

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



EFECTOS DEL CpG ODN 1668 Y β -GLUCANOS OBTENIDOS DE HONGOS AISLADOS DE AMBIENTES EXTREMOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA, HUMORAL Y ANTIOXIDANTE EN EL HUACHINANGO DEL PACIFICO (*Lutjanus peru*).

TESIS:

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

TOMÁS CÁRDENAS REYNA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. SAWAKO OSHIMA

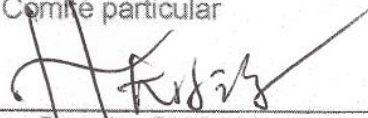
CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA C. REYES BECERRIL

La presente tesis "Efectos del CpG ODN 1668 y β -glucanos obtenidos de hongos aislados de ambientes extremos sobre la respuesta inmune innata, humoral y antioxidante en el huachinango del pacífico (*Lutjanus peru*)" realizada por el C. Tomás Cárdenas Reyna, dirigido por la Dra. Sawako Oshima y la Dra. Martha C. Reyes Becerril, ha sido evaluada y aprobada por el comité particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité particular



Dra. Sawako Oshima
Director de tesis



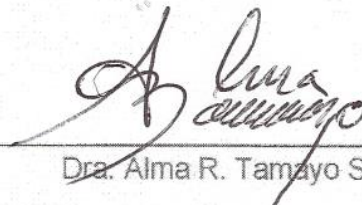
Dra. Martha C. Reyes Becerril
Co-director de tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Asesor



Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor



Dra. Alma R. Tamayo Sosa
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, al Instituto en Ciencias Agropecuarias y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste por permitirme desarrollarme como investigador.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT por el apoyo otorgado.

A la Dra. Sawako Oshima que siempre estuvo al pendiente de mí, por enseñarme a ser crítico y creativo.

A la Dra. Martha Reyes por mostrarme con el ejemplo, que trabajando cariñosa y arduamente cada día, se consiguen alcanzar los sueños.

Al Dr. Carlos Angulo por sus sabios consejos, sobre todo por su paciencia, las enseñanzas en clases, al final, me fue brindado todo el apoyo, gracias por escuchar.

Al Dr. Gerardo Medina, al Dr. Gilberto López, al Dr. Carloman Herrera, por sus consejos, su apoyo y enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio: Beatriz Meza, Mario Rojas, Crystal Guluarte, Paola Tenorio, Erika Alamillo, Esteban Velázquez, Gregorio Rodríguez, Rodolfo Osuna, Abel Ramos, Noé Medina, Javier Palacios, Jennifer Brizuela, Luis Rodríguez y a Joanna Saavedra por el apoyo personal y profesional, ustedes también contribuyeron en mi formación y estuvieron presentes en el proceso de mi desarrollo para alcanzar mi objetivo, les agradezco sinceramente a cada uno de ustedes.

A mi familia, por el apoyo incondicional, constante, cariñoso, paciente...

Gracias...

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pagina
Lista de cuadros	VIII
Lista de figuras	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
CAPITULO 1	XIV
I. INTRODUCCIÓN	15
I.I. JUSTIFICACIÓN	19
I.II. HIPÓTESIS	20
I.III. OBJETIVOS	20
1.3.1. General	20
1.3.2. Específicos	20
CAPITULO 2	21
II. REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1. Acuicultura en México	22
2.2 Huachinango del Pacifico (<i>Lutjanus peru</i>)	23
2.2.2. Características morfológicas	23
2.2.3. Alimentación	24
2.2.4. Distribución e importancia comercial	24
2.3. Panorama de salud en la acuicultura	25
2.4. <i>Vibrio</i> spp.	27
2.4.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i>	28

2.6. Órganos del sistema inmune en peces teleósteos	30
2.6.1. Timo	31
2.6.2. Riñón cefálico	32
2.6.3. Bazo	33
2.6.4. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)	33
2.6.5. Centros melanomacrófagos (CMMs)	34
2.7. Sistema inmune en peces	35
2.7.1. Sistema inmune innato	36
2.7.1.1. Barreras superficiales: Moco	36
2.7.1.2. Mecanismos mediados por células: no específicos	38
2.7.1.3. Catalasa	38
2.7.1.4. Anti proteasas	39
2.7.1.5. Superóxido dismutasa	40
2.7.1.6. Péptidos antibacterianos	41
2.7.1.7. Proteasas	41
2.7.1.8. Transferrina	41
2.7.1.9. Lectinas	41
2.7.1.10. Lisozima	42
2.7.1.11. Proteína C-reactiva (CRP)	42
2.7.1.12. Complemento	43
2.7.1.13. Mecanismos celulares no específicos	44
2.7.1.14. Células fagocíticas	44
2.7.1.15. Factor de necrosis tumoral (TNF)	45
2.7.1.16. Interferón	45
2.7.1.17. Interleucinas (IL)	45

2.7.1.18. Anticuerpos naturales	46
2.7.1.19. Reconocimiento de lo no propio por el sistema inmune innato	46
2.7.2. Sistema inmune adaptativo	47
2.7.2.1. Mecanismos de defensa específicos	48
2.7.2.2. Inmunoglobulinas	49
2.7.2.3. Memoria inmunológica	50
2.7.2.4. Mecanismos de defensa celulares	50
2.8. Inmunoestimulantes en acuicultura	51
2.9. CpG ODN	55
2.9.1. Mecanismo de la actividad de CpG	56
2.9.2. Clases de CpG ODN	58
2.9.3. CpG ODN 1668	58
2.10. TLR's	59
2.10.1. TLR9	62
2.11. β -glucanos	63
2.11.1. Hongos marinos	64
2.11.2. Líquenes	65
2.11.3. β -glucanos como inmunoestimulantes	66
2.11.4. Activación del sistema inmune mediante β -glucanos	66
II.I. LITERATURA CITADA	68
CAPITULO 3.	96
III. ARTÍCULOS CORRESPONDIENTES	97
3.1. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (<i>Lutjanus peru</i>) exposed to <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	97
3.2. Immunostimulatory properties of marine and lichen fungal	108

glucans in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells.

