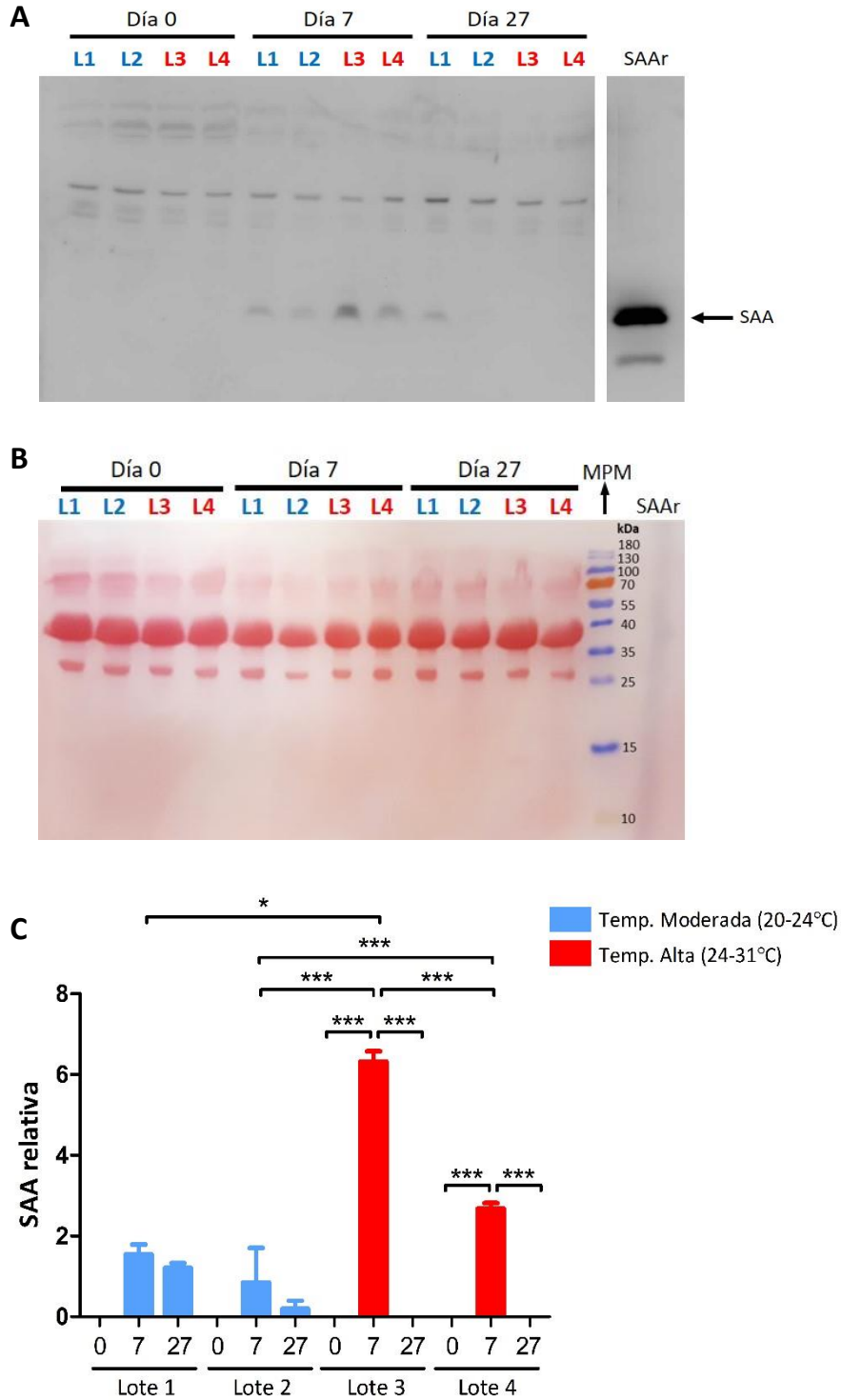


Figura 3.1.4 – Análisis por *Western blot* de los niveles de SAA en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* expuestos a gradientes de temperatura moderada y alta. En A se muestra la membrana revelada con el sustrato quimioluminiscente luego de la incubación con suero anti-SAA y anticuerpo secundario, la flecha negra indica la banda correspondiente a la SAA. En B se muestra la membrana teñida con la solución de rojo Ponceau y se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM), expresado en kilo-Daltons (kDa). Los SEP fueron sembrados de acuerdo al número de lote (L1, L2, L3 o L4) y al día de extracción de sangre (0, 7 o 27). En C se grafican los niveles relativos de SAA, dichos niveles se cuantificaron empleando el programa ImageJ a partir de dos imágenes de *Western blot* independientes y están expresados como valores relativos, normalizados utilizando la banda de ~25 kDa de las tinciones con rojo Ponceau como control de carga de cada carril. Los lotes sometidos a temperatura moderada se indican con color azul, mientras que los lotes sometidos a temperatura alta se indican con color rojo. Los asteriscos (*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA, y el post test de comparación múltiple de Tukey.

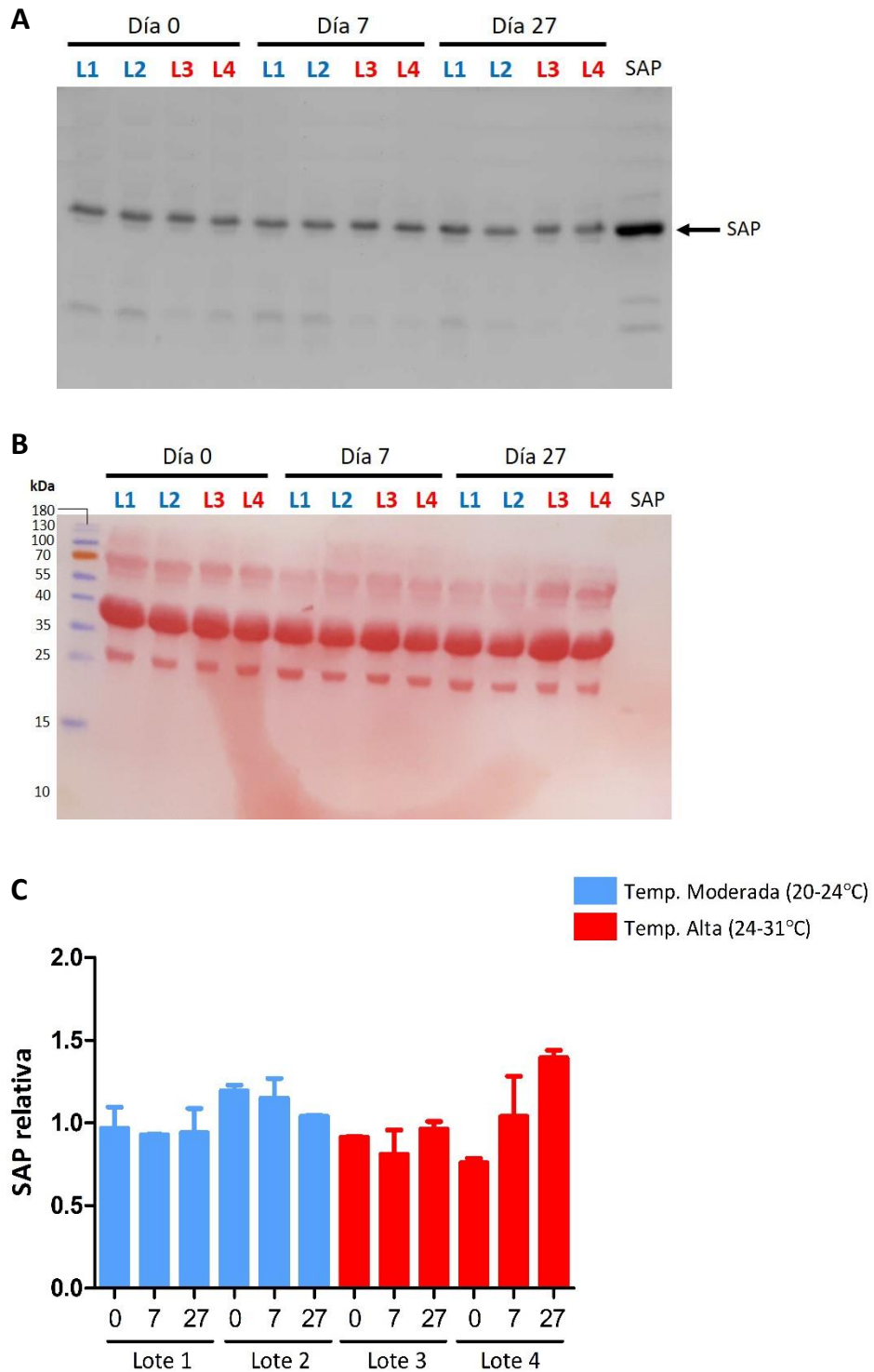


Figura 3.1.5 – Análisis por *Western blot* de los niveles de SAP en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* expuestos a gradientes de temperatura moderada y alta. En A se muestra la membrana revelada con el sustrato quimioluminiscente luego de la incubación con suero anti-SAP y anticuerpo secundario, la flecha negra indica la banda correspondiente a la SAP. En B se muestra la membrana teñida con la solución de rojo Ponceau y se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM), expresado en kilo-Daltons (kDa). Los SEp fueron sembrados de acuerdo al número de lote (L1, L2, L3 o L4) y al día de extracción de sangre (0, 7 o 27). En C se grafican los niveles relativos de SAP, dichos niveles se cuantificaron empleando el programa ImageJ a partir de dos imágenes de *Western blot* independientes y están expresados como valores relativos, normalizados utilizando la banda de ~25 kDa de las tinciones con rojo Ponceau como control de carga de cada carril. Los lotes sometidos a temperatura moderada se indican con color azul, mientras que los lotes sometidos a temperatura alta se indican con color rojo. Los asteriscos (*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA, y el post test de comparación múltiple de Tukey.

