



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS



# Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) como herramienta para evaluar los niveles de IgM sérica en esturiones en cultivo

TESIS DE GRADO PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS DE  
LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA POR

Gonzalo Paredes

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUÍMICA.

TUTORES

Valeria Silva, Ana María Ferreira..... Universidad de la República

EVALUADOR

Martín Breijo..... Universidad de la República

Montevideo  
miércoles 29 noviembre, 2023

*Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*) como herramienta para evaluar los niveles de IgM sérica en esturiones en cultivo,*  
Gonzalo Paredes.

Esta tesis fue preparada en L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X.  
Contiene un total de 98 páginas.  
Compilada el miércoles 29 noviembre, 2023.  
<https://higiene.edu.uy/inmunologia/>

El placer más noble es el júbilo de comprender.

LEONARDO DA VINCI

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Agradecimientos

Mi primer y gran agradecimiento es para mis cotutoras la Dra. Valeria Silva, y la Dra Ana Ferreira por su maravillosa supervisión, orientación y aliento. Agradezco sinceramente la retroalimentación constructiva, el amable apoyo y el asesoramiento durante mi trabajo de fin de grado. Sus niveles de paciencia, conocimiento e ingenio es algo a lo que siempre seguiré aspirando.

También me gustaría agradecer a Marcio y Sofía por aceptar ser parte de su equipo, junto al resto del grupo de la cátedra de Inmunología quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme con cualquier consulta que tuviera.

Además, extendiendo mi agradecimiento al personal del polo tecnológico de Pando, quienes proporcionaron de información invaluable para la tesina. Así como a la Dra. Paula Aribildi, por su asistencia en alguno de estos ensayos. A todos mis amigos, a Andrés por su tiempo, consejos y apoyo moral.

Por último, pero no menos importante, mi cálido y orgulloso agradecimiento a mi familia por su tremendo apoyo, quienes me han dado el mejor ejemplo in vivo de que con constancia y dedicación toda meta es alcanzable. Sin esa fuerza, esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todos.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Resumen

En el presente trabajo nos propusimos obtener anticuerpos específicos anti-IgM de esturión ruso y utilizarlos como herramienta para evaluar los niveles de IgM sérica en esturión ruso cultivados en granjas acuícolas de nuestro país. Las inmunoglobulinas IgM de esturión se purificaron a partir de suero siguiendo cuatro metodologías distintas, siendo la combinación de precipitación con sulfato de amonio 33 % seguida por diálisis extensiva contra buffer Tris a baja concentración iónica del sobrenadante la que brindó mejores resultados. Con el objetivo de evaluar la purificación, se efectuó un análisis por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras de las fracciones obtenidas en cada etapa. En la fracción final de purificación se obtuvo: a) en condiciones no reductoras una banda principal de 180 kDa cuyo tamaño e identificación corresponden a la inmunoglobulina IgM de esturión b) en condiciones reductoras se obtuvieron bandas principales de 70 kDa y 25 kDa cuyos tamaños coinciden con los tamaños para la cadena pesada y liviana de inmunoglobulina IgM de esturión, respectivamente. Las bandas obtenidas a partir de las fracciones de purificación se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF).

La IgM purificada, se utilizó en carácter de antígeno en ratones. La inmunización se siguió en intervalos aproximados de 20 días mediante la extracción de suero y medición de título de anticuerpos mediante Elisa de anticuerpos. Los anticuerpos anti-IgM obtenidos a partir del suero de ratones se utilizaron para comparar por Western Blot la concentración de IgM sérica en muestras de sueros de esturión cultivados en invierno y verano (condiciones de ausencia o presencia de estrés crónico por temperatura). Si bien no se alcanzó significancia estadística, se observó una tendencia al aumento en los niveles de IgM en los sueros de peces expuestos a altas temperaturas (grupos de verano) respecto a los expuestos a baja temperatura (grupos de invierno), aún a pesar de que los niveles de proteínas séricas disminuyeron significativamente durante el verano. De hecho, al normalizar los niveles de IgM respecto a los niveles de proteínas totales, sí se observó un aumento significativo de la IgM sérica en los esturiones expuestos a altas temperaturas. Los resultados obtenidos en este trabajo profundizan a la comprensión del sistema inmune adaptativo del esturión ruso, y aportan una herramienta molecular valiosa para investigar la respuesta inmunitaria en esta especie de peces.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.



# Tabla de contenidos

<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>V</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes . . . . .	1
1.2. Generalidades del esturión . . . . .	3
1.3. Acuicultura del esturión . . . . .	4
1.4. Sistema inmune . . . . .	6
1.4.1. Generalidades . . . . .	6
1.4.2. Evolución . . . . .	8
1.4.3. Sistema inmune en los peces . . . . .	10
1.5. Inmunoglobulinas . . . . .	13
1.5.1. Características generales . . . . .	13
1.5.2. Inmunoglobulinas en peces . . . . .	14
1.5.3. Inmunoglobulinas IgM . . . . .	16
1.5.4. Inmunoglobulinas en el esturión . . . . .	18
1.5.5. Efecto de la temperatura en la producción de inmunoglobulinas en peces . . . . .	19
1.6. Objetivos . . . . .	21
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
2.1. Reactivos generales . . . . .	24
2.2. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso . . . . .	24
2.2.1. Metodología 1 - Precipitación de la fracción euglobulina . . . . .	26
2.2.2. Metodología 2 - Precipitación con sulfato de amonio 50 % . . . . .	27
2.2.3. Metodología 3 - Precipitación con sulfato de amonio 50 % seguido de aglutinación con polietilenglicol . . . . .	27
2.2.4. Metodología 4 - Precipitación con sulfato de amonio 33 % seguida de diálisis contra buffer Tris-HCl 5mM . . . . .	27
2.2.5. Cuantificación de niveles de proteína total en las fracciones obtenidas en cada método de purificación . . . . .	28
2.3. Evaluación de la purificación . . . . .	28
2.3.1. Evaluación de la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE . . . . .	29

## Tabla de contenidos

2.3.2. Condiciones de trabajo de la evaluación de la purificación por electroforesis SDS-PAGE . . . . .	30
2.4. Identificación de IgM de esturión ruso mediante espectrometría de masas. . . . .	30
2.5. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratón . . .	31
2.5.1. Inmunización de ratones con IgM de esturión ruso . . . . .	31
2.5.2. Seguimiento de la inmunización mediante ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos . . . . .	33
2.6. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo. . . . .	35
<b>3. Resultados</b>	<b>39</b>
3.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso . . . . .	39
3.1.1. Resultados obtenidos para la Metodología 1. . . . .	39
3.1.2. Resultados obtenidos para la Metodología 2 . . . . .	40
3.1.3. Resultados obtenidos para la Metodología 3 . . . . .	40
3.1.4. Resultados obtenidos para la Metodología 4. . . . .	41
3.1.5. Evaluación de la purificación mediante espectrometría de masas MALDI TOF TOF . . . . .	43
3.2. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratones . .	45
3.3. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo . . . . .	45
3.3.1. Puesta a punto de la metodología para la determinación semicuantitativa de IgM de esturión en suero por Western Blot	46
3.4. Efecto de la temperatura en la expresión de niveles séricos de IgM de esturión . . . . .	48
<b>4. Discusión de resultados</b>	<b>51</b>
4.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión . . . . .	51
4.2. Efecto de la temperatura en los niveles IgM séricos de esturión . .	52
<b>5. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>59</b>
<b>Referencias</b>	<b>62</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>80</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>82</b>

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes

El esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedti*) se ha cultivado en Uruguay con éxito durante los últimos quince años, siendo la granja de piscicultura Black River Uruguay (Esturiones del Río Negro S.A.) la empresa pionera en la región. Actualmente, Uruguay se destaca como el mayor productor de caviar en Sudamérica. [1] Durante 2018, Uruguay exportó más de 6,5 toneladas de caviar, el equivalente a unos 2,5 millones de dólares, ubicándose entre los 10 productores de caviar más importantes del mundo. [2]. Sin embargo, la acuicultura del esturión en nuestro país no ha estado ajena a las dificultades que afectan al sector acuícola a nivel mundial. Por un lado, los cambios emergentes debidos al cambio climático, por ejemplo, aumento de la temperatura del agua, aumento del nivel del mar, aparición de floraciones de algas nocivas, cambios en los patrones de lluvia, así como el aumento de la contaminación y frecuencia de algunos eventos extremos en los recursos hídricos, lo que puede afectar la salud de los peces y su capacidad de crecimiento. [3,4] Por otro lado, factores humanos como la falta de recursos, regulaciones y políticas claras para la acuicultura pueden dificultar la gestión sostenible de la industria y la rentabilidad de los productores. [5] En Uruguay, la situación en las granjas de esturión, no escapa a dicha problemática, registrándose temperaturas máximas del agua entre 28 y 30 °C durante los últimos veranos. [6] Esto se ha asociado con un aumento de infecciones bacterianas que aumentan la mortalidad de los peces y amenazan su acuicultura. [7]

Para abordar esta problemática el grupo de investigación se enfocó en el estudio del efecto del calor sobre el sistema inmune del esturión ruso. En 2015 Mauricio Castellano presentó en Facultad de Ciencias, UdelaR, la tesina de grado ‘Estudio de dos componentes de las defensas innatas del esturión cultivado en un establecimiento de piscicultura en Uruguay’. [8] El trabajo propuso un abordaje a la problemática del aumento de la mortalidad de los esturiones durante el verano conociendo los efectos de la temperatura sobre algunos componentes del sistema inmune innato del esturión. Mediante el análisis de resultados de ensayos bioquími-

## Capítulo 1. Introducción

cos se evidenciaron diferencias en la funcionalidad de la vía alternativa del sistema complemento (ACP) y las enzimas ceruloplasmina (Cp) y lisozima entre esturiones criados en condiciones de temperatura diferentes. En este trabajo se encontró que durante el verano, las defensas del esturión se vieron afectadas de diversas maneras, como una disminución en el suero de la ACP y Cp, mientras que la actividad lisozima aumentó. También se observó una disminución en los niveles de proteína total y cortisol en el suero, lo que sugiere una respuesta de estrés crónico inducido en el esturión. [7] En 2018, Marcio Aversa profundizó en la caracterización de la respuesta del esturión frente al estrés térmico y a componentes bacterianos. [9] Con este objetivo se analizaron las variaciones de las proteínas amiloides A y P del suero (SAA y SAP) y se encontró que la SAP estaba presente en el suero de forma constitutiva y se mantuvo constante frente al desafío bacteriano o al estrés térmico crónico, mientras que la SAA aumentó significativamente frente al desafío bacteriano pero el aumento no se sostenía cuando la situación de estrés térmico persistía. [10] En suma, estos estudios demostraron que temperaturas mayores a 24°C producen varias alteraciones en componentes solubles del sistema inmune innato, pero hasta ahora no conocemos como se podrían alterar los componentes solubles del sistema inmune adaptativo, en gran parte debido a la falta de reactivos comerciales para este análisis.

Más adelante, el grupo se enfocó en el estudio de la inflamación, local y sistémica desencadenada en el esturión ruso por la infección intraperitoneal con la bacteria *Aeromonas hydrophila*, en presencia o ausencia de estrés térmico crónico. Este estudio busca comprender de qué manera el estrés térmico crónico afecta la respuesta inmune de los esturiones, haciéndolos más vulnerables a las infecciones. Como parte de este trabajo se identificaron y caracterizaron funcionalmente las poblaciones celulares peritoneales residentes y reclutadas por dicha infección (Tesis de Doctorado de Marcio Aversa, en curso). Desafortunadamente, en este modelo de peces existe escasa literatura sobre los efectos del estrés térmico crónico en la respuesta inmune. En particular, poco se ha profundizado sobre las características y variaciones de componentes moleculares adaptativos clave en la inmunidad (como es la IgM) frente a la exposición crónica a temperaturas y bacterias patógenas. En este sentido, contar con reactivos que nos permitan evaluar la producción de IgM nos sería muy útil para profundizar este análisis. Por otro lado, existe una gran dificultad para identificar y caracterizar distintas poblaciones celulares, ya que no se conocen marcadores fenotípicos para las células del sistema inmune, ni existen reactivos comerciales para esturión que faciliten evaluar posibles marcadores. Por tanto, hasta el momento los estudios realizados por nuestro grupo han clasificado a las células peritoneales por citometría de flujo de acuerdo a su tamaño y complejidad celular, así como a algunas propiedades funcionales, como ser la capacidad fagocítica y la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos propusimos obtener anticuerpos anti-IgM de esturión, por un lado, para emplearlos en el análisis de las variaciones de IgM en peces cultivados a distintas temperaturas, y por otro, porque a futuro podrían permitir la identificación de los linfocitos B IgM+ peritoneales.

A continuación, se introducen algunas generalidades del esturión y se profun-

## 1.2. Generalidades del esturión

diza en conceptos del sistema inmune, haciendo foco sobre lo que se conoce sobre las inmunoglobulinas en estos peces.

## 1.2. Generalidades del esturión

El término esturión engloba a un grupo de 27 especies de peces pertenecientes a la familia *Acipenseridae* del orden *Acipenseriformes* y de la subclase Chondrostei, cuya evidencia fósil data del período Jurásico, [11] por lo que se estima han evolucionado desde hace más de 200 millones de años. [12] Las características arcaicas de este antiguo linaje de peces lo colocan en una posición filogenética clave en la base de las 30,000 especies de peces teleósteos modernos. [13] Los *Acipenseriformes* probablemente evolucionaron a partir de un antepasado paleonisciforme a través de la reducción pedomórfica de la osificación del endoesqueleto. [14]

Desde el punto de vista morfológico las distintas especies de esturión son similares (Figura 1.1), los esturiones se caracterizan por tener un cuerpo pesado, alargado y subcilíndrico en sección con aletas radiadas. La cabeza termina en un hocico duro y extendido; un espiráculo (pequeña abertura por encima y detrás de los ojos) cuya boca inferior, protrusible, es precedida por 4 barbillas llamativas. Las 27 especies de esturión poseen 5 placas óseas distribuidas de la siguiente manera: una fila de placas ubicadas en la línea media de la espalda, dos filas hacia los laterales del dorso y 2 a lo largo del margen ventrolateral. La cola se caracteriza por ser asimétrica y heterocerca, es decir el lóbulo de la aleta superior es más largo respecto al lóbulo inferior. [15]

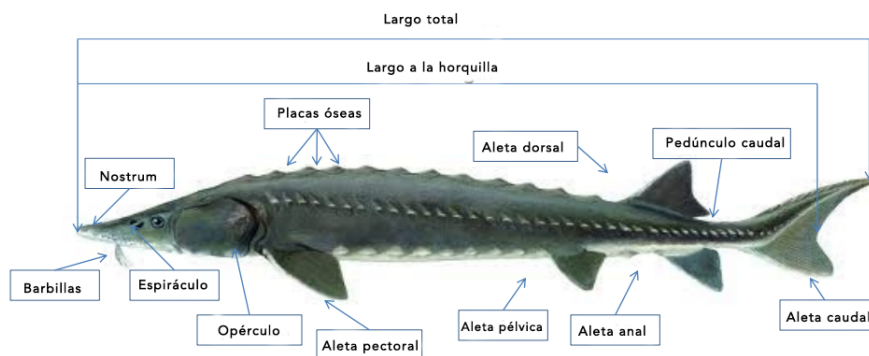


Figura 1.1: Morfología del esturión. Adaptado de Morphological Phylogeny of Sturgeons. [16]

La madurez sexual tardía y la longevidad de muchas especies de esturión conduce a un ciclo de producción mucho más largo en comparación con la mayoría de los otros peces cultivados. Debido a que no se han establecido marcadores moleculares para la diferenciación sexual, sólo es posible estimar que en la mayor parte de las especies de esturión la diferenciación sexual no ocurre hasta los dos años. Debido a que los esturiones no tienen dimorfismo sexual externo bien expresado,

## Capítulo 1. Introducción

es necesario determinar el sexo mediante metodologías como el ultrasonido. En la acuicultura, los individuos de cada género son seleccionados, siendo la mayoría los machos sacrificados para obtener carne antes de los cuatro años, mientras la mayoría de las hembras se mantienen para la cosecha de caviar. [17] [18]

El sistema inmune adaptativo de los esturiones ha sido poco estudiado hasta la fecha. Sin embargo, el conocimiento actual sugiere que comparte componentes básicos con los mamíferos. [19, 20] Aún se necesitan más estudios para dilucidar e identificar marcadores celulares, que permitan comprender los mecanismos y las vías de señalización del sistema inmune del esturión. En conjunto, un entendimiento más integral de las defensas del esturión podrían ayudar a garantizar una producción más robusta e incluso recomendaciones sobre posibles tratamientos y vacunas ante patógenos oportunistas.

### 1.3. Acuicultura del esturión

Durante siglos, los esturiones se han explotado por su carne y sus huevas, el caviar, un producto ampliamente conocido por su alto valor comercial. En las últimas décadas, la sobreexplotación, la contaminación del agua, la destrucción de sus hábitats naturales y el bloqueo de la migración del desove han llevado a que las poblaciones nativas de esturión disminuyeran a niveles críticos y múltiples especies se enfrentaran a su extinción. [21, 22]

Veintisiete especies de esturión están en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y el 63 % figura como en "Peligro Crítico", la categoría de amenaza más alta de la Lista. [23] En profundo contraste, por más de 20 años, su acuicultura se ha incrementado considerablemente y en conjunto con varios programas de restauración en todo el mundo dan esperanzas cautelosas que algunas poblaciones puedan recuperarse [24].

La acuicultura es la actividad de producción animal que más se ha expandido en las últimas décadas a nivel mundial, superando en ritmo de crecimiento anual al resto de las producciones animales y supliendo casi el 50 % de los productos acuáticos que se consumen actualmente. [25]

La producción acuícola es proyectada a seguir creciendo en todos los continentes. En América Latina se espera que se expanda hasta en un 33 %. La acuicultura del esturión no escapa a ello, notando un crecimiento exponencial a partir del cambio de milenio. [18]

La expansión del consumo ha sido impulsada no solo por aumentos en la producción, sino también por una combinación de muchos otros factores. Por ejemplo, desarrollos tecnológicos en el procesamiento, la cadena de frío, envío y distribución; el aumento de los ingresos en todo el mundo, que se correlaciona fuertemente con una mayor demanda de pescado y productos pesqueros, reducciones en pérdidas y desperdicios; y una mayor conciencia de los beneficios para la salud del pescado entre los consumidores. [26]

Respecto a la acuicultura del esturión se data que al menos un total de 35 países, participan en su producción de carne y caviar. Algunos tienen una larga tradición en la agricultura del esturión en varios niveles, mientras que otros se

### 1.3. Acuicultura del esturión

convirtieron gradualmente y recientemente se han involucrado en su producción. [27]

Si bien la mayor parte de las empresas que producen esturión se encuentran en China, Rusia y Francia, muchos países del mundo incluyendo a Uruguay están involucrados en esta producción. [28] Las especies de esturión más utilizadas en la acuicultura son el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) que es criado actualmente en 22 países alcanzando una producción total de alrededor de 8800 toneladas por año, seguido por el esturión ruso (*Acipenser gueldensteadii*) cultivado en unos 16 países, mientras que el esterlete (*Acipenser ruthenus*) se produce en 15, y el esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) se cultiva actualmente en 12 países. [27]

Uruguay es el principal productor de caviar de América del Sur. Como se observa en la Figura 1.2 produjo un estimado de 10 toneladas de caviar en 2019, y 94 toneladas de carne esturión. En 2020, Uruguay exportó siete toneladas de caviar. La mayor parte de las exportaciones de caviar de Uruguay se destinó a EE. UU. (31%), seguido de Rusia (23%) y la UE (18%). Hasta 2016, Uruguay experimentó un crecimiento en sus precios de exportación, alcanzando un pico de 455 EUR/kg. Desde entonces, los precios han tenido una tendencia a la baja hasta alcanzar los 284 EUR/kg en 2020. [29]

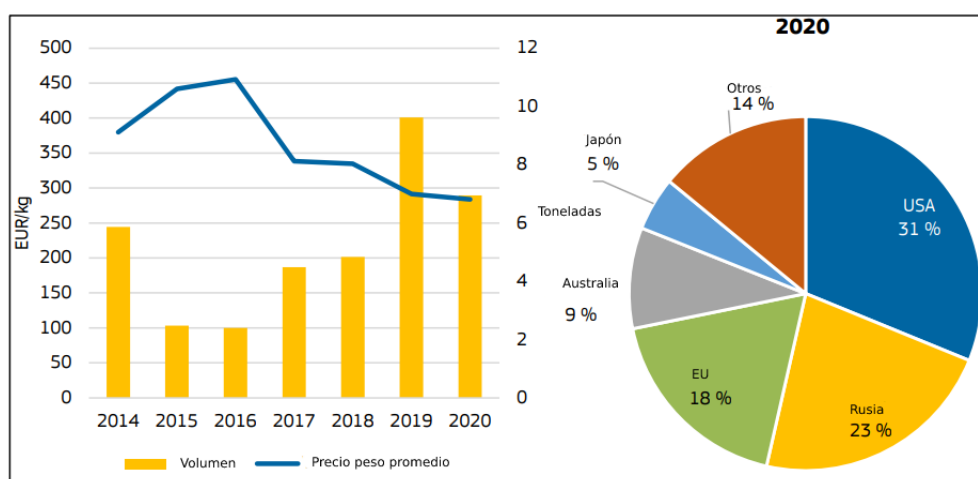


Figura 1.2: Exportación uruguaya de caviar. Volumen y precio medio ponderado, valores nominales. (lado izquierdo). Principales mercados de exportación en 2020 en porcentajes (lado derecho). Adaptado de The caviar market, production, trade and consumption in and outside the EU, EUMOFA. [29]

El aumento masivo de la acuicultura del esturión en las últimas décadas ha puesto mayor énfasis en el estudios de la especie, y en particular de su sistema inmunológico y la respuesta de defensa contra enfermedades asociadas a la cría intensiva. Las granjas uruguayas enfrentan como uno de los principales desafíos, el aumento en la mortalidad de peces durante el verano. Cómo se menciona en la sección de antecedentes, estudios previos de este grupo de trabajo han demostrado que este problema está relacionado con la inducción de una respuesta de estrés crónico que puede ser provocada por varios factores, incluida la temperatura alta

## Capítulo 1. Introducción

del agua, que afecta negativamente al sistema inmunitario innato del esturión. [7] En consecuencia, la producción del esturión se ve afectada por el aumento de mortalidad de los peces, debido a infecciones de patógenos oportunistas como *Aeromonas hydrophila*. [25] Esto se suma a la escasez de herramientas de refuerzo en la producción, cómo el monitoreo de la infección, y estrategias de selección reproductivas que permitan abordar . Desde un punto de vista práctico-académico, este trabajo pretende contribuir a la producción del esturión en Uruguay, buscando profundizar en el conocimiento del efecto de estrés térmico crónico sobre el sistema inmune del esturión.

### 1.4. Sistema inmune

#### 1.4.1. Generalidades

El sistema inmune comprende el conjunto de estructuras y procesos biológicos responsables de asegurar la inmunidad y el mantenimiento de la homeostasis dentro de un organismo. El término incluye a todas las moléculas, células y mecanismos involucrados en la defensa frente al daño tisular y los patógenos. [30] y, por lo tanto, juega un rol clave en mantener la integridad de los tejidos sanos. [31] Un sistema inmunológico eficaz es capaz de detectar una amplia variedad de agentes infecciosos (bacterias, virus, parásitos), y distinguirlos del tejido propio sano, así como de interpretar cambios en el ambiente que lo rodea para responder de manera adecuada, combatiendo a los patógenos, reparando el daño a los tejidos propios y empleando mecanismos reguladores que eviten respuestas exacerbadas. [32]

El sistema inmune tiene dos líneas de defensa fundamentales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La **inmunidad innata** es el primer mecanismo inmunológico para luchar contra un patógeno invasor, y como la palabra innata lo indica, involucra a aquellos componentes y mecanismos de reconocimiento, que son heredados y están listos para actuar rápidamente previo a un daño o infección en los tejidos. La entrada de los patógenos al medio interno está limitada por barreras físicas, como la piel y las mucosas. Estas barreras son activas y secretan componentes que ayudan a limitar la entrada de los patógenos. Además, el sistema inmune innato cuenta con componentes solubles, como el sistema del complemento, las enzimas antimicrobianas, las interleucinas, el interferón, y con células que residen en los tejidos (macrófagos, mastocitos y células dendríticas residentes) y que circulan por la sangre (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y células asesinas naturales (células NK por sus siglas en inglés)). [33] La activación del sistema inmune innato comienza cuando receptores solubles o celulares expresados de forma constitutiva reconocen patrones conservados en diferentes clases de patógenos o patrones moleculares asociados a daño tisular para desencadenar una respuesta inmune rápida que limite su invasión y contribuya a mantener la homeostasis. [34]

Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan una defensa inicial eficaz contra una gran cantidad de infecciones. Sin embargo, muchos patógenos han evo-



## 1.4. Sistema inmune

lucionado para resistir la inmunidad innata [35], para su eliminación se requiere de los mecanismos más potentes de la inmunidad adaptativa. Dicho esto, la inmunidad innata es crucial para combatir una infección debido a que no sólo es la encargada de actuar rápido y primero, sino que cumple una función fundamental como activadora de la inmunidad adaptativa. Además, algunos mecanismos efectores de la inmunidad adaptativa potencian los mecanismos efectores de la inmunidad innata, permitiendo combatir eficazmente a los patógenos.

La **inmunidad adaptativa** (también conocida como adquirida) son todos los mecanismos, células y moléculas involucrados en la respuesta tardía del sistema inmune. A diferencia del sistema inmune innato, el sistema inmune adaptativo es más lento para combatir una infección. Pudiendo demorar días, incluso semanas en desarrollar su respuesta. [36] Un punto clave que distingue los sistemas innato y adaptativo es la capacidad de reconocimiento de sus receptores. Mientras que los receptores de la inmunidad innata reconocen patrones moleculares conservados de los patógenos, como por ejemplo los receptores Toll-like (TLR), que detectan componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS), los receptores de la inmunidad adaptativa, reconocen una amplia variedad de antígenos, tanto de origen microbiano y no microbiano, y por tanto sus respuestas son especializadas y suelen ser más abarcativas. [37] [38]

En el sistema inmune adaptativo, los linfocitos B y T utilizan sus receptores de superficie celular (BCR y TCR) para reconocer a sus antígenos y al activarse, responden mediante amplificación clonal y diferenciación celular. [39]

El BCR y el TCR, son receptores específicos de antígeno formados por recombinación somática. [40]. El reordenamiento de genes V (D) y J en diferentes combinaciones genera una amplia diversidad de especificidades antígeno-receptor. Dicho reordenamiento es mediado por las proteínas RAG1 y RAG2, iniciado mediante la introducción de rupturas de ADN de doble cadena específicas. Los extremos rotos del ADN luego se unen mediante la maquinaria celular de reparación. [41].