CAPITULO 4 118

IV. CONCLUSIONES GENERALES 119

LISTA DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1 Agentes de enfermedades en peces con importancia económica.	26
Cuadro 2. Inmunoestimulantes usados en peces y camarón	54
Cuadro 3. Receptores Toll-like y sus ligandos	61

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Huachinango (<i>Lutjanus peru</i>).	24
Figura 2	Distribución geográfica del huachinango del Pacifico (<i>Lutjanus peru</i>).	25
Figura 3	Principales órganos linfoides en peces teleósteos.	31
Figura 4	Señalización de CpG-ADN-TLR9-mediada por células.	57
Figura 5	Estructura de TLR. Toll-like receptores (TLRs) y receptores del interleukin-1.	60

RESUMEN

Los CpG ODN 1668 sintéticos de clase B y β -glucanos, derivados naturales de hongos, poseen evidentes propiedades inmunoestimulantes. En este estudio, se evaluó el potencial inmunoestimulante de CpG ODN 1668 para mejorar la respuesta inmune en el huachinango del Pacífico expuesto a *Vibrio parahaemolyticus*. Por otra parte, fue evaluado el potencial inmunoestimulante de nueve glucanos en leucocitos de riñón cefálico de huachinango del Pacífico en respuesta a la infección bacteriana contra *Aeromonas hydrophila*. En un primer estudio, se evaluaron cuatro tratamientos diferentes: (1) CpG ODN 1668, (2) CpG ODN 1668 e infectado con *V. parahaemolyticus*, (3) solo infección con *V. parahaemolyticus* y (4) PBS (control), los cuales fueron inyectados intraperitonealmente. Se tomaron muestras a las 24, 72, 168 y 240 h de estimulación/infección. Los resultados muestran que CpG-ODN 1668 incrementó la actividad de anti-proteasas, superóxido dismutasa y catalasa en suero. Los CpG ODN 1668 sobre regularon la expresión de los genes TLR9 e IgM en riñón cefálico, intestino y piel, con mayor expresión en riñón cefálico. La correlación más alta fue observada entre los genes TLR9 e IgM en riñón cefálico e intestino. Por último, no se observaron daños histopatológicos en peces estimulados con CpG ODN 1668. Los datos histopatológicos mostraron un incremento en el número de centros melanomacrófagos en los peces infectados. En general, estos resultados indican que CpG ODN 1668 activan la respuesta inmune innata y sobre regula la expresión del gen TLR9 así como los niveles de IgM. Estos resultados pueden ser aprovechados para el control de la Vibriosis en cultivo del huachinango del Pacífico.

En un segundo experimento, el potencial inmunoestimulante de nueve glucanos extraídos de hongos aislados de ambientes extremos fue evaluado en leucocitos de riñón cefálico por 24 h, utilizando análisis colorimétricos y expresión génica molecular. Además, la respuesta contra la infección bacteriana con *Aeromonas hydrophila* fue evaluada por citometría de flujo. Los leucocitos respondieron positivamente a glucanos, donde la viabilidad fue superior al 80%. Los glucanos derivados de hongos incrementaron la capacidad fagocítica comparado con el grupo control (PBS). Del mismo modo, la producción de óxido nítrico y la actividad de la mieloperoxidasa en

leucocitos de riñón cefálico fueron aumentadas por glucanos en comparación con grupos control y zymosan. Igualmente, las actividades antioxidantes de superóxido dismutasa y catalasa se incrementaron en los tratamientos con glucanos derivados de hongos comparado con los grupos zymosan y control. En cuanto a expresión génica, se observó una sobre regulación significativa de las citocinas IL-1 β , TNF- α y IL-17. Finalmente, la supervivencia de los leucocitos estimulados con los diferentes glucanos y expuestos *in vitro* con *Aeromonas hydrophila* fue significativamente incrementada en comparación al control (PBS). Este estudio reveló que los mejores glucanos fueron obtenidos de los hongos: 197A, 197B, 166 y 07NH4; y todos ellos poseen propiedades inmunoestimulantes y también aumentan la supervivencia de leucocitos contra *Aeromonas hydrophila*.

Palabras clave:

CpG ODN 1668; Inmunidad innata; TLR9; IgM; Expresión génica; *Vibrio parahaemolyticus*; Glucanos de hongos; Respuesta inmune; Leucocitos; *Aeromonas hydrophila*; huachinango del Pacífico.

ABSTRACT

B-class CpG ODN 1668 and fungi derived-glucans, have clear immunostimulatory properties. In this study, we investigated the immunostimulant potential of CpG ODN 1668 to enhance the immune response in the Pacific red snapper exposed to *Vibrio parahaemolyticus*. On other hand, the immunostimulant potential of nine glucans in Pacific red snapper head-kidney leukocytes in response against bacterial infection using *Aeromonas hydrophila* was evaluated. In a first study, four different treatments were evaluated: (1) CpG ODN 1668, (2) CpG ODN 1668 and infection with *V. parahaemolyticus*, (3) *V. parahaemolyticus* alone and (4) PBS (control), which were intraperitoneally injected. Samples were taken at 24, 72, 168 and 240 h of stimulation/infection. The results show that CpG-ODN 1668 enhanced the anti-protease, superoxide dismutase and catalase activities in serum. CpG ODN 1668 up regulated TLR9 and IgM gene expression in head-kidney, intestine and skin, with the highest expression in head-kidney. The highest correlation was observed between TLR9 and IgM in head-kidney and intestine. Finally, no histopathological damages in fish stimulated with CpG ODN 1668 were observed. The histopathological data showed an increase in melanomacrophages-like structures numbers in infected fish. Overall, these results indicate that CpG ODN 1668 activates innate immune response and up regulates the TLR9 as well as IgM levels. These results can be used for the control of Vibriosis in farmed Pacific red snapper.