3.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos

Como segunda etapa de este trabajo, se buscó evaluar el efecto de la estimulación con componentes bacterianos sobre los mismos parámetros de la respuesta inmune innata del esturión ruso analizados para el experimento de gradiente de temperatura. Para ello se realizó un experimento en el que se inocularon esturiones juveniles intraperitonealmente con bacterias *Aeromonas hydrophila* inactivadas y se obtuvieron muestras de suero al día 1 y 3 post-inoculación (ver Figura 2.3.2). En este estudio se empleó *A. hydrophila* debido a que esta especie ha sido frecuentemente aislada de esturiones con sintomatología infecciosa en la granja ERN⁹⁰, por lo cual es probable que sea uno de los patógenos responsables del aumento de la mortalidad de los peces durante las estaciones cálidas del año.

3.2.1) Evolución de la masa de los esturiones a lo largo del experimento

El estado general de los esturiones a lo largo del experimento también se evaluó monitoreando la evolución de su masa (ver Figura 3.2.1). Nuevamente se aprecia la considerable dispersión biológica de los datos, al igual que ocurrió para el experimento de gradiente de temperatura. En este caso tampoco se encontraron diferencias significativas en la masa de los esturiones entre los grupos; las medianas se mantuvieron prácticamente constantes, independientemente del tratamiento o del día del análisis. Por lo tanto, es posible afirmar que la inoculación con bacterias inactivadas no afectó la masa de los animales.

3.2.2) Cuantificación de los niveles de proteína total en suero de esturión ruso

Los niveles de proteínas totales en suero obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 3.2.2. Nuevamente no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los grupos experimentales a los tiempos analizados. Dado que en este experimento el tiempo de muestreo post-inoculación fue corto (1 o 3 días) y que los peces fueron mantenidos a temperaturas no estresantes (18-20°C), no era esperable que los peces desarrollaran una respuesta de estrés crónico, lo que es compatible con que los niveles séricos de proteínas se hayan mantenido estables a lo largo del experimento.

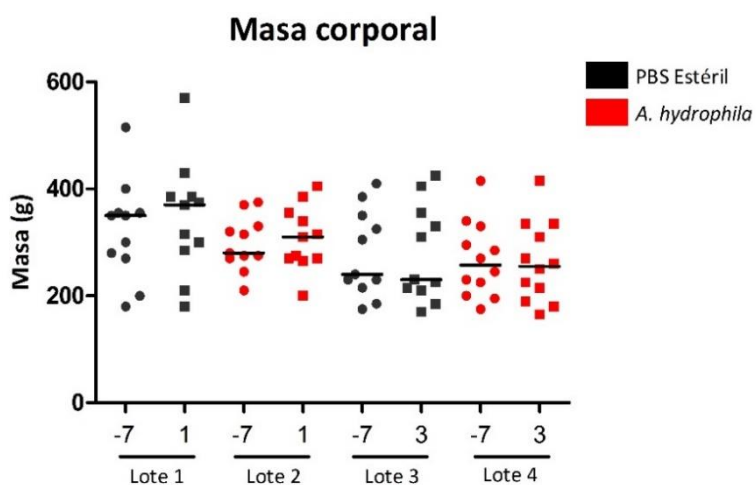


Figura 3.2.1 – Evolución de la masa corporal de *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de estimulación con componentes bacterianos. Los datos están organizados por lote de peces (1 a 4) y por día de extracción de sangre (-7, 1 o 3); en negro se representan los peces inoculados con PBS estéril y en rojo aquellos inoculados con *Aeromonas hydrophila*. Se muestran los valores individuales y las medianas para cada grupo. El análisis de varianza no paramétrico de una sola vía de Kruskal-Wallis, empleando post test de comparación múltiple de Dunn's, no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

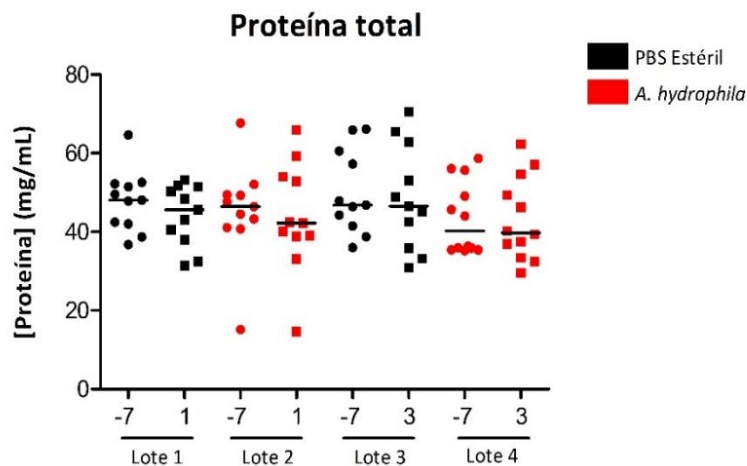


Figura 3.2.2 – Niveles séricos de proteína total en *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de estimulación con componentes bacterianos. Los datos están organizados por lote de peces (1 a 4) y por día de extracción de sangre (-7, 1 o 3); en negro se representan los peces inoculados con PBS estéril y en rojo aquellos inoculados con *Aeromonas hydrophila*. Se muestran los valores individuales y las medianas para cada grupo. El análisis de varianza no paramétrico de una sola vía de Kruskal-Wallis, empleando post test de comparación múltiple de Dunn's, no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

3.2.3) Cuantificación de la actividad de componentes enzimáticos innatos en suero de esturión ruso

La Figura 3.2.3 ilustra los datos de las actividades de componentes enzimáticos innatos en el suero de los esturiones durante este experimento. Si bien pueden apreciarse ciertas tendencias (> actividad de VA y Cp al día 1 y de lisozima al día 3), estas no fueron significativas. Por lo tanto es posible concluir que la estimulación con bacterias inactivadas a la dosis empleada en este experimento no indujo cambios en la funcionalidad de dichos componentes en suero.

3.2.4) Determinación de los niveles de SAA y SAP en suero de esturión ruso

Los niveles séricos de SAA y SAP se analizaron mediante *Western blot* con el objetivo de evaluar si la estimulación con bacterias inactivadas indujo variaciones en la concentración sérica de estas proteínas. Al igual que en el experimento de gradiente de temperatura, se emplearon pools del suero de los peces de cada lote, para cada tiempo de análisis. En los paneles A y B de las Figuras 3.2.4 y 3.2.5 se muestran las imágenes de las membranas reveladas con el sustrato quimioluminiscente y teñidas con la solución de rojo Ponceau para ambas proteínas. Asimismo, en el panel C de dichas figuras se muestra la cuantificación de los niveles relativos de SAA y SAP, empleando la misma normalización descrita en la sección 3.1.4. Como se puede observar en la Figura 3.2.4 C los niveles de SAA fueron prácticamente indetectables al día -7 del experimento y aumentaron significativamente al día 3 post-inoculación. Sin embargo, este aumento se observó tanto en el grupo inoculado con *A. hydrophila* como en el grupo control (inoculado con PBS), siendo prácticamente igual en ambos grupos. Estos resultados indican que la inoculación intraperitoneal tuvo un efecto *per se* aumentando los niveles de SAA, pero no permiten asegurar que la estimulación bacteriana haya tenido un efecto sobre los niveles séricos de esta proteína. Por otro lado, como se observa en la Figura 3.2.5 los niveles séricos de la SAP se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del experimento, a pesar de que se observó una tendencia a la disminución en los valores de SAP en los esturiones inoculados con *A. hydrophila* al día 3 (Figura 3.2.5 C), esta tendencia no mostró significancia estadística. Estos resultados permiten concluir que la SAP no actúa como PFA positiva en estas condiciones de estimulación.