En las respuestas adaptativas dependientes de anticuerpos (inmunoglobulinas, Ig), los linfocitos B se activan para secretar anticuerpos, que son formas solubles de su receptor de antígeno de superficie. Los anticuerpos circulan en el torrente sanguíneo y penetran en los demás fluidos corporales, donde se unen específicamente al antígeno que estimuló su producción. La unión del anticuerpo puede desencadenar distintos mecanismos que contribuyen a la defensa del huésped. Esto incluye: a) la neutralización del patógeno y toxinas, bloqueando su capacidad para unirse a los receptores celulares, b) la opsonización o marcado del patógeno para su destrucción por células fagocíticas, c) la activación de la cascada de complemento y la activación de células efectoras d) el marcado de células infectadas para ser destruidas. Dichas funciones de las inmunoglobulinas contribuyen en la protección contra diversos agentes de riesgo. [36], [42]

En las respuestas mediadas por células, las células T específicas de antígenos se activan y reaccionan contra un antígeno extraño presentado en la superficie de otra célula, ya que a diferencia de las células B, las células T solo pueden reconocer péptidos presentados por células presentadoras de antígenos a través del

## Capítulo 1. Introducción

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células T pueden actuar de varias maneras. Las células T colaboradoras pueden producir y liberar citocinas que potencian a otras células del sistema inmune. Las células T también pueden reconocer directamente células infectadas o cancerosas por la presencia de antígenos en su superficie celular. Una vez que se produce el reconocimiento, los linfocitos T citotóxicos son capaces de inducir la apoptosis de las células infectadas mediante la liberación de sustancias citotóxicas, como granzimas y perforinas. La perforina es capaz de crear poros en la membrana de la célula diana, lo que permite la entrada de granzima B, una serina proteasa que activa una cascada de señalización que conduce a apoptosis. Además, los linfocitos T citotóxicos también pueden inducir la apoptosis de las células infectadas o cancerosas a través de la expresión de ligandos del receptor de muerte, como el FasL, que se une al receptor Fas en la célula objetivo y activa una cascada de señalización que conduce a la apoptosis. Estos mecanismos son clave para reducir la oportunidad de replicación intracelular típica de los virus o para eliminar células malignas. [43]

Una propiedad crucial de la inmunidad adaptativa es la capacidad de generar memoria inmunológica. La memoria inmunológica permite almacenar información sobre un estímulo y permite que el huésped desarrolle una respuesta inmunitaria más competente tras la exposición repetida del mismo antígeno. [44]. Asimismo, su activación necesita de una menor cantidad de antígeno y se puede producir incluso luego de varios años desde la primera exposición. En suma, para detectar y eliminar patógenos, el huésped utiliza mecanismos tanto innatos como adaptativos. Es decir, existe una gran sinergia entre el sistema inmune adaptativo e innato. Con frecuencia la respuesta inmune adaptativa orquesta y potencia los mecanismos protectores de la inmunidad innata, haciéndolos capaces de combatir la infección de forma más eficaz. Ambos mecanismos incluyen la discriminación propia y no propia. [30] Los defectos en cualquiera de los sistemas pueden provocar enfermedades, como inflamación inapropiada, enfermedades autoinmunes, trastornos de inmunodeficiencia y reacciones de hipersensibilidad. [45] Una vez dada la respuesta inmunológica y eliminado el patógeno, la mayor parte las células inmunes mueren, pero un pequeño porcentaje de células dan lugar a células de memoria de larga vida que median una rápida y respuesta inmunitaria protectora frente a patógenos ya encontrados. La inmunización eficaz depende de la combinación entre la especificidad antigénica y memoria de la inmunidad adaptativa. [37,44]

### 1.4.2. Evolución

Se estima que desde que la vida comenzó hace unos 3.500 millones de años, las células vivas han desarrollado algún tipo de mecanismo de inmunidad proporcionando una defensa inicial eficaz contra una gran cantidad de infecciones. [46] La función de defensa se encuentra conservada desde las esponjas a los primates, donde la presencia de mecanismos de defensa eficaces ha ido de la mano del éxito evolutivo. [32]

La inmunidad innata fue la primera estrategia de defensa en aparecer en la historia evolutiva, su origen se estima en los primeros eucariotas. La inmunidad

## 1.4. Sistema inmune

innata funcionó perfectamente como estrategia de defensa durante millones de años y se la considera la inmunidad más universal (la mayor parte de los seres sobreviven exclusivamente gracias a los mecanismos innatos. [47] Los sistemas inmunitarios innatos aparecieron hace alrededor de mil millones de años en el proceso evolutivo, mucho antes de la materialización de la inmunidad adaptativa. [48] Debido a su primer lugar en la historia, se puede decir que la inmunidad innata ha experimentado un proceso de perfeccionamiento a lo largo de un período de tiempo más extenso en comparación con la inmunidad adaptativa. [49]

Se puede pensar a la inmunidad innata como la estrategia para discriminar lo propio de lo ajeno. Cualquier individuo que no pudiera hacer esta distinción estaría destinado a consumirse y extinguirse. De hecho, se estima que la ameba podría ser la forma más antigua del macrófago y tal vez dio origen, por un camino evolutivo desconocido, al macrófago moderno. [36]

Por otro lado, los microorganismos también necesitan sobrevivir evadiendo las defensas inmunitarias innatas de un individuo. Como resultado muchos microorganismos patógenos han evolucionado para resistir la inmunidad innata y su eliminación requiere de los mecanismos de la inmunidad adaptativa. [50]

La inmunidad adaptativa surgió hace unos 500 millones de años en peces mandibulados. Se considera que dos eventos macroevolutivos contribuyeron al origen del sistema inmune adaptativo: la aparición del transposón del gen activador de recombinación (RAG) y dos rondas de duplicación del genoma completo. Se estima que dichos eventos ocurrieron en un lapso de tiempo evolutivo de menos de 20 millones de años. (Figura 1.3) [50]. Dichos eventos permitieron los primeros reordenamientos de genes necesarios para generar una gran diversidad de moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). [51]

Los peces funcionan como un vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Su sistema inmune representa un punto de transición entre los mecanismos de defensa más primitivos y los más avanzados, como se observa en los mamíferos, situándolos en un punto intermedio en la evolución. Comparaciones entre el sistema inmune de peces con organismos anteriores y vertebrados superiores deberían eventualmente conducir a una mayor comprensión de los principios generales del diseño del sistema inmune. Por este motivo es que el estudio del sistema inmune de los peces resulta de particular interés desde el punto de vista evolutivo [52] Como ejemplo, nuevas revisiones han demostrado que peces no mandibulados poseen células similares a los linfocitos, la suma de evidencia acumulada por su función inmunológica, [46, 50] sugiere que la presencia de los linfocitos puede ubicarse filogenéticamente anterior a la adquisición de la mecanismos moleculares de inmunidad adaptativa. La aparición de los linfocitos antes que la inmunidad adaptativa se basa en evidencia paleontológica y genética. A medida que se han realizado investigaciones en estas áreas, se ha encontrado que los linfocitos, como parte del sistema inmunológico innato, están presentes en organismos más primitivos, mientras que la inmunidad adaptativa, que involucra la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la respuesta de los linfocitos T, apareció más tarde en la evolución. [53] La evidencia paleontológica sugiere que los peces cartilaginosos, como los tiburones,

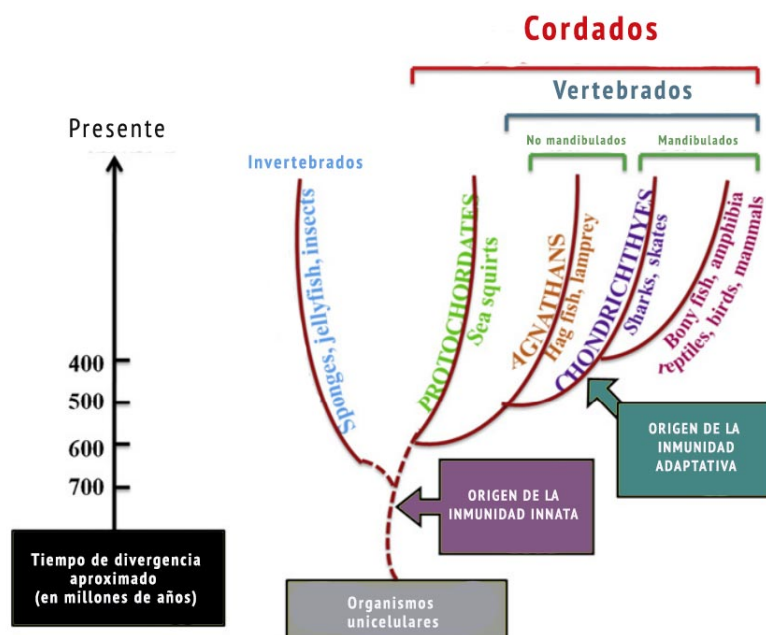


Figura 1.3: Orígenes y relaciones evolutivas entre los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. Adaptado de Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. [12]

nes, ya poseían un sistema inmunológico innato completo con linfocitos, antes de que se desarrollara la inmunidad adaptativa en organismos más avanzados. [54]

Además, en lamprea se han identificado linfocitos tipo B o tipo T que expresan receptores variables que generan diversidad de reconocimiento utilizando ensamblados de repetidos ricos en leucina, formando un tipo diferente de reordenamiento de los inmunorreceptores de células tipo linfocitarias que se encuentra en vertebrados mandibulados. [55]

No obstante, es importante tener en cuenta que la inmunología de los peces no puede considerarse un sistema homogéneo. El número de especies de peces es mucho mayor que el número de especies de mamíferos y la distancia evolutiva entre familias diferentes (por ejemplo familias de teleósteos), son considerablemente más grandes que entre los mamíferos. [56]

### 1.4.3. Sistema inmune en los peces

En este apartado se introducen los mecanismos de respuesta inmune generales de los peces, haciendo énfasis en los aspectos que competen a este trabajo.

El sistema inmune en peces comparte características, incluso órganos homólogos con otros vertebrados. No obstante, se consideran varias diferencias. La primera distinción clave del sistema inmune de los peces con los mamíferos es la ausencia de médula ósea, cuya función como órgano hematopoyético en mamíferos, es des-

## 1.4. Sistema inmune

empeñada por la región anterior del riñón, donde se encuentran linajes celulares hematopoyéticos similares a los de médula ósea de mamíferos. [57]. Otra diferencia notable entre los mamíferos y los peces es que, en lugar de ganglios linfáticos, los peces tienen una extensa red para atrapar sustancias transportadas en la sangre, principalmente en el riñón y el bazo, órganos donde se localizan poblaciones particulares de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune. [58] Otros órganos que participan en la respuesta inmune de los peces son el timo, el tejido linfoide asociado a las mucosas del tracto intestinal, la piel y las branquias. [9] Por otra parte, en los peces, la inmunidad innata es el mecanismo de defensa fundamental. En particular, el sistema complemento de los peces es el mecanismo de defensa innato mejor estudiado. [7,9] El sistema complemento está compuesto por una serie de proteínas séricas que tienen tres mecanismos efectores: a) recubrir patógenos y partículas ajenas al cuerpo para facilitar su reconocimiento y destrucción por parte de las células fagocíticas (opsonización); b) iniciar las respuestas inflamatorias estimulando la contracción del músculo liso, la vasodilatación y la quimioatracción de leucocitos; y c) lisar patógenos mediante el ensamblado de un complejo de ataque a membrana. [59] El hecho de que los peces viven libres en su entorno desde la etapa embrionaria temprana hace que durante ese tiempo dependan principalmente del sistema inmunológico innato para su supervivencia. [60]

En el esturión, se ha demostrado que la respuesta inmune innata se ve afectada negativamente con el aumento de la temperatura. En particular, el calor afecta negativamente la barrera de la piel, reflejándose en la disminución de la secreción de mucus y alteraciones de la microbiota de la mucosa [61].

En cuanto a la inmunidad adaptativa, al igual que en los mamíferos, la respuesta en peces es dependiente y específica de antígeno y se basa en la diversificación somática de los genes del receptor del antígeno para generar un vasto repertorio de células, cada una de las cuales expresa un receptor de antígeno diferente. [62]. Al igual que el sistema inmune adaptativo de los mamíferos, el sistema inmune adaptativo de los peces se divide en dos componentes principales: respuestas celulares y respuestas humorales. Se ha descrito que los peces poseen subpoblaciones de células con características similares a los linfocitos B y T de otros vertebrados. [63,64] La inmunidad humoral en peces también involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B que se diferencian a células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos. Los linfocitos B de los peces primordialmente presentan inmunoglobulinas de la clase IgM, con una cadena pesada bastante parecida a la cadena  $\mu$  de los mamíferos. [19] [65] También se han identificado anticuerpos IgD e IgT/Z, mientras que IgG, IgA e IgE están ausentes. Se han encontrado IgM e IgD en todas las especies de peces y, por lo tanto, parecen ser clases de anticuerpos primordiales. [63] En los peces cartilagosos también se ha identificado el receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), constituido por dímeros unidos por enlaces disulfuro de dos cadenas de proteínas, similar a la cadena pesada de las IgG de mamíferos. [66]

Al igual que en otros vertebrados, las células T de peces poseen receptores de antígeno en su superficie que les permiten reconocer y unirse a antígenos específi-

## Capítulo 1. Introducción

cos. Estos receptores de antígeno en las células T de peces tienen una estructura similar a los receptores de células T de otros vertebrados, aunque pueden presentar diferencias en su diversidad y organización génica. [64] Los principales subtipos de células T en peces son las células T citotóxicas (CD8+) y las células T colaboradoras (CD4+). Las células T citotóxicas, están involucradas en la eliminación de células infectadas por patógenos, ayudando a controlar la propagación de los patógenos intracelulares. [67]

Las células T CD4+ ocupan una posición clave en la coordinación del sistema inmunitario. A través de la producción de citoquinas y otros mediadores, estas células ayudan a activar y estimular a otras células del sistema inmunológico, como los macrófagos y las células B. Además, las células T colaboradoras también son importantes en la generación de respuestas de memoria inmunológica. En cuanto a la maduración de las células T en peces, ocurre principalmente en los órganos linfoides primarios, como el timo y el riñón. Además, la maduración permite la producción de células T reguladoras que son capaces de reconocer antígenos sin atacar a las propias, lo que es esencial para evitar reacciones autoinmunes. [68] [69] La respuesta de las células T requiere de la presentación del antígeno, fenómeno que ya se presenta en peces. Notablemente, los genes que codifican para los productos del MHC de clase I y MHC de clase II en los peces, se encuentran en cromosomas diferentes. La existencia de dos tipos de MHC implica la diferenciación de dos poblaciones funcionales de linfocitos T, colaboradores y citotóxicos. [67] Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) interactúan con el MHC I, mientras que las células T colaboradoras CD4+ interactúan con el MHC II. Además, hay dos tipos de TCR, un heterodímero de cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  (TCR  $\alpha\beta$  o de cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  (TCR  $\gamma\delta$ , cada uno con un solo sitio de unión al antígeno. [70] Los cuatro loci TCR ( $\alpha$ - $\delta$ ) están presentes en también en *Acipenseriformes*. [71]

Un aspecto importante de la respuesta inmunitaria adaptativa de los peces óseos es la memoria inmunológica. Si bien hay evidencia de que dicha memoria es de corto plazo, [65], es suficiente para conducir a una producción rápida y pronunciada de anticuerpos tras una exposición secundaria al mismo antígeno. Esto, por supuesto, es un prerrequisito para la vacunación efectiva. Si bien en los peces, la memoria inmunológica se basa principalmente en el mecanismo de las células T y B y sus subpoblaciones celulares [37, 44], también hay evidencia que atribuye participación en la memoria inmunológica a los macrófagos y las células NK, que están, como en los mamíferos, asociadas con la inmunidad innata. A este tipo de inmunidad se la ha descrito como inmunidad entrenada, caracterizándola como una respuesta intensificada frente una nueva exposición al antígeno que puede ejercerse contra microorganismos tanto homólogos como heterólogos de manera independiente de los linfocitos T y B. [72, 73] Si bien a la inmunidad entrenada se la considera como una respuesta de intensidad menor que una respuesta inmune adaptativa aún confiere una mayor resistencia a la reinfección del huésped, posibilitando una mayor respuesta inflamatoria. Este entrenamiento de las células innatas que mejora la respuesta a un encuentro posterior con el antígeno se asocia con una reprogramación epigenética, cuyo proceso está regulado por una clase de ARN no codificante (lncRNA) llamados lncRNA de cebado inmunológico (IPL),

que están regulados positivamente por el estímulo inicial. [74] En carpas, y bagres se ha demostrado que efectivamente, los macrófagos y las células NK pueden responder mejor cuando se vuelven a exponer al mismo antígeno, observándose diferencias significativas en parámetros como el porcentaje de fagocitosis, y el índice de sobrevivencia del organismo. [75] [76]

## 1.5. Inmunoglobulinas

### 1.5.1. Características generales

Las inmunoglobulinas (Ig) son componentes moleculares críticos del sistema inmunológico adaptativo. Las Igs son proteínas glicosiladas expresadas por los linfocitos B en dos formas: unidas a la membrana, como receptores de linfocitos B (BCR), o como anticuerpos secretados en el plasma sanguíneo por células B diferenciadas. [36]

Generalmente, las inmunoglobulinas se producen como respuesta a la presencia de una molécula extraña (antígeno) en un organismo. Las moléculas de Ig están presentes principalmente en la sangre, donde representan la segunda proteína más abundante después de la albúmina, y también se encuentran en otros fluidos fisiológicos, como el fluido intersticial y las secreciones mucosas. [77]

La estructura de las Igs se caracteriza por compartir entre sí un dominio de aproximadamente 70-100 residuos de aminoácidos unidos por un enlace disulfuro central (entre dos residuos conservados de cisteína) que ancla y estabiliza hojas betas antiparalelas en una estructura típica globular denominado dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). [78]

Aunque se conocen excepciones en tiburones y camélidos [79], todos los monómeros de las Igs están formados por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) idénticas. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras contienen un dominio variable N-terminal (VH y VL) y uno o más dominios constantes C-terminal que forman la región constante (CH y CL). Ambos tipos de dominios adoptan el pliegue característico IgSF. Una cadena L típica tendrá una masa de aproximadamente 25 kDa, y una cadena C de tres dominios, tendrá una masa de aproximadamente 55 kDa. La variabilidad en el peso molecular (PM) radica en los aminoácidos que se encuentran en la superficie externa del dominio IgSF y en los bucles que unen las hebras.

Los dominios variables participan en el reconocimiento de antígenos, ya que los mecanismos de recombinación de distintos segmentos génicos son responsables de dar lugar a una enorme variabilidad de secuencias, en particular en algunas regiones hipervariables llamadas CDR (regiones determinantes de complementariedad). Por otro lado, los dominios que comprenden las regiones constantes median las funciones efectoras de la molécula de las Igs. [80] [39] Además, de acuerdo a las regiones constantes de las cadenas pesadas se pueden distinguir diferentes clases o isotipos de Igs.

En mamíferos, se han descrito cinco isotipos de Ig distintos que se denominan IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. [81] Cada uno realiza funciones efectoras distintas en

## Capítulo 1. Introducción

ubicaciones anatómicas particulares. Por ejemplo, IgM e IgD son receptores de antígenos de superficie de células B vírgenes y la IgM activa principalmente al sistema complemento y se encuentra principalmente en la sangre. IgG es el isotipo más predominante en la sangre y el líquido extracelular. Las IgGs también activan al sistema de complemento y opsoniza los patógenos para facilitar su reconocimiento por células fagocíticas. Además, media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por parte de las células NK. La IgA juega un papel importante en la inmunidad de las mucosas y es el principal isotipo secretado en los tractos gastrointestinal y respiratorio. IgA funciona esencialmente como un anticuerpo neutralizante en las superficies mucosas. A diferencia de la IgG, en mamíferos hay muy poca IgE en la sangre o en los fluidos extracelulares, pero la IgE es relativamente pequeña y puede difundirse fácilmente fuera de la sangre y penetrar en los tejidos. Allí, la IgE defiende principalmente contra parásitos helmínticos y media la hipersensibilidad inmediata al recubrir los mastocitos. [80–82]

### 1.5.2. Inmunoglobulinas en peces

Como se menciona anteriormente, los linfocitos B de los peces expresan inmunoglobulinas en su superficie y secretan anticuerpos antígeno -específicos en respuesta a desafíos inmunes, siendo IgM el principal receptor de superficie de las células B2 convencionales y B1 “innatas” de la zona marginal. [37]

En contraste a lo que ocurre en mamíferos, en los peces se han encontrado sólo tres isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgD/W, IgZ/T. (Ver figura 1.4). La principal excepción es que no se ha encontrado IgT en el bague de canal. [83] Hasta lo que se conoce, la IgM es la que desempeña un papel más importante en la respuesta inmune adaptativa en los peces, además de ser la inmunoglobulina más abundante en el suero. Las funciones efectoras de IgM incluyen la activación del complemento y opsonización de patógenos para mediar la fagocitosis. La IgM se encuentra presente en la superficie celular de los linfocitos B, lo cual permite usarla como marcador para esta subpoblación linfoide. [57] [19,65]

Respecto a la IgD, se ha encontrado en todos los grupos de vertebrados con mandíbula, excepto en las aves, lo que indica que es una clase de anticuerpo primordial. Al igual que la IgM, la IgD se expresa como un receptor en las células B, generado como resultado del corte y empalme alternativo de pre-ARNm que contiene la región variable (VH) y la región constante de cadena pesada (CH).

En algunas especies de peces, IgD es ortólogo de IgW, un isotipo de Ig que se encuentra solo en peces cartilagosos y peces pulmonados, lo que demuestra que IgD/W, como IgM, estaba presente en el antepasado de todos los vertebrados mandibulares vivos. En marcado contraste con IgM, IgD/W es evolutivamente lábil, mostrando muchas duplicaciones así como deleciones de dominios, la presencia de múltiples formas de corte y empalme, existencia como una forma predominantemente secretora o transmembrana, o pérdida del gen completo de una manera específica de especie. [84]

IgT/Z es un tipo de anticuerpos exclusivo de peces óseos. Y si bien aún se ha investigado muy poco, un aspecto destacado de la IgT es su capacidad para atra-



## 1.5. Inmunoglobulinas

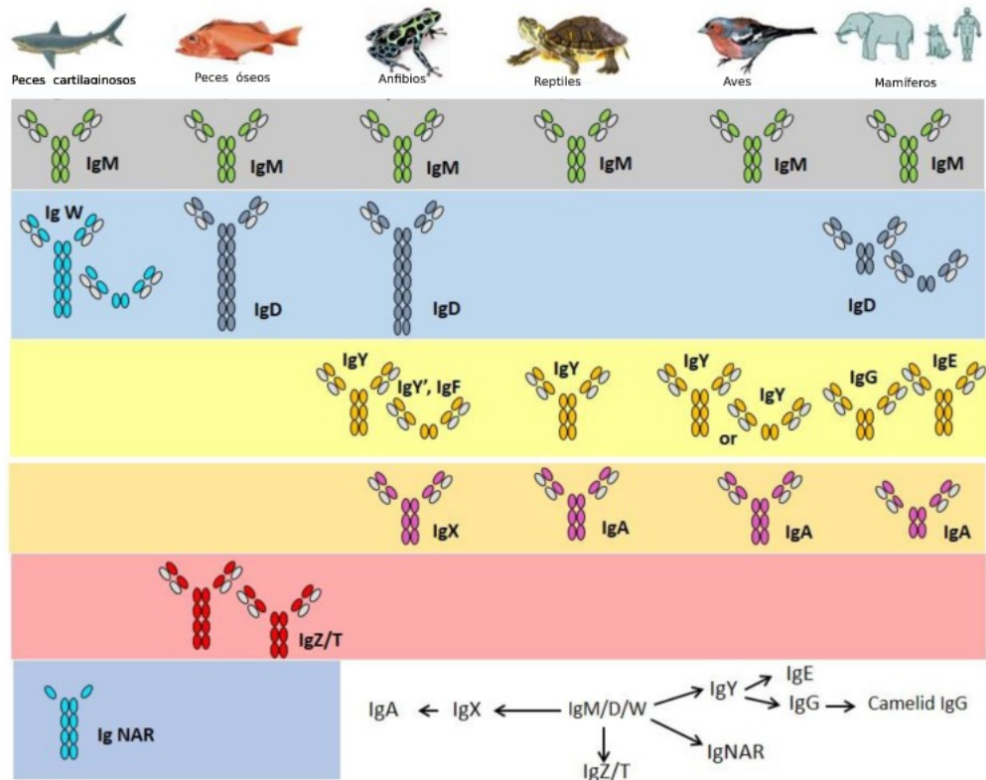


Figura 1.4: Isotipos de inmunoglobulinas de peces y sus relaciones propuestas con isotipos de otros grupos de vertebrados, Adaptado de Fish Immunoglobulins [20]

vesar el epitelio mucosal gracias al receptor inmunoglobulina polimérico (pIgR), lo cual le confiere un papel crucial en la defensa contra patógenos en los tejidos mucosos de los peces. En respuesta a ciertas infecciones parasitarias, en truchas se ha observado un aumento en la producción de IgT en las superficies mucosas como el intestino, las branquias y la piel, mientras que los cambios en la IgM se limitan a los compartimentos sistémicos. Las células B que producen IgT, se pueden distinguir como diferentes subconjuntos de células B que aquellas que expresan IgM e IgD en su superficie. IgT/Z no se deriva del suero, sino que en parte parece ser sintetizada localmente por células productoras de Ig en las capas subepidérmicas y mucosas de la piel. También se ha postulado el papel de esta Ig de moco como receptor específico de antígeno para las células T. [85] Aunque aún hay mucho por descubrir en relación con la función precisa de la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por IgT en los peces, hay evidencia de la existencia de una compleja interacción entre diferentes tipos de células B y sus respuestas inmunitarias en la mucosa de los peces. [86].