In a second experiment, the immunostimulant potential of nine glucans was evaluated in Pacific red snapper head-kidney leukocytes at 24 h using colorimetric assays and molecular gene expression. In addition, the response against bacterial infection with *Aeromonas hydrophila* was evaluated by flow cytometry. Leukocytes responded positively to glucans, where the viability was higher than 80%. Fungi derived-glucans augmented the phagocytic ability compared to control group (PBS). Similarly, nitric oxide production and myeloperoxidase activity were increased in leukocytes stimulated with glucans compared with control and zymosan groups. Likewise, superoxide dismutase and catalase antioxidant activities were increased in fungi derived-glucans compared with zymosan and control groups. Regarding gene expression, significant up-

regulation of cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-17. Finally, the survival of stimulated leukocytes with different glucans and in vitro exposed to *Aeromonas hydrophila* was significantly increased compared to control (PBS). This study revealed that the best glucans were obtained from: 197A, 197B, 166 and 07NH4; all of them possess immunostimulatory properties and also enhance leukocyte survival against *Aeromonas hydrophila*.

Keywords:

CpG ODN 1668; Innate immunity; TLR9; IgM; Gene expression; *Vibrio parahaemolyticus*; Fungi glucans; Immune response; Leukocytes; *Aeromonas hydrophila*; Pacific red snapper.

CAPITULO 1

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura marina representa uno de los sectores de más rápido crecimiento (INP, 2014), su objetivo es incrementar la productividad por unidad de espacio. Los peces son usualmente cultivados en espacios relativamente pequeños como estanques o jaulas flotantes, con altas densidades de individuos. La sobre población en los cultivos afecta de manera adversa a la salud de los peces haciéndolos susceptibles a enfermedades infecciosas (Austin 1988; Hjeltnes and Roberts 1993; Lightner 1993). La ocurrencia de enfermedades en la acuicultura es una problemática que conducen a grandes pérdidas económicas en esta industria, dentro de estas enfermedades, las infecciones bacterianas son una de las causas más importantes de en el sector acuícola (Immanuel et al., 2004).

La Vibriosis, causada por *Vibrio* spp., es una enfermedad bacteriana común en peces marinos y de agua dulce (Rucker, 1959; Ross et al., 1968; Gómez-Gil et al., 2006). *V. parahaemolyticus* es una bacteria halofílica, gram-negativa, ampliamente distribuida en aguas marinas y costeras (Su and Liu, 2007; Nelapatiet al., 2012; Ceccarelli et al., 2013; Zhang and Orth, 2013). Se han identificado una amplia diversidad de vibrios en lesiones externas y órganos internos de peces (Gómez-Gil et al., 2006). Además, este microorganismo ha sido reconocido como un importante patógeno transmitido por alimentos que provoca gastroenteritis humana en varios países (Okuda et al., 1997; Dileep et al., 2003; Chiou et al., 2000; Robert-Pillot et al., 2004). Así mismo, las bacterias del genero *Aeromonas* tienen un amplio impacto en la salud de animales acuáticos.

Para la prevención y tratamiento de enfermedades en acuicultura, se han desarrollado diferentes medidas de control de microorganismos mediante el uso de vacunas, antibióticos y desinfectantes, sin embargo, algunos de estos, tienen un impacto sobre la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos y poco favorable hacia el medio ambiente (Igbinsosa, E., 2016). Alternativamente, la vacunación ha sido sugerida como una medida efectiva profiláctica para el control de enfermedades en peces (Midtlyng et al., 1996). Tradicionalmente las vacunas se componen de patógenos vivos atenuados, con o sin la capacidad de replicarse,

patógenos inactivados ó sus subunidades (Tafalla et al., 2013). En muchos países, las vacunas vivas no son aprobadas para uso en acuicultura, mientras las vacunas inactivadas ya sea con patógenos muertos o sin la capacidad de replicarse, generalmente son poco inmunogénicas. Por lo tanto, los adyuvantes o inmunopotenciadores son requeridos en las vacunas para que la respuesta inmune pueda ser altamente protectora contra ciertos patógenos (Tafalla et al., 2013). Algunos adyuvantes tal como sales de aluminio y emulsiones de lípidos, se piensa que actúan creando depósitos del antígeno en el sitio de inoculación, desde el cual el antígeno es liberado lentamente y presentado al sistema inmune sobre un prolongado periodo de tiempo (Tafalla et al., 2013). Sin embargo frecuentemente generan un daño en el tejido en el cual se inoculan.

Los CpG ODNs se conocen como secuencias inmunoestimulantes (ISS) y se han convertido en la base para el desarrollo de vacunas para una amplia gama de aplicaciones debido a sus destacadas propiedades de activación inmune. Los CpG ODNs han sido probados como un adyuvante en vacunas en más de una docena de ensayos clínicos en diversos campos incluyendo enfermedades infecciosas, cáncer y alergias. Coincidentemente, la prueba clínica más extensa se ha realizado para vacunación profiláctica de hepatitis B donde dos vacunas independientes se han aplicado para investigar cómo los CpG se pueden utilizar para mejorar la inmunogenicidad. Una vacuna profiláctica de HBV utilizando ISS como su único adyuvante, ha sido probada ampliamente en ensayos clínicos (Halperin et al., 2003; Halperin et al., 2006). Así mismo se han desarrollado ensayos clínicos utilizando las ISS para influenza (Cooper et al., 2004), melanoma (Speiser et al., 2005; Appay et al., 2006) y rinitis alérgica (Tulic et al., 2004; Simons et al., 2004; Creticos et al., 2006).