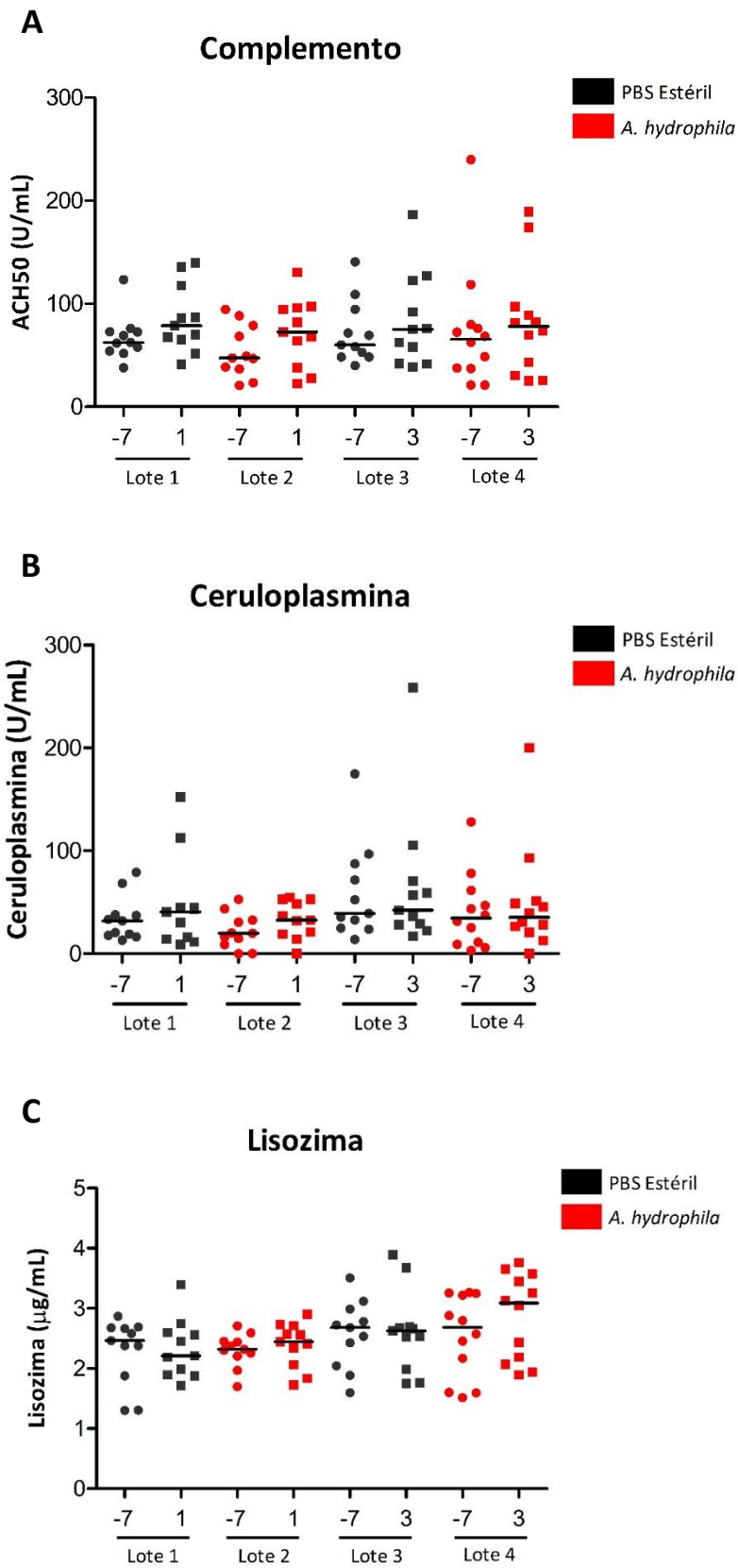


Figura 3.2.3 – Análisis de componentes enzimáticos innatos en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de estimulación con componentes bacterianos. En A se grafican los niveles de actividad de la VA del SC (ACH50), en B los niveles de actividad de Cp y en C los niveles de actividad de lisozima. Los datos están organizados por lote de peces (1 a 4) y por día de extracción de sangre (-7, 1 o 3), en negro se representan los peces inoculados con PBS estéril y en rojo aquellos inoculados con *Aeromonas hydrophila*. Se muestran los valores individuales y las medianas para cada grupo. El análisis de Kruskal-Wallis, con el post test de Dunn's, no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

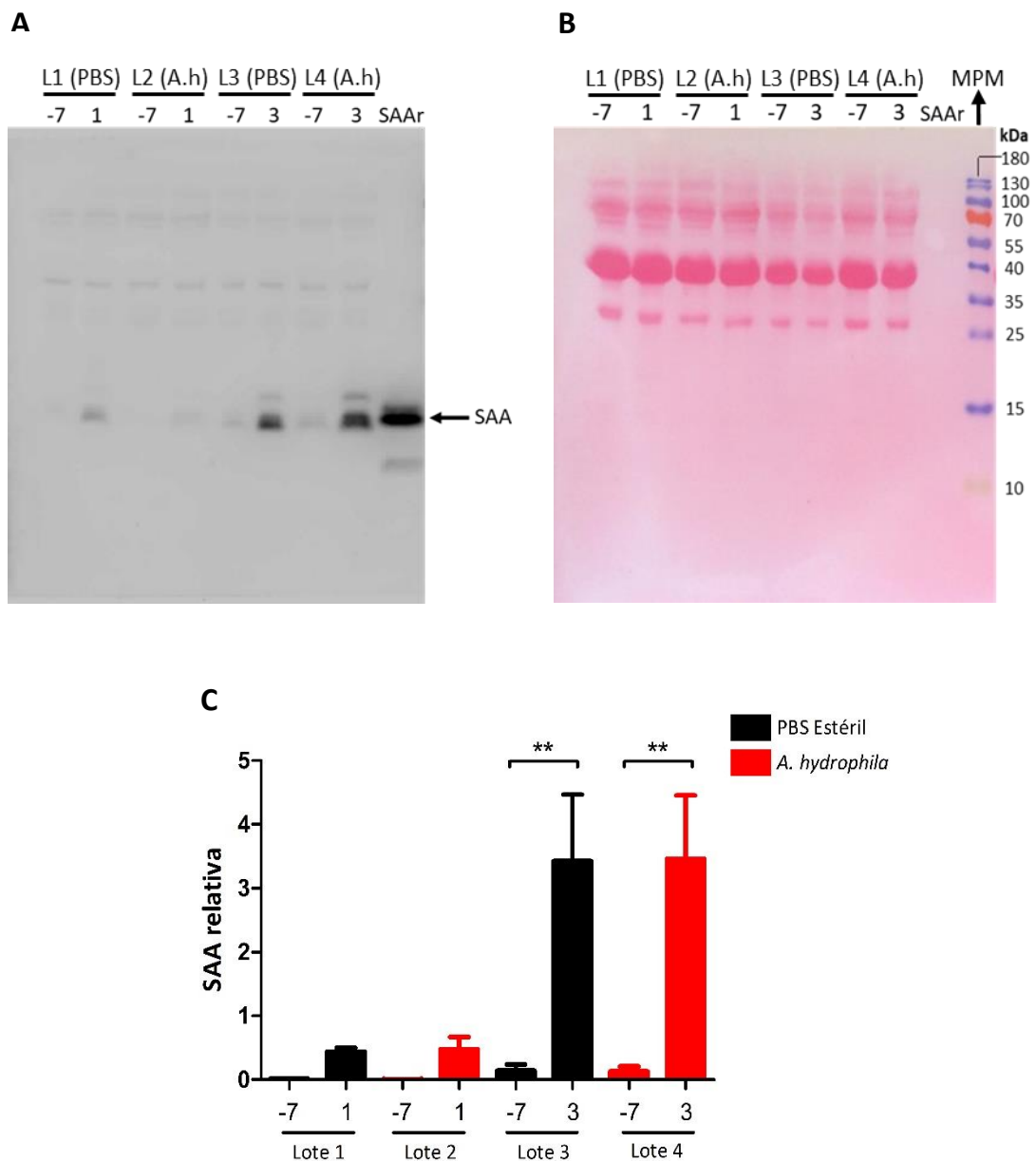


Figura 3.2.4 – Análisis por *Western blot* de los niveles de SAA en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de estimulación con componentes bacterianos. En A se muestra la membrana revelada con el sustrato quimioluminiscente luego de la incubación con suero anti-SAA y anticuerpo secundario, la flecha negra indica la banda correspondiente a la SAA. En B se muestra la membrana teñida con la solución de rojo Ponceau y se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM), expresado en kilo-Daltons (kDa). Los SEP fueron sembrados de acuerdo al número de lote (L1, L2, L3 o L4) y al día de extracción de sangre (-7, 1 o 3). En C se grafican los niveles relativos de SAA, dichos niveles se cuantificaron empleando el programa ImageJ a partir de tres imágenes de *Western blot* independientes y están expresados como valores relativos, normalizados utilizando la banda de ~25 kDa de las tinciones con rojo Ponceau como control de carga de cada carril. Los lotes inoculados con PBS estéril se indican con color negro y los lotes inoculados con *Aeromonas hydrophila* se indican con color rojo. Los asteriscos (*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA, y el post test de comparación múltiple de Tukey.

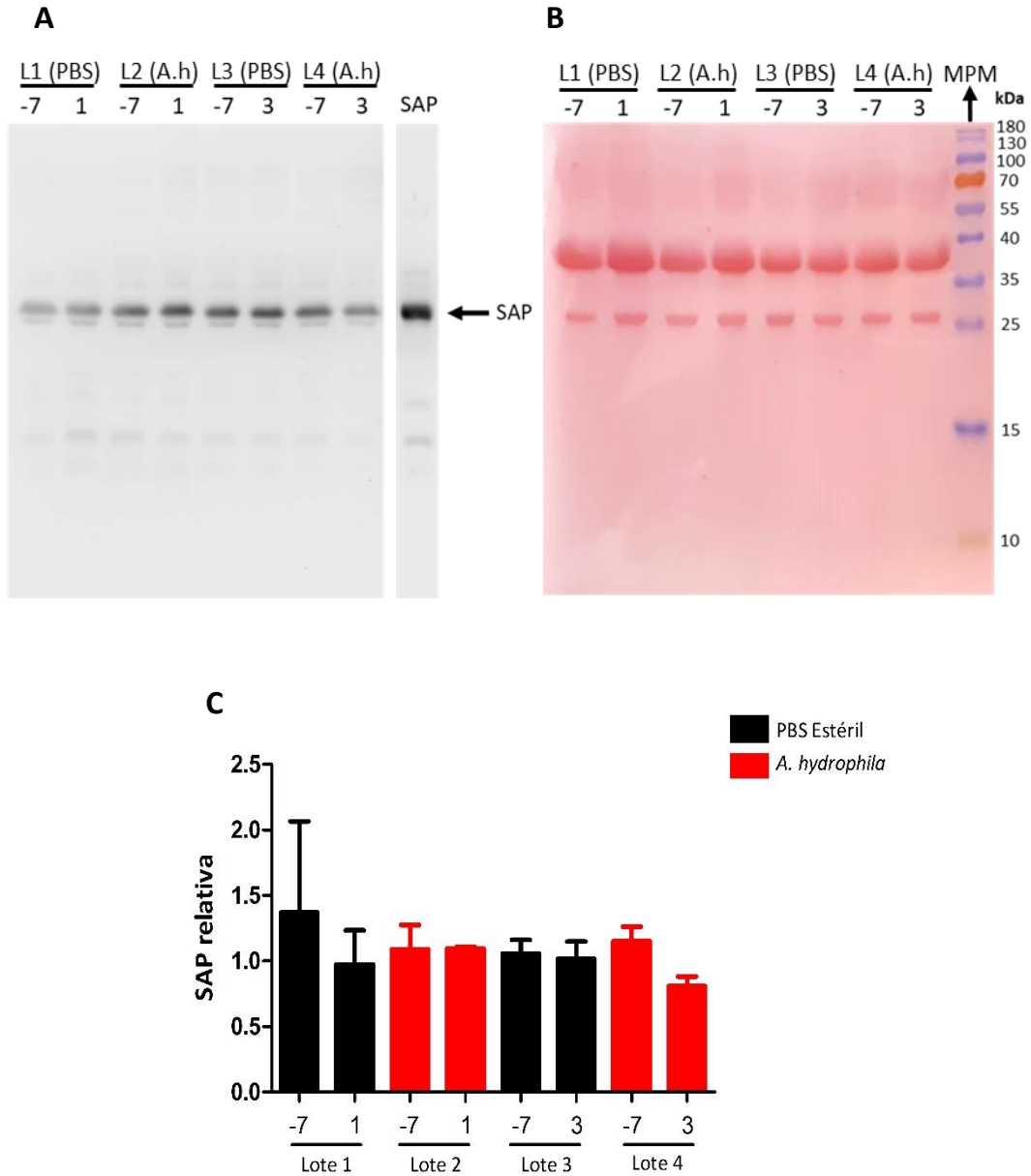


Figura 3.2.5 – Análisis por *Western blot* de los niveles de SAP en suero de *Acipenser gueldenstaedtii* a lo largo del experimento de estimulación con componentes bacterianos. En A se muestra la membrana revelada con el sustrato quimioluminiscente luego de la incubación con suero anti-SAP y anticuerpo secundario, la flecha negra indica la banda correspondiente a la SAP. En B se muestra la membrana teñida con la solución de rojo Ponceau y se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM), expresado en kilo-Daltons (kDa). Los SEP fueron sembrados de acuerdo al número de lote (L1, L2, L3 o L4) y al día de extracción de sangre (-7, 1 o 3). En C se grafican los niveles relativos de SAP, dichos niveles se cuantificaron empleando el programa ImageJ a partir de tres imágenes de *Western blot* independientes y están expresados como valores relativos, normalizados utilizando la banda de ~25 kDa de las tinciones con rojo Ponceau como control de carga de cada carril. Los lotes inoculados con PBS estéril se indican con color negro y los lotes inoculados con *Aeromonas hydrophila* se indican con color rojo. Los asteriscos (*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA, y el post test de comparación múltiple de Tukey.