En el caso de los peces cartilaginosos, las Igs no se arreglan en el típico arreglo translocón observado en vertebrados superiores, donde múltiples segmentos V, segmentos D y segmentos J están dispuestos corriente arriba de las regiones C para todos los diferentes isotipos de Ig. En su lugar, se organizan en clusters,

## Capítulo 1. Introducción

donde un solo segmento V, dos o más segmentos D, un segmento J y las regiones C para un sólo isotipo están presentes en cada cluster, y múltiples cluster están presentes para cada isotipo. [87] Además de IgM e IgW, los peces cartilagosos de la familia de los elasmobranquios expresan un tipo de anticuerpos que son homodímeros de las cadenas IgH que no se asocian con cadenas IgL, denominados IgNAR (ver figura 1.4) [87] Por otro lado, también existen receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas reguladores de la inmunidad innata que a la fecha sólo se ha detectado en peces óseos, estos son denominados “noveles receptores tipo-inmunitario” y los “noveles transcritos semejantes a la inmunoglobulina” (o NITR y NILT respectivamente por su sigla en inglés) Aunque estructuralmente son similares a las Ig de los linfocitos B, estos receptores no se re-arreglan como los anticuerpos. [88] [59]

### 1.5.3. Inmunoglobulinas IgM

La IgM es el único isotipo conservado funcionalmente en todos los vertebrados con mandíbula, [89] y se la considera la inmunoglobulina más antigua que comparte funciones similares en todos los gnatóstomos. [90]

La IgM es el tipo de inmunoglobulina más abundante en el plasma de peces óseos y se puede encontrar tanto en forma de receptor de membrana como secretada. La función de la IgM es similar en todos los vertebrados mandibulados, que incluye la opsonización, facilitando la fagocitosis, la neutralización y la activación del sistema complemento. [71,91] Además se ha descrito que en algunos peces la IgM puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). [92] El ADCC es un mecanismo mediante el cual los anticuerpos se unen a antígenos en la superficie de las células diana y son reconocidos por las células NK a través de receptores específicos para la región Fc, lo cual induce la activación de un mecanismo citotóxico que elimina a las células diana por apoptosis. En mamíferos este mecanismo es llevado a cabo por algunos subtipos de IgG [38] Sin embargo, en algunos peces se ha descrito que la IgM puede mediar este mecanismo, aunque no está esclarecido que los receptores participan. [93]

El monómero de la molécula de IgM posee una estructura heterodimérica doble, que consta de dos cadenas pesadas (H)( $\mu 2$ ) idénticas y dos cadenas  $\kappa$  o  $\gamma$  livianas idénticas (L2). [94]. Los genes que codifican para la IgM en los organismos deben generar tanto las formas de receptor como las formas secretoras de esta inmunoglobulina. Esta necesidad de producir diferentes formas estructurales de IgM implica que los genes involucrados en el ensamblaje del polímero de IgM se encuentran en regiones altamente conservadas del genoma.

Como se menciona, la IgM se presenta tanto en forma de monómero en la superficie de las células B como en forma de polímero secretado en circulación. Esto se logra a través de un proceso llamado empalme alternativo, en el cual los genes de IgM pueden generar diferentes formas de ARN mensajero que codifican para las distintas formas estructurales.

Los genes que dirigen el ensamblaje del polímero de IgM están ubicados en regiones genómicas conservadas, lo que significa que estos genes tienen una se-

## 1.5. Inmunoglobulinas

cuencia similar entre diferentes individuos de la misma especie y entre especies relacionadas. Esto asegura que los mecanismos moleculares necesarios para el ensamblaje del polímero de IgM se mantengan estables y funcionales a lo largo de la evolución. [95,96]

La conservación de estos genes en dominios altamente conservados del genoma es esencial para garantizar la producción adecuada de IgM con sus diferentes formas estructurales y para asegurar la función correcta de esta inmunoglobulina en el sistema inmunológico. [97] La polivalencia de la IgM permite una alta avididad de unión, que hace particularmente eficiente la unión a antígenos polivalentes, tanto proteicos y no proteicos, por ejemplo, carbohidratos o lípidos presentes en superficies microbianas que se encuentran altamente repetidos.

La cadena pesada de la IgM se compone de 1 dominio superfamilia Ig correspondiente a la región VH y 4 dominios en la región CH. Sin embargo, dentro de distintas especies, existen diferencias claras en la estructura de las IgM producidas.

Por ejemplo, en peces cartilaginosos, al igual que ocurre en otros vertebrados, las IgM que se encuentran en la forma transmembrana contienen el mismo número de dominios CH que la forma secretada. Por el contrario, en peces teleósteos la IgM anclada a la membrana carece del cuarto dominio constante CH. Además, en peces teleósteos la forma predominante de IgM secretada tiene una estructura mayormente tetramérica, a diferencia de otros vertebrados superiores y peces cartilaginosos, en los cuales la IgM secretada es pentamérica. Esta IgM pentamérica incluye una cadena J que estabiliza el pentámero. [19, 37, 82, 98] Distintas formas de IgM en peces y mamíferos se representan en la figura 1.5

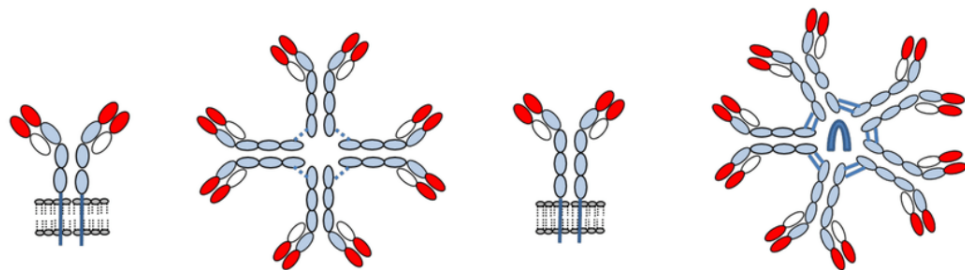


Figura 1.5: Representación esquemática de IgM en peces teleósteos y mamíferos. (A) Monómero IgM en teleósteos. (B) Tetramero IgM en teleósteos. (C) Monómero IgM en mamíferos. (D) Pentámero IgM en mamíferos. Cada círculo indica un dominio Ig. Los círculos azul (cadena pesada) y blanco (cadena ligera) son dominios constantes, mientras que los círculos rojos son dominios variables. La cadena J presente en la estructura del pentámero IgM de los mamíferos está ausente en los peces teleósteos que normalmente forman tetrameros IgM. Adaptado de [99]

Cabe destacar que en los mamíferos, la afinidad de los anticuerpos va aumentando durante la respuesta inmune, acompañado de un cambio de clase de inmunoglobulina (por ejemplo de IgM a IgG). Por esto al comparar las afinidades de unión al antígeno de las IgM se ha encontrado que son típicamente más bajas

## Capítulo 1. Introducción

que las de otros isotipos como la IgG. [67] Sin embargo, en los peces no se observa ningún cambio en el tipo de inmunoglobulina y la afinidad de los anticuerpos secretado suele ser baja, aunque en algunos casos sí se observa un aumento en la afinidad por el antígeno. [67] [56] En los tiburones se ha descrito que frente a una inmunización inicialmente se produce IgM pentamérica (19S), mientras que luego se produce IgM monomérica (7S) e IgNAR, aunque esta respuesta deriva de distintos linajes de linfocitos B y no se debe a un proceso de cambio de clase. [71]

### 1.5.4. Inmunoglobulinas en el esturión

En el género *Acipenser*, se han descrito tres clases de inmunoglobulinas: IgM, IgD [20,100] e IgW/T, un homólogo putativo de IgD [101], mientras que IgG, IgA, IgE e IgT/Z están ausentes [102,103]. La IgM es el isotipo de inmunoglobulinas predominante en el suero y se ha demostrado que tiene una estructura tetramérica [101]

En términos generales, parece que la inmunoglobulina del esturión es fisicoquímicamente muy similar a la IgM encontrada en otras especies peces. Los estudios que se han propuesto purificar, identificar y caracterizar IgM de esturión mediante metodologías moleculares han obtenido caracterizaciones similares. [103–106] En primer lugar, se ha informado que el PM de la IgM de esturión es de alrededor de 870-900 kDa, lo que indica su gran tamaño. En segundo lugar, se ha determinado que la IgM se compone de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), de PMs de 70-73 y 27-30 kDa, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que la IgM de esturión tiene una estructura tetramérica. A su vez, a partir de la amplia diversidad de metodologías empleadas para purificar IgM de esturión, (precipitación por sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, diálisis y concentración de las fracciones del suero) se han obtenido purificados que exhiben una alta pureza y homogeneidad. Este aspecto revela que la IgM de esturión posee una estructura tridimensional bien definida y estable, de hecho se ha visto que la IgM mantiene su conformación al aplicarle distintas estrategias de purificación. [107]

Cabe destacar que se han observado diferencias en el reconocimiento de la IgM por antisueros policlonales, producidos tanto en modelos de conejo como de ratones. En el análisis de reactividad cruzada del antisuero policlonal anti-IgM de algunas especies de esturión se ha mostrado reacción cruzada con IgM de otras especies de peces, como el pez espátula. Sin embargo, no se obtuvo reactividad cruzada con IgM de bagre de canal, trucha arcoíris o lubina rayada. [103,104]

Desde otro punto de vista, el análisis filogenético de isotipos de la cadena liviana de Ig mostró que en Acipensiformes aparecen los subtipos  $\kappa$ ,  $\lambda$  y  $\sigma$ . [108] En *A. ruthenus*, las transcripciones de  $\kappa$ , del timo comprendían el 99% de las transcripciones de cadena liviana, lo que sugiere que  $\lambda$  y  $\sigma$  desempeñan papeles menores en la inmunidad al esturión. [70,108]. Por otro lado, en esturiones híbridos (*A. ruthenus* x *H. huso*) se han purificado los anticuerpos del suero y se observó que presentan una mayor capacidad de unión a antígenos en comparación con la de los teleosteos. Además la capacidad de unión de estos anticuerpos aumentó con

la edad. [106] También se encontró que estos esturiones son capaces de producir inmunoglobulinas naturales, sin la necesidad previa de exposición al antígeno. [106]

### 1.5.5. Efecto de la temperatura en la producción de inmunoglobulinas en peces

Dado que los peces son poiquilotérmicos, su metabolismo depende directamente de la temperatura del agua circundante y por eso la influencia de la temperatura sobre la respuesta inmune en peces ha sido sustancialmente documentada. Esta influencia se observa con mayor frecuencia como la variación estacional de la incidencia de enfermedades infecciosas. [109, 110]

Los efectos de la temperatura en la producción de las inmunoglobulinas se han examinado en varios teléosteos. Se conoce que una serie de factores influyen en la producción de inmunoglobulinas, tales como el estado de inmunocompetencia del individuo, la ruta de entrada del antígeno, la naturaleza del mismo, la dosis y la temperatura. [82] En teleósteos se ha documentado que la concentración sérica de IgM es significativamente variable en diferentes etapas de la vida, así como bajo diferentes condiciones fisicoquímicas como edad, peso, sexo, enfermedad, vacunación, desafío y condiciones ambientales. [111, 112]

En un estudio realizado en el halibut del Atlántico, se investigó el impacto de diferentes temperaturas de crecimiento (12 °C y 18 °C) en la producción de anticuerpos, lo que reveló que las temperaturas más altas dieron como resultado niveles más altos de anticuerpos [113]. De manera similar, un estudio en la lubina examinó la respuesta de anticuerpos a varias temperaturas (12 °C, 18 °C, 24 °C y 30 °C), observando respuestas elevadas a las dos temperaturas más altas [114]. Un estudio sobre lenguado de verano mantenido a temperaturas que oscilaban entre 7,5 °C y 27 °C mostró un retraso en la producción de anticuerpos a las temperaturas más bajas, sin afectar la magnitud o la duración de la respuesta [115]. Con respecto a la tilapia del Nilo cultivada a diferentes temperaturas (18 °C, 23 °C, 28 °C y 33 °C), se observó un aumento significativo en los niveles de IgM en plasma con el aumento de la temperatura, excepto en la temperatura más alta [116]. Un informe que investigó el bacalao del Atlántico cultivado durante 12 meses a temperaturas del agua de 1 °C, 7 °C y 14 °C reveló aumentos significativos e interrelacionados en la concentración de IgM en plasma a medida que aumentaba la temperatura del agua [117]. En un estudio inicial sobre la eficacia de la vacuna utilizando salmón del Atlántico mantenido a temperaturas de 2 °C, 4 °C, 6 °C, 8 °C y 10 °C, se observó que la protección después del desafío era más eficaz a temperaturas más bajas (6 °C o menos), a pesar de que no hubo diferencias significativas en los niveles de anticuerpos específicos entre los grupos. [118] En la carpa, la producción de anticuerpos se inhibió a 12°C. [119] Por el contrario, un estudio sobre la trucha arcoíris encontró una regulación positiva significativa del gen responsable de codificar la IgM secretada en peces mantenidos a 25 °C, mientras que no se observó ningún efecto sobre la expresión de IgT/Z. [120] En conjunto, estos resultados sugieren que las variaciones en la temperatura afectan la respuesta de anticuerpos en los peces, siendo el efecto dependiente de la temperatura óptima de cada especie.

## Capítulo 1. Introducción

La respuesta de anticuerpos se ve afectada por la temperatura a distintos niveles. La primera fase de la respuesta, el reconocimiento y procesamiento de antígenos, parece ser independiente de la temperatura. Las interacciones celulares subsiguientes son los primeros eventos que demuestran la sensibilidad a la temperatura. La siguiente proliferación y diferenciación de células B son independientes de la temperatura, mientras que la síntesis y liberación de anticuerpos son los segundos procesos dependientes de la temperatura. Estos eventos se evidencian por un retraso en la aparición de anticuerpos circulantes, aunque la magnitud y duración de la respuesta humoral no se ven afectadas [82] [121]

Además de la dependencia de la especie, los efectos de la temperatura dependen de la dosis de antígeno, la vía de administración y el tiempo de aclimatación. [122, 123] El efecto de la temperatura en el retraso temporal en la producción de Igs se ha documentado en varias especies de peces, incluyendo trucha arcoiris, [124], tilapia del nilo [125] y salmón rojo. [126]

La primera estrategia empleada para entender los mecanismos por los cuales la temperatura afecta la producción de anticuerpos se basó en estudios con conjugados haptenos-transportadores. [127] Esta estrategia sugirió que el paso sensible a la temperatura en la producción de anticuerpos estaba relacionado con la alteración de la función de los linfocitos T colaboradores. En estudios posteriores utilizando conjugados hapteno-carriers dependientes y no dependientes del timo, se evidenció que las respuestas mediadas por células T eran sensibles a bajas temperaturas, pero la función de memoria T o de las células B no se veían afectadas. [128] En esta línea, se vió que bajas temperaturas ejercerían su influencia a nivel de la membrana plasmática de las células T. Se postuló que las células T del bagre pueden ser incapaces de desarrollar adaptaciones homeoviscosas para compensar el efecto rígido de las temperaturas más bajas en las membranas celulares. [129] Otros componentes de la membrana que participan en diversos procesos de reconocimiento celular, como las proteínas y los carbohidratos también pueden verse afectados por la temperatura ambiental. En la carpa, se ha visto que los niveles de ácido siálico disminuyen con la reducción de la temperatura, resultando en una disposición diferente de glicanos, que se correlaciona con una modificación de la estructura y función de la membrana plasmática. [130] Si bien aún se necesitan más estudios para concluir esta hipótesis, se ha establecido que las temperaturas ambientales más bajas pueden actuar sobre la respuesta inmune de peces modificando los lípidos y carbohidratos de la superficie celular de las células T colaboradoras.

En el esturión, no se ha examinado el efecto de la temperatura sobre la síntesis de Igs, ni en condiciones basales ni en consecuencia de una respuesta inmunológica. En este trabajo nos enfocamos en comparar la producción de inmunoglobulinas de esturión ruso utilizando anticuerpos anti-IgM en muestras de sueros de esturión en condiciones de invierno y verano.

## 1.6. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal producir anticuerpos policlonales anti-IgM de esturión ruso en ratón, con la finalidad de utilizarlos para evaluar los niveles de IgM sérica en esturiones cultivados en las granjas acuícolas.

Como objetivos específicos se plantean:

- Purificar anticuerpos IgM de esturión ruso a partir de muestras de suero.
- Inmunizar ratones con la IgM de esturión purificada y evaluar la respuesta de anticuerpos producida.
- Evaluar los niveles de anticuerpos IgM en muestras de invierno y verano

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.



# Capítulo 2

## Materiales y métodos

En este capítulo se detallan las técnicas, métodos y conceptos estudiados y empleados en el presente trabajo. En primer lugar, se enumeran los reactivos generales y se analizan las distintas técnicas de purificación de la IgM de esturión ruso. Luego se explica la metodología utilizada para la inmunización de ratones con la fracción de IgM purificada y el seguimiento de la respuesta de anticuerpos en el tiempo. Por último se realiza una introducción sobre la técnica de Western-Blot y su aplicación a los objetivos de interés específicos. En la Figura 2.1 se representa en detalle el diagrama de flujo de la metodología de trabajo empleada.

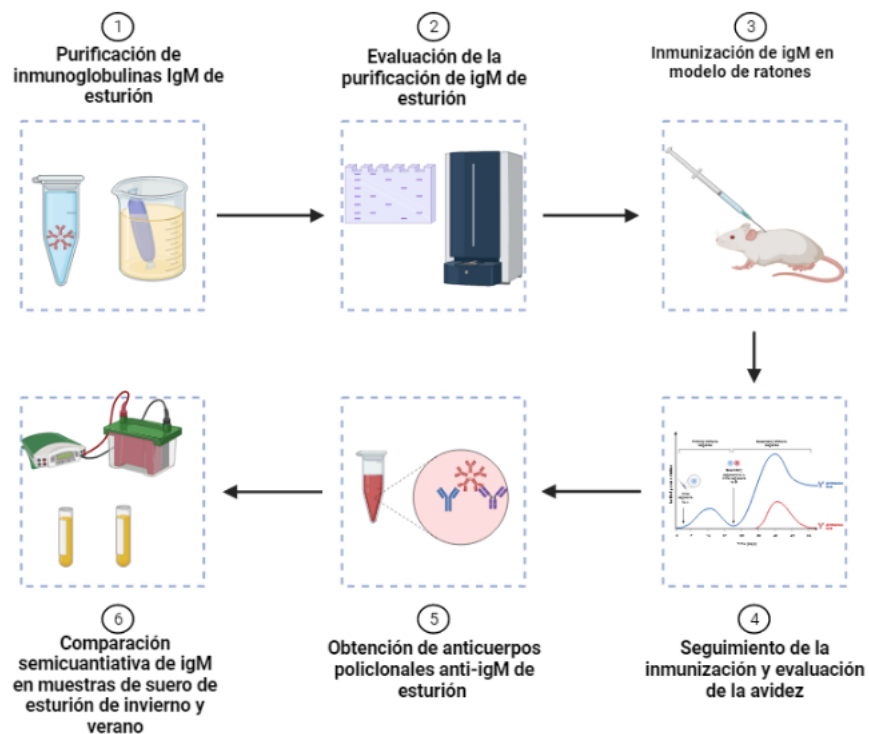


Figura 2.1: Diagrama de flujo general de la estrategia experimental empleada para cumplir los objetivos del trabajo. Creada en <https://biorender.com/>

## 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 Uruguaya; ácido acético, ácido cítrico, y acetato de sodio de Merck (Alemania); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), acrilamida y dodecil-sulfato sódico (SDS) de Applichem (Alemania); bisacrilamida, persulfato de amonio (APS), tetrametiletilendiamina (TEMED) y tris(hidroximetil) aminometano de Sigma-Aldrich (EEUU), fosfato de sodio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) de Carlo Erba, ditiotreitól (DTT) de Bio Basic (Canadá), reactivo Micro<sup>TM</sup> 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; anticuerpo policlonal de cabra anti- IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano de Calbiochem (Alemania) y marcador de peso molecular (MPM) de proteínas preteñido de rango 10-180 kDa Thermo Scientific. (EEUU).

## 2.2. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

El presente trabajo se enfocó en utilizar técnicas de purificación basadas en trabajos disponibles en la literatura para la purificación de IgM en otras especies de esturión. En estos trabajos se utilizaron las técnicas de precipitación con sulfato de amonio, en combinación con una o varias etapas de diálisis.

La precipitación con sulfato de amonio es considerada hace décadas como un método clásico para la purificación y concentración de inmunoglobulinas a partir del suero. [131]. La precipitación con sulfato de amonio fue la metodología de purificación seleccionada debido a que es una metodología rápida y económica, ampliamente útil para separar proteínas de muestras complejas de partida y concentrar volúmenes considerables de la proteína de interés. A su vez, dicha metodología fue vastamente empleada para el aislamiento y purificación de IgM a partir de diferentes especies de esturión. [104] [132]

El concepto clave de este método consiste en que la solubilidad de las proteínas es afectada por la concentración salina (iones). En solución, las proteínas forman enlaces de hidrógeno con moléculas de agua a través de sus grupos polares e iónicos expuestos. [133] A concentraciones de sal elevadas, el sulfato de amonio compete con las cadenas laterales polares de la proteína por el apareamiento de iones con las moléculas de agua, por tanto la sal reduce el volumen efectivo de disolvente, lo que resulta en precipitación. [134] Si bien la mayor parte de las proteínas requieren al menos una pequeña concentración de sal para permanecer plegadas y

## 2.2. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

estables, [135] a medida que la concentración de sal aumenta, la superficie de la proteína se cargará tanto, de modo que las moléculas de proteína se autoagregan y precipitan. [136] (ver Figura 2.2). Debido a que la precipitación se debe a una solubilidad reducida y no a la desnaturalización, la proteína que precipita puede resolubilizarse fácilmente usando soluciones amortiguadoras con concentraciones fisiológicas de NaCl. [137]

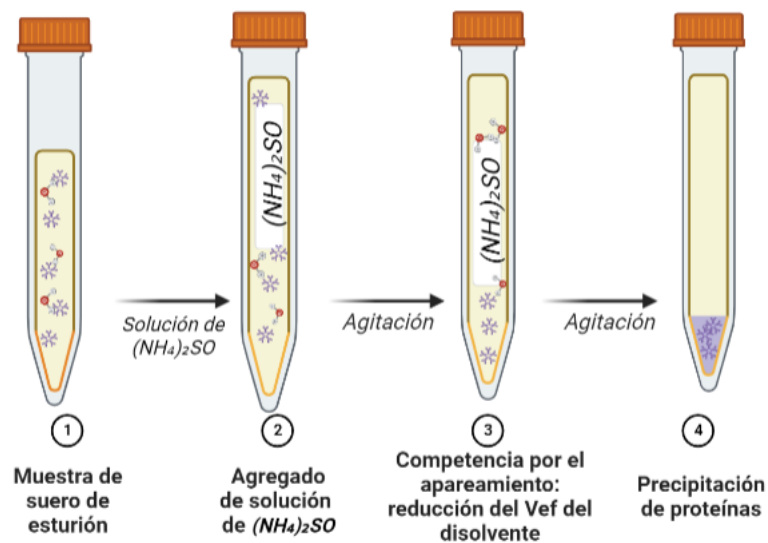


Figura 2.2: Representación del proceso de precipitación de proteínas con sulfato de amonio. Creada en <https://biorender.com/>

La cantidad de sulfato de amonio necesaria para precipitar una proteína determinada dependerá principalmente de la carga superficial, la distribución superficial de las cadenas laterales polares y el tamaño de la proteína, así como del pH y la temperatura de la solución. [138]

Por otro lado, todas las metodologías de purificación incluyeron al menos una etapa de diálisis. La diálisis es una metodología que permite separar moléculas de acuerdo con su tamaño, mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las de la macromolécula de interés. Estos poros permiten que moléculas pequeñas, tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, difundan a través de la membrana, pero bloqueen el tránsito de moléculas mayores. [139]

El procedimiento estándar para una diálisis es introducir una disolución macromolecular en el saco o bolsa de diálisis, que se sumerge en un volumen relativamente grande de disolvente. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo hasta que se alcanza el equilibrio, las macromoléculas permanecerán

## Capítulo 2. Materiales y métodos

en el interior de saco de diálisis. El proceso puede repetirse varias veces a fin de sustituir completamente un sistema disolvente por otro. (ver figura2.3). [140]

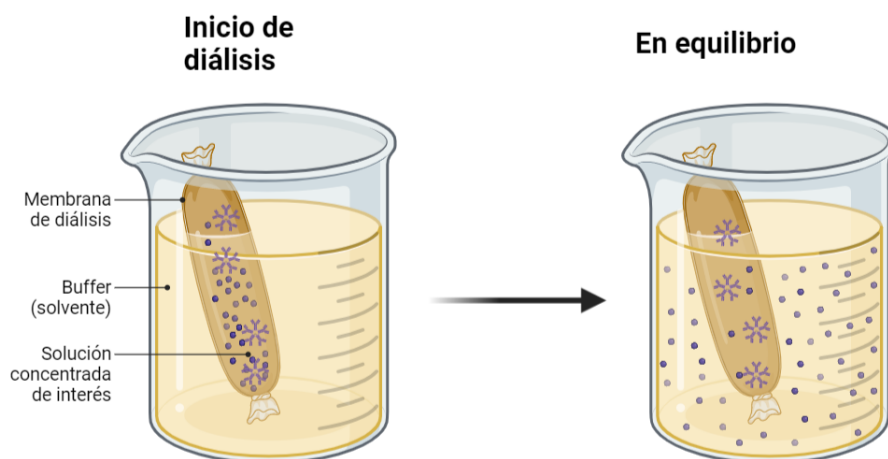


Figura 2.3: Representación de la metodología de diálisis. Adaptada de <https://biorender.com/>

Las muestras de suero utilizadas para la purificación de IgM de esturión ruso estaban conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio de Inmunología. Estas muestras fueron obtenidas de esturiones rusos de 4 años cultivados en la granja Esturiones del Río Negro durante los meses de invierno. La purificación partió de muestras individuales de esturión descongeladas a partir de alícuotas de suero almacenadas  $-80^{\circ}\text{C}$ , que se alicuotaron y preservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 11 meses.