Los oligodeoxynucleotidos CpG o CpG ODN son moléculas sintéticas cortas de ADN mono catenario que contienen un deoxinucleótidos trifosfato de citosina ("C") seguido por un deoxinucleótidos trifosfato de guanina ("G"). La "p" se refiere al enlace fosfodiéster entre nucleótidos consecutivos, aunque algunos ODN tienen una columna vertebral fosforotioato modificado (PS) en su lugar. (Weiner et al., 1997). Basado en la

estructura del su esqueleto y secuencias de oligonucleótidos, los CpG ODNs se caracterizan en tres clases con distintas características estructurales y biológicas, incluyendo tipo A, tipo B y tipo C (Krieg, 2002). Los ODNs CpG-A están diseñados con un esqueleto fosfodiéster y son muy eficaces en la activación dendrítica, presentación de antígenos y células NK (Uhlmann y Vollmer, 2003). Los ODNs Clase B, completamente diseñados con esqueleto de fosforotioato (PS), tienen mucho mayor efecto estimulante de los linfocitos B y producción de Ig (Krieg et al., 1995; Kang y Kim, 2012). Por último, ODNs clase C también se construyen de esqueletos de PS y combinan las propiedades y efectos de los dos A y B clase ODNs, activando dendríticas, linfocitos B y NK células (Vollmer et al., 2004). Estos inmunomoduladores ODNs tienen varios usos terapéuticos potenciales en humanos (Hartmann y Krieg, 2000; Carpentier y Delattre, 2003; Taghavi and Gunduz, 2016). Ha sido reportado que los CpG ODN sintéticos magnifican la respuesta inmune con menos toxicidad que otros adyuvantes usados en peces (Bode et al., 2011; Rhodes et al., 2004; Carrington et al., 2007; Liu et al., 2010, a; Liu et al., 2010, b; Kang et al., 2012). Particularmente el CpG ODN 1668 de clase B, ha sido reportado como un potente inmunoestimulante en peces marinos de importancia en acuicultura, es decir mediante el incremento del estallido respiratorio, inducen la expresión de interleucina 1- β , y proliferación leucocitaria (Carrington y Secombes, 2006), así como producción de interferón- α , maduración de células dendríticas, y activación de células B (Higgins et al., 2007).

Los β - glucanos son polímeros de glucosa encontrados en la pared celular de plantas, hongos, levaduras y bacterias (Brown and Gordon, 2003), los cuales han mostrado tener actividad inmunoestimulante en peces y otros animales (Ai et al., 2007; Masuda et al., 2009). Los β - glucanos son oligosacáridos no digestibles, consisten en unidades β -1,3--unidas a b-D-glucopyranosyl que forman un esqueleto que contiene cadenas β - 1,6 laterales dispersadas aleatoriamente. En humano y ratón, los β - glucanos han mostrado estimular tanto la respuesta inmune específica (adyuvante en vacunas) como la respuesta inmune no específica (Abel and Czop, 1992; Adachi et al., 1994; LeBlanc et al., 2006; Mucksova et al., 2001; Williams et al., 1989). Así mismo los β - glucanos estimulan la fagocitosis y la producción de citocinas pro inflamatorias por los macrófagos (Brown, 2006; Brown and Gordon, 2001). Los β -glucanos tienen la

habilidad de estimular neutrófilos y monocitos para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rubin-Bejerano et al., 2007; Thornton et al., 1996; Vetvicka et al., 1996; Xia et al., 1999). El reconocimiento de partículas derivadas de hongos y levaduras ha sido atribuido a una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) incluyendo el receptor del complemento 3 (CR3), lactosylceramida y un receptor putativo específico de β - glucano llamado Dectin-1 (Sonck et al., 2009). Los β - glucanos también han sido conocidos por incrementar la resistencia en peces y otros animales acuáticos, en contra de infecciones bacterianas y virales (15, 71, 72).

El huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) es una importante especie de pez para las pesqueras locales y otros países en Latinoamérica por su rápida ganancia de peso y alto valor a la venta en el mercado. Su distribución abarca desde Bahía Magdalena, Baja California Sur México, hacia el norte de la costa de Perú, e incluye el sur del Golfo de California, México (Santamaría y Chávez, 1999). En México la captura del huachinango alcanzó 2,779 toneladas, valuadas en 6.3 millones de dólares en 2012 (CONAPESCA 2012), además ha incrementado su cultivo debido a su rápido crecimiento y alto valor en el mercado (García-Ortega et al., 2005; Gallardo et al., 2010; Sarabia-Méndez et al. 2010).

Por lo tanto el objetivo de este estudio está enfocado a conocer los efectos del CpG ODN 1668 y β -glucanos obtenidos de hongos aislados de ambientes extremos sobre la respuesta inmune innata, humoral y antioxidante en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*).