4) DISCUSIÓN



En este estudio se buscó evaluar la influencia de los factores ambientales que afectan a los esturiones en las granjas de piscicultura durante el verano uruguayo -tales como la exposición a estrés térmico y/o a componentes bacterianos- sobre varios componentes séricos pertenecientes al sistema inmune innato de estos peces. En esta sección se discuten los resultados obtenidos en los experimentos realizados.

4.1) Experimento de exposición a gradientes de temperatura moderada y alta

Como se mencionó en la introducción, la temperatura constituye un factor ambiental crítico para la vida de los peces; en particular en el caso de los esturiones existen varios estudios que confirman que dicho factor es capaz de afectar considerablemente sus funciones incluyendo la reproducción⁹⁵, la capacidad de responder al estrés^{96,97} y la respuesta inmune^{98,99}. De acuerdo a la literatura disponible, las temperaturas adecuadas para el crecimiento del esturión verde (*Acipenser medirostris*) están en el rango de 19-24°C y dependen además de otros factores asociados al cultivo como la tasa de alimentación, el oxígeno disuelto, la edad de los peces y la densidad de cultivo^{100,101}. Para evaluar el efecto de los cambios ambientales asociados a la exposición de esturiones rusos a temperaturas cálidas o muy cálidas sobre las defensas innatas, diseñamos experimentos en condiciones de cultivo controladas donde variara solamente la temperatura. Para ello se seleccionaron dos rangos de temperatura: moderada (20-24°C) o alta (24-31°C). Estos rangos se seleccionaron en base a la información disponible sobre las temperaturas adecuadas para el cultivo de diferentes especies de esturión, la variación de la temperatura del agua del Río Negro e incluso los datos obtenidos previamente por nuestro grupo⁸⁹.

Respecto a los parámetros a evaluar, como se manifestó anteriormente, el conocimiento del funcionamiento del sistema inmune en los peces es limitado en comparación con los mamíferos y, en particular, el género *Acipenser* ha sido pobremente estudiado. Esto se traduce en dificultades a la hora de determinar en esturión los niveles de mediadores innatos (por ejemplo citoquinas) o de caracterizar las poblaciones celulares inflamatorias. De hecho no existen comercialmente reactivos especie-específicos para estudios inmunológicos en *Acipenser spp.* Por este motivo, para abordar este estudio se analizaron en primer lugar componentes innatos que pudieran cuantificarse en base a sus actividades a través de métodos enzimáticos, tales como la VA del SC, la Cp y la lisozima.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los gradientes realizados de 20-24°C y 24-31°C bajo condiciones controladas de laboratorio lograron reproducir los efectos sobre componentes del sistema inmune innato observados en los esturiones cultivados en la granja ERN durante el verano⁸⁹; de hecho, los peces sometidos a altas temperaturas por varias semanas presentaron una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la VA y de la Cp, y un leve aumento en los niveles de lisozima a lo largo del tiempo. Además, estos efectos fueron más intensos cuando se comparan con los observados en peces mantenidos a temperaturas moderadas (ver Figura 3.1.3). Asimismo, las alteraciones observadas son similares a las encontradas por nuestro grupo en estudios anteriores donde los esturiones se expusieron por 37 días a 24°C en condiciones de cultivo controladas; en ese estudio se observó un descenso en

la actividad de la VA (3.6 veces), la Cp (3.1 veces) y un modesto aumento en la actividad lisozima (1.7 veces). Estos cambios correlacionaron con una disminución de la masa corporal y del contenido de proteínas totales en suero, por lo cual se asociaron con una respuesta de estrés crónico inducida por la larga exposición a 24°C (conocida con el término *distress* en inglés)⁸⁹. En contraste, en el presente trabajo, la exposición al gradiente de 20-24°C no alcanzó a provocar alteraciones de similar magnitud, aunque la actividad del complemento y la Cp exhibieron una tendencia a la disminución (1.3 veces y 1.6 veces, respectivamente) y el aumento de la lisozima (1.4 veces) fue significativo. La menor intensidad en los efectos provocados por la exposición a los gradientes de temperatura sobre los niveles de los componentes enzimáticos concuerda con el hecho que no se registraron alteraciones sobre la masa corporal ni sobre los niveles de proteínas totales en los peces. Por lo tanto, resulta evidente que en este estudio el aumento de la temperatura en ambos gradientes constituyó un factor que influenció varios parámetros asociados a las defensas innatas, aunque no se habría alcanzado un estado de estrés crónico. Las diferencias en los efectos observados entre estos experimentos podrían explicarse por la utilización de distinta densidad de cultivo, un factor que también induce estrés en los peces¹⁰² y ha sido uno de los factores estudiados durante el cultivo del esturión¹⁰³⁻¹⁰⁵. En el presente experimento la densidad de cultivo fue aproximadamente 3 veces menor (~8 kg/m³) a la que se utilizó en el estudio previo (~22 kg/m³) y 4 veces menor a la estimada durante el cultivo en la granja (~30 kg/m³). Es posible entonces que en el estudio realizado a menor densidad de cultivo los peces soportaran mayores temperaturas sin presentar los signos de estrés crónico previamente descritos (disminución de masa corporal y proteínas en suero, y aumento en la mortalidad). Lo anterior muestra la importancia de contar con parámetros que permitan determinar con mayor sensibilidad estados de estrés crónico, que en el presente trabajo no pudimos explorar con mayor profundidad. Cabe mencionar que la pérdida de masa corporal, la disminución en los niveles de proteínas séricas o el aumento en la mortalidad podrían ser muy poco sensibles ya que se alcanzan como consecuencia de un proceso severo de estrés crónico, y su ausencia no implica necesariamente que los peces no hayan experimentado cierto estrés por un tiempo prolongado.

Respecto a los efectos observados por las temperaturas cálidas o muy cálidas, la disminución en las actividades de la VA y de la CP también se han descrito para algunos teleósteos bajo condiciones de estrés crónico inducido por temperatura o hacinamiento^{19,102}. Cuando un organismo se ve sometido a un agente estresor que se mantiene por un período de tiempo extenso, como en este caso las temperaturas mayores a 24°C para los esturiones, se produce un cambio sustancial en su metabolismo energético, de forma tal que la mayor parte de los recursos energéticos son destinados a satisfacer la demanda originada por el proceso de estrés. Esto afecta la síntesis de muchos componentes, incluyendo aquellos asociados a las defensas, generando una deficiencia para enfrentarse a una situación de infección o trauma. Más aún, considerando que el funcionamiento del sistema inmune requiere una alta demanda de energía (continua generación de células inmunes en la médula ósea, activación celular, diferenciación y proliferación, síntesis de grandes cantidades de mediadores solubles), la capacidad para desarrollar una respuesta inmune durante el estrés crónico se ve considerablemente afectada, disminuyendo la eficiencia de la respuesta y conduciendo a un estado general de inmunosupresión⁷⁹. En este escenario, teniendo en cuenta que la mayoría de las proteínas del SC y la Cp son sintetizadas en el hígado, es altamente probable que la reducción en la actividad de la VA y de la Cp se deba a cambios sobre la síntesis hepática de dichas

proteínas. Conociendo que el SC es uno de los componentes más importantes de las defensas innatas de los peces y que la Cp interviene regulando la inflamación innata, el efecto de las altas temperaturas sobre estos componentes podría, al menos parcialmente, explicar el aumento en la susceptibilidad a las infecciones y mortalidad observado en las granjas de cultivo de esturiones durante los meses cálidos del año. Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que este efecto sobre la síntesis proteica no repercute en los niveles de todas las proteínas plasmáticas. Por ejemplo, en el caso de la lisozima sus niveles aumentaron significativamente en ambos grupos a lo largo del experimento, y al día 7 fueron más altos en los esturiones mantenidos a altas temperaturas en comparación con aquellos mantenidos a temperaturas moderadas. Considerando que la síntesis hepática podría estar globalmente afectada, este aumento podría explicarse por un incremento en la síntesis de lisozima en leucocitos o en las células epiteliales de las branquias, capaces de sintetizar esta enzima en los peces^{58,65}. La inducción de lisozimas (existe más de una clase¹⁰⁶) durante la respuesta de estrés es sin duda un mecanismo de protección en una situación de riesgo. Si bien la lisozima se expresa en el hígado, no es claro que éste sea el origen de la actividad que medimos en el plasma; de hecho, la síntesis extra hepática de la lisozima está estrechamente vinculada a su actividad lítica, a través de la cual contribuiría al proceso de fagocitosis mediada por neutrófilos y macrófagos (revisado en 1.3.5)⁵²⁻⁵⁴. Además, esta enzima adquiere un rol crucial en los peces debido a la reducida diversidad y cantidad de péptidos antimicrobianos que sintetizan⁶⁰ y a su hábitat natural que es un ambiente copioso en cuanto a la presencia de patógenos oportunistas^{51,58}. Resulta interesante considerar que previamente se ha reportado el desarrollo de respuestas al estrés que incluyen aumento en la actividad lisozima. El estudio realizado por Eslamloo & Falahaktar¹⁰⁷ mostró un aumento en los niveles de lisozima en esturiones siberianos (*Acipenser baerii*) sometidos a estrés por hipoxia, sugiriendo que este componente podría estar regulado por hormonas inducidas por la respuesta de estrés. Similares resultados se han observado en peces gato, en los cuales se indujo aumento de la actividad lisozima durante una situación de estrés por bajo nivel de agua que generó mortalidad⁸⁵.