A continuación se describen las 4 metodologías de purificación utilizadas en este trabajo:

### 2.2.1. Metodología 1 - Precipitación de la fracción euglobulina

La primer metodología de purificación se basó en la técnica para purificar IgM de suero de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) descrita por Partula. [104] En esta técnica, el suero de partida se dializó extensivamente contra buffer Tris-HCl 5 mM a  $4^{\circ}\text{C}$  (buffer de diálisis) utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU). El precipitado obtenido tras dicha diálisis se lavó 5 veces con buffer de diálisis y se disolvió en buffer Tris-HCl 0.1 M, 1 M NaCl, pH 8.6. Posteriormente, la fracción obtenida se dializó nuevamente utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU) contra buffer fosfato 10 mM pH 7.4, conteniendo NaCl 150 mM (PBS). La fracción final así obtenida (fracción euglobulina) fue almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis

## 2.2. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

### 2.2.2. Metodología 2 - Precipitación con sulfato de amonio 50 %

La segunda estrategia de purificación realizada se basó en la técnica utilizada por Yektaseresht y colaboradores para purificar IgM de suero de esturión Siberiano y esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) [105]. En esta técnica el suero de partida se sometió a una precipitación con una solución de sulfato de amonio saturado al 50 % por 6 horas a 4°C con agitación suave y luego se centrifugó a 9000 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado así obtenido se lavó 5 veces contra buffer de diálisis para remover el sulfato de amonio y se resuspendió en PBS. Finalmente, la fracción obtenida se dializó contra PBS por 24 h utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU). La fracción obtenida, fue preservada a 4°C hasta su posterior análisis por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

### 2.2.3. Metodología 3 - Precipitación con sulfato de amonio 50 % seguido de aglutinación con polietilenglicol

La tercer metodología realizada se basó en la técnica utilizada por Yasumoto y colaboradores para purificar IgM de suero de esturión híbrido (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*). [106] En esta técnica el suero de partida se diluyó en una proporción de 1:4 con PBS y posteriormente se sometió a una precipitación con igual volumen de solución saturada de sulfato de amonio durante 1 h a 4°C con agitación. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm a 4 °C durante 10 min. El precipitado se disolvió en PBS y se dializó toda la noche utilizando una membrana Sigma-Aldrich (EEUU) de tamaño de poro 14 kDa contra PBS. Posteriormente, a la fracción obtenida se le agregó un volumen igual de polietilenglicol (PEG) 6000 al 24% durante 2 h a 4 °C con el objetivo de aglutinar los componentes de alto PM, fracción en la que se esperaba obtener las IgM séricas. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm a 4 °C durante 10 min y se disolvieron en PBS. Finalmente, la fracción obtenida se dializó contra PBS por 24 h utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU). La fracción obtenida se lavó 5 veces contra buffer de diálisis y se resuspendió en PBS, fue preservada a 4°C hasta su posterior análisis por SDS-PAGE.

### 2.2.4. Metodología 4 - Precipitación con sulfato de amonio 33 % seguida de diálisis contra buffer Tris-HCl 5mM

La cuarta metodología utilizada se basó en la técnica amablemente proporcionada por la M. Sc. Silvina Rossi (Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR), anteriormente empleada para la purificación de IgM de suero de esturión Siberiano. En esta técnica el suero de esturión de partida se sometió a una precipitación con solución de sulfato de amonio 33% en reposo durante 2h a 4°C. A diferencia del resto de las metodologías empleadas, en el primer paso se descartó el precipitado inicial y se continuó trabajando con el sobrenadante. El sobrenadante

## Capítulo 2. Materiales y métodos

se dializó contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7.4 utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU). El precipitado se lavó 5 veces con buffer Tris- HCl 5 mM pH 7.4, se disolvió en PBS, y se dializó nuevamente contra PBS por 24 h utilizando una membrana de tamaño de poro 14 kDa (Sigma-Aldrich, EEUU). La fracción así obtenida fue preservada a 4°C hasta su posterior análisis por SDS-PAGE.

### 2.2.5. Cuantificación de niveles de proteína total en las fracciones obtenidas en cada método de purificación

La concentración proteica de las fracciones obtenidas para cada método de purificación se determinó analizando la absorbancia a 280nm. En el caso de la purificación por la metodología 4, además se cuantificó la concentración de la fracción final por la metodología de ácido bicinonínico utilizando el reactivo comercial Micro™ BCA Assay kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo plano, y se analizaron las muestras y el estándar (BSA) por duplicado. Brevemente, se sembró 150  $\mu$ L de una dilución 37/100 de IgM purificada (para obtener una concentración estimada de 10  $\mu$ g/mL de acuerdo a la Abs280) y de diluciones seriadas del estándar de BSA al 1/2 (concentraciones de 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.75  $\mu$ g/mL) en PBS, con 150  $\mu$ L del reactivo de trabajo. La placa se cubrió con papel Parafilm y tapa y se incubó durante 2 h 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 en la fracción purificada.

## 2.3. Evaluación de la purificación

Como se mencionó al inicio de este capítulo, la evaluación de la purificación se realizó en dos etapas principales. Primeramente, las fracciones obtenidas aplicando las distintas metodologías de purificación se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. En segundo lugar, se seleccionaron y cortaron bandas específicas obtenidas a partir los SDS-PAGE obtenidos mediante la metodología 4 de purificación, y se enviaron al servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur para su identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). A continuación, se describen ambas metodologías.

### 2.3.1. Evaluación de la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE

Para evaluar las etapas de purificación de cada metodología se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE. La electroforesis es un método versátil para la separación y caracterización fisicoquímica parcial de moléculas aprovechando las diferencias de tamaño, conformación y carga. [141] Cabe resaltar que esta técnica permitió comparar las distintas estrategias de purificación (descriptas para la IgM de otras especies de esturión) mediante la determinación de (a) el grado de contaminación con otras proteínas séricas y (b) el grado de degradación/procesamiento proteolítico en las fracciones de Ig recuperadas. [142] El método de electroforesis se basa en la diferencia de movilidad de moléculas cargadas tras aplicarle un campo eléctrico y se utiliza principalmente para el análisis y purificación de proteínas o ácidos nucleicos. [143] La electroforesis normalmente se lleva a cabo cargando una muestra que contiene las moléculas de interés en carril (o pozo) en una matriz porosa a la que luego se le aplica un voltaje. Moléculas de diferente tamaño, forma y movimiento de carga migran a través de la matriz a diferentes velocidades. Al final de la separación, las moléculas se detectan como bandas en diferentes posiciones. La matriz puede estar compuesta por una serie de materiales diferentes, como ser papel, acetato de celulosa o geles hechos de poliacrilamida, agarosa o almidón. [144]

Los geles de poliacrilamida son estructuras reticuladas inertes. Los tamaños de poro en dichos geles son similares al radio molecular de muchas proteínas. [145] Los geles de poliacrilamida son ideales para aplicaciones electroforéticas por muchas razones; la poliacrilamida es un medio termoestable, transparente, fuerte y relativamente inerte químicamente. Su versatilidad, sin embargo, radica en que se puede preparar con una amplia gama de tamaños de poro, que es la característica intrínseca crucial del gel para determinar cómo migraran las proteínas de diferentes tamaños. El tamaño de poro de un gel se puede variar mediante las concentraciones de monómero de acrilamida y bisacrilamida. [143] [145]

Aunque la tecnología y métodos de separación de electroforesis han evolucionado durante más de 100 años [146], en la mayoría de los sistemas se carga el gel de poliacrilamida entre dos cámaras (interna y externa) de tal manera que la única conexión eléctrica entre las cámaras es a través del gel. Al aplicarle el voltaje y mediante la combinación óptima de porosidad, densidad del gel, número de pocillos y condiciones de corrida se logra la migración y separación satisfactoria de los distintos componentes moleculares de la muestra. [141] En este trabajo se utilizaron geles de poliacrilamida dado que es una de las matrices más utilizadas para la separación de proteínas por pesos moleculares, útil para la separación de inmunoglobulinas. Además, se utilizó dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que enmascara la carga de las proteínas, por lo tanto, los complejos aniónicos formados tienen una carga negativa neta aproximadamente constante por unidad de masa lo cual permite descartar la variable carga, haciendo que las proteínas migren de acuerdo a su tamaño. [147]

## Capítulo 2. Materiales y métodos

### 2.3.2. Condiciones de trabajo de la evaluación de la purificación por electroforesis SDS-PAGE

En este marco, se optimizaron las condiciones de acuerdo a las propiedades físico-químicas generales de la IgM. Asimismo, debido a que es sabido que las moléculas poliméricas de IgM pueden disociarse parcial o completamente en condiciones reductoras, [148] se incluyó el agregado del agente reductor DTT. La disociación de las IgM por DTT se basa en la ruptura de los enlaces disulfuro presentes en las IgM.

Para evaluar la purificación, las distintas fracciones de cada metodología se sembraron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Para esto se utilizaron geles concentradores al 4 % (m/v) y separadores al 12.5 % (m/v) de 1.5 mm de espesor. 2.7 µg de las distintas fracciones de cada purificación se llevaron a un volumen final de 24 µL con buffer 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 se sembró un MPM Thermo Scientific preteñido (10-180 kDa). Los geles se corrieron en buffer de corrida Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS 1 % durante 20 minutos a 80 V y luego durante 50 minutos a 150 V a temperatura ambiente en un sistema MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad, EEUU). Una vez finalizada la corrida electroforética los geles se retiraron del equipo, se fijaron en solución de ácido acético 10 %, etanol 40 % y se tiñeron con solución de azul de Coomassie coloidal seguido de lavado con agua destilada.

## 2.4. Identificación de IgM de esturión ruso mediante espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica ampliamente utilizada para identificar y caracterizar proteínas. La digestión enzimática de las proteínas en péptidos, que luego se analizan en el espectrómetro de masas y se identifican mediante métodos computacionales utilizando bases de datos específicas para la especie en cuestión. En este trabajo, las bandas obtenidas del análisis por SDS-PAGE de la fracción obtenida luego de aplicar la metodología 4 se enviaron a analizar al servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA, Instituto Pasteur). Se eligió trabajar con esta fracción porque fue la metodología que produjo mejores resultados, observándose en el análisis por SDS-PAGE bandas del tamaño esperado para la IgM y menor presencia de posibles contaminantes. Una vez que las muestras llegaron al Instituto Pasteur, las proteínas extraídas de cada banda fueron reducidas y alquiladas con iodoacetamida y luego analizadas por MALDI-TOF/TOF MS (del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization y Time of Flight Mass Spectrometry). El análisis completo y la búsqueda de los péptidos obtenidos fue realizada por Madelón Portela (UByPA), utilizando la base de datos de " *Acipenser ruthenus (Sterlet sturgeon)* [7906]z proteome:up000289886 (descargada [149] a la que se le unió una base de datos propia obtenida a partir



## 2.5. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratón

del transcriptoma hepático de esturión ruso ensamblado por nuestro grupo [6]. En los casos donde no se obtuvieron resultados con estas bases de datos se realizó una búsqueda en la base de datos Vertebrados EST.

## 2.5. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratón

De acuerdo con el plan de trabajo planteado, una vez que se logró una buena purificación de las IgMs de esturión ruso se procedió a inmunizar ratones utilizando dicho antígeno, con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales anti-IgM de esturión ruso. Los aspectos críticos a considerar en un esquema de inmunización incluyen: la cepa de ratón que se va a inmunizar, el tipo y dosis de antígeno, el uso de adyuvante, la mezcla de antígeno y adyuvante, y la elección de la vía y el régimen de inmunización. [150]

En esta etapa también se utilizó como antígeno la IgM purificada a partir de la metodología 4, ya que fue el procedimiento que dio mejores resultados, tanto a nivel de presencia de contaminantes (resultados de SDS-PAGE), como de identificación proteica (resultados de espectrometría de masas). Se utilizaron 3 lotes de ratones a los que se les administraron dosis distintas de IgM de esturión ruso emulsionado con adyuvante completo de Freund (ACF) para la inmunización inicial y adyuvante incompleto de Freund (AIF) para la inmunización de refuerzo. Se utilizaron estos adyuvantes debido a que son quizás los adyuvantes más ampliamente utilizados para estudios en animales y sobre los cuales había más experiencia previa en el Laboratorio de Inmunología. Ambos adyuvantes contienen aceite mineral como agente emulsionante y en el caso del ACF también contiene bacterias *Mycobacterium* muertas por calor. [151] Debido a que las reacciones adversas son generalmente mucho más extensas con el ACF que con el AIF, el ACF generalmente solo se usa en la inmunización inicial, mientras que el AIF se usa para las dosis de refuerzo. [152]

Durante la inmunización el seguimiento de la respuesta de anticuerpos anti-IgM se realizó mediante la metodología de ELISA. A continuación, se describen los procedimientos realizados para la obtención de los anticuerpos policlonales anti-IgM de esturión ruso en ratón.

### 2.5.1. Inmunización de ratones con IgM de esturión ruso

En la Figura 2.4, se esquematiza la estrategia completa de inmunización utilizada en este trabajo. Los ratones se distribuyeron en 3 lotes de 3 individuos cada uno, los cuales fueron separados en cajas de tamaño adecuado y mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Inmunología, ubicado en el Instituto de Higiene. El protocolo de experimentación animal se realizó siguiendo los procedimientos recomendados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (UdelaR), de acuerdo con el protocolo aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina (Protocolo N° 1478, "Preparación de anticuerpos policlonales específicos

## Capítulo 2. Materiales y métodos

contra proteínas de esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii* en ratón”). Todos los procedimientos con los animales fueron realizados por la Dra. Ana María Ferreira y la Dra. Valeria Silva con la colaboración de la Dra. Paula Arbildi para algunas extracciones de sangre.

Al día inicial los 3 lotes de ratones de la cepa CD1 se inmunizaron por vía intraperitoneal con 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla IgM de esturión ruso emulsionada con ACF. Cada lote fue inmunizado con distintas dosis de IgM: 100  $\mu\text{g}$  para el Lote 1, 50  $\mu\text{g}$  para el Lote 2 y 25  $\mu\text{g}$  para el Lote 3. A cada ratón de cada lote se le realizó un pequeño corte en la oreja con el objetivo de individualizarlo e identificarlo (sin corte, corte en oreja derecha o corte en oreja izquierda). Con el objetivo de lograr el seguimiento de la inmunización, los ratones fueron sangrados respetando intervalos de tiempos según se indica en la Figura 2.4, y la respuesta de anticuerpos fue seguida por ELISA para decidir el momento adecuado de dar la dosis de refuerzo o booster (momento en el cual la respuesta de anticuerpos comienza a bajar). La inmunización de refuerzo se realizó con una dosis de 50  $\mu\text{g}$  para todos los lotes a los 136 días post-inmunización. El día final se realizó la eutanasia de los ratones para obtener el máximo volumen posible de suero policlonal anti-IgM de esturión. [153] El tiempo final del protocolo fue extendido respecto al previsto debido a desafíos e imprevistos temporales, incluyendo aquellos derivados de la pandemia.

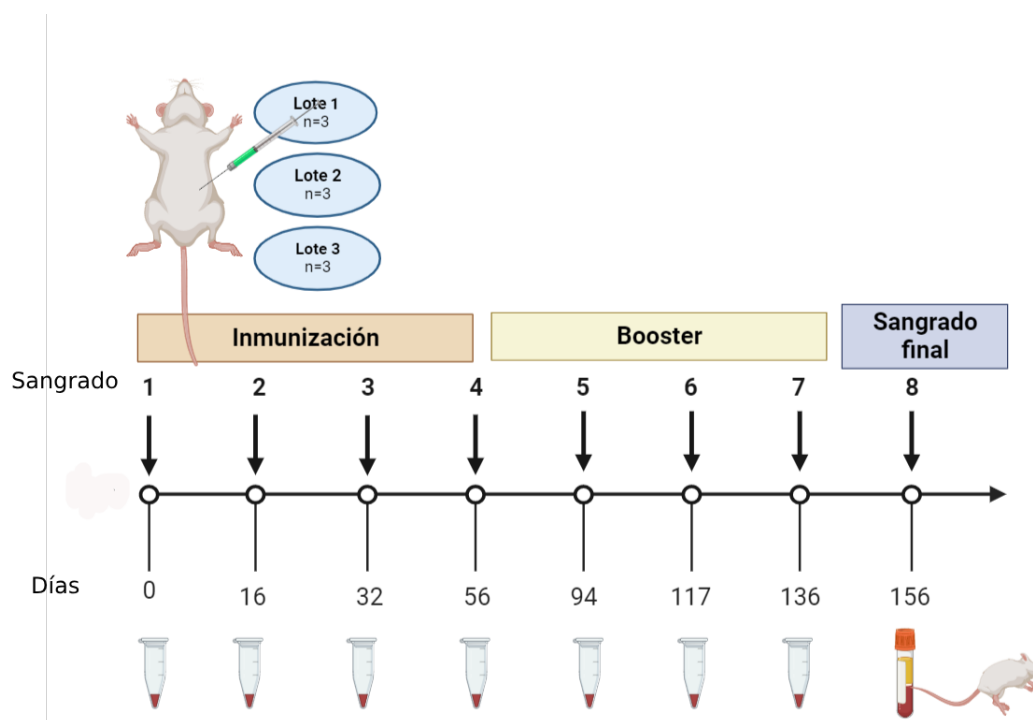


Figura 2.4: Estrategia experimental empleada para la inmunización con igM en Modelo de Ratones. Creada en <https://biorender.com/>

## 2.5. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratón

### 2.5.2. Seguimiento de la inmunización mediante ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos

La obtención de anticuerpos anti-IgM siguiendo el protocolo de inmunización detallado en el apartado anterior se evaluó mediante de ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El ELISA es un inmunoensayo de alta sensibilidad que se utiliza para detectar y cuantificar distintos tipos de analitos (incluidos los anticuerpos). La detección de estos analitos se logra mediante la formación de inmunocomplejos anticuerpo-antígeno. [154]

La técnica general del ELISA se basa en la inmovilización de un antígeno o un anticuerpo en una superficie de fase sólida y en la introducción de muestras biológicas que contienen los anticuerpos o los antígenos específicos que se quieren detectar, los cuales formaran los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo de acuerdo a la molécula inmovilizada en la fase sólida. Para evaluar la formación de los inmunocomplejos usualmente se utilizan anticuerpos acoplados covalentemente a una enzima, usualmente peroxidasa. [155] La adición del sustrato a la enzima da lugar a la reacción enzimática y cuyo producto media la generación de una especie coloreada. El cambio de color es medible a través de la densidad óptica que luego se convierte a valores numéricos. Los ELISAs usualmente se realizan en placas de poliestireno de 96 pocillos, que favorecen la absorción de las macromoléculas a la fase sólida. Dependiendo de la combinación antígeno-anticuerpo empleada y al tipo de analito que se quiera evaluar, el ensayo se denomina ELISA de captura o sandwich, ELISA competitivo o ELISA de anticuerpos. También puede clasificarse en ELISA directo o indirecto, dependiendo de si es el anticuerpo primario o el secundario el que está unido a la enzima. En este trabajo, el seguimiento de la respuesta de anticuerpos de los ratones inmunizados con IgM de esturión ruso se realizó mediante ELISA de anticuerpos.

El proceso comienza con la sensibilización de una placa, en la cual se recubre la placa con el antígeno de interés. Este antígeno debe ser la proteína o molécula que provocó la respuesta específica de anticuerpos que se pretende medir en los animales inmunizados, en nuestro caso la IgM de esturión ruso. Luego, se agrega la muestra biológica, en nuestro caso diluciones de los sueros de ratón correspondientes a las diferentes extracciones realizadas. Si los sueros contienen anticuerpos específicos anti IgM, estos se unirán a la IgM que recubre la placa. A continuación, se añade un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa. Este anticuerpo secundario se une a los anticuerpos primarios presentes en la muestra, formando un complejo antígeno-anticuerpo-anticuerpo secundario. Después, se agrega un sustrato que es convertido por la enzima unida al anticuerpo secundario. Esta reacción produce un producto coloreado cuya intensidad del color se mide utilizando un lector de placas. La absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra, así como con su afinidad. Por lo tanto para poder comparar las distintas extracciones de los distintos ratones es necesario calcular el título de anticuerpos. [156], [157] [155] El título de anticuerpos se determina al identificar la mayor dilución de la muestra que presenta una respuesta positiva significativa, generalmente por encima de un umbral

## Capítulo 2. Materiales y métodos

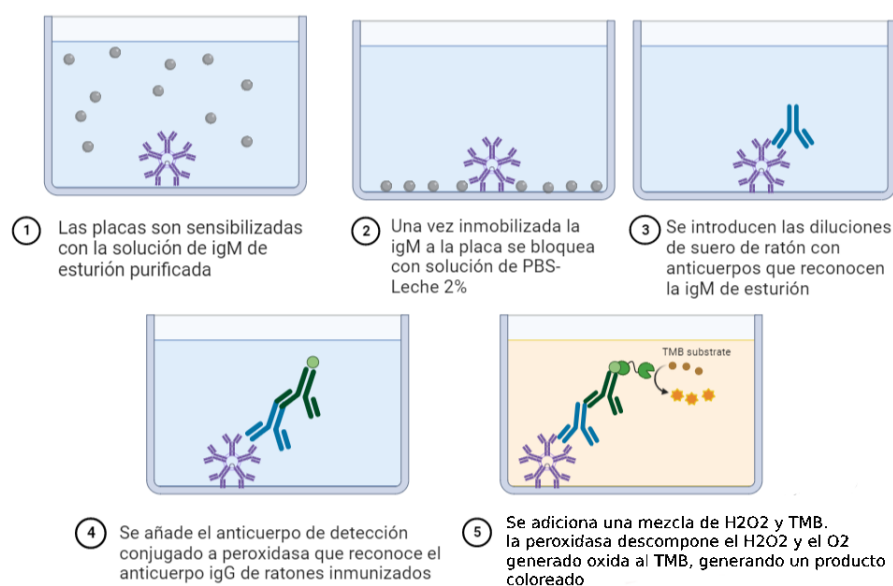


Figura 2.5: Representación esquemática del ensayo de ELISA indirecto de anticuerpos utilizado para el seguimiento de inmunización de igM de esturión en ratones. <https://biorender.com/>

establecido. Por ejemplo si una muestra muestra una absorbancia por encima del valor de corte en una dilución de 1:100, el título de anticuerpos se informaría como 100. El ensayo de ELISA concretado con el fin de realizar el seguimiento de la respuesta de inmunización se esquematiza en la Figura 2.5

Para este ensayo se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner Bio One, High Binding) que se sensibilizaron con 100  $\mu$ L de una concentración 5  $\mu$ g/mL de IgM de esturión ruso en buffer PBS. La sensibilización se realizó a 4<sup>o</sup> toda la noche en cámara húmeda y posteriormente se realizó el bloqueo con PBS-Leche descremada al 2% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se sembraron 100  $\mu$ L/pozo de diluciones seriadas al 1/3 de los sueros de ratón inmunizados en cada lote (partiendo de una dilución inicial 1/300) y se incubó toda la noche a 4<sup>o</sup>C en cámara húmeda. Para la detección de los inmunocomplejos se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de una solución de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (CalbioChem 401371, a una dilución 1/14000), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Todos los lavados entre los distintos pasos del ELISA se realizaron con PBS 0.05% Tween20. Finalmente se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de sustrato TMB 10 mg/mL (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.006% v/v y se incubó la placa 10 minutos con agitación y protegida de la luz. La reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ L/pozo de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La Densidad Óptica se midió a 450nm en un lector de placa de 96 pocillos (Labsystems Multiskan MS). Para este análisis se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, EEUU). [158]

2.6. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo.

## 2.6. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la temperatura sobre los niveles de IgM en el esturión ruso, en este trabajo se analizaron los niveles séricos de IgM en suero de esturiones cultivados durante invierno y verano en la granja Esturiones del Río Negro mediante Western blot (WB) utilizando los anticuerpos anti-IgM de esturión ruso obtenidos.

La metodología de WB se utiliza ampliamente para separar e identificar proteínas. Desde su primera descripción en 1979, se ha convertido en uno de los más utilizados métodos de investigación en ciencias de la vida. [159]

La base de esta técnica es la formación de un inmunocomplejo anticuerpo-proteína que puede detectarse una vez inmovilizado en una membrana. En un procedimiento estándar de WB primeramente se disocia una mezcla de proteínas en función del  $\gamma$ PM mediante electroforesis en gel. Luego, se transfieren las proteínas a una membrana, una vez realizada la transferencia se visualizan las proteínas para verificar el éxito del procedimiento, utilizando un colorante como el rojo Ponceau. [160] [161] Luego, los sitios de adsorción de la membrana no ocupados por proteínas son bloqueados con una proteína no específica para prevenir la posterior adsorción no específica de los anticuerpos. A continuación, la membrana se incubaba con anticuerpos específicos que marcan la proteína de interés y la membrana es revelada y visualizada (Ver Figura 2.6). Finalmente, para el revelado de los complejos antígeno-anticuerpo formados se usa comúnmente la quimioluminiscencia. Se basa en el uso de anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa. Cuando se agrega un reactivo a base de peróxido, la enzima cataliza la oxidación de luminol, y esta reacción emite luz la cual es fácilmente detectable mediante sistemas de cámaras. [162]// A continuación, se describe el análisis por WB realizado para evaluar los niveles de IgM sérica en esturiones cultivados durante distintos momentos del año.

Se utilizaron muestras de sueros de esturiones de 4 años expuestos a temperaturas altas (verano) y temperaturas bajas (invierno), extraídos en 2018 de peces mantenidos en la granja Esturiones del Río Negro. Debido a que se contaban con entre 18 y 20 muestras para cada condición, y dado que no era posible analizarlas de forma individual mediante WB, se realizaron 4 pools de suero para cada condición, mezclando 30  $\mu$ L de 4 o 5 muestras de suero individuales para cada pool.