I.I. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades en peces pueden conducir a grandes pérdidas económicas para la industria acuícola. Para la prevención y tratamiento de enfermedades, se han desarrollado diferentes medidas de control de microorganismos mediante el uso de vacunas y antibióticos, sin embargo, algunos de estos, tienen un impacto en la resistencia bacteriana y efecto del medio ambiente. La vacunación y el uso de adyuvantes, ha sido sugerido como un método profiláctico efectivo para el control de enfermedades en peces y a su vez con medio ambiente. Adyuvantes sintéticos tal como CpG ODN y β - glucanos han mostrado ser activadores e inductores de una fuerte respuesta inmune y con menos toxicidad que otros adyuvantes. El huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) es importante económicamente en la acuicultura artesanal a lo largo de la costa noreste de México por su amplia aceptación, y alto valor en el mercado. Los avances en biotecnología han mostrado que esta especie puede ser un candidato prometedor en acuicultura. En años recientes, el brote de enfermedades han sido un severo problema en la acuicultura y una amplia variedad de *Vibrio* spp. han sido encontrados en lesiones externas y en órganos internos tanto en peces cultivados como en estado salvaje. Por lo tanto este estudio está enfocado a conocer los efectos de CpG ODN 1668 y β - glucanos de hongos aislados de ambientes extremos sobre el sistema inmune del huachinango del pacífico (*Lutjanus peru*) como posible medida de prevención y tratamiento frente a la enfermedad causada por *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas hydrophila* respectivamente.

I.II. HIPÓTESIS

Si el uso del inmunoestimulante sintético (CpG ODN) y natural (β - glucano) en vacunas, es capaz de estimular la respuesta inmune innata y participa en la activación de la fase de memoria y respuesta primaria a infecciones, entonces, el CpG ODN y β -glucanos de hongos extremófilos en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) modularán la respuesta inmune innata y antioxidante que podría ayudar en el control de la infección por *V. parahaemolyticus* y *Aeromonas hydrophila* respectivamente.

I.III. OBJETIVOS

1.3.1. General

Evaluar el efecto de CpG ODN 1668 y β -glucanos obtenidos de hongos aislados de ambientes extremos sobre la respuesta inmune innata, humoral y antioxidante en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*).

1.3.2. Específicos

- 1) Evaluar la respuesta inmune innata y antioxidante a través del plasma sanguíneo en respuesta a la administración intraperitoneal de CpG ODN 1668 y *Vibrio parahaemolyticus*.
- 2) Analizar la expresión de los genes TLR9, IgM de órganos y tejidos linfoides en respuesta a la estimulo de CpG ODN 1668 y *Vibrio parahaemolyticus* mediante qPCR.
- 3) Evaluar los cambios histopatológicos en intestino de peces expuestos experimentalmente a *V. parahaemolyticus* y tratados CpG ODN 1668.
- 4) Evaluar la respuesta inmune innata y antioxidante en leucocitos de riñón cefálico y bazo del huachinango expuestos a β - glucanos de hongos aislados de ambientes extremos y *Aeromonas hydrophila*.

CAPITULO 2

Revisión de literatura

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Acuicultura en México

A finales del siglo pasado se ha dado un fuerte impulso a la acuicultura, ya que representa una alternativa para ampliar la oferta alimentaria, la generación de divisas y creación de nuevas fuentes de empleo estimulando el desarrollo regional (FAO, 2017). En México destaca el cultivo del camarón, ostión y peces de la familia de los tunidos la carpa, etc. Entre los principales estados acuicultores se encuentra Sinaloa, Sonora y Nayarit, mientras que en Baja California Sur la producción acuícola corresponde al sexto lugar en el Pacífico de México (SAGARPA, 2011). La familia *Lutjanidae* es uno de los principales recursos pesqueros en las plataformas de zona tropical y subtropical, gracias a su excelente calidad y alto valor de mercado. De acuerdo con reportes de la organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación FAO, las capturas de pargos alcanzan las 90,000 toneladas. Para México se tiene reportado que durante los últimos 20 años los volúmenes de pesca han variado entre 4000 y 11617 toneladas anuales, solo por la pesca comercial. Durante 2002, en los estados de Oaxaca, Jalisco, Guerrero, Michoacán y Colima, el huachinango ocupó el segundo, cuarto, quinto, sexto y séptimo lugar con volúmenes de 832,403, 355,298 y 130 toneladas respectivamente. En los últimos años, el estado de Baja California se ha consolidado como el principal productor de huachinango, aportando 1,014 y 826 toneladas a la producción nacional para los años 2010 y 2011 respectivamente. Los Lutjanidos son la especie objetivo de la pesquería artesanal en los estados costeros del Pacífico, ya que son especies de gran demanda en el mercado y brindan grandes ingresos a los pescadores. El huachinango por su volumen de producción, se encuentra ubicado en el lugar 26 de la producción pesquera en México; sin embargo por su valor económico, se sitúa en el lugar 11. La tasa media de crecimiento anual de producción en los últimos 10 años es de 0.15% (CONAPESCA, 2012). El Golfo de California es una de las más importantes regiones acuícolas del Pacífico tropical este y la región acuícola más productiva en México (OECD, 2006). Una gran porción de esta productividad se debe por la cosecha comercial de cabrillas, pargos, corvinas y jacks y otros peces de costa marina que forman agregaciones para el desove en sitios

específicos durante ciertas temporadas (Aburto- Oropeza et al., 2008; Erisman et al., 2007; Román-Rodríguez, 2000; Sala et al., 2003).

2.2 Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*)

2.2.1. Clasificación taxonómica

Lutjanus peru (Nichols & Murphy 1922)

Eukariota; Metazoa;	Acanthopterygii; Percomorpha;
Chordata; Craniata;	Perciformes; Percoidei
Actinopterygii; Neopterygii;	Familia Lutjanidae;
Teleostei; Euteleostei;	Especie: <i>Lutjanus</i> ; <i>Lutjanus peru</i>
Neoteleostei; Acanthomorpha;	Nombre común: Huachinango

2.2.2. Características morfológicas

El huachinango es un pez tropical (26-30° C) que llega a alcanzar tallas de 95 cm de longitud total y se han registrado individuos que llegan a pesar 8 kilos. Estos peces muestran un cuerpo cubierto por escamas de color plateado- rosado a plateado-rojizo con franjas de color amarillento y el color de las aletas puede variar desde rosadas a rojas (Figura 1). Poseen un hueso pre orbitario que en adultos tiende a ser muy ancho. Los ejemplares de mayor tamaño presentan un surco desde el borde anterior de los ojos hasta los orificios nasales y otro surco en la parte superior del preopérculo. El huachinango tiene una placa de dientes vomerinos de forma ligeramente romboidal, con o sin extensión posterior mediana; lengua con una o más áreas de dientes granulares. La aleta dorsal presenta 10 espinas y de 13 a 14 radios blandos, su perfil posterior es puntiagudo, su aleta caudal es truncada y levemente emarginada. Cuenta con una serie de escamas oblicuas por encima de la línea lateral (Fisher et al., 1995).