En este trabajo también se analizaron los niveles séricos de dos potenciales PFAs identificadas en el esturión ruso: la SAA y la SAP. Con respecto a la SAA, se observó que sus niveles fueron significativamente mayores (3.7 veces) al día 7 en los peces expuestos a temperaturas altas respecto a los expuestos a temperaturas moderadas, volviendo a los niveles basales al día 27 (Figura 3.1.4 C). Una apreciación que surge del análisis de dicha figura es que si bien los lotes sometidos a alta temperatura (3 y 4) mostraron aumento, los niveles de SAA fueron significativamente mayores en los peces del lote 3 en comparación al lote 4, aunque ambos lotes recibieron igual tratamiento (tiempo de aclimatación, manejo, mantenimiento y temperatura del agua). Esta diferencia en el comportamiento de estos lotes podría estar relacionada con distinta densidad de cultivo; el lote 3 tenía 12 peces al igual que los lotes 1 y 2, mientras que el lote 4 tenía 13 peces (ver Figura 2.3.1). Si bien se consideró que la diferencia de un solo pez no generaba un cambio importante en este parámetro, no se puede descartar que haya tenido un efecto sobre la respuesta de los peces al estrés térmico, ya que al igual que la temperatura la densidad de cultivo tiene un gran impacto en el cultivo de los esturiones¹⁰³⁻¹⁰⁵. Otro aspecto que puede explicar este resultado es la variabilidad biológica de los esturiones utilizados en este estudio; a diferencia de los animales tradicionales utilizados para experimentación, se trabajó con esturiones que no son endogámicos ni criados en condiciones controladas de laboratorio. Además, como se puede observar en los resultados (sección 3), en la mayoría de los parámetros

analizados se observan importantes dispersiones. Por otro lado, el análisis de la SAA se realizó sobre pools de suero, debido a que no resultó posible analizar muestras individuales por *Western Blot*. Esto no permitió discernir si esta diferencia en la respuesta desarrollada por los lotes se debe a que todos los peces del lote 3 presentaron mayores niveles de SAA, o a que un único pez presentó niveles muy superiores a los del resto del grupo. En contraste con la respuesta observada para la SAA, en el caso de la SAP no se observaron cambios en sus niveles en ninguno de los lotes, por lo que se puede concluir que las variaciones de temperatura a las que se sometieron los esturiones en este experimento, y el estrés que probablemente estas conllevan, no afectaron significativamente su síntesis. Cabe destacar que el análisis de los niveles de SAA y SAP en respuesta al estrés inducido por calor en el esturión ruso aporta información novedosa, ya que a la fecha no existen estudios de los niveles séricos de dichas proteínas en ninguna especie de esturión, ni tampoco en otras especies de peces; la información disponible sobre estas proteínas deriva de estudios basados en el análisis de la expresión hepática de estos genes^{74,75}.

En relación con el significado del aumento de la SAA en respuesta al estrés, cabe recordar que esta proteína está implicada en numerosas funciones vinculadas a la regulación de procesos inflamatorios tanto en mamíferos¹⁰ como en peces⁷³, por lo cual el incremento de los niveles séricos de esta proteína podría contribuir a limitar una posible respuesta inflamatoria inducida por estrés. Por otro lado, esta respuesta no persistió más allá de 7 días, aunque la condición de estrés se mantuvo y probablemente se hizo más intensa. Esto es posiblemente consecuencia del desequilibrio metabólico asociado al estrés crónico que se discutió en los párrafos anteriores.

En conjunto, los resultados de este experimento sugieren que la exposición de esturiones rusos a condiciones de temperatura similares a las del verano uruguayo induce alteraciones significativas sobre los componentes séricos enzimáticos analizados, provocando un debilitamiento general de sus defensas innatas posiblemente a través de mecanismos inducidos por una respuesta de estrés crónico. Por este motivo, y al igual que como ocurrió en el estudio precedente de nuestro grupo, el presente trabajo constituye una nueva evidencia de que el cultivo de esturiones rusos a temperaturas $\geq 24^{\circ}\text{C}$ presenta serias dificultades, sobre todo cuando se utilizan condiciones de alta densidad que inducen de por sí estrés por hacinamiento. Por otro lado, encontramos que la SAA puede inducirse durante una respuesta de estrés térmico crónico. Sin embargo, teniendo en cuenta que esta proteína es una PFA en varias especies de peces, es probable que sea inducida por una situación de infección en el esturión, por lo que un aumento en sus niveles séricos no necesariamente reflejaría una situación de estrés. Sumado a esto, el hecho de que su aumento no se haya mantenido a lo largo del experimento evidencia que no es un biomarcador ideal para analizar la respuesta de estrés por calor en los esturiones. En conjunto, esto plantea la necesidad de identificar nuevos marcadores de estrés térmico crónico en el esturión ruso. Esta identificación significaría un gran avance para el diseño de estrategias de monitoreo de respuesta de estrés de los esturiones en las granjas de piscicultura, lo que mejoraría sustancialmente las condiciones de cría de dichos animales en nuestro país.

4.2) Experimento de estimulación con componentes bacterianos

El segundo objetivo de este trabajo fue estudiar cómo responden los esturiones a la estimulación con componentes bacterianos, en particular analizando cambios a nivel de las defensas innatas. Anteriormente nuestro grupo de investigación realizó un experimento en el laboratorio húmedo de la granja ERN en el que se estimularon esturiones rusos con *A. hydrophila* inactivadas a tres dosis diferentes (10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/kg) y se analizaron los niveles de VA, Cp y lisozima al día 1 y 3. En dicho experimento, si bien se observaron variaciones en estos parámetros, ninguna de las dosis empleadas produjo cambios robustos (datos no publicados). Este resultado puede deberse a que las condiciones de estimulación no fueron suficientes para producir efectos sistémicos y/o a que estos parámetros no constituyen buenos indicadores de una respuesta inflamatoria localizada. Por otra parte, en dicho experimento se observó un incremento significativo en los niveles de transcritos de SAA en el hígado de esturiones rusos estimulados con la dosis de 10^9 UFC /kg (Tesis de Maestría del Lic. Mauricio Castellano). En este trabajo buscamos reproducir el experimento anterior utilizando la dosis mayor de bacterias *A. hydrophila* inactivadas (10^9 UFC/kg) y además evaluar los niveles séricos de SAA y SAP. Los resultados del presente experimento mostraron que los tres parámetros, VA, Cp y lisozima, tendieron a aumentar por la estimulación con bacterias inactivadas, pero estos aumentos no alcanzaron significancia estadística a ninguno de los tiempos analizados (Figura 3.2.3). Si bien las condiciones generales de ambos experimentos fueron muy similares, hubo una diferencia importante en el diseño experimental ya que en el experimento previo, pero no en este trabajo, los peces fueron individualizados mediante el uso de un chip, que permitió que los valores obtenidos para cada parámetro al día 1 o día 3 post-inoculación pudieran ser normalizados por los valores correspondientes al día -7, obteniéndose datos de la variación del parámetro para cada pez. Esta normalización hizo posible determinar que en el caso de los peces inoculados a la dosis de 10^9 UFC/kg la actividad de la VA y de la Cp aumentó en promedio 1.4 veces al día 1, disminuyendo al día 3, mientras que la lisozima aumentó aproximadamente 1.25 veces al día 3. Sin embargo, sólo el aumento en los niveles de la Cp al día 1 fue estadísticamente significativo (Figura 4.2, panel A), apoyando la idea de que no hubieron cambios robustos en estos parámetros. En este trabajo se intentó inicialmente individualizar a los esturiones a través del uso de precintos numerados colocados en la aleta caudal. Sin embargo, pocos días después de haber colocado los precintos se comprobó que el material plástico de los mismos dañaba la piel de los peces, generando una pequeña herida. Por este motivo se decidió quitar los precintos y se esperó a que los peces se recuperaran de la lesión antes de comenzar con el experimento. Dado que en este caso los peces no fueron individualizados, no se pudo realizar la normalización individual. No obstante, cuando se normalizaron los valores medios (medianas) obtenidos para la VA, Cp y lisozima al día 1 o 3 por sus correspondientes valores al día -7, observamos que las variaciones en dichos parámetros fueron similares a las observadas en el experimento previo (panel B de la Figura 4.2). De los resultados obtenidos en ambos estudios, se desprende que la inoculación de las bacterias muertas a esta dosis genera una respuesta que a nivel sistémico es prácticamente indetectable a nivel de los parámetros analizados. A su vez, este estudio muestra que a los efectos de estudiar la respuesta inflamatoria en la población de esturiones, y considerando la gran variabilidad biológica en estos organismos, sería de gran importancia encontrar un método de individualización que no genere daño en los peces, ya que el seguimiento de cada pez en forma individual aporta mucha más información, permitiendo

evaluar la evolución de cada pez y normalizar los valores de los distintos parámetros respecto a sus valores iniciales. Una posible alternativa podría ser la implantación de chips, tal como se aplicó en el experimento previo realizado por nuestro grupo, sin embargo esto también genera una herida, requiere el uso de antibióticos tras la inyección del chip y además los chips pueden perderse luego de varias semanas (tiempo requerido para la aclimatación y espera de descenso del efecto inflamatorio provocado por la implantación). El uso de precintos de plástico más blando, también fue probado en algunas experiencias, sin resultados alentadores (al cabo de varios días se observan lesiones).