Las muestras de suero se sembraron en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y la electroforesis se realizó en condiciones no reductoras. Para ello se emplearon geles concentradores al 4% (m/v) y separadores al 12.5% (m/v) de 1.5 mm de espesor. Previo a la electroforesis 10  $\mu$ L de una solución 1/10 de cada muestra de suero se llevó a un volumen final de 24  $\mu$ L 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), y cantidad suficiente de PBS y se calentaron a 80-90°C durante 5

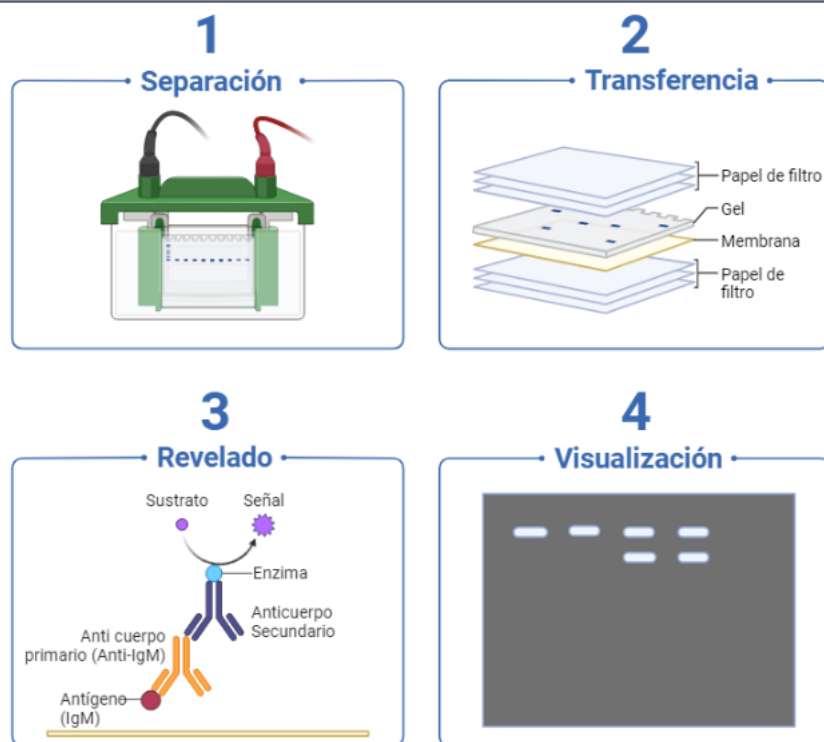


Figura 2.6: Representación general de la técnica de Western Blot. Creada en <https://biorender.com/>

minutos. En paralelo, también se sembró 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 15 minutos a 80 V y luego durante 55 minutos a 150 V a temperatura ambiente en un sistema MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad, EEUU). Una vez culminada la corrida electroforética, los geles 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 buffer de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % (v/v)) y se dispusieron en un cassette 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 cassettes se montaron en un sistema MiniPROTEAN Trans-Blot (BioRad) y se transfirieron O/V a 56V y 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau (Ponceau S 0. % (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), se bloquearon con una solución PBS conteniendo leche descremada 5 % (m/v) y Tween20 0.05 % (v/v) durante 1h a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-IgM de esturión ruso (pool obtenido mezclando todos los sueros de ratones con alto título a una dilución final 1/4000)

## 2.6. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo.

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 incubó con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1/2000) en PBS, BSA 0.2 %, Tween20 0.05 % durante 1 hora 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 IgM en los distintos grupos de temperatura se analizaron mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, EEUU). Con el objetivo de comparar los niveles de IgM en el suero de esturiones expuestos a diferentes condiciones, se repitió el análisis tres veces (réplicas analíticas) y los datos obtenidos de la densitometría fueron analizados.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.



# Capítulo 3

## Resultados

En el presente capítulo se desarrollan los resultados obtenidos en este trabajo. Como se comentó en la sección 1.6, el objetivo general del mismo fue producir anticuerpos policlonales anti-IgM de esturión ruso en ratón con la finalidad de utilizarlos para evaluar los niveles de IgM sérica en esturiones cultivados en las granjas acuícolas durante invierno y verano.

### 3.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

Para la purificación de IgM se partió de sueros individuales de esturiones rusos de 4 años mantenidos en la granja Esturiones del Río Negro obtenidos durante invierno. Al evaluar la fracción final obtenida empleando cada uno de los cuatro métodos de purificación descritos en la sección 2.2 se observaron diferencias sustanciales entre las distintas metodologías. En particular, se observaron claras diferencias de tamaño de los precipitados obtenidos, así como en las bandas observadas en el análisis por SDS-PAGE. A continuación, se describen los resultados obtenidos para las cuatro metodologías de purificación empleadas en este trabajo.

#### 3.1.1. Resultados obtenidos para la Metodología 1.

Este método se basó en la diálisis extensiva del suero de esturión ruso empleando un buffer de baja fuerza iónica (Tris-HCl 5 mM) para obtener la fracción llamada eugobulina [104]. Al inducir la precipitación se pudo observar la obtención de un precipitado no homogéneo: una parte de precipitado presentó aspecto particulado y otra parte consistencia viscosa. Tras el posterior lavado de este precipitado con el buffer de diálisis, se redujo la cantidad de precipitado en aproximadamente un 40%, obteniéndose un precipitado más homogéneo de aspecto particulado y color amarillo (eliminando la fracción más viscosa). Este precipitado no presentó dificultades para ser resuspendido en PBS. Las distintas fracciones de la purificación se evaluaron mediante SDS-PAGE con y sin agentes reductores seguida de tinción con azul de Coomassie con el objetivo de determinar la presencia de bandas

## Capítulo 3. Resultados

concordantes con el PM esperado para la IgM de esturión y evaluar la presencia de otros contaminantes proteicos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.1 donde se observa que el precipitado final obtenido muestra el mismo perfil de bandas proteicas que el suero de partida.

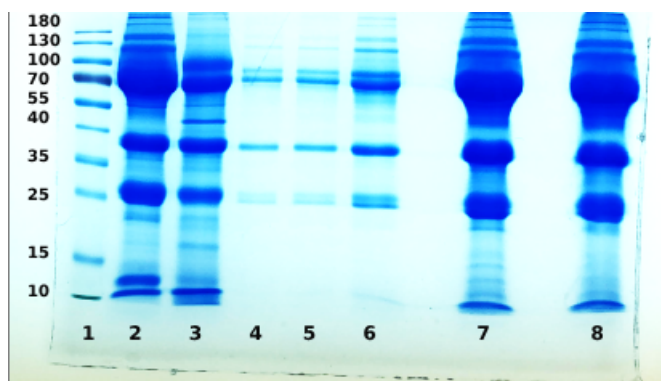


Figura 3.1: **Evaluación de la purificación mediante la metodología 1 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal.** Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 1 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras. En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida, sembradas de la siguiente manera: (1) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa), (2) suero de esturión, (3) sobrenadante post diálisis con Buffer Tris a baja concentración iónica, (4,5,6) lavados del precipitado post diálisis con Buffer Tris a baja concentración iónica (7) precipitado post diálisis con Tris, (8) fracción final obtenida post diálisis contra PBS

### 3.1.2. Resultados obtenidos para la Metodología 2

Este método se basó en la precipitación del suero de esturión ruso empleando una solución de sulfato de amonio al 50 % [105]. En este caso, se obtuvo un precipitado abundante de color amarillo homogéneo. El precipitado no presentó dificultades para ser resuspendido en PBS 1X. Como se muestra en la Figura 3.2, en la fracción final purificada se observaron varias bandas a pesos moleculares que difieren de los obtenidos para la cadena pesada y liviana de IgM de esturión, indicando que la purificación no fue suficiente para separar la inmunoglobulina IgM de esturión de otros componentes séricos.

### 3.1.3. Resultados obtenidos para la Metodología 3

Este método se basó en la precipitación del suero de esturión ruso (diluido al  $\frac{1}{4}$  con PBS) empleando una solución de sulfato de amonio al 50 % seguida de un paso de precipitación con PEG 12 % [106]. En este caso, el precipitado obtenido con sulfato de amonio fue de color blancuzco, y presentó dificultades para ser resuspendido en PBS, lo cual se logró tras el agregado de un volumen de 3 mL de PBS y agitación de 5 minutos. Luego de la precipitación con PEG no se observaron cambios macroscópicos en el precipitado obtenido. Como se observa en la Figura

### 3.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

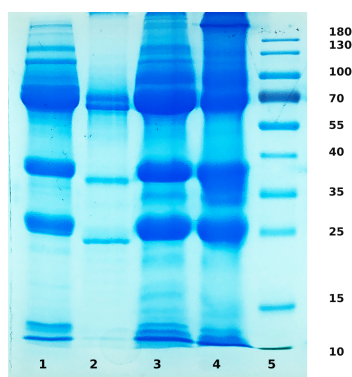


Figura 3.2: **Evaluación de la purificación mediante la metodología 2 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal. Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 2 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras.** En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida, sembradas de la siguiente manera: (1) suero de esturión, (2) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (3) precipitado post precipitación con sulfato de amonio, (4) fracción final (5) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa),

3.3, el análisis mediante SDS-PAGE mostró que tanto en el precipitado con sulfato de amonio, como en la fracción final obtenida tras la aglutinación con PEG se observó presencia de muchas bandas, concluyendo que la purificación de IgM de esturión ruso a partir del suero no fue efectiva empleando este método.

#### 3.1.4. Resultados obtenidos para la Metodología 4.

Este método se basó en la precipitación del suero de esturión ruso empleando una solución de sulfato de amonio al 33 % seguida de una diálisis del sobrenadante con un buffer Tris de baja fuerza iónica, siguiendo un protocolo puesto a punto por investigadores del Polo Tecnológico de Pando para purificar IgM de esturión siberiano (MSc. Silvina Rossi, comunicación personal). En este caso, se emplearon dos sueros de esturión ruso distintos, uno con coloración amarilla característica de estos sueros (suero n°19) y otro sin esta coloración (suero n°17). Esto se realizó debido a que, por experiencia previa del grupo los sueros amarillos poseen una proteína muy abundante (de tamaño aproximado entre 35-40 kDa en SDS-PAGE), que no está presente en los sueros sin esta coloración. La evaluación macroscópica de los precipitados obtenidos mostró diferencias con las metodologías previamente descritas. En el primer paso de precipitación con sulfato de amonio al 33 % se observó un precipitado abundante de color blanco para el suero n°17 y amarillo para el suero n°19 (Ver figura 3.4).

Luego de la diálisis del sobrenadante contra el buffer Tris-HCl 5 mM se obtuvo un precipitado particulado de coloración blancuzca para ambas muestras de suero. En ambas muestras los precipitados finales no presentaron dificultades para ser resuspendidos en PBS 1X. Como se muestra en la Figura 3.5, el análisis por SDS-PAGE mostró que en la fracción final obtenida mediante esta metodología

### Capítulo 3. Resultados

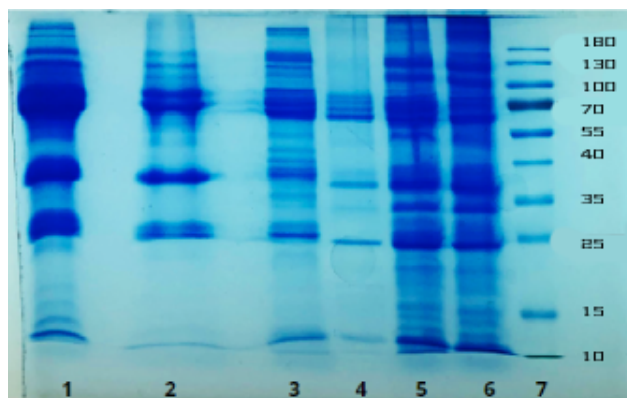


Figura 3.3: **Evaluación de la purificación mediante la metodología 3 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal** Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 3 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras. En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida n°19 (suero amarillo), sembradas de la siguiente manera: (1) Suero de esturión, (2) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (3) resuspensión del precipitado post-precipitación con sulfato de amonio, (4) sobrenadante post-aglutinación con PEG, (5) fracción final post-aglutinación con PEG, (6) fracción final post-aglutinación con PEG en condiciones no reductoras, (7) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa)



Figura 3.4: **Resultados macroscópicos obtenidos en la precipitación de suero de esturión empleando sulfato de amonio 33 % de acuerdo con el protocolo de la metodología 4.** A la izquierda se muestra resultado de precipitación derivado de muestra de suero de esturión n°17 (suero de partida de color blancuzco), a la derecha resultado de precipitación derivado de muestras de suero de esturión n°19 (suero de partida de coloración amarilla).

se observaron bandas de PM aparente de 25 kDa y 70 kDa que coinciden con los pesos registrados en literatura para la cadena liviana y la cadena pesada de IgM de esturión. Respecto a la cantidad de IgM purificada, durante este trabajo se realizaron 3 purificaciones diferentes usando distintos sueros individuales de partida ( $56 \pm 20$  mg/mL), en los que se estimó una concentración de  $3.4 \pm 1.3$  mg de IgM por mL suero, lo que representaría un  $6.1 \pm 0.7\%$  de las proteínas totales séricas.

### 3.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión ruso

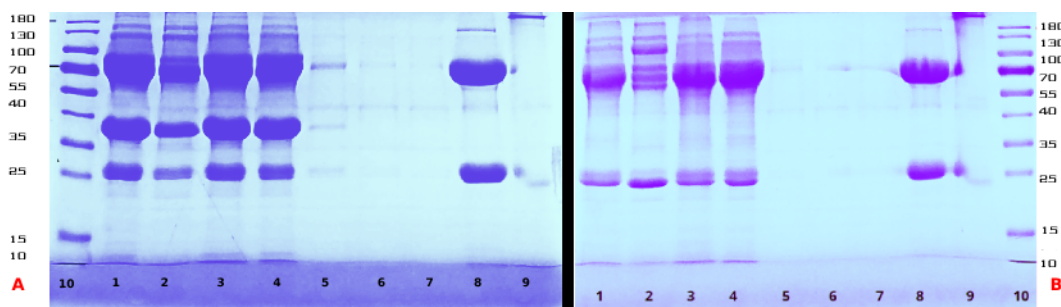


Figura 3.5: **Evaluación de la purificación mediante la metodología 4 por SDS-PAGE teñido con azul Coomassie Coloidal. Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 4 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5% (m/v) bajo condiciones reductoras.** En A se muestra el análisis de las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida n°19 (suero amarillo), mientras que en B se muestra el análisis empleando el suero de partida n°17. Las distintas fracciones se sembraron de la siguiente manera: (1) Suero de esturión, (2) precipitado post-precipitación con sulfato de amonio, (3) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (4) sobrenadante post-dialísis con Tris-HCl 5 mM, (5, 6 y 7) lavados con buffer Tris-HCl 5 mM, (8) fracción final obtenida, (9) fracción final obtenida bajo condiciones no reductoras (10) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa)

En suma, en las fracciones finales obtenidas empleando las metodologías 1, 2 y 3 se observó alta presencia de contaminantes. Si bien en los geles SDS-PAGE se pudieron ver ligeras diferencias en la intensidad y nitidez de las bandas correspondientes a las cadenas de IgM, en todos los casos fue claro que la purificación no fue efectiva. Por el contrario, en el análisis por SDS-PAGE de la fracción final obtenida empleando la metodología 4, se observaron bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados para IgM de esturión en condiciones tanto reductoras, como no reductoras. Estos resultados sugirieron que empleando la metodología 4 se logró una buena purificación de la IgM de esturión ruso. Para confirmar estos resultados, se procedió a la identificación de las bandas observadas en SDS-PAGE mediante espectrometría de masas.

#### 3.1.5. Evaluación de la purificación mediante espectrometría de masas MALDI TOF TOF

Como se comentó antes, debido a los resultados obtenidos aplicando la metodología 4, se procedió a analizar las bandas de SDS-PAGE obtenidas por espectrometría de masas. Para esto se realizó un nuevo SDS-PAGE maximizando los cuidados para evitar contaminaciones, en el que se observaron bandas con pesos moleculares cercanos a 25 kDa y 70 kDa para las condiciones reductoras y bandas de 180 kDa y 25 kDa para las condiciones no reductoras (Ver figura 3.6(A)). Las bandas principales obtenidas se cortaron cuidadosamente y se enviaron al servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo para su análisis por MALDI TOF/TOF MS. Las búsquedas de los péptidos obtenidos se realizaron empleando una base de datos que contiene la información

### Capítulo 3. Resultados

del genoma de *Acipenser ruthenus* [149] a la que se le unió una base de datos de nuestro grupo obtenida a partir del transcriptoma hepático de *A. gueldenstaedtii* [6]. Usando esta base de datos las bandas 1, 3 y 5 se identificaron como cadena pesada  $\mu$  de IgM de *A. ruthenus* (ver Figura 3.6B). Debido a que para las bandas 2 y 4 no se logró identificación con las bases de datos local, la búsqueda se realizó en la base de datos de Vertebrados- EST. En este caso ambas bandas se identificaron como secuencias de *A. transmontanus* que se alinearon con el precursor de la cadena liviana de anticuerpos y con la cadena liviana kappa de *A. ruthenus*, respectivamente (ver Figura 3.6(B)). Estos resultados indican que las bandas obtenidas en el SDS-PAGE corresponden a las secuencias de IgM de cadena liviana y pesada, que son los principales componentes de los anticuerpos IgM de esturión. Estos resultados confirmaron que la purificación empleando la metodología 4 fue adecuada para purificar los anticuerpos IgM de esturión ruso.

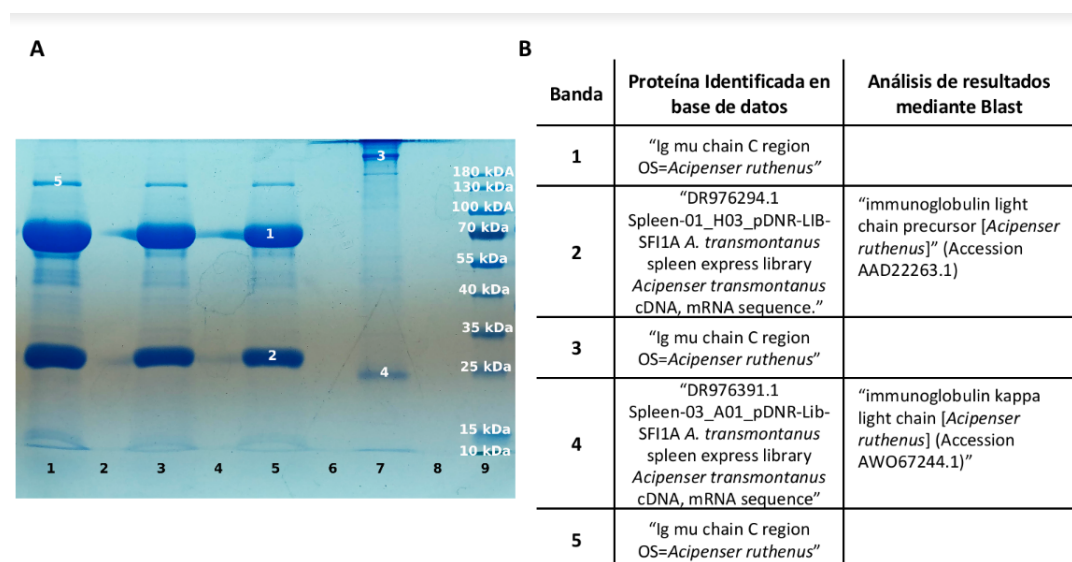


Figura 3.6: Análisis de la fracción obtenida aplicando la metodología 4 mediante espectrometría de masas. (A) La fracción obtenida tras la purificación mediante la metodología 4 fue analizada mediante SDS-PAGE al 12,5% (m/v) en condiciones reductoras (0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.01  $\mu\text{g}$  de muestra en carriles 1, 3 y 5, respectivamente) y no reductoras (0.01  $\mu\text{g}$  de muestra en carril 7). Las bandas teñidas con Coomassie Coloidal se cortaron del gel y se enviaron para análisis mediante MALDI-TOF/TOF MS. (B) Tabla de identificación de bandas de proteínas obtenidas en (A), En la columna 1 se muestra la numeración de las bandas, en la columna 2 se muestra la proteína identificada en cada banda mediante la búsqueda en bases de datos correspondientes y en la columna 3 se muestra el análisis de resultados mediante Blast para aquellos componentes identificados con la base de datos Vertebrados EST

## 3.2. Obtención de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratones

Como siguiente etapa de este trabajo se procedió a inmunizar ratones con la fracción de IgM purificada mediante la metodología 4. Se buscó obtener antisueros de ratón conteniendo un alto título de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso.

En este caso se utilizaron ratones debido a su rápida reproducción y disponibilidad en el laboratorio. Se utilizaron 3 lotes de ratones que se inmunizaron con distintas cantidades de IgM de esturión (100, 50 y 25  $\mu\text{g}$ ). El seguimiento de la inmunización se realizó mediante ELISA de anticuerpos, cuantificando el título de los antisueros contra IgM de esturión purificada. En la figura 3.7 se muestran los gráficos correspondientes a la titulación del nivel de anticuerpos anti-IgM de esturión de sueros de los ratones inmunizados. En la figura 3.8 se muestran los gráficos obtenidos de la evolución del título de anticuerpos anti-IgM de esturión a lo largo del tiempo de la inmunización. En primer lugar se puede observar que desde el primer punto de extracción (día 16) se obtiene una densidad óptica mayor que en el tiempo 0, indicando que en los 3 grupos de ratones hubo una respuesta primaria de anticuerpos. El pico de respuesta primaria se obtuvo entre los 16 y 32 días de exposición al antígeno, esto ocurre en los 3 grupos de ratones, independientemente de la cantidad inicial inoculada. Respecto a la variabilidad entre individuos, es notable la variabilidad en: a) el tiempo en el que se produce el pico de respuesta primaria, b) el propio valor de título de anticuerpos; reflejando las diferencias biológicas típicas entre individuos en respuesta a un antígeno, independientemente de la dosis de antígeno empleada. A partir del día 56, se observa una tendencia a la baja en el título en los 3 grupos, siendo el punto de extracción 5 (día 134) el punto de menor valor. Tras la administración de la dosis de refuerzo (día 156) se observaron las respuestas de anticuerpo más altas en todos los grupos de ratones, obteniendo títulos mayores en varios órdenes de magnitud respecto a la respuesta inicial. Esto evidencia una respuesta secundaria más fuerte, típica de una respuesta inmunitaria de generación de anticuerpos IgG. (Ver figura 3.8)

## 3.3. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantitativo

Con el objetivo de poder comparar los niveles de IgM de esturión en suero de muestras de invierno y verano, es necesario contar con una metodología robusta, repetible y reproducible que permita cuantificar los niveles de inmunoglobulina IgM de esturión. La elección de este trabajo fue la técnica de Western Blot semicuantitativo. Dicha metodología, si bien presenta varias ventajas a la hora de detectar la presencia o ausencia de anticuerpos en muestras biológicas, implica varios desafíos a la hora de cuantificar, y para ello se necesita de la puesta a punto de las condiciones óptimas de trabajo, tal como se describe a continuación.

### Capítulo 3. Resultados

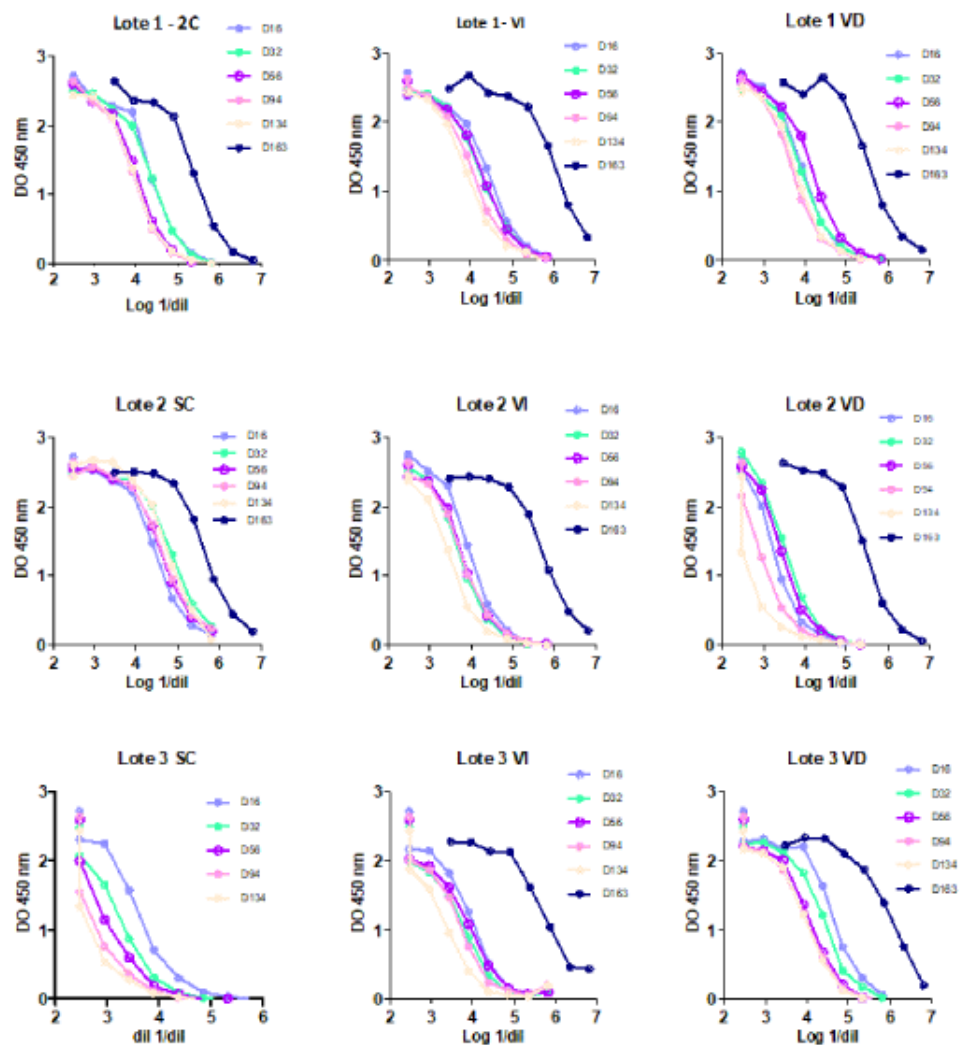


Figura 3.7: **Análisis para la determinación del título de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratones inmunizados mediante ELISA.** Los gráficos muestran la Densidad óptica a 450 nm vs Log del inverso de la dilución para cada extracción de suero. Cada fila representa un lote de ratones. Los lotes 1,2 y 3 se inmunizaron con 100, 50 y 25 de IgM de esturión respectivamente. Las siglas SC, VI, VD corresponden a las marcas de ratones: SC: sin corte, VI: corte izquierdo, VD: corte derecho. El título de anticuerpos específicos se definió como el área debajo de cada curva y se calculó empleando el programa GraphPad. Nota: el ratón SC del Lote 3 no llegó al punto final, por eso no se cuenta con datos para el día 163.