Figura 1. Huachinango (*Lutjanus peru*) capturado en aguas de Baja California Sur (México).
Fuente: [http:// www.mexfish.com](http://www.mexfish.com).

2.2.3. Alimentación

Las larvas del huachinango se alimentan principalmente de zooplancton, mientras los juveniles de mayor talla que habitan los fondos marinos consumen gran variedad de invertebrados bénticos, principalmente crustáceos, larvas o juveniles de peces. Por otra parte los adultos de *L. peru* son depredadores oportunistas y eurípagos, que consumen una gran diversidad de presas, aunque los crustáceos y los peces constituyen el alimento principal de muchas especies. En menor proporción consumen una variedad de invertebrados, como moluscos, poliquetos y crustáceos (Santamaría-Miranda et al., 2005).

2.2.4. Distribución e importancia comercial

El huachinango del Pacífico, *Lutjanus peru*, es una de las especies más importantes, tanto por su volumen de capturas como por su alto valor en el mercado para las pesquerías artesanales en México. Esta especie ha obtenido popularidad a nivel mundial por la calidad de su carne, con un valor en el mercado de alrededor de \$ 100.00 MXN por kilo (SAGARPA, 2011). Habita mar adentro al menos 90 m de profundidad. Su distribución varía desde Bahía Magdalena, Baja California Sur, México hacia el norte de la costa de Perú, e incluye el sur del Golfo de California México. La temporada reproductiva se extiende desde Mayo hasta Julio, con otro pico pequeño en

septiembre en la Bahía de La Paz en el Golfo de California, y se extiende desde Febrero a Septiembre en la costa del estado de Guerrero (Santamaría-Miranda et al., 2005). (Figura 2). En algunas regiones del noroeste Mexicano, como la costa este de Baja California Sur, el ciclo de pesca depende en gran medida del huachinango ya que su captura puede aportar hasta 25% de los ingresos por ventas en playa. El huachinango del Pacífico es un pez de alto valor comercial; pero su demanda puede exceder su oferta, promoviendo la captura de peces juveniles salvajes y su cultivo en jaulas flotantes en el mar en una pequeña escala en diferentes áreas de la costa del Pacífico.



Figura 2. Distribución geográfica del Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*)

2.3. Panorama de salud en la acuicultura

Los peces y productos de pesquería, representan una fuente de proteínas y micronutrientes esenciales que son importantes para la salud humana. La acuicultura está entre uno de los sectores de más rápido crecimiento en la producción de alimentos en el mundo (Reverter et al., 2014), sin embargo las enfermedades infecciosas, son el principal impedimento para el desarrollo de la acuicultura y frecuentemente la causa de pérdidas económicas más significantes (Plant y LaPatra, 2011).

Las enfermedades afectan a los animales marinos de valor económico de dos maneras; La primera por la reducción en el potencial de pesca que resulta del decremento de la productividad biológica, la cual puede disminuir por el incremento de la mortalidad, lento crecimiento, defensas inmunes invertidas en los agentes

infecciosos y respuestas del hospedero a la infección que dañan a ambos. La segunda por un mal sabor, apariencia o por riesgos a la salud humana (Lafferty et al., 2015). Las enfermedades infecciosas en acuicultura son causadas por diferentes bacterias, parásitos y virus patógenos.

De las enfermedades marinas, 25% son causadas por virus, 34% son por bacterias, 19% son protistas y 18% aremetazoans; en cuanto a los anfitriones, 49% de los agentes infecciosos afectan a peces, 21% afectan crustáceos, moluscos afectan a 28% y 1% afectan equinodermos (Cuadro 1). Suficiente es decir, muchos agentes infecciosos causan importantes enfermedades marinas e infectan una variedad de especies cultivadas y pescadas (Lafferty et al., 2015).

Cuadro 1. Agentes de enfermedades en peces con importancia económica.