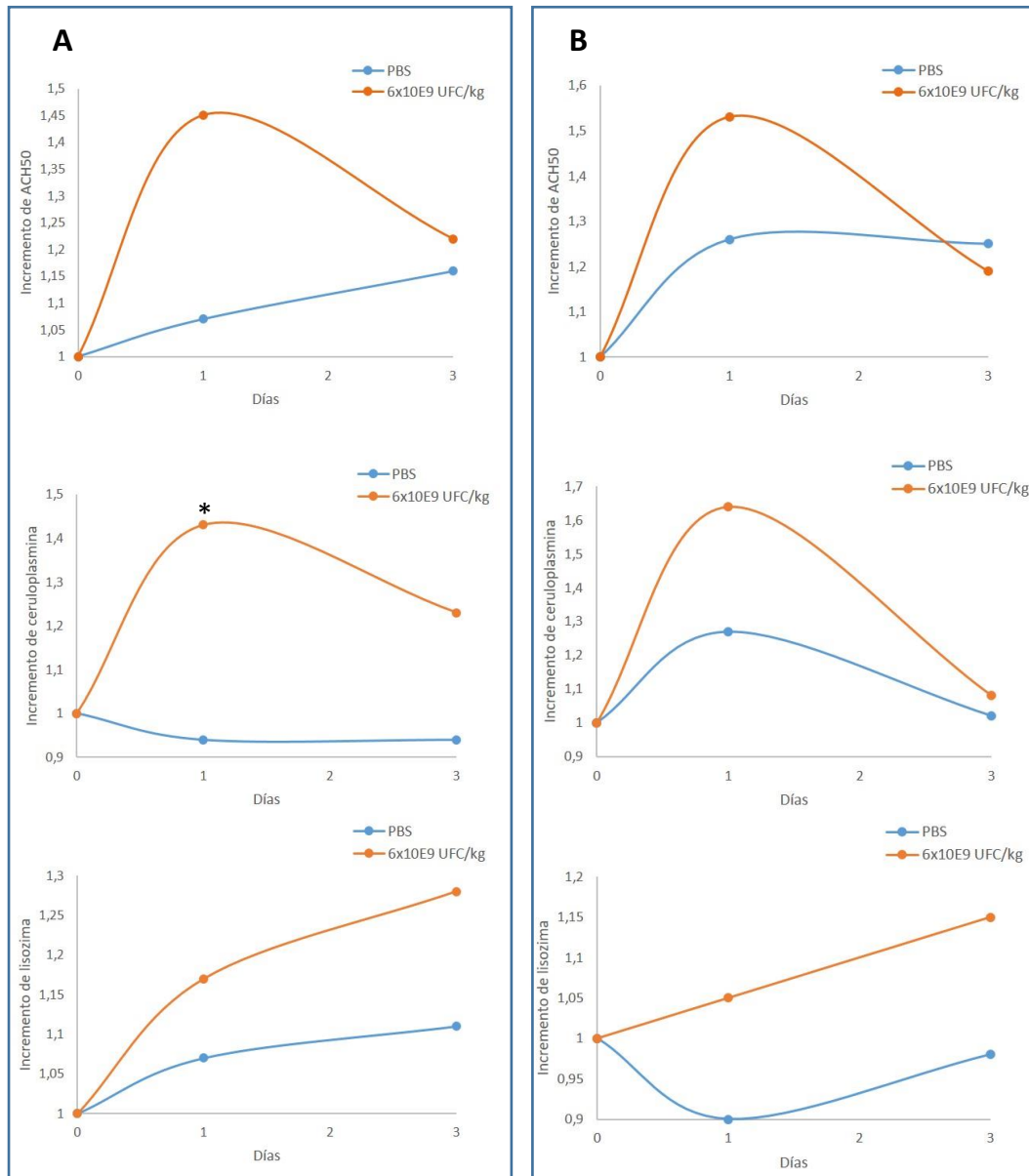


Figura 4.2 – Normalización de los valores de actividad de la VA, Cp y lisozima analizados en suero de *Acipenser gueldenstaedtii*. En el panel A se exhiben las normalizaciones correspondientes al experimento previo realizado en el laboratorio húmedo de la granja ERN, mientras que en B se exhiben los resultados correspondientes al experimento del presente trabajo realizado en el IIP. En A los valores obtenidos para cada parámetro al día 1 o 3 se normalizaron por los valores correspondientes al mismo pez al día -7; en B se normalizaron los promedios de los valores obtenidos para cada parámetro al día 1 o 3 respecto al promedio de los valores obtenidos al día -7. El asterisco (*) indica las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de varianza de una sola vía de ANOVA, y el post test de comparación múltiple de Tukey.

Respecto a los niveles séricos de las PFAs analizadas, al día 3 post-inoculación los niveles de SAA aumentaron significativamente y con similar intensidad tanto en los peces estimulados con *A. hydrophila* como en los peces control (Figura 3.2.4 C). Este resultado indicaría que el daño ocasionado por la inoculación indujo la síntesis de esta proteína y que la administración de la dosis 10^9 UFC/kg de las bacterias muertas no provocó un efecto medible adicional, sugiriendo que la SAA sería un marcador sensible de inflamación aguda. Nuevamente el empleo de pools de SE para este análisis no permitió discernir cómo fue la respuesta individual en estos peces. Recientemente en nuestro laboratorio, utilizando anticuerpos purificados a partir de sueros policlonales que reconocen distintos péptidos de la SAA, se logró ajustar un ELISA de captura que permite el análisis individual de los SE (ensayo optimizado por el Lic. Mauricio Castellano en el marco de su trabajo de posgrado). El análisis de los niveles individuales de SAA utilizando este ELISA mostró que los niveles de SAA aumentaron 2.5 veces en los peces estimulados con *A. hydrophila* y que éste aumento fue 1.4 veces mayor al de los peces inoculados con PBS. También se observó que en este último grupo un pez mostró niveles elevados de SAA al día 3, lo que contribuiría a aumentar notoriamente los niveles de SAA en el SEp, explicando los resultados que se obtuvieron en este trabajo. El Lic. Castellano también observó que en este experimento hubo una correlación positiva entre los niveles de SAA en suero y los niveles de transcritos de SAA en el hígado. En cuanto al aspecto cinético, generalmente la respuesta de fase aguda asociada a la estimulación por IL-1 e IL-6 de los hepatocitos se desencadena rápidamente siendo evidente el resultado de esta estimulación entre las primeras 24 y 72 horas posteriores a una infección. De acuerdo a nuestros resultados, el incremento en los niveles séricos de SAA fue detectable, pero modesto a las 72 horas, si bien es probable que a las 24 horas ya se registren cambios a nivel de ARNm. En relación con la SAP, contrastando con los resultados obtenidos para la SAA; no se encontraron diferencias significativas en sus niveles séricos tras la inoculación de bacterias inactivadas (Figura 3.2.5 C). En este caso aún no se dispone de un ELISA para realizar un análisis individual que permita verificar la tendencia a una menor síntesis de la SAP. Los resultados de este experimento concuerdan con lo reportado en varios artículos donde distintas especies de peces fueron desafiadas o infectadas con bacterias Gram negativas y no se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de proteínas tipo SAP^{68,77,108}.

Tomados en conjunto, los resultados previamente descriptos sugieren que la estimulación con una dosis de 10^9 UFC/kg de *A. hydrophila* inactivadas logró inducir una respuesta de fase aguda modesta en los esturiones. La SAA sería el marcador más sensible de inflamación dentro de los analizados, dado que fue el único que mostró un aumento significativo en respuesta a la estimulación, e incluso frente al daño ocasionado por la inyección. En este sentido, es importante considerar que es posible que la estimulación realizada con bacterias muertas a nivel peritoneal no sea suficiente para disparar una respuesta de fase aguda. De acuerdo con todo lo anterior, un modelo más adecuado para estudiar la respuesta de fase aguda sería la infección con bacterias, ya sea *A. hydrophila* u otra especie bacteriana presente en las aguas del Río Negro. De hecho, la gran mayoría de estudios referidos al análisis del efecto de patógenos sobre la respuesta innata de los peces utilizan modelos de infección y de esa forma han evidenciado modificaciones significativas sobre las actividades del SC, Cp y lisozima^{41,51}. Cabe mencionar que, dadas las dificultades prácticas que supone la experimentación con esturiones (disponibilidad de animales, costos de mantenimiento), hasta el inicio de este trabajo no se disponía de suficiente información como para realizar infecciones sin riesgo de niveles de mortalidad que hicieran fracasar el experimento (p. ej: dosis letal, evolución en el tiempo de la mortalidad).



5) CONCLUSIONES



Los resultados del experimento de gradiente de temperatura constituyen una nueva evidencia de que el cultivo de esturiones rusos a temperaturas $\geq 24^{\circ}\text{C}$ provoca un debilitamiento general de sus defensas innatas. Además, considerando datos previos obtenidos en condiciones de hacinamiento, se observó que una baja densidad de cultivo repercute favorablemente en la tolerancia de los esturiones a las altas temperaturas. En este sentido, no caben dudas de que disminuir la densidad de cultivo de los esturiones en las granjas de piscicultura minimizaría el estrés global ocasionado por la multiplicidad de estresores presentes, en particular, contribuyendo a una mayor tolerancia a la exposición a temperaturas altas. Sin embargo, esta práctica conllevaría problemas para las empresas debido a que podría repercutir negativamente sobre los niveles de producción anuales, por lo cual la aplicación de esta medida no es sencilla en términos prácticos. Sería útil realizar experimentos en condiciones de cultivo similares a las granjas, donde se evalúen en forma conjunta los efectos del hacinamiento y de la temperatura para determinar rangos de densidad de cultivo que permitan un mejor balance entre el rendimiento productivo y la condición sanitaria de los peces. Adicionalmente, el análisis de los efectos sobre los niveles de las proteínas SAA y SAP mostró que ninguna de ellas sería útil como biomarcador de una respuesta de estrés crónico inducido por calor. En el caso de la SAA, si bien sus niveles podrían aumentar en condiciones agudas de estrés térmico, no sería un parámetro ideal de dicha respuesta, porque sus niveles se restablecieron rápidamente y, además, al ser una potencial PFA, no permitiría distinguir entre una respuesta de estrés y una situación de infección. Esto refleja la necesidad de identificar nuevos marcadores de estrés térmico crónico en el esturión ruso, lo cual significaría un gran avance para el diseño de estrategias de monitoreo de la salud de estos peces durante su cría en granjas acuícolas.