#### 3.3.1. Puesta a punto de la metodología para la determinación semicuantitativa de IgM de esturión en suero por Western Blot

Para la puesta a punto de la metodología, fue necesario determinar: a) la concentración de trabajo del anticuerpo primario y b) la carga de fracción de IgM



### 3.3. Efecto de la temperatura en los niveles séricos de IgM de esturión mediante Western Blot semicuantativo

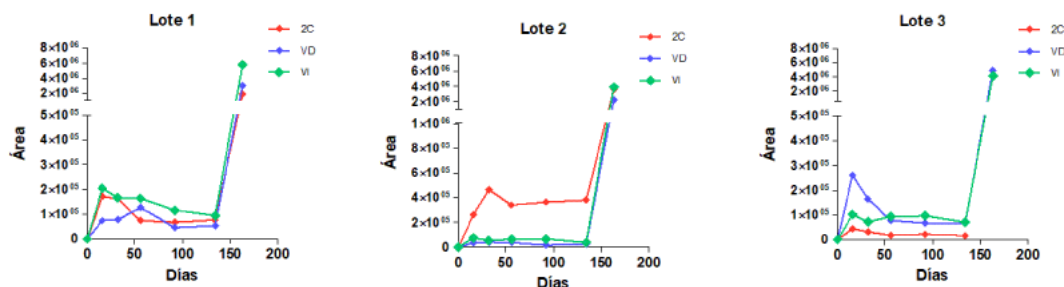


Figura 3.8: **Análisis de niveles de anticuerpos anti IgM de esturión en ratones inmunizados por ELISA a lo largo del tiempo.** Se grafica el título de anticuerpos definido como área de la curva de los gráficos de la figura 3.7 post inmunización. Cada gráfico muestra los resultados obtenidos para un lote de ratones. Las siglas SC, VI, VD corresponden a las marcas de ratones: SC: sin corte, VI: corte izquierdo, VD: corte derecho

y sueros de esturión, para obtener una intensidad adecuada para la cuantificación por densitometría, lo que implica que la densidad sea detectable y no se observe saturación. Para la determinación de la concentración de trabajo de anticuerpo primario se efectuaron incubaciones con un pool de sueros de ratones inmunizados en los que se obtuvo mayor título, utilizando dos diluciones: 1/4000 y 1/1000. Para (b), por otra parte, se hicieron pruebas de carga de IgM donde se sembraron diluciones seriadas al décimo de la fracción de IgM purificada obtenida. Se partió de una carga aproximada de  $27 \mu\text{g}$  de IgM hasta llegar a una carga de  $0.027 \mu\text{g}$  de IgM por carril. Los resultados mostraron que una incubación con el pool de sueros de ratones inmunizados 1/4000 y una carga de  $27 \mu\text{g}$  de la fracción de IgM purificada son las condiciones que representan una banda de intensidad y nitidez adecuada, ver figura (3.10 siendo estas las concentraciones óptimas de trabajo en los futuros análisis. En el caso de los sueros de esturión, se observó que los anticuerpos anti-IgM obtenidos reconocen mayoritariamente la banda de IgM en condiciones no reductoras. Por esta razón se decidió trabajar en estas condiciones y emplear una dilución 1/10 de suero para obtener una banda mejor definida que permita una mejor cuantificación de los Westerns Blots siguientes.

Adicionalmente, se procedió a la determinación de reactividad cruzada del anticuerpo secundario. La reactividad cruzada entre antígenos se produce cuando un anticuerpo generado contra un antígeno específico tiene capacidad de reconocer un antígeno diferente, por lo que el anticuerpo puede reconocer una proteína que es diferente a la de interés. [163] En nuestro caso de estudio, se considera la posibilidad de reacción cruzada entre el anticuerpo secundario y alguno de los componentes del suero de esturión. Para examinar la reactividad cruzada del anticuerpo secundario, se realizó un ensayo Western Blot, sembrando pooles de suero de esturión tal cual se describe en la sección 2.5. pero sin el agregado de anticuerpo secundario (anti-IgM de esturión). En la Figura 3.9 se muestran los resultados del Western Blot obtenido. Se constató de que tanto en presencia de agente reductor

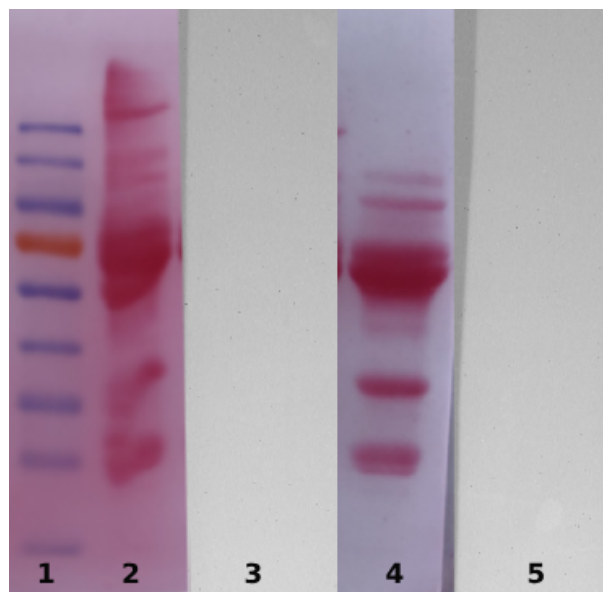


Figura 3.9: **Prueba de control de reacción cruzada de anticuerpo secundario.** Se muestra el revelado por Western Blot de muestras de suero de esturión tras eliminar la presencia de anticuerpo primario. (1) MPM (2,4) Sueros de esturión revelado con Rojo Ponceau en condiciones no reductoras y reductoras respectivamente, (3,5) revelado de muestras de suero de esturión por WB

como en ausencia de agente reductor no hubo evidencia de reacción cruzada entre el anticuerpo secundario y alguno de los componentes del suero utilizados en la siembra.

### 3.4. Efecto de la temperatura en la expresión de niveles séricos de IgM de esturión

La cuantificación de los niveles séricos de IgM por densitometría permite evaluar si las condiciones de invierno - verano se asocian con variaciones significativas en la concentración sérica de estas proteínas.

Para ello se partió del muestreo de 4 pools del suero de los peces, para cada condición. Las variaciones en los niveles de IgM en grupos de esturión a distintas condiciones se analizaron mediante densitometría utilizando el programa ImageJ. Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante densitometría cada ensayo de Western blot fue repetido tres veces. En la figura 3.11 se muestran los resultados representativos de las membranas reveladas con sustrato quimioluminiscente.

Se puede observar una tendencia al aumento de concentración de IgM sérica en el grupo de verano. Dicha tendencia es contraria a la diferencia observada en la cuantificación de proteínas totales en el suero obtenida en la determinación por BSA, donde se observa una disminución en el verano respecto al invierno.3.11C.

### 3.4. Efecto de la temperatura en la expresión de niveles séricos de IgM de esturión

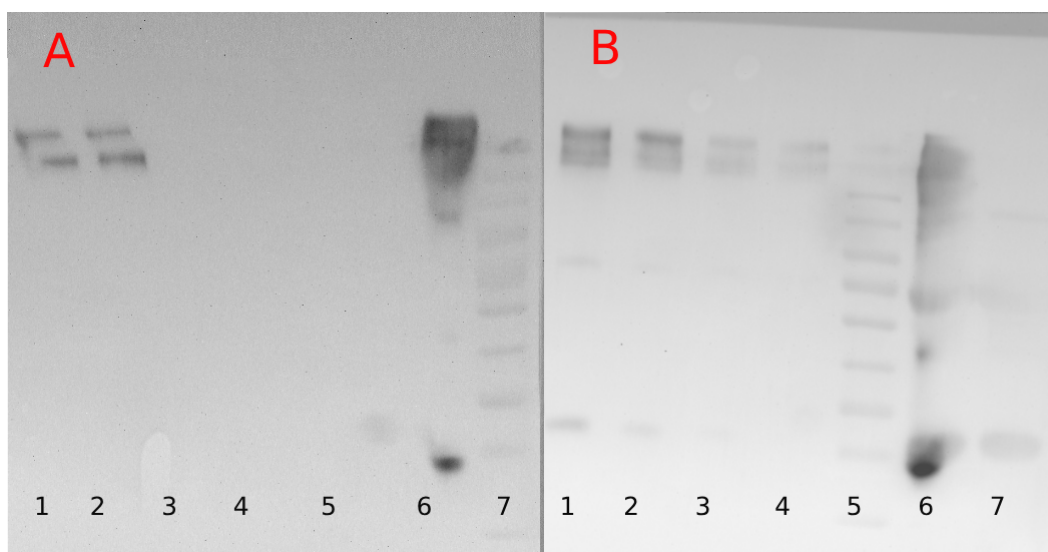


Figura 3.10: **Puesta a punto de condiciones óptimas de trabajo para la metodología de Western Blot.** En A se muestra un Western Blot representativo donde se incubó con sueros de ratones inmunizados en una dilución de 1/4000. Se parte de SDS-PAGE 12.5% (m/v) bajo condiciones reductoras. Se sembraron 4 diluciones seriadas de la fracción final de IgM purificada (carriles 1 a 4: 27  $\mu\text{g}$ , 2.7  $\mu\text{g}$ , 0.27  $\mu\text{g}$ , 0.027  $\mu\text{g}$ ), carril 5 pool de suero de esturión en condiciones reductoras, carril 6 pool de sueros de esturión, carril 7 MPM. En B se muestra un Western Blot representativo donde se incubó con sueros de ratones inmunizados en una dilución de 1/1000. Se sembraron 4 diluciones seriadas de la fracción final de IgM purificada (carriles 1 a 4), carril 5 MPM, carril 6 pool de sueros de esturión, carril 7 pool de sueros de esturión en condiciones reductoras

Interesantemente, al normalizar por la concentración de proteínas totales, se observa un aumento significativo de IgM. 3.11D. Por otro lado, se observa una alta variabilidad entre los pools analizados, por lo que no se descarta que la tendencia observada esté relacionada con la forma en que el sistema inmunológico responde a la infección de diferentes individuos, algunos individuos podrían tener una respuesta más rápida que otros. En cualquier caso aunque los resultados no son significativamente diferentes entre los grupos, la tendencia observada podría aportar información valiosa para futuros estudios sobre la respuesta inmunológica y la salud de los esturiones, lo que podría ser de gran importancia para la protección, producción y conservación de esta especie.

### Capítulo 3. Resultados

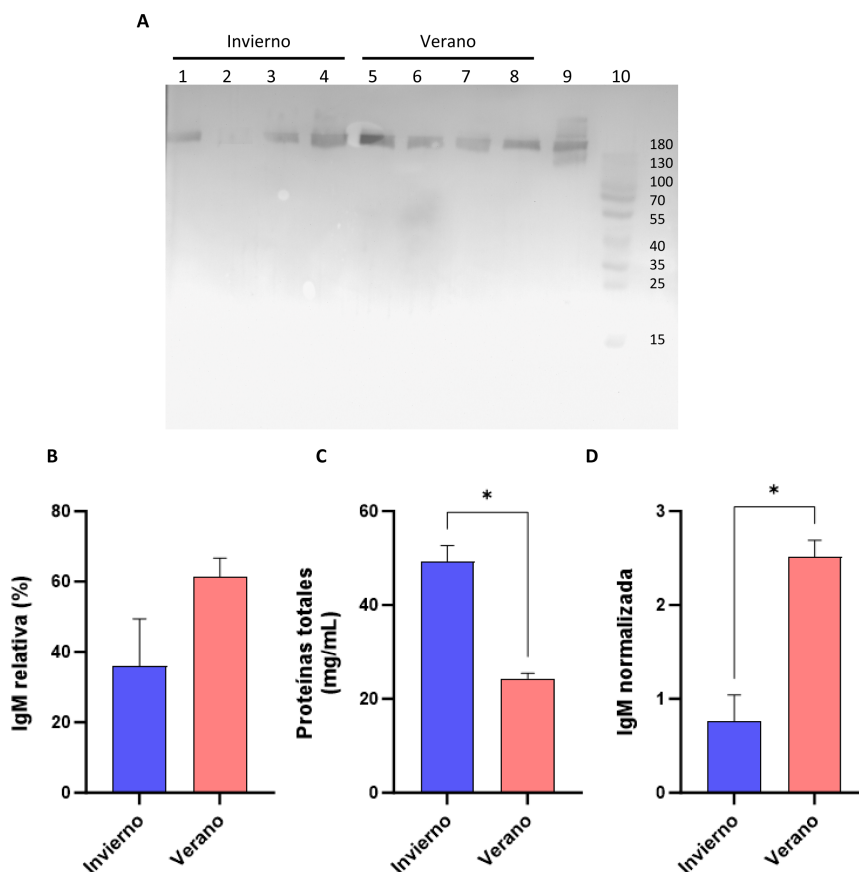


Figura 3.11: **Análisis de la variabilidad de los niveles séricos de IgM de esturión durante invierno y verano.** En A se muestra un Western Blot representativo donde se sembraron 4 pools de suero del grupo de invierno (carriles 1 a 4) y 4 del grupo verano (carriles 5 a 8). En el carril 9 se muestra la fracción de IgM purificada analizada en paralelo y en el carril 10 el MPM. En B se grafican los niveles de IgM cuantificados empleando el programa ImageJ a partir de tres imágenes de Western blot independientes. Los niveles de IgM están expresados como valores porcentuales relativos a la banda de IgM purificada sembrada en cada Western Blot. En C se grafica la concentración de proteínas totales de los pools de invierno y verano, cuantificados mediante el método de BCA. En D se grafican los niveles de IgM cuantificados mediante Western Blot normalizados por el nivel de proteínas totales correspondiente a cada pool de invierno y verano. Los asteriscos (\*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de Mann-Whitney.

# Capítulo 4

## Discusión de resultados

### 4.1. Purificación de inmunoglobulinas IgM de esturión

La purificación de inmunoglobulinas IgM en esturión es un proceso desafiante debido a la concentración de estas proteínas en la sangre y las matrices biológicas en la que se encuentran. Y, a pesar de que la literatura de experimentos previos que se hayan planteado este objetivo en *Acipenser* es limitada, en este trabajo se han obtenido resultados que siguen la línea de caracterizaciones obtenidas en dicha literatura. En el SDS-PAGE en condiciones reductoras, los tamaños obtenidos para las cadenas H (70 kDa) y L (25 kDa) de IgM de esturión ruso corresponden a los obtenidos en estudios que han purificado IgM a partir de suero de esturión siberiano (*Acipenser baerii*) [104], esturión estrellado (*Acipenser stellatus*) [105], esturión blanco *Acipenser transmontanus* [103] y esturión híbrido (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) [106]. Comparando estos resultados con otras especies de peces, se ha observado que el PM aparente de la cadena H y L para peces óseos varía en un rango de 60-77 kDa y 23-26 kDa, respectivamente. [164]

Adicionalmente, en los análisis por SDS-PAGE se observa una banda de 130 kDa diferente a las cadenas H y L, cuya identificación mediante espectrometría de masas MALDI TOF TOF (ver figura 3.6) coincide con la cadena H de esturión. (Ver figura 3.6) Es posible que esta banda sea el resultado de una disociación incompleta de las subunidades H-L o a su reasociación después de la disociación. De forma análoga, se podría explicar la banda observada en condiciones no reductoras donde además de la presencia de una banda principal de 180 kDa, se observa una banda de aproximadamente 22 kDa cuya identificación por MALDI TOF TOF coincide con la identificación de la cadena liviana  $\kappa$  de *Acipenser ruthenus*. La diferencia en la migración en el gel de electroforesis entre esta banda y la correspondiente a la cadena L de la IgM, no puede atribuirse a diferente tamaño molecular. El tratamiento con agentes reductores modifica la conformación de las proteínas al romper no solo enlaces disulfuro entre cadenas polipeptídicas sino también intracatenarios. Por tanto no es comparable cómo migra una proteína en condiciones reducidas vs no reducidas.

Por otro lado, es notable que la aplicación de las metodologías detalladas en

## Capítulo 4. Discusión de resultados

los trabajos previamente observados en otras especies de esturión, estrechamente relacionadas, no sea adecuada para la purificación de IgM de esturión ruso. En este caso, se considera un punto clave de la purificación, la conservación del sobrenadante en la precipitación inicial con sulfato de amonio. Este paso de precipitación lograría separar componentes de mayor tamaño que precipitarían con sulfato de amonio y no se arrastrarían para el paso de diálisis a baja fuerza iónica. Esto sugiere posibles diferencias en la composición del suero entre especies de esturiones, que tienen como consecuencia la necesidad de adaptar las metodologías de purificación de inmunoglobulinas IgM de acuerdo a la especie. En suma, los resultados del presente trabajo indican que la precipitación con sulfato de amonio 33 % combinada con diálisis contra buffer Tris a baja fuerza iónica del sobrenadante es una metodología simple y de alto rendimiento para purificar las IgMs del suero de esturión ruso. Además, en este trabajo se estimó que la IgM representa un 6.1 % de las proteínas totales en los sueros de esturión ruso empleados para las purificaciones, siendo de un orden similar a lo estimado en algunos peces teleósteos. [165–167]

### 4.2. Efecto de la temperatura en los niveles IgM séricos de esturión

Debido a su naturaleza poiquilotérmica, los peces requieren una consideración especial ante los desafíos térmicos. Los cambios de temperatura tanto agudos como crónicos afectan negativamente las funciones inmunitarias de los peces y la capacidad de luchar contra agentes patógenos. [168] Si bien existe un vacío de conocimiento respecto a cómo la temperatura afecta la capacidad de respuesta inmune de los esturiones, la literatura que aborda dicha problemática apunta a que la temperatura desempeña un papel crítico en el desarrollo de las respuestas inmunitarias. La acuicultura del esturión ruso en Uruguay implica someterlo a temperaturas de agua más altas que su rango fisiológico óptimo donde la exposición crónica a estas temperaturas tiene un efecto negativo en el sistema inmune innato de los peces, aumentando la mortalidad causada por infecciones. [7] Por lo tanto, comprender mejor el efecto de la temperatura en la relación entre el esturión ruso y su sistema inmune, es esencial para lograr un cultivo exitoso y la conservación de esta especie.

En este trabajo quisimos analizar la relación entre la temperatura y los niveles séricos de IgM en el esturión ruso, esta relación depende probablemente de varios factores, como ser las condiciones ambientales, la densidad de población en el cultivo, cuál es su temperatura fisiológica óptima, la presencia de patógenos, así como la ocurrencia en paralelo de otros procesos biológicos como el desarrollo y la producción gonadal. Interesantemente, los antecedentes en otros peces muestran que la producción de IgM puede disminuir o aumentar dependiendo de estos y otros múltiples factores. [168, 169]

Variaciones en los niveles de IgM provocadas por la temperatura se han observado en teleósteos. En el pez dorado, los niveles séricos de IgM muestran cambios significativos, bajo la exposición crónica y aguda de temperaturas subóptimas, in-

## 4.2. Efecto de la temperatura en los niveles IgM séricos de esturión

dependientemente del sexo. Se encontró que un aumento artificial tanto crónico como agudo de la temperatura (de 15 a 25 grados), provocó un aumento agudo y sostenido de la IgM plasmática. [170] Sin embargo, la expresión de hormonas propias de la estación reproductiva opacó la influencia en la producción de IgM de la propia temperatura. Esto lo indican cambios en los niveles de IgM tras el aumento de esteroides durante la temporada de desove del pez dorado, que disminuyen con el cese del desove en verano, mientras que la temperatura del agua aumenta. [170]

En otro orden, se han reportado tanto aumentos como disminuciones de la producción de IgM en peces frente a un estímulo sostenido de temperatura mayor a la óptima fisiológica. En un estudio, se investigó el impacto de diferentes factores ambientales en las concentraciones séricas de IgM en la tilapia del Nilo, los resultados mostraron que los peces expuestos a 33 °C presentaron una disminución significativa de las concentraciones de IgM en comparación con aquellos criados a temperaturas de 18.4 °C, 23 °C y 28 °C. [116] De forma similar, se reportó que la crianza a altas temperaturas (30 °C) suprimió la producción de IgM en la mucosa del bagre de canal inmunizado con antígenos DNP-KLH. [171] Un ejemplo donde la concentración de IgM aumenta proporcionalmente a la temperatura es en la trucha arcoíris, una especie de peces cuyo rango óptimo de rendimiento fisiológico de 5 °C a menos de 20 °. Se encontró una regulación positiva del gen responsable de codificar la IgM secretada en peces cuando son expuestos a 25 °C. [120] También en la trucha arcoíris, se obtuvo un hallazgo similar cuando se utilizó una vacuna de ADN contra el VHSV. Se observó que a 15 °C, había un título de anticuerpos séricos más elevado en comparación con 10 °C, mientras que no se detectaron anticuerpos a 5 °C. Esto sugiere que la respuesta inmunológica generada es más efectiva a temperaturas más altas, y su eficacia puede disminuir en temperaturas más bajas, lo que fue representado en el porcentaje de supervivencia de la población tras la exposición posterior al virus. [120] En contraste, al estudiar la producción de anticuerpos específicos en la trucha arcoíris contra *Aeromonas salmonicida* inactivada, se observaron resultados diferentes. En este caso, la producción de anticuerpos pareció retrasarse a la temperatura normal de 15 °C en comparación con los 12 °C, pero ambas temperaturas alcanzaron niveles similares a los 90 días posteriores a la estimulación, lo que indica que los efectos de la temperatura en la producción de IgM no son universalmente similares. [172] Estos hallazgos resaltan la complejidad de cómo las temperaturas afectan la respuesta inmunológica adaptativa en diferentes contextos y especies.

En el esturión, a la fecha no hay estudios que hayan abordado específicamente el nexo entre la temperatura y las producciones de IgM. Sin embargo, como se detalla en la sección 1.5.5 varios estudios han indicado fluctuaciones en los niveles de producción de IgM en peces estresados por calor y, como tal, su producción en peces depende de la temperatura.

En el género *Acipenser*, se han encontrado relaciones entre exposición a condiciones de temperaturas elevadas y la enfermedad. Un grupo de investigación de la Universidad de Manitoba, Canadá ha encontrado varios hallazgos en el esturión del lago (*Acipenser fulvescens*). Por ejemplo, demostraron que la exposición a temperaturas crónicas más altas durante el desarrollo tiene consecuencias fisiológicas

## Capítulo 4. Discusión de resultados

para las poblaciones de esturión del lago, con alteración de la tasa metabólica, la tolerancia térmica, el tamaño corporal, HSI, y actividad de la glutatión peroxidasa hepática (GPx) una enzima que desintoxica los peróxidos oxidativamente dañinos formados como resultado del estrés térmico. [173] A su vez, al estudiar el impacto de la exposición de 22 días de lipopolisacáridos bacterianos a diferentes temperaturas, se encontró que los peces aclimatados a 16 °C mostraron una respuesta inmunológica más robusta y persistente frente al estímulo bacteriano en comparación con aquellos aclimatados a 20 °C. Además, se registró mayor mortalidad en los peces aclimatados en las temperaturas más altas, lo que sugiere una capacidad inmunológica comprometida a 20 °C en esta especie de esturión. [174] Finalmente, caben destacar los resultados de un estudio reciente donde se analizó exhaustivamente la respuesta transcripcional por mRNAseq de dos grupos de esturiones del lago en exposición de 30 días a distintas temperaturas de forma creciente, el grupo sur denominado como los individuos expuestos a 20-23°C , y el grupo norte en el rango de 16 - 20 °C. Se observó que el grupo expuesto a mayores temperaturas obtuvo un mayor número de transcripciones expresadas diferencialmente en comparación con la del norte. Es notable que la diferencia de transcriptos se apreció en ambos grupos a medida que las temperaturas aumentaban, concluyendo que a una mayor temperatura ocurre una mayor plasticidad transcripcional. Ambos grupos respondieron a temperaturas de aclimatación elevadas mediante la regulación negativa de la transcripción de genes involucrados en la síntesis de proteínas y la producción de energía. [175] Por otro lado, en el esturión ruso, estudios transcriptómicos, desarrollados por nuestro grupo también van en esa línea, ya que se encontró que varios genes que participan en la síntesis proteica disminuyen su expresión hepática en esturiones rusos mantenidos a temperaturas de 30 °C durante 5 semanas. [176] Este resultado le da apoyo a la diferencia observada en la determinación de la concentración de proteínas totales en el suero obtenidos del presente trabajo. En suma, la respuesta frente al estrés crónico por temperatura en el esturión parece abarcar una amplia variedad de procesos de relacionados a la maquinaria celular involucrada en la regulación transcripcional y traduccional, función mitocondrial, daño oxidativo e inmunocompetencia. [175] Adicionalmente otros estudios acompañan el impacto de la temperatura en la infectividad y propagación de *V. botryosa* en el esturión blanco (*Acipenser tramontanus*). En este caso, se encontró que los peces mantenidos a 18 °C durante 40 días experimentaron una mayor mortalidad y una infección más severa en comparación con los peces a 13 °C. Además, se observaron lesiones musculares y una diseminación sistémica más intensa a temperaturas más elevadas, sugiriendo que la temperatura influye en el desarrollo de la infección sistémica. [177]

En lo que refiere a los resultados de los experimentos realizados en este trabajo, si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgM séricas en relación a la temperatura, es posible observar una tendencia hacia el aumento de los niveles séricos de IgM durante el verano, en contraste con el resultado observado para los niveles de proteínas totales. Considerando que factores que influyen en la producción de IgM como la etapa de desarrollo y las condiciones de hacinamiento se mantuvieron constantes en los peces analizados, es posible que la exposición a altas



#### 4.2. Efecto de la temperatura en los niveles IgM séricos de esturión

temperaturas en el verano juegue un rol en la tendencia observada. Una hipótesis respecto a estos resultados es señalar la debilitación de las barreras primarias del sistema inmune del esturión. Datan registros de que el estrés por calor causa efectos adversos en la piel lo que refleja en la disminución de la secreción del moco y el desorden de la microbiota de la mucosa, lo que puede contribuir a las infecciones. [178]. Además, en el esturión ruso se ha observado un aumento en las infecciones por patógenos oportunistas durante el verano. Por lo tanto, sería razonable suponer la posibilidad de una mayor permeabilidad de la piel de los esturiones en verano, que acompaña con una mayor probabilidad o frecuencia a las infecciones bacterianas, lo que resulte en la necesidad de activación del sistema inmune adaptativo, haciendo que aumenten los niveles de IgM sérica. Para poder ampliar este estudio sería interesante realizar un análisis similar empleando sueros de esturiones obtenidos de distintos inviernos y veranos para poder evaluar si se observa un resultado similar.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Capítulo 5

## Conclusiones

En este trabajo se lograron purificar las IgM de esturión ruso a partir del suero lo cual permitió obtener anticuerpos anti-IgM de esturión ruso. Estos anticuerpos contribuirán a estudiar y comprender el sistema inmunológico frente a distintos patógenos, por ejemplo *A. hydrophila*. Además, podrían tener implicaciones significativas en el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos basados en la medición de anticuerpos específicos, utilizados para detectar infecciones bacterianas en la acuicultura del esturión ruso.