Peces	Agente etiológico	Región	Impacto
Virus			
Peces (marinos)	Nodavirus	Mundial	Mortalidad
Peces (arenque)	Virus de septicemia hemorrágica	Holártico	Mortalidad
Besugo rojo	Iridovirus	Japón, Mediterráneo	Mortalidad
Sardinias	Herpesvirus	Australia	Mortalidad
Salmon	Virus de anemia infecciosa	Atlántico norte, Chile	Mortalidad
Salmon	Virus de necrosis hematopoyética infecciosa	U.S.A., Europa, Japón	Mortalidad
Peces (varios)	Acuabirnavirus	Mundial	Mortalidad
Bacteria			
Peces (marinos)	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Regiones tropicales y subtropicales en el mundo	Mortalidad
Platijas	<i>Edwardsiella tarda</i>	Japón	Mortalidad, salud
Peces (marinos)	<i>Vibrio</i> spp.	Mundial	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Mycobacterium</i> spp.	Mundial	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Streptococcus</i> spp.	Mundial	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Listonella anguillarum</i>	Mundial	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Moritella viscosa</i>	Atlántico norte	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Photobacterium damsela</i>	U.S.A., Europa, Japón	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	U.S.A., Europa, Japón	Mortalidad
Salmon	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Mundial	Mortalidad
Salmon	<i>Vibrio salmonicida</i>	Holártico	Mortalidad
Salmon	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Holártico	Mortalidad
Cola amarilla	<i>Nocardia seriolae</i>	Japón	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Chlamydia</i> -semejante a bacteria	Mundial	Crecimiento
Cola amarilla	<i>Lactococcus garviae</i>	Japón	Mortalidad
Protistas			
Peces (marinos)	<i>Ichthyophonus hoferi</i>	Holártico	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Regiones tropicales y subtropicales	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Mundial	Mortalidad
Metazoarios			
Peces (marinos)	<i>Kudoa</i> spp.	Mundial	Comerciabilidad
Salmon	<i>Parvicapsula</i> spp.	Noruega	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Enteromyxum</i> spp.	Mediterráneo, Japón	Mortalidad
Peces (marinos)	<i>Anisakid nematodes</i>	Mundial	Comerciabilidad
Peces (marinos)	<i>Cryptocoryle lingua</i>	Mundial	Mortalidad, crecimiento
Peces (marinos)	<i>Monogenea</i> (varios)	Mundial	Mortalidad, crecimiento
Salmon	<i>Eubothrium</i> spp.	Europa	Crecimiento
Peces (marinos)	<i>Lepeophtheirus</i> spp., <i>Caligus</i> spp.	Mundial	Mortalidad

(Lafferty et al., 2015)

Para el control de enfermedades, estrategias como vacunación, probióticos, agentes antimicrobianos, son empleados en acuicultura así como en otras áreas de ganadería. Los antibióticos han sido rutinariamente administrados, pero como consecuencia, han tenido un impacto negativo sobre el medio ambiente y salud humana. Esto incluye la emergencia de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, la acumulación de residuos en tejidos comestibles y depresión del sistema inmune (Bricknell y Dalmo, 2005).

De acuerdo a lo anterior se han propuesto nuevas estrategias de control y prevención que beneficien tanto a los individuos de producción, sean amigables con el medio ambiente con el propósito de establecer una excelente inocuidad alimentaria (Perez-Sanchez et al., 2013). Estas nuevas estrategias dirigidas al estímulo del sistema inmune de peces, al igual que animales domésticos de producción, han desarrollado una respuesta inmune frente a agentes infecciosos (Nayak, 2010)

2.4. *Vibrio* spp.

Entre las distintas bacterias, *Vibrio* spp. son organismos ubicuos en ambiente marino y estuarino y son patógenos oportunistas cuando un pez está en estado inmunodeprimido. Especies de *Vibrio* tal como *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, y *Vibrio splendidus*, han sido encontradas como agentes causales de infecciones en sistemas acuícolas. (Jayasree et al., 2006; Letchumanan et al., 2015). La vibriosis en peces se manifiesta generalmente como una septicemia hemorrágica abdominal diseminada y abdomen aumentado de volumen debido a la inflamación de vísceras internas, necrosis en sinusoides hepáticos, severa degeneración hidrópica en hígado, el tejido renal presenta hemosiderosis, necrosis de los túbulos contorneados y glomérulos, necrosis de las arterias envainadas del bazo, y hemorragia intestinal (Zhang et al., 2016), así mismo, necrosis y hemorragias en piel (Khouadja et al., 2013). Como con muchas enfermedades de los peces, se puede hacer mucho para limitar la ocurrencia y severidad de vibriosis por el tratamiento cuidadoso de los peces y el control de factores ambientales. De hecho, vibriosis en peces podría ser casi totalmente evitable si se

practica muy buen manejo. Sin embargo cuando aparecen infecciones, el uso de la vacunación es recomendado debido a que está dirigida al estímulo de la respuesta inmune ya que los peces como los vertebrados superiores cuentan con un sistema inmune capaz de responder a las infecciones por agentes patógenos (Ellis, 1999).

2.4.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Una de las principales enfermedades bacterianas es causada por *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria gram-negativa, halofílica, la cual causa la enfermedad conocida como vibriosis que afecta a una gran variedad de peces, crustáceos y otros animales acuáticos (Zhang et al., 2016). Las especies patogénicas de *Vibrio* producen varios factores de virulencia responsables de las lesiones en peces que incluyen; enterotoxina, hemolisina, citotoxina, proteasa, lipasa, fosfolipasa, sideroforo, factor adhesivo y/o hemaglutininas (Zhang and Austin 2005). Los factores de virulencia de las cepas de *V. parahaemolyticus* están comúnmente asociadas con la expresión de hemolisina termoestable (TDH) y hemolisina relacionada a TDH (TRH), la cual esta codificada por los genes *tdh* y *trh*. Por lo tanto, el gen *tdh*, marcado por una hemolisis tipo β en agar Wagatsuma (Nishibuchi and Kaper 1995), y el gen *trh* se correlacionan por pruebas ureasa positivas (Okuda et al. 1997), sirviendo como marcadores para cepas patogénicas. Se sugiere que muchas proteasas extracelulares juegan roles importantes en la virulencia de *Vibrio* spp. En un estudio, fue reportada una proteasa fue identificada como el principal factor de virulencia en un aislado clínico de *V. parahaemolyticus* negativo a *tdh* y *trh*, y esta enzima mostro actividad citotóxica sobre células ováricas y renales (Lee et al. 2002).