Los resultados del experimento de estimulación con componentes bacterianos evidencian que la SAA podría comportarse como una PFA positiva, a pesar de que el modelo de estimulación con *A. hydrophila* inactivadas (10^9 UFC/kg) por vía intraperitoneal no resultó óptimo para el estudio de la respuesta de fase aguda en esturión ruso. Por tanto, surge la necesidad de realizar experimentos de infección y de evaluar los niveles de SAA de forma individual para verificar el comportamiento de esta proteína durante la fase aguda de la infección.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo contribuyen a profundizar en el conocimiento de la respuesta inmune innata del esturión ruso, un pez condrósteo cuyo sistema inmune es prácticamente desconocido.



6) PERSPECTIVAS



Los resultados de esta tesina indican que la temperatura constituye un factor ambiental crítico para la cría de esturiones en los establecimientos acuícolas de nuestro país. Asimismo la capacidad de los esturiones para tolerar temperaturas altas dependería de la densidad de cultivo. Por esa razón sería importante analizar el efecto de la densidad de cultivo sobre la respuesta de estrés inducido por calor, realizando experimentos con esturiones mantenidos a diferentes densidades para evaluar a qué densidad los peces toleran temperaturas altas con la menor repercusión posible sobre su sistema inmune. Como se comentó en la sección 4.1, disminuir la densidad de cultivo puede repercutir en la producción de las empresas, por lo que es necesario determinar la densidad de cultivo que brinde mejores resultados costo/beneficio.

Por otro lado, para profundizar sobre la respuesta de fase aguda durante la exposición de los esturiones a los patógenos sería interesante realizar ensayos de infección con *A. hydrophila* ya que reproducirían de mejor manera la situación natural en las granjas. Además, utilizando el modelo de infección resultaría importante evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta inmune innata desencadenada. Dado que el modelo de infección aún no está puesto a punto, resulta imprescindible realizar experimentos para evaluar la dosis óptima de bacterias a utilizar. En este sentido, nuestro grupo se encuentra trabajando en la optimización de dicho modelo; de hecho, en experimentos pilotos se observó que una dosis de 1×10^7 UFC de *A. hydrophila*/kg induce un aumento significativo en los niveles de SAA en suero a las 72 horas post-infección en esturiones mantenidos a 21°C. También sería relevante analizar la repercusión del estrés inducido por calor sobre la respuesta de SAA en este modelo de infección, de forma de poder verificar si las alteraciones en los niveles séricos de esta proteína permitirían diferenciar entre una respuesta de estrés y una situación de infección.

Finalmente este trabajo mostró la necesidad de identificar nuevos marcadores de estrés crónico. Para esto, nuestro grupo de investigación está abocado a la búsqueda de nuevos marcadores de inflamación y estrés utilizando técnicas modernas de transcriptómica y proteómica. Ya se ha avanzado en este camino, obteniendo los primeros datos para el ensamblado *de novo* del transcriptoma hepático del esturión ruso mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (Valeria Silva, proyecto Fondo María Viñas en ejecución). La identificación de estos marcadores es fundamental para el desarrollo de inmunoensayos que permitan monitorear el estado sanitario de los esturiones en los establecimientos de piscicultura.



7) BIBLIOGRAFÍA



1. Jarić I, Gessner J. Analysis of publications on sturgeon research between 1996 and 2010. *Scientometrics*. 2012;90(2):715-735. doi:10.1007/s11192-011-0583-7
2. Birstein VJ, DeSalle R. Molecular Phylogeny of Acipenserinae. *Mol Phylogenet Evol*. 1998;9(1):141-155. doi:10.1006/mpev.1997.0443
3. Betancur-R R, Wiley EO, Arratia G, et al. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol Biol*. 2017;17(1):162. doi:10.1186/s12862-017-0958-3
4. Billard R, Lecointre G. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Rev Fish Biol Fish*. 2000;10(4):355-392. doi:10.1023/A:1012231526151
5. Bemis WE, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Environ Biol Fishes*. 1997;48(1/2/3/4):167-183. doi:10.1023/A:1007312524792
6. Gesner, J, Freyhof, J & Kottelat M. *Acipenser gueldenstaedtii*, Russian Sturgeon. *IUCN Red List Threat Species*. 2010. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-%0A1.RLTS.T232A13042340.en>.
7. 16ava Reunión del CITES (Convención para el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de fauna y flora salvaje). Acipenseriformes. *Implementación la resolución 89*. 2009. <https://www.cites.org/sites/default/files/eng/com/ac/16/16-07-2.pdf>.
8. Bronzi P, Rosenthal H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview. *J Appl Ichthyol*. 2014;30(6):1536-1546. doi:10.1111/jai.12628
9. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*.; 2017. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
10. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci*. 2005;6B(11):1045-1056. doi:10.1631/jzus.2005.B1045
11. Lieschke GJ, Trede NS. Fish immunology. *Curr Biol*. 2009;19(16):678-682. doi:10.1016/j.cub.2009.06.068
12. Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol Lett*. 2012;148(1):23-33. doi:10.1016/j.imlet.2012.08.003
13. Secombes CJ, Wang T. The innate and adaptive immune system of fish. *Woodhead Publishing Limited*; 2012. doi:10.1533/9780857095732.1.3
14. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*. 2006;20(2):137-151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
15. Zarkadis IK, Mastellos D, Lambris JD. Phylogenetic aspects of the complement system. *Dev Comp Immunol*. 2001;25(8-9):745-762. doi:10.1016/S0145-305X(01)00034-9
16. Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunol*. 2001;11(2):187-197. doi:10.1006/fsim.2000.0304
17. Fjalestad KT, Moen T, Gomez-Raya L. Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. *Aquac Res*. 2003;34(5):397-406. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00823.x

18. Zapata AG, Varas A, Torroba M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol Today*. 1992;13(4):142-147. doi:10.1016/0167-5699(92)90112-K
19. Nikoskelainen S, Bylund G, Lilius E-M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev Comp Immunol*. 2004. doi:10.1016/j.dci.2003.10.003
20. Siwicki AK, Studnicka M, Morand M, Pozet F, Terech-Majewska E. Comparative immunotoxicology - A new direction. *Acta Vet Brno*. 1998. doi:10.2754/avb199867040295
21. Kolev M, Friec G Le, Kemper C. Complement-tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):811-820. doi:10.1038/nri3761
22. Levine L, Osler AG, Mayer MM. Studies on the role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in complement fixation and immune hemolysis. III. The respective roles of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in immune hemolysis. *J Immunol*. 1953;71(5):374-379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13118175>.
23. Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo TK, Somamoto T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(12):1296-1308. doi:10.1016/j.dci.2011.03.003
24. Thurman JM, Holers VM. The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *J Immunol*. 2006;176(3):1305-1310. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1305
25. Encinas P, Rodriguez-Milla MA, Novoa B, Estepa A, Figueras A, Coll J. Zebrafish fin immune responses during high mortality infections with viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus. A proteomic and transcriptomic approach. *BMC Genomics*. 2010. doi:10.1186/1471-2164-11-518
26. Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, Børgwald 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. doi:10.1007/s00251-006-0096-3
27. Boshra H, Li J, Sunyer JO. Recent advances on the complement system of teleost fish. En: *Fish and Shellfish Immunology*. Vol 20. ; 2006:239-262. doi:10.1016/j.fsi.2005.04.004
28. Sunyer JO, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995;45(3-4):333-345. doi:10.1016/0165-2427(94)05430-Z
29. Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*. 2001;25(8-9):827-839. doi:10.1016/S0145-305X(01)00038-6
30. Zarkadis IK, Sarrias MR, Sfyroera G, Sunyer JO, Lambris JD. Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: A plausible explanation for their functional diversity. *Dev Comp Immunol*. 2001;25(1):11-24. doi:10.1016/S0145-305X(00)00039-2
31. Bury N. Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. *Freshw Biol*. 2009;54(9):2015-2015. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02238.x
32. Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect*. 1998;106(7):375-384. doi:10.1289/ehp.98106375
33. Pandey S, Ahmad I, Parvez S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2001;41(3):345-352. doi:10.1007/s002440010258

34. Sahoo PK, Das S, Mahapatra K Das, et al. Characterization of the ceruloplasmin gene and its potential role as an indirect marker for selection to *Aeromonas hydrophila* resistance in rohu, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol*. 2013;34(5):1325-1334. doi:10.1016/j.fsi.2013.02.020
35. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22(1):439-458. doi:10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457
36. Conforti A, Franco L, Milanino R, Velo GP. Copper and ceruloplasmin (Cp) concentrations during the acute inflammatory process in the rat. *Agents Actions*. 1982;12(3):303-307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7136956>.
37. Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. Ceruloplasmin: an Acute Phase Reactant That Scavenges Oxygen-Derived Free Radicals. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389(1):368-379. doi:10.1111/j.1749-6632.1982.tb22150.x
38. Das S, Sahoo PK. Ceruloplasmin, a moonlighting protein in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2018;82:460-468. doi:10.1016/j.fsi.2018.08.043
39. Koller LD, Mulhern SA, Frankel NC, Steven MG, Williams JR. Immune dysfunction in rats fed a diet deficient in copper. *Am J Clin Nutr*. 1987;45(5):997-1006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472455>.
40. Roberge C, Páez DJ, Rossignol O, Guderley H, Dodson J, Bernatchez L. Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon. *Mol Immunol*. 2007;44(6):1374-1383. doi:10.1016/j.molimm.2006.05.005
41. Sahoo PK, Mahapatra K Das, Saha JN, et al. Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008;25(1-2):163-169. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.003
42. Giclas PC, Manthei U, Strunk RC. The acute phase response of C3, C5, ceruloplasmin, and C-reactive protein induced by turpentine pleurisy in the rabbit. *Am J Pathol*. 1985;120(1):146-156. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
43. Dautremepuits C, Betoulle S, Paris-Palacios S, Vernet G. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquat Toxicol*. 2004;68(4):325-338. doi:10.1016/j.aquatox.2004.04.003
44. Seniuk OF, Skorobogat'ko O V, Tarasenko PD, et al. [Study of physiological functions of human ceruloplasmin. The effect of ceruloplasmin on immunocytes in a normal state and in pathology]. *Biokhimiia*. 1994;59(10):1503-1510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819392>.
45. Gitlin JD. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J Biol Chem*. 1988;263(13):6281-6287.
46. Bull RC, Sciences A. Trace Minerals and Immunology. 1989:1-5.
47. Scheinberg, IH, Morell, AG. Ceruloplasmin. En: GL Eichorn, ed. *Organic Biochemistry*. Vol 1. New York: Elsevier; 1973:306-319.
48. Lee KH, Yun SJ, Nam KN, Gho YS, Lee EH. Activation of microglial cells by ceruloplasmin. *Brain Res*. 2007;1171(1):1-8. doi:10.1016/j.brainres.2007.07.053
49. Alexander JB, Ingram GA. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis*. 1992;2(C):249-279. doi:10.1016/0959-8030(92)90066-7

50. Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem.* 1984;63(2):165-189. doi:10.1007/BF00285225
51. Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res.* 2008;39(3):223-239. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x
52. Biggar WD, Sturgess JM. Role of lysozyme in the microbicidal activity of rat alveolar macrophages. *Infect Immun.* 1977;16(3):974-982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/561033>.
53. Thacore H, Willett HP. The formation of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis* in tissue culture cells. *Am Rev Respir Dis.* 1966;93(5):786-796. doi:10.1164/arrd.1966.93.5.786
54. Klockars M, Roberts P. Stimulation of phagocytosis by human lysozyme. *Acta Haematol.* 1976;55(5):289-295. doi:10.1159/000208029
55. Dautigny A, Prager EM, Pham-Dinh D, et al. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *J Mol Evol.* 1991;32(2):187-198. doi:10.1007/BF02515392
56. Sun BJ, Wang GL, Xie HX, Gao Q, Nie P. Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli*. *Aquaculture.* 2006;252(2-4):106-113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.046
57. Bayne CJ, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev Comp Immunol.* 2001;25(8-9):725-743. doi:10.1016/S0145-305X(01)00033-7
58. Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Organ.* 1989;6:1-5. doi:10.3354/dao006001
59. Demers NE, Bayne CJ. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev Comp Immunol.* 1997;21(4):363-373. doi:10.1016/S0145-305X(97)00009-8
60. Plouffe DA, Hanington PC, Walsh JG, Wilson EC, Belosevic M. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation.* 2005;12(4):266-277. doi:10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x
61. Bowden TJ, Butler R, Bricknell IR. Seasonal variation of serum lysozyme levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2004;17(2):129-135. doi:10.1016/j.fsi.2003.12.001
62. Fletcher TC, White A. Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Experientia.* 1973;29(10):1283-1285. doi:10.1007/BF01935119
63. Langston AL, Hoare R, Stefansson M, Fitzgerald R, Wergeland H, Mulcahy M. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2002;12(1):61-76. doi:10.1006/fsim.2001.0354
64. Watts M, Munday BL, Burke CM. Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau): Implications for aquaculture. *J Fish Dis.* 2002;25(4):191-200. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00342.x
65. Robertsen B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 1999;9(4):269-290. doi:10.1006/fsim.1998.0186

66. Schrödl W, Büchler R, Wendler S, et al. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics - Clin Appl*. 2016;10(11):1077-1092. doi:10.1002/prca.201600028
67. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 2010. doi:10.1016/j.tvjl.2010.04.009
68. Raida MK, Buchmann K. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(1):35-45. doi:10.1016/j.dci.2008.07.001
69. Winkelhake JL, Vodcnik MJ, Taylor JL. Induction in rainbow trout of an acute phase (C-reactive) protein by chemicals of environmental concern. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp*. 1983;74(1):55-58. doi:10.1016/0742-8413(83)90148-2
70. Lund V, Olafsen JA. Changes in serum concentration of a serum amyloid P-like pentraxin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during infection and inflammation. *Dev Comp Immunol*. 1999;23(1):61-70. doi:10.1016/S0145-305X(98)00038-X
71. Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*. 2009;59(6):517-526. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034426>.
72. Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18562-18567. doi:10.1074/jbc.M500490200
73. Jørgensen JB, Lunde H, Jensen L, Whitehead AS, Robertsen B. Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 β , IL-6 and TNF α or bacterial lipopolysaccharide. *Dev Comp Immunol*. 2000;24(6-7):553-563. doi:10.1016/S0145-305X(00)00022-7
74. Jensen LE, Hiney MP, Shields DC, Uhlar CM, Lindsay AJ, Whitehead AS. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *J Immunol*. 1997;158(1):384-392. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8977214&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/8C0EE8C5-BC25-4B5E-9209-DA5360951D47>.
75. Gonzalez SF, Buchmann K, Nielsen ME. Ichthyophthirius multifiliis infection induces massive up-regulation of serum amyloid A in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115(1-2):172-178. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.007
76. Lund V, Olafsen JA. A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. *Dev Comp Immunol*. 1998;22(2):185-194. doi:10.1016/S0145-305X(97)00051-7
77. Lee PT, Bird S, Zou J, Martin SAM. Phylogeny and expression analysis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-P (SAP) like genes reveal two distinct groups in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;65:42-51. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.037
78. Selye H. The present state of stress conception. *Munch Med Wochenschr*. 1953;95(15):426-433. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13072402.
79. Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(12):1366-1375. doi:10.1016/j.dci.2011.07.002
80. Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A, Martelli P. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;130(3-4):141-162. doi:10.1016/j.vetimm.2009.01.013

81. Ottaviani E, Franceschi C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog Neurobiol.* 1996;48(4-5):421-440. doi:10.1016/0301-0082(95)00049-6
82. Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997;77(3):591-625. doi:10.1152/physrev.1997.77.3.591
83. Pankhurst NW. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2011;170(2):265-275. doi:10.1016/j.ygcen.2010.07.017
84. Dhabhar FS. Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2008;4(1):2-11. doi:10.1186/1710-1492-4-1-2
85. Small BC, Bilodeau AL. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. En: *General and Comparative Endocrinology.* Vol 142. ; 2005:256-262. doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.004
86. Tort L, Padrós F, Rotllant J, Crespo S. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* 1998;8(1):37-47. doi:10.1006/fsim.1997.0120
87. Mauri I, Romero A, Acerete L, et al. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish Shellfish Immunol.* 2011. doi:10.1016/j.fsi.2010.10.006
88. Yin Z, Lam TJ, Sin YM. The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L). *Fish Shellfish Immunol.* 1995;5(7):519-529. doi:10.1016/S1050-4648(95)80052-2
89. Castellano M, Silva-Álvarez V, Fernández-López E, et al. Russian sturgeon cultured in a subtropical climate shows weaken innate defences and a chronic stress response. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;68:443-451. doi:10.1016/j.fsi.2017.07.048
90. Perretta A, Antúnez K, Zunino P. Phenotypic, molecular and pathological characterization of motile aeromonads isolated from diseased fishes cultured in Uruguay. *J Fish Dis.* 2018;(June):1-11. doi:10.1111/jfd.12864
91. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol.* 1979;122(1):75-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/762425>. Accedido marzo 26, 2018.
92. Pelgrom SMGJ, Lock RAC, Balm PHM, Bonga SEW. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat Toxicol.* 1995;32(4):303-320. doi:10.1016/0166-445X(95)00004-N
93. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta.* 1952;8:302-309. doi:10.1016/0006-3002(52)90045-0
94. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
95. Gao X, Lin P, Li M, Duan Z, Liu H. Effects of water temperature and discharge on natural reproduction time of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, in the Yangtze River, China and impacts of the impoundment of the Three Gorges Reservoir. *Zoolog Sci.* 2014;31(5):274-278. doi:10.2108/zs130123

96. Lankford SE, Adams TE, Cech JJ. Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003;135(2):291-302. doi:10.1016/S1095-6433(03)00075-8
97. Kieffer JD, Baker DW, Wood AM, Papadopoulos CN. The effects of temperature on the physiological response to low oxygen in Atlantic sturgeon. *Fish Physiol Biochem*. 2011;37(4):809-819. doi:10.1007/s10695-011-9479-y
98. Gradil AM, Wright GM, Speare DJ, Wadowska DW, Purcell S, Fast MD. The effects of temperature and body size on immunological development and responsiveness in juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish Shellfish Immunol*. 2014;40(2):545-555. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.036
99. Coleman DJ, Camus AC, Martínez-López B, Yun S, Stevens B, Soto E. Effects of temperature on *Veronaea botryosa* infections in white sturgeon *Acipenser transmontanus* and fungal induced cytotoxicity of fish cell lines. *Vet Res*. 2018;49(1):11. doi:10.1186/s13567-018-0507-0
100. Mayfield RB, Cech JJ. Temperature Effects on Green Sturgeon Bioenergetics. *Trans Am Fish Soc*. 2004;133(4):961-970. doi:10.1577/T02-144.1
101. Allen PJ, Nicholl M, Cole S, Vlazny A, Cech JJ. Growth of Larval to Juvenile Green Sturgeon in Elevated Temperature Regimes. *Trans Am Fish Soc*. 2006;135(1):89-96. doi:10.1577/T05-020.1
102. 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 Physiol Biochem*. 2014;40(4):1105-1113. doi:10.1007/s10695-014-9909-8
103. Celikkale MS, Memis D, Ercan E, Cagiltay F. Growth performance of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzenburg, 1833) at two stocking densities in net cages. *J Appl Ichthyol*. 2005;21(1):14-18. doi:10.1111/j.1439-0426.2004.00567.x
104. Falahatkar B, Poursaeid S. Stress responses of great sturgeon *Huso huso* subjected to husbandry stressors. *Aquac Int*. 2013;21(4):947-959. doi:10.1007/s10499-012-9566-9
105. Webb MAH, Allert JA, Kappenman KM, et al. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. *Gen Comp Endocrinol*. 2007;154(1-3):98-104. doi:10.1016/j.ygcen.2007.06.002
106. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*. 2010;35(1):127-160. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413917>. Accedido noviembre 7, 2018.
107. 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(1):29-42. doi:10.1080/10888705.2014.856243
108. Peatman E, Baoprasertkul P, Terhune J, et al. Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(11):1183-1196. doi:10.1016/j.dci.2007.03.003