Por otro lado, los resultados del estudio comparativo de niveles séricos de IgM en diferentes estaciones del año proporcionan una nueva evidencia sobre cómo el cambio estacional, y posiblemente la temperatura influyen en la inmunidad del esturión ruso. Considerando datos de nuestro grupo y otros estudios similares, el estrés térmico por encima de las condiciones fisiológicas óptimas afecta negativamente la síntesis de proteínas y ciertos componentes de la respuesta inmune innata, aunque no parece disminuir la producción de inmunoglobulinas IgM. De hecho, se observa una tendencia al aumento de estas inmunoglobulinas en respuesta al estrés térmico, cuyo aumento es significativo al normalizar frente a la cantidad de proteínas totales, posiblemente debido a un aumento en las infecciones por patógenos oportunistas en esta época del año.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a profundizar en la comprensión del efecto del estrés térmico crónico sobre la respuesta inmunológica adaptativa de los esturiones rusos y aportan una herramienta molecular valiosa para investigar la respuesta inmunitaria general en esta especie de peces.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Capítulo 6

## Perspectivas

Aunque los resultados de este trabajo proporcionan valiosa información acerca del impacto de la temperatura en la producción de anticuerpos en el esturión ruso, es necesario llevar a cabo un análisis más profundo para obtener una comprensión completa de la interacción entre la temperatura y el sistema inmune adaptativo de estos peces.

En perspectiva, sería interesante analizar la especificidad de las IgM producidas, por ejemplo para discernir si durante el verano aparecen IgM dirigidas hacia patógenos específicos como *A. hydrophila*. También sería interesante emplear los anticuerpos anti-IgM obtenidos para estudiar la población de linfocitos B del esturión ruso, existe evidencia de que la IgM se expresa en la superficie de los linfocitos B de peces [19, 20], y que los linfocitos IgM+ son la población dominante en sangre y en tejidos linfoides sistémicos en peces teleosteos y cartilagosos [102, 179]; son esta clase de inmunoglobulinas las principales candidatas como marcadores de linfocitos B en el esturión ruso. El estudio de esta población celular es particularmente interesante, ya que un descubrimiento reciente muestra que los linfocitos B IgM de los peces tienen una potente capacidad fagocítica [180] y se ha sugerido que poseen una estrecha relación evolutiva con los linfocitos B-1 de los mamíferos [181]. Por esa razón sería importante analizar el efecto del estrés inducido por calor en la capacidad fagocítica, realizando experimentos con esturiones en similares condiciones de cultivo. Los anticuerpos anti-IgM generados, podrían a futuro ser empleados para identificar linfocitos B durante infecciones bacterianas, así como para observar la actividad fagocítica de estos linfocitos B. Sería útil emplear el modelo de infección para examinar cómo la temperatura influye en la activación, reclutamiento y/o migración de los linfocitos B, así como en la síntesis de anticuerpos de otros tipos.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

url backend=biber, style=numeric-comp, ]biblatex

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.



## Referencias

- [1] P. Bronzi and H. Rosenthal, “Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview,” *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 30, no. 6, pp. 1536–1546, 2014. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jai.12628>
- [2] D. N. de Recursos Acuáticos, “Boletín estadístico pesquero,” *MGAP-DINARA*, pp. 1–52 p, 2019. [Online]. Available: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/Bolet%C3%ADn%20Estad%C3%ADstico%20Pesquero%202016-2018.pdf>
- [3] Food and A. O. of the United Nations, “The state of world fisheries and aquaculture 2020,” <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>, 2020, [Accessed 02-Jul-2023].
- [4] P. Vaz, E. Kebreab, S. Hung, J. Fadel, S. Lee, and N. Fanguie, “Impact of nutrition and salinity changes on biological performances of green and white sturgeon,” *PLoS ONE*, vol. 10, 04 2015.
- [5] R. D. I. M. J. Muñiz, J. A. Jimber del Río, F. J. Jiménez Beltrán, and P. Vera Gilces, “The fisheries and aquaculture sector in latin america: Exports to east asia and production,” *PLOS ONE*, vol. 17, pp. 1–8, 07 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267862>
- [6] A. Costábile, M. Castellano, M. Aversa-Marnai, I. Quartiani, D. Conijeski, A. Perretta, A. Villarino, V. Silva-Álvarez, and A. M. Ferreira, “A different transcriptional landscape sheds light on russian sturgeon (*acipenser gueldenstaedtii*) mechanisms to cope with bacterial infection and chronic heat stress,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 128, pp. 505–522, 2022. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822004971>
- [7] M. Castellano, V. Silva-Álvarez, E. F. López, V. Mauris, D. Conijeski, A. Villarino, and A. M. Ferreira, “Russian sturgeon cultured in a subtropical climate shows weaken innate defences and a chronic stress response,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 68, 07 2017.
- [8] M. Castellano, “Estudio de dos componentes de las defensas innatas del esturión cultivado en un establecimiento de piscicultura en uruguay, - lic en

## Referencias

- bioquímica,” *Tesis de fin de grado, Universidad de la República, Facultad de Ciencias*, 2015.
- [9] M. Aversa, “Estudio de la respuesta inmune innata inducida por estrés térmico o componentes bacterianos en el esturión ruso,” *Universidad de la República, Facultad de Ciencias*, 2018.
- [10] M. Aversa-Marnai, M. Castellano, I. Quartiani, D. Conijesky, A. Perretta, A. Villarino, V. Silva-Álvarez, and A. M. Ferreira, “Different response of acipenser gueldenstaedtii crp/sap and saa to bacterial challenge and chronic thermal stress sheds light on the innate immune system of sturgeons,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 121, pp. 404–417, 2022. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821004447>
- [11] Y. Shen, N. Yang, Z. Liu, Q. Chen, and Y. Li, “Phylogenetic perspective on the relationships and evolutionary history of the acipenseriformes,” *Genomics*, vol. 112, 02 2020.
- [12] L. Vasilyeva, A. Elhetawy, and N. Sudakova, “History, current status, and prospects of sturgeon aquaculture in russia,” *Aquaculture Research*, vol. 50, pp. 979–993, 02 2019.
- [13] K. Du and e. a. Stöck, “The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization,” *Nature Ecology & Evolution*, vol. 4, no. 6, pp. 841–852, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1166-x>
- [14] P. Vecsei and D. Peterson, “Sturgeon ecomorphology: A descriptive approach,” *Environmental Biology of Fishes*, vol. 27, pp. 103–133, 01 2006.
- [15] E. N. Artyukhin, “Morphological phylogeny of the order acipenseriformes,” *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 22, no. s1, pp. 66–69, 2006. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0426.2007.00930.x>
- [16] L. Sturgeon and C. G. L.-T. E. L. T. E. Research, “Morphological phylogeny of sturgeons,” pp. 23–33, 08 2012. [Online]. Available: <https://www.glsturgeon.com/wp-content/uploads/2012/06/Lake-Sturgeon-Phylogeny-and-Morphology.pdf>
- [17] V. Ethier, “Seafoodwatch.” *MonteReyBayAquarium, USA*, 2014.
- [18] W. K. Scott. (2010) Sturgeons (acipenseriformes). [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/y4161e/y4161e05.pdf>
- [19] M. S. C. R. S. J. B. P. Fillatreau S, Six A, “The astonishing diversity of ig classes and b cell repertoires in teleost fish. front immunol.” *Front Immunol*, vol. 13, pp. 4–28, 02 2013.

- [20] S. Mashoof and M. F. Criscitiello, “Fish immunoglobulins,” *Biology*, vol. 5, 2016.
- [21] G. Chandra and D. Fopp-Bayat, “Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 13, no. 1, pp. 119–137, 2021. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12466>
- [22] E. Ercan, “A glance on sturgeon farming potential of turkey,” *International Aquatic Research*, vol. 3, pp. 117–124, 01 2011.
- [23] International Union for Conservation of Nature, “Summary statistics,” <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>, accessed 2023-04-24.
- [24] L. Vasilyeva, A. Elhetawy, and N. Sudakova, “History, current status, and prospects of sturgeon aquaculture in russia,” *Aquaculture Research*, vol. 50, pp. 979–993, 02 2019.
- [25] A. Perretta, K. AntÃ, and P. Zunino, “Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales mÃaisladas de peces cultivados en Uruguay,” *Veterinaria (Montevideo)*, vol. 55, pp. 4–8, 2019. [Online]. Available: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-48092019000100004&nrm=iso](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092019000100004&nrm=iso)
- [26] I. Ertör and M. Ortega, “The expansion of intensive marine aquaculture in turkey: The next-to-last commodity frontier?” *Journal of Agrarian Change*, vol. 19, 07 2018.
- [27] P. Bronzi, H. Rosenthal, and J. Gessner, “Global sturgeon aquaculture production: An overview,” *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 27, pp. 169 – 175, 03 2011.
- [28] M. Chebanov and P. Williot, “An assessment of the characteristics of world production of siberian sturgeon destined to human consumption,” *Sturgeon for the conservation of diversity: 16th International Symposium on Sturgeon, Wuhan, China, Program and Abstracts, June 25th-29th 2018*, pp. 24–24, 2018.
- [29] E. EUMOFA, “The caviar market, production, trade and consumption in and outside the eu,” pp. 169 – 175, 05 2021. [Online]. Available: <https://feap.info/wp-content/uploads/2021/05/2021-the-caviar-market.pdf>
- [30] D. D. Chaplin, “Overview of the immune response,” vol. 845, pp. 35 294–2170. [Online]. Available: <http://www.hcdm.org/>.
- [31] “Tissue-specific immunity for a changing world,” *Cell*, vol. 184, no. 6, pp. 1517–1529, 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867421000854>

## Referencias

- [32] L. B. Nicholson, “The immune system,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, pp. 275–301, 2016.
- [33] S. Turvey and D. Broide, “Innate immunity,” *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 125, pp. S24–32, 11 2009.
- [34] M. D. Cooper and M. N. Alder, “The Evolution of Adaptive Immune Systems,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 815–822, feb 2006. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- [35] B. J. Callahan and M. R. McLaren, “Opinion piece pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome,” 2020. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2019.0592>
- [36] W. M. e. a. Janeway CA Jr, Travers P, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*, G. Science, Ed., 2001, vol. 5. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
- [37] L. P. A. K. Adef Othan Kordon1, \*, “Adaptive immune system in fish,” *Turk. J. Fish. Aquat.*, 2022. [Online]. Available: [https://www.trjfas.org/uploads/pdf\\_14889.pdf](https://www.trjfas.org/uploads/pdf_14889.pdf)
- [38] A. K. Abbas, *Immunologia celular y molecular (9a. ed.)*. Elsevier, 2009.
- [39] L. J. e. a. Alberts B, Johnson A, *Molecular Biology of the Cell. edition= 4th edition*. Garland Science, 2002. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26921/>
- [40] A. Minervina, M. Pogorelyy, and I. Mamedov, “T-cell receptor and b-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity,” *Transplant International*, vol. 32, no. 11, pp. 1111–1123. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tri.13475>
- [41] S. D. Fugmann, I. J. Villey, L. M. Ptaszek, and D. G. Schatz, “Identification of two catalytic residues in rag1 that define a single active site within the rag1/rag2 protein complex,” *Molecular Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 97–107, 2000. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276500804062>
- [42] T. W. Mak, M. E. Saunders, and B. D. Jett, *Introduction to the Immune Response*. Elsevier, 2014. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123852458000017>
- [43] R.-V. A. Anaya JM, Shoenfeld Y, *Introduction to T and B lymphocytes*, 2013 Jul 18. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>
- [44] W. Ratajczak, P. Niedźwiedzka-Rystwej, B. Tokarz-Deptuła, and W. Deptuła, “Immunological memory cells,” *Central European Journal of Immunology*, vol. 43, pp. 194–203, 01 2018.

- [45] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, and H. L. Kim, "An introduction to immunology and immunopathology," *Allergy, Asthma Clinical Immunology*, vol. 14, no. 2, p. 49, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- [46] S. Sirisinha, "Evolutionary insights into the origin of innate and adaptive immune systems: different shades of grey." *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, vol. 32 1, pp. 3–15, 2014.
- [47] M. T. C. E. G.-L. Victorio M. Collado, Rebeca Porras, "El sistema inmune innato i: Sus mecanismos," *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense*, 2008. [Online]. Available: <file:///C:/Users/59891/Downloads/ecob,+RCCV0808120001A.PDF.pdf>
- [48] K. Buchmann, "Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, 2014. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00459>
- [49] R. Medzhitov, "Recognition of microorganisms and activation of the immune response," *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819–826, 2007.
- [50] M. F. Flajnik and M. Kasahara, "Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures," *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, no. 1, pp. 47–59, 2010. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/nrg2703>
- [51] J. A. Hooper, "The history and evolution of immunoglobulin products and their clinical indications," *LymphoSign Journal*, vol. 2, no. 4, pp. 181–194, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.14785/lpsn-2014-0025>
- [52] P. Rauta, B. Nayak, and S. Das, "Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms," *Immunology letters*, vol. 148, pp. 23–33, 08 2012.
- [53] T. Boehm and J. Swann, "Origin and evolution of adaptive immunity," *Annual review of animal biosciences*, vol. 2, pp. 259–83, 02 2014.
- [54] M. D. Cooper and M. N. Alder, "The evolution of adaptive immune systems," *Cell*, vol. 124, pp. 815–822, 2006.
- [55] M. Alder, B. Herrin, A. Sadlonova, C. Stockard, W. Grizzle, L. Gartland, G. Gartland, J. Boydston, C. Turnbough, and M. Cooper, "Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey," *Nature immunology*, vol. 9, pp. 319–27, 04 2008.
- [56] I. Sommerset, B. Krossøy, E. Biering, and P. Frost, "Vaccines for fish in aquaculture," *Expert Review of Vaccines*, vol. 4, pp. 101 – 89, 2005.

## Referencias

- [57] S. Rubio Ahumada, “Identificación de linfocitos b en pez cebra,” 2013. [Online]. Available: <https://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/17635>
- [58] C. Press and Evensen, “The morphology of the immune system in teleost fishes,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 9, no. 4, pp. 309–318, 1999. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464898901814>
- [59] M. RUBIO-GODOY, “Inmunología de los peces óseos: Revisión,” *Rev. mex. de cienc. pecuarias [online]*, vol. .1, n.1, pp. 47–57, 2010. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci.arttext&pid=S2007-11242010000100004&lng=es&nrm=iso>
- [60] S. Sahoo, H. Banu, A. Prakash, and G. Tripathi, “Immune system of fish: An evolutionary perspective,” 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.5772/intechopen.99541>
- [61] Y. et al., “Heat stress weakens the skin barrier function in sturgeon by decreasing mucus secretion and disrupting the mucosal microbiota,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, 2022. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.860079>
- [62] J. Sepulveda, N. Seija, P. Oppezso, and M. A. Navarrete, “The Antigen Receptor as a Driver of B-Cell Lymphoma Development and Evolution,” 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.5772/intechopen.72122>
- [63] S. L. Kaattari, “Fish b lymphocytes: Defining their form and function,” *Annual Review of Fish Diseases*, vol. 2, pp. 161–180, 1992. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0959803092900623>
- [64] G. Scapigliati, A. M. Fausto, and S. Picchiatti, “Fish lymphocytes: An evolutionary equivalent of mammalian innate-like lymphocytes?” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2018. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00971>
- [65] M. Vega Ramirez, R. López-Santiago, M. Moreno, and V. Flores, “Respuesta inmune en peces,” pp. 309–314, 10 2010.
- [66] Z. Khalid, Y. Chen, D. Yu, M. Abbas, M. Huan, Z. Naz, H. M. Mengist, M. jie Cao, and T. Jin, “Igna antibody: Structural features, diversity and applications,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 121, pp. 467–477, 2022. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464822000365>
- [67] M. Vega Ramirez, R. López-Santiago, M. Moreno, and V. Flores, “Respuesta inmune en peces,” pp. 309–314, 10 2010.
- [68] T. Nakanishi, Y. Shibasaki, and Y. Matsuura, “T cells in fish,” *Biology*, vol. 4, p. 640, 10 2015.

- [69] K. J. Laing and J. D. Hansen, “Fish t cells: Recent advances through genomics,” *Developmental Comparative Immunology*, vol. 35, no. 12, pp. 1282–1295, 2011, special issue on Teleost Fish Immunology. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X11000644>
- [70] C. Höhne, D. Prokopov, H. Kuhl, D. Kang, C. Klopp, S. Wuertz, V. Trifonov, and M. Stöck, “The immune system of sturgeons and paddlefish (acipenseriformes): a review with new data from a chromosome-scale sturgeon genome,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 13, 02 2021.
- [71] N. Smith, M. Rise, and S. Christian, “A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, p. 2292, 10 2019.
- [72] J. Petit, C. Embregts, M. Forlenza, and G. Wiegertjes, “Evidence of trained immunity in a fish: Conserved features in carp macrophages,” *The Journal of Immunology*, vol. 203, p. ji1900137, 05 2019.
- [73] Z. Zhang, H. Chi, and R. Dalmo, “Trained innate immunity of fish is a viable approach in larval aquaculture,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, 01 2019.
- [74] S. Fanucchi, J. Domínguez-Andrés, L. A. Joosten, M. G. Netea, and M. M. Mhlanga, “The intersection of epigenetics and metabolism in trained immunity,” *Immunity*, vol. 54, no. 1, pp. 32–43, 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761320304520>
- [75] L. Petrie-Hanson and A. E. B. Peterman, “Trained immunity provides long-term protection against bacterial infections in channel catfish,” *Pathogens*, vol. 11, no. 10, 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/10/1140>
- [76] M. Stosik, B. Tokarz-Deptuła, and W. Deptuła, “Immunological memory in teleost fish,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 115, pp. 95–103, 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821001509>
- [77] J. S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, and H. L. Kim, “An introduction to immunology and immunopathology,” *Allergy, Asthma Clinical Immunology*, vol. 14, p. 49, 9 2018.
- [78] J. M. Cruse, R. E. Lewis, and H. Wang, *MOLECULES, CELLS, AND TISSUES OF IMMUNITY*. Elsevier, 2004. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012198382650025X>
- [79] D. Könning, S. Zielonka, J. Grzeschik, M. Empting, B. Valldorf, S. Krah, C. Schröter, C. Sellmann, B. Hock, and H. Kolmar, “Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 45, pp. 10–16, 2017, engineering and design: New trends in designer proteins •

## Referencias

- Membranes. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X16300963>
- [80] M. L. Chiu, D. R. Goulet, A. Teplyakov, and G. L. Gilliland, "Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics," *Antibodies*, vol. 8, 2019.
- [81] C. L. Schroeder HW Jr, "Structure and function of immunoglobulins." *J Allergy Clin Immunol.*, 2010.
- [82] A. August, "Immunoglobulins," *Academic Press*, pp. 314–320, 2006. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123708796001848>
- [83] E. Bengten, S. Quiniou, J.-i. Hikima, G. Waldbieser, G. Warr, N. Miller, and M. Wilson, "Structure of the catfish igh locus: Analysis of the region including the single functional ighm gene," *Immunogenetics*, vol. 58, pp. 831–44, 11 2006.
- [84] Y. Ohta and M. F. Flajnik, "Igd, like igm, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103 28, pp. 10 723–8, 2006.
- [85] I. Salinas, Álvaro Fernández-Montero, Y. Ding, and J. O. Sunyer, "Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances," *Developmental Comparative Immunology*, vol. 121, p. 104079, 2021. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X21000872>
- [86] K. Buchmann and C. J. Secombes, *Principles of Fish Immunology From Cells and Molecules to Host Protection*. Springer, 2022.
- [87] H. Matz, D. Munir, J. Logue, and H. Dooley, "The immunoglobulins of cartilaginous fishes," *Developmental Comparative Immunology*, vol. 115, p. 103873, 2 2021.
- [88] I. Rodriguez-Nunez, D. Weisel, G. Litman, and J. Yoder, "Multigene families of immunoglobulin domain-containing innate immune receptors in zebrafish: Deciphering the differences," *Developmental and comparative immunology*, vol. 46, 02 2014.
- [89] C. Grönwall, J. Vas, and G. Silverman, "Protective roles of natural igm antibodies," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, 2012. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00066>
- [90] M. Flajnik, "Flajnik, m.f. comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. nat. rev. immunol. 2, 688698," *Nature reviews. Immunology*, vol. 2, pp. 688–98, 10 2002.



- [91] E. Ostrycharz and B. Hukowska-Szematowicz, “New insights into the role of the complement system in human viral diseases,” *Biomolecules*, vol. 12, no. 2, 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/2/226>
- [92] R. Castro, L. Jouneau, H.-P. Pham, O. Bouchez, V. Giudicelli, M.-P. Lefranc, E. Quillet, A. Benmansour, F. Cazals, A. Six, S. Fillatreau, O. Sunyer, and B. Pierre, “Teleost fish mount complex clonal igm and igt responses in spleen upon systemic viral infection,” *PLoS pathogens*, vol. 9, p. e1003098, 01 2013.
- [93] S. Lam, H. Chua, Z. Gong, T. Lam, and Y. Sin, “Development and maturation of the immune system in zebrafish, danio rerio: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study,” *Developmental Comparative Immunology*, vol. 28, pp. 9–28, 1 2004.
- [94] P. Casali, “Igm,” in *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, second edition ed., P. J. Delves, Ed. Oxford: Elsevier, 1998, pp. 1212–1217. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656003261>
- [95] M. van der Neut Kolfshoten, J. Schuurman, M. Losen, W. K. Bleeker, P. Martínez-Martínez, E. Vermeulen, T. H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L. A. Aarden *et al.*, “Anti-inflammatory activity of human igg4 antibodies by dynamic fab arm exchange,” *Science*, vol. 317, no. 5844, pp. 1554–1557, 2007.
- [96] D. M. Czajkowsky, J. Hu, Z. Shao, and R. J. Pleass, “Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives,” *EMBO molecular medicine*, vol. 4, no. 10, pp. 1015–1028, 2012.
- [97] V. Lee, J. Huang, M. Lui, K. Malecek, Y. Ota, A. Mooers, and E. Hsu, “The evolution of multiple isotypic igm heavy chain genes in the shark,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 180, pp. 7461–70, 06 2008.
- [98] B. Keyt, R. Baliga, A. Sinclair, S. Carroll, and M. Peterson, “Structure, function, and therapeutic use of igm antibodies,” *Antibodies*, vol. 9, p. 53, 10 2020.
- [99] S. Bilal, A. Etayo, and I. Hordvik, “Immunoglobulins in teleosts,” *Immunogenetics*, vol. 73, pp. 1–13, 02 2021.
- [100] L. Zhu, Z. Yan, M. Feng, D. Peng, Y. Guo, X. Hu, L. Ren, and Y. Sun, “Identification of sturgeon igd bridges the evolutionary gap between elasmobranchs and teleosts,” *Developmental Comparative Immunology*, vol. 42, no. 2, pp. 138–147, 2014. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X13002474>
- [101] R. Zhu, H.-J. Du, S.-Y. Li, Y.-D. Li, H. Ni, X.-J. Yu, Y.-Y. Yang, Y.-D. Fan, N. Jiang, L.-B. Zeng, and X.-G. Wang, “De novo annotation of the immune-enriched transcriptome provides insights into

## Referencias

- immune system genes of chinese sturgeon (*acipenser sinensis*),” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 55, pp. 699–716, 2016. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816304120>
- [102] S. Fillatreau, A. Six, S. Magadan, R. Castro, J. O. Sunyer, and P. Boudinot, “The astonishing diversity of ig classes and b cell repertoires in teleost fish,” *Frontiers in immunology*, vol. 4, p. 28, 2013. [Online]. Available: <https://europepmc.org/articles/PMC3570791>
- [103] M. A. Adkison, B. Basurco, and R. P. Hedrick, “Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *acipenser transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies.” *Developmental and comparative immunology*, vol. 20 4, pp. 285–298, 1996.
- [104] S. Partula, I. Metais, Y. Launey, J.-P. Lagard'ere, and J. Charlemagne, “Characterization of serum immunoglobulins in a chondrosteian fish, *Acipenser baeri*,” *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 17, no. 6, pp. 515–524, 1993. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8299850/>
- [105] A. Yektaseresht, Z. Hemati, and A. Gholamhosseini, “Isolation and partial characterization of serum immunoglobuline in two species of sturgeons, siberian sturgeon (*acipenser baerii*) and stellate sturgeon (*acipenser stellatus*),” *Mrine Science and Technology Bulletin*, vol. 7, 06 2018.
- [106] K. Yasumoto, K. Koiwai, K. Hiraoka, I. Hirono, and H. Kondo, “Characterization of natural antigen-specific antibodies from native sturgeon serum,” *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 112, pp. 103 770–103 770, jul 2020. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/32634523>
- [107] S. Gautam and K.-C. Loh, “Immunoglobulin-m purification — challenges and perspectives,” *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6, pp. 840–849, 2011. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501100098X>
- [108] S. V. Guselnikov, K. O. Baranov, A. M. Najakshin, L. V. Mechetina, N. A. Chikaev, A. I. Makunin, S. V. Kulemzin, D. A. Andreyushkova, M. Stöck, S. Wuertz, J. Gessner, W. C. Warren, M. Scharl, V. A. Trifonov, and A. V. Taranin, “Diversity of immunoglobulin light chain genes in non-teleost ray-finned fish uncovers igl subdivision into five ancient isotypes,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, 2018. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01079>
- [109] M. Tribe and K. Bowler, “Temperature dependence of “standard metabolic rate” in a poikilotherm,” *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 25, no. 2, pp. 427–436, 1968. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010406X68903514>