2.5. *Aeromonas hydrophila*

Las bacterias del genero *Aeromonas* tienen una distribución mundial y un amplio impacto en la salud de animales acuáticos. *Aeromonas hydrophila*, está entre las bacterias más comunes en hábitats de agua dulce y con frecuencia causa enfermedad en peces cultivados y salvajes (Austin y Austin, 2007) y es una bacteria gram-negativa,

anaerobia facultativa que está presente en una variedad de ambientes acuáticos (Janda, 1991) y es patogénica para una amplia gama de animales, incluyendo peces, reptiles, aves y mamíferos (Tomas, 2012). Las *Aeromonas* se adaptan a los ambientes que tienen una amplia gama de conductividad, turbidez, pH, salinidad y temperatura (Hazen *et al.*, 1978a). La temperatura óptima depende de la cepa particular, pero generalmente van de 25 a 35° C. Por lo tanto, mayoría epizootias en peces de aguas templadas se reportan generalmente en primavera y principios del verano (Meyer, 1970). La resistencia a la enfermedad también es baja en estas temporadas porque los organismos acuáticos a menudo son frecuentemente anémicos y tienen una disminución en las proteínas del suero resultante de períodos de inactividad y el hambre que se han producido durante el invierno, los animales también aumentan la producción de corticosteroides, que a su vez aumenta su susceptibilidad a la infección (Huizinga *et al.*, 1979). Del mismo modo, epizootias de *A. hydrophila* y *A. jandaei* se han reportado con frecuencia en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) y ocurren más a menudo en primavera y verano cuando las temperaturas del agua oscilan entre 17 y 20 ° C (Esteve *et al.*, 1993). El patógeno también puede afectar a especies de agua templada y agua fría, pero no está necesariamente restringido a ambientes de agua dulce. Las *Aeromonas* móviles también pueden causar enfermedad en los vertebrados de sangre caliente. Las enfermedades causadas por este patógeno incluyen septicemia fatal de *Aeromonas* móvil (MAS) en peces, así como gastroenteritis, septicemia, meningitis y fascitis necrotizante en infección humana (Trower y Abo, 2000; Blair *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2002; Janda y Abbott, 2010). En seres humanos inmunocomprometidos, *A. hydrophila* puede causar artritis séptica, diarrea, úlceras en la córnea en piel e infecciones en heridas, meningitis y septicemia fulminante (von Gravenitz y Mensch, 1968; Davis *et al.*, 1978). Aislados clínicos de *A. hydrophila* se han obtenido a partir de alimentos tal como pescados, mariscos, leche cruda, las aves de corral y carnes rojas y todos los aislados tuvieron biotipos idénticos a los de las cepas enterotoxina-positiva (Palumbo *et al.*, 1989). La capacidad de estas bacterias para crecer competitivamente a 5° C puede indicar su potencial como un peligro para la salud pública. Las *Aeromonas* móviles causan diversas condiciones patológicas que incluyen infecciones agudas, crónicas y subclínicas. La severidad de la enfermedad es

influenciada por una serie de factores interrelacionados, incluyendo la virulencia bacteriana, el tipo y grado de estrés que se ejerce sobre una población de peces, la condición fisiológica del huésped y el grado de resistencia genética inherente dentro de poblaciones específicas. Los rasgos genéticos de *A. hydrophila* que contribuyen notablemente a la virulencia, incluyen genes que codifican a toxinas, flagelos, pili y sistemas de secreción (Ji et al., 2015; Pang et al., 2015; Rasmussen-Ivey et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales *A. hydrophila* causa septicemia grave en los peces aún están por establecerse.

La transmisión de la enfermedad ocurre por la contaminación del agua de estanque, peces enfermos o convalecientes, pueden ser reservorios de la infección. Ciertas algas (Kawakami y Hashimoto, 1978) y otros protozoos que son ingeridos por peces pueden también la enfermedad causada por *Aeromonas* (Chang y Huang, 1981).

Debido a que estas bacterias componen parte de la micro-biota intestinal normal en peces sanos (Trust et al., 1974), la presencia de la bacteria, por sí misma, no es indicativa de enfermedad. En consecuencia, el estrés asociado con la acuicultura intensiva a menudo incrementa la severidad de epizootias causadas por estas bacterias. Históricamente, los brotes en acuicultura de MAS en peces han causado enormes pérdidas económicas industriales en China (Zhang et al., 2014) y los Estados Unidos (Hossain et al., 2014).

2.6. Órganos del sistema inmune en peces teleósteos

El sistema inmune de los peces teleósteos es similar al de los vertebrados, sin embargo, presentan algunas diferencias. A pesar de estas diferencias, la respuesta inmune de vertebrados, tanto mamíferos como peces se divide en dos tipos, que son la inmunidad innata y adaptativa.

La carencia de médula ósea y nódulos linfáticos en peces teleósteos es una de las principales diferencias con los mamíferos, lo que hace que no se pueda diferenciar claramente entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides primarios y secundarios. Aunque algunos autores optan por denominar a los órganos que ejercen estas funciones en los peces como órganos linfo-hematopoyéticos (Zapata, 1985). Por otro

lado se ha reportado que el timo, riñón cefálico y el bazo son los órganos linfoides principales de teleósteos (Figura 3). El timo es un órgano de diferenciación y selección de linfocitos T, por otro lado el riñón cefálico contiene un gran número de macrófagos y linfocitos B y debido a su gran capacidad hematopoyética se le considera como un análogo a la médula ósea de los mamíferos, el bazo tiene funciones similares a las del riñón cefálico con énfasis en la presentación de antígenos y la inducción de la respuesta inmune adaptativa. En teleósteos de agua dulce, el timo es el primer órgano a convertirse linfoide, aunque antes, el riñón cefálico puede contener progenitores hematopoyéticos pero no linfocitos (Lam et al., 2004). Sin embargo, en teleósteos marinos, el orden en que se desarrollan los principales órganos linfoides es; riñón cefálico, bazo y, finalmente el timo, aunque