- [110] R. M. Kocan, P. K. Hershberger, G. M. Sanders, and J. R. Winton, "Effects of temperature on disease progression and swimming stamina in ichthyophonus-infected rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (walbaum)." *Journal of fish diseases*, vol. 32 10, pp. 835–43, 2009.
- [111] F. Hirotooshi, S. Kiyoshi, Y. Fumio, and H. Akihiko, "Serum immunoglobulin m (igm) during early development of masu salmon (*oncorhynchus masou*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, vol. 99, pp. 637–643, 1991.
- [112] C. Sánchez, P. López-Fierro, A. Zapata, and J. Dominguez, "Characterisation of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 3, no. 4, pp. 237–251, 1993. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464883710247>
- [113] R. Hoare, H. Hovland, A. Langston, A. Imsland, S. Stefansson, M. Mulcahy, and H. Wergeland, "Susceptibility of three different strains of juvenile atlantic halibut (*hippoglossus hippoglossus* l.) cultured at two different temperatures to *vibrio anguillarum* and temperature effect on antibody response," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 13, no. 2, pp. 111–123, 2002. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464801903857>
- [114] S. Cecchini and M. Saroglia, "Antibody response in sea bass (*dicentrarchus labrax* l.) in relation to water temperature and oxygenation," *Aquaculture Research*, vol. 33, pp. 607 – 613, 07 2002.
- [115] J. Stolen, T. Gahn, V. Kasper, and J. Nagle, "The effect of environmental temperature on the immune response of a marine teleost (*paralichthys dentatus*)," *Developmental amp; Comparative Immunology*, vol. 8, no. 1, p. 89–98, 1984.
- [116] M. Dominguez, A. Takemura, M. Tsuchiya, and S. Nakamura, "Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the nile tilapia, *oreochromis niloticus*," *Aquaculture*, vol. 241, pp. 491–500, 11 2004.
- [117] H. Jónsdóttir, S. Helgason, B. Bjornsson, T. Jørgensen, and L. Pilström, "Humoral immune parameters in atlantic cod (*gadus morhua* l.)," *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry molecular biology*, vol. 122, pp. 173–80, 03 1999.
- [118] A. Lillehaug, A. Ramstad, K. Bækken, and L. J. Reitan, "Protective immunity in atlantic salmon (*salmo salar* l.) vaccinated at different water temperatures," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 143–156, 1993. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464883710156>

## Referencias

- [119] L. Guz and A. Kozińska, “Influence of temperature on the immune response of carp to lipopolysaccharide and whole cell aeromonas bestiarum vaccines,” *Pol. J. Vet. Sci.*, vol. 6, no. 3 Suppl, pp. 18–20, 2003.
- [120] M. K. Raida and K. Buchmann, “Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following yersinia ruckeri vaccination,” *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 77, no. 1, pp. 41–52, Aug. 2007.
- [121] I. A. Guschina and J. L. Harwood, “Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms,” *FEBS Letters*, vol. 580, no. 23, pp. 5477–5483, 2006, lipidome and Disease. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579306007836>
- [122] A. et al, “Influence of environmental temperature on the immune response in fish,” *Springer*, vol. 61, no. 10, p. 1/35, 1973.
- [123] J. Cushing, J. E., “An Effect of Temperature Upon Antibody-Production in Fish,” *The Journal of Immunology*, vol. 45, no. 2, pp. 123–126, 10 1942. [Online]. Available: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.45.2.123>
- [124] H. Mikkelsen, T. Lindenstrøm, and M. Nielsen, “Effects of temperature on production and specificity of antibodies in rainbow trout (oncorhynchus mykiss),” *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 37, pp. 518 – 522, 11 2006.
- [125] J. Wang, D.-Q. Lu, B. Jiang, H.-L. Luo, G.-L. Lu, and A.-X. Li, “The effect of intermittent hypoxia under different temperature on the immunomodulation in streptococcus agalactiae vaccinated nile tilapia ( oreochromis niloticus ),” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 79, p. 2012, 04 2018.
- [126] S. Alcorn, A. Murra, and R. Pascho, “Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (oncorhynchus nerka),” *Fish shellfish immunology*, vol. 12, pp. 303–34, 05 2002.
- [127] J. E. Bly and L. W. Clem, “Temperature and teleost immune functions,” *Fish Shellfish Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 159–171, 1992. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464805800567>
- [128] N. W. Miller and L. W. Clem, “Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens.” *The Journal of Immunology*, vol. 133, no. 5, pp. 2356–2359, 11 1984. [Online]. Available: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.133.5.2356>
- [129] A. F. Abruzzini, L. O. Ingram, and L. W. Clem, “Temperature-mediated processes in teleost immunity: Homeoviscous adaptation in teleost lymphocytes,” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 169, no. 1, pp. 12–018, 1982. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3181/00379727-169-41300>

- [130] C. L. Morvan, D. Troutaud, and P. Deschaux, “Differential Effects of Temperature on Specific and Nonspecific Immune Defences in Fish,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 201, no. 2, pp. 165–168, 01 1998. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1242/jeb.201.2.165>
- [131] A. M. Campbell, “5 - PRODUCTION AND PURIFICATION OF ANTIBODIES,” in *Immunoassay*, E. P. Diamandis and T. K. Christopoulos, Eds. Academic Press, 1996, pp. 95–115. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122147302500066>
- [132] A. Yektaseresht, Z. Hemati, and A. Gholamhosseini, “Isolation and partial characterization of serum immunoglobulin in two species of sturgeons, siberian sturgeon (*acipenser baerii*) and stellate sturgeon (*acipenser stellatus*),” *Marine Science and Technology Bulletin*, vol. 7, pp. 24–34, June 2018.
- [133] T. A. Kuzmina, M. A. Timofeeva, S. N. Kovalchuk, T. V. Kovalev, N. A. Chikaev, A. V. Kolesnikov, and V. B. Krylov, “Characterization of natural antigen-specific antibodies from naïve sturgeon serum,” *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 112, pp. 103 770–103 770, jul 2020. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/32634523>
- [134] A. M. Hyde, S. L. Zultanski, J. H. Waldman, Y.-L. Zhong, M. Shevlin, and F. Peng, “General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series,” *Organic Process Research Development*, vol. 21, no. 9, pp. 1355–1370, 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>
- [135] K. Duong-Ly and S. Gabelli, “Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation,” *Methods in enzymology*, vol. 541, pp. 85–94, 03 2014.
- [136] M. Kastelic, Y. V. Kalyuzhnyi, B. Hribar-Lee, K. A. Dill, and V. Vlachy, “Protein aggregation in salt solutions,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 21, pp. 6766–6770, may 2015. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25964322https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450416/>
- [137] P. Wingfield, “Protein precipitation using ammonium sulfate,” *Current protocols in protein science*, vol. Appendix 3, pp. Appendix–3F, May 2001. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18429073https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817497/>
- [138] U. M. Kent, “Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration,” *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 1999.
- [139] D. Khullar, “Basic fundamentals of dialysis,” *Journal International Medical Sciences Academy*, vol. 15, 07 2002.
- [140] D. virtual UFQ, <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Dialisis>.
- [141] R. Kumar, “Electrophoresis -principles and methods,” pp. 24–28, 05 2020.

## Referencias

- [142] E. Bergmann-Leitner, R. Mease, E. Duncan, F. Khan, J. Waitumbi, and E. Angov, "Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies," *Malaria journal*, vol. 7, p. 129, 08 2008.
- [143] A. Guttman and L. Hajba, *Basic principles of capillary gel electrophoresis*, 01 2022.
- [144] cytvia, "Western blotting - principles and methods," pp. 1–118, 2022.
- [145] G. Kavooosi and S. Ardestani, "Gel electrophoresis of protein - from basic science to practical approach," 04 2012.
- [146] J. Chin, K. H. Yuen, C. Sieo, and B. C. Yiap, "electrophoresis what does a century old technology hold for the future of separation science?'," *International research journal of applied and basic sciences*, vol. 7, pp. 213–221, 12 2013.
- [147] Z. Zhu, J. J. Lu, and S. Liu, "Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 709, pp. 21–31, 2012. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011013328>
- [148] A. Slavičková, "Electrophoresis of nonreduced igm and igg monoclonal antibodies on mixed agarose-polyacrylamide gels," *ELECTROPHORESIS*, vol. 11, no. 10, pp. 892–892, 1990. [Online]. Available: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.1150111020>
- [149] D. Kang, M. Stöck, S. Kneitz, C. Klopp, J. Woltering, M. Adolfi, R. Feron, D. Prokopov, A. Makunin, I. Kichigin, C. Schmidt, P. Fischer, H. Kuhl, S. Wuertz, J. Gessner, W. Kloas, C. Cabau, C. Iampietro, H. Parrinello, and M. Scharl, "The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization," *Nature Ecology Evolution*, vol. 4, 06 2020.
- [150] T. Maira-Litrán, "Immunization of mice," *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 117, no. 1, pp. 11.4.1–11.4.11, 2017. [Online]. Available: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpmb.30>
- [151] E. Lindblad, *Freund's Adjuvants*, 02 2008, pp. 49–63.
- [152] S. M. Louis H Miller, Allan Saul, "Revisiting freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world," *Trends in Parasitology*, vol. 21, pp. 412–414, 9 2005.
- [153] C. H. de Experimentación Animal.
- [154] F. A. Alhajj M, "Enzyme linked immunosorbent assay." *StatPearls Publishing*, 01 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

- [155] K. Boguszewska, M. Szewczuk, S. Urbaniak, and B. Karwowski, “Review: immunoassays in dna damage and instability detection,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, 12 2019.
- [156] M. Karim, *ELISA: History, Types and Applications*, 09 2018.
- [157] N. Japp, J. Soucek, A. Sasson, M. Hollingsworth, S. Batra, and W. Junker, “Tumor biomarker in-solution quantification, standard production, and multiplex detection,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2021, pp. 1–12, 09 2021.
- [158] “GraphPad”, “”prism guide”,” [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat\\_area\\_under\\_the\\_curve.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_area_under_the_curve.htm),.
- [159] C. P. Moritz, “40years western blotting: A scientific birthday toast,” *Journal of Proteomics*, vol. 212, p. 103575, 2020. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391919303471>
- [160] S. Counts, “Western blot,” in *Encyclopedia of Movement Disorders*, K. Kompoliti and L. V. Metman, Eds. Oxford: Academic Press, 2010, pp. 323–326. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123741059002975>
- [161] “Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots,” *Analytical Biochemistry*, vol. 401, no. 2, pp. 318–320, 2010. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269710001351>
- [162] J. J. Bass, D. J. Wilkinson, D. Rankin, B. E. Phillips, N. J. Szewczyk, K. Smith, and P. J. Atherton, “An overview of technical considerations for western blotting applications to physiological research,” *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, vol. 27, no. 1, pp. 4–25. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/sms.12702>
- [163] G. Bentley, G. Boulot, and V. Chitarra, “Cross-reactivity in antibody-antigen interactions,” *Research in Immunology*, vol. 145, no. 1, pp. 45–48, 1994. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923249494800421>
- [164] W. B. Van Muiswinkel, “The piscine immune system: innate and acquired immunity,” In: *Fish diseases and disorders I: Protozoan and metazoan infections*, P.T.K. Woo (ed.). CAB Int., Oxon, UK (1995) 729-750., pp. 729–750, 11 1995.
- [165] M. Choudhury and K. Prasad, “Isolation and characterization of immunoglobulin m of asian sea bass, lates calcarifer and its level in serum,” *Central European Journal of Biology*, vol. 6, pp. 180–187, 02 2011.

## Referencias

- [166] S. Behera, J. Mohanty, T. Swain, and S. Garnayak, "Isolation and characterization of serum immunoglobulins from kalbasu (*Labeo calbasu*) (hamilton, 1822)," *Asian Fisheries Science*, vol. 22, pp. 481–489, 09 2009.
- [167] S. Bilal, K. K. Lie, O. A. Karlsen, and I. Hordvik, "Characterization of igm in norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses)," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 59, pp. 9–17, 2016. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816306301>
- [168] D. L. Makrinos and T. J. Bowden, "Natural environmental impacts on teleost immune function," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 53, pp. 50–57, 2016, special Issue: ISFSI 2016. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464816300870>
- [169] L. Long, H. Zhang, Q. Ni, H. Liu, F. Wu, and X. Wang, "Effects of stocking density on growth, stress, and immune responses of juvenile chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture system," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, vol. 219, pp. 25–34, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045619300146>
- [170] Y. Suzuki, M. Orito, M. Iigo, H. Kezuka, M. Kobayashi, and K. Aida, "Seasonal changes in blood igm levels in goldfish, with special reference to water temperature and gonadal maturation," *Fisheries Science*, vol. 62, pp. 754–759, 1996.
- [171] C. Le Morvan, P. Deschaux, and D. Troutaud, "Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-dnp antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: A kinetic study," *Developmental Comparative Immunology*, vol. 20, no. 5, pp. 331–340, 1996. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X96000274>
- [172] B. Köllner and G. Kotterba, "Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*," *Fish Shellfish Immunology*, vol. 12, no. 1, pp. 35–48, 2002. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464801903523>
- [173] W. S. Bugg, G. R. Yoon, A. N. Schoen, A. Laluk, C. Brandt, W. G. Anderson, and K. M. Jeffries, "Effects of acclimation temperature on the thermal physiology in two geographically distinct populations of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*)," *Conservation Physiology*, vol. 8, 1 2020.
- [174] A. N. S. A. M. W. K. M. J. W. G. A. William S. Bugg, Gwangseok R. Yoon, "Elevated temperatures dampen the innate immune response and compromise stress and metabolic physiology in developing lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*)," *Journal of Experimental Biology*, vol. 226, no. 10, p. jeb245335, 2023.



- [175] W. S. Bugg, M. J. Thorstensen, K. E. Marshall, W. G. Anderson, and K. M. Jeffries, “Elevated temperatures reduce population-specific transcriptional plasticity in developing lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*),” *Molecular Ecology*, vol. 32, pp. 4044–4062, 7 2023.
- [176] A. Costabile, M. Castellano, M. Aversa-Marnai, I. Quartiani, D. Conijeski, A. Perretta, A. Villarino, V. Silva-Álvarez, and A. M. Ferreira, “A different transcriptional landscape sheds light on russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) mechanisms to cope with bacterial infection and chronic heat stress,” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 128, pp. 505–522, 2022.
- [177] D. Coleman, A. Camus, B. Martínez-López, S. Yun, B. Stevens, and E. Soto, “Effects of temperature on *Veronaea botryosa* infections in white sturgeon *Acipenser transmontanus* and fungal induced cytotoxicity of fish cell lines,” *Veterinary Research*, vol. 49, 12 2018.
- [178] S. Yang, W. Xu, C. Tan, M. Li, D. Li, C. Zhang, L. Feng, Q. Chen, J. Jiang, Y. Li, Z. Du, W. Luo, C. Li, Q. Gong, X. Huang, X. Du, J. Du, G. Liu, and J. Wu, “Heat stress weakens the skin barrier function in sturgeon by decreasing mucus secretion and disrupting the mucosal microbiota,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, p. 860079, 04 2022.
- [179] S. Jenberie, H. L. Thim, J. O. Sunyer, K. Skjødt, I. Jensen, and J. B. Jørgensen, “Profiling atlantic salmon b cell populations: CpG-mediated TLR ligation enhances Igm secretion and modulates immune gene expression,” *Scientific Reports*, vol. 8, 2018.
- [180] D. Parra, A. Rieger, J. Li, Y.-A. Zhang, L. Randall, C. Hunter, D. Barreda, and J. Sunyer, “Pivotal advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4(+) T cells,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 91, pp. 525–36, 11 2011.
- [181] J. O. Sunyer, “Evolutionary and functional relationships of B cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen.” *Infectious disorders drug targets*, vol. 12 3, pp. 200–12, 2012.

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Índice de tablas

Esta página ha sido intencionalmente dejada en blanco.

# Índice de figuras

1.1. Morfología del esturión. Adaptado de Morphological Phylogeny of Sturgeons. [16] . . . . .	3
1.2. Exportación uruguaya de caviar. Volumen y precio medio ponderado, valores nominales. (lado izquierdo). Principales mercados de exportación en 2020 en porcentajes (lado derecho). Adaptado de The caviar market, production, trade and consumption in and outside the EU, EUMOFA. [29] . . . . .	5
1.3. Orígenes y relaciones evolutivas entre los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. Adaptado de Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. [12] . . . . .	10
1.4. Isotipos de inmunoglobulinas de peces y sus relaciones propuestas con isotipos de otros grupos de vertebrados, Adaptado de Fish Immunoglobulins [20] . . . . .	15
1.5. Representación esquemática de IgM en peces teleósteos y mamíferos. (A) Monómero IgM en teleósteos. (B) Tetrámero IgM en teleósteos. (C) Monómero IgM en mamíferos. (D) Pentámero IgM en mamíferos. Cada círculo indica un dominio Ig. Los círculos azul (cadena pesada) y blanco (cadena ligera) son dominios constantes, mientras que los círculos rojos son dominios variables. La cadena J presente en la estructura del pentámero IgM de los mamíferos está ausente en los peces teleósteos que normalmente forman tetrámeros IgM. Adaptado de [99] . . . . .	17
2.1. Diagrama de flujo general de la estrategia experimental empleada para cumplir los objetivos del trabajo. Creada en <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>	23
2.2. Representación del proceso de precipitación de proteínas con sulfato de amonio. Creada en <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> . . . . .	25
2.3. Representación de la metodología de diálisis. Adaptada de <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a>	26
2.4. Estrategia experimental empleada para la inmunización con igM en Modelo de Ratones. Creada en <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> . . . . .	32
2.5. Representación esquemática del ensayo de ELISA indirecto de anticuerpos utilizado para el seguimiento de inmunización de igM de esturión en ratones. <a href="https://biorender.com/">https://biorender.com/</a> . . . . .	34

## Índice de figuras

- 2.6. Representación general de la técnica de Western Blot. Creada en <https://biorender.com/> . . . . . 36
- 3.1. **Evaluación de la purificación mediante la metodología 1 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal. Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 1 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras.** En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida, sembradas de la siguiente manera: (1) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa), (2) suero de esturión, (3) sobrenadante post diálisis con Buffer Tris a baja concentración iónica, (4,5,6) lavados del precipitado post diálisis con Buffer Tris a baja concentración iónica (7) precipitado post diálisis con Tris, (8) fracción final obtenida post diálisis contra PBS . . . . . 40
- 3.2. **Evaluación de la purificación mediante la metodología 2 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal. Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 2 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras.** En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida, sembradas de la siguiente manera: (1) suero de esturión, (2) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (3) precipitado post precipitación con sulfato de amonio, (4) fracción final (5) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa), . . . . . 41
- 3.3. **Evaluación de la purificación mediante la metodología 3 por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie Coloidal** Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 3 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras. En la imagen se muestran las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida n°19 (suero amarillo), sembradas de la siguiente manera: (1) Suero de esturión, (2) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (3) resuspensión del precipitado post-precipitación con sulfato de amonio, (4) sobrenadante post-aglutinación con PEG, (5) fracción final post-aglutinación con PEG, (6) fracción final post-aglutinación con PEG en condiciones no reductoras , (7) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa) . . . . . 42
- 3.4. **Resultados macroscópicos obtenidos en la precipitación de suero de esturión empleando sulfato de amonio 33% de acuerdo con el protocolo de la metodología 4.** A la izquierda se muestra resultado de precipitación derivado de muestra de suero de esturión n°17 (suero de partida de color blancuzco), a la derecha resultado de precipitación derivado de muestras de suero de esturión n°19 (suero de partida de coloración amarilla). . . . . 42

- 3.5. **Evaluación de la purificación mediante la metodología 4 por SDS-PAGE teñido con azul Coomasie Coloidal. Las fracciones de los distintos pasos de purificación empleando la metodología 4 se analizaron mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) bajo condiciones reductoras.** En A se muestra el análisis de las fracciones obtenidas empleando el suero de esturión ruso de partida n°19 (suero amarillo), mientras que en B se muestra el análisis empleando el suero de partida n°17. Las distintas fracciones se sembraron de la siguiente manera: (1) Suero de esturión, (2) precipitado post-precipitación con sulfato de amonio, (3) sobrenadante post-precipitación con sulfato de amonio, (4) sobrenadante post-diálisis con Tris-HCl 5 mM, (5, 6 y 7) lavados con buffer Tris-HCl 5 mM, (8) fracción final obtenida , (9) fracción final obtenida bajo condiciones no reductoras (10) MPM (se indican los tamaños de las bandas del MPM en kDa) . . . . . 43
- 3.6. **Análisis de la fracción obtenida aplicando la metodología 4 mediante espectrometría de masas.**(A) La fracción obtenida tras la purificación mediante la metodología 4 fue analizada mediante SDS-PAGE al 12,5 % (m/v) en condiciones reductoras (0.07 ug/mL, 0.02 ug/mL y 0.01 µg de muestra en carriles 1, 3 y 5, respectivamente) y no reductoras (0.01 µg de muestra en carril 7). Las bandas teñidas con Coomassie Coloidal se cortaron del gel y se enviaron para análisis mediante MALDI-TOF/TOF MS. (B) Tabla de identificación de bandas de proteínas obtenidas en (A), En la columna 1 se muestra la numeración de las bandas, en la columna 2 se muestra la proteína identificada en cada banda mediante la búsqueda en bases de datos correspondientes y en la columna 3 se muestra el análisis de resultados mediante Blast para aquellos componentes identificados con la base de datos Vertebrados EST . . . . . 44
- 3.7. **Análisis para la determinación del título de anticuerpos anti-IgM de esturión ruso en ratones inmunizados mediante ELISA.** Los gráficos muestran la Densidad óptica a 450 nm vs Log del inverso de la dilución para cada extracción de suero. Cada fila representa un lote de ratones. Los lotes 1,2 y 3 se inmunizaron con 100, 50 y 25 de IgM de esturión respectivamente. Las siglas SC, VI, VD corresponden a las marcas de ratones: SC: sin corte, VI: corte izquierdo, VD: corte derecho. El título de anticuerpos específicos se definió como el área debajo de cada curva y se calculó empleando el programa GraphPad. Nota: el ratón SC del Lote 3 no llegó al punto final, por eso no se cuenta con datos para el día 163. . . . . 46

## Índice de figuras

- 3.8. **Análisis de niveles de anticuerpos anti IgM de esturión en ratones inmunizados por ELISA a lo largo del tiempo.** Se grafica el título de anticuerpos definido como aréa de la curva de los gráficos de la figura 3.7 post inmunización. Cada gráfico muestra los resultados obtenidos para un lote de ratones. Las siglas SC, VI, VD corresponden a las marcas de ratones: SC: sin corte, VI: corte izquierdo, VD: corte derecho . . . . . 47
- 3.9. **Prueba de control de reacción cruzada de anticuerpo secundario.** Se muestra el revelado por Western Blot de muestras de suero de esturión tras eliminar la presencia de anticuerpo primario. (1) MPM (2,4) Sueros de esturión revelado con Rojo Puncture en condiciones no reductoras y reductoras respectivamente, (3,5) revelado de muestras de suero de esturión por WB . . . . . 48
- 3.10. **Puesta a punto de condiciones óptimas de trabajo para la metodología de Western Blot.** En A se muestra un Western Blot representativo donde se incubó con sueros de ratones inmunizados en una dilución de 1/4000. Se parte de SDS-PAGE 12.5% (m/v) bajo condiciones reductoras. Se sembraron 4 diluciones seriadas de la fracción final de IgM purificada (carriles 1 a 4: 27  $\mu\text{g}$ , 2.7  $\mu\text{g}$ , 0.27  $\mu\text{g}$ , 0.027  $\mu\text{g}$ ), carril 5 pool de suero de esturión en condiciones reductoras, carril 6 pool de sueros de esturión, carril 7 MPM. En B se muestra un Western Blot representativo donde se incubó con sueros de ratones inmunizados en una dilución de 1/1000. Se sembraron 4 diluciones seriadas de la fracción final de IgM purificada (carriles 1 a 4), carril 5 MPM, carril 6 pool de sueros de esturión, carril 7 pool de sueros de esturión en condiciones reductoras . . . . . 49
- 3.11. **Análisis de la variabilidad de los niveles séricos de IgM de esturión durante invierno y verano.** En A se muestra un Western Blot representativo donde se sembraron 4 pooles de suero del grupo de invierno (carriles 1 a 4) y 4 del grupo verano (carriles 5 a 8). En el carril 9 se muestra la fracción de IgM purificada analizada en paralelo y en el carril 10 el MPM. En B se grafican los niveles de IgM cuantificados empleando el programa ImageJ a partir de tres imágenes de Western blot independientes. Los niveles de IgM están expresados como valores porcentuales relativos a la banda de IgM purificada sembrada en cada Western Blot. En C se grafica la concentración de proteínas totales de los pooles de invierno y verano, cuantificados mediante el método de BCA. En D se grafican los niveles de IgM cuantificados mediante Western Blot normalizados por el nivel de proteínas totales correspondiente a cada pool de invierno y verano. Los asteriscos (\*) indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante el análisis de Mann-Whitney. . . . . 50





Esta es la última página.  
Compilado el miércoles 29 noviembre, 2023.  
<https://higiene.edu.uy/inmunologia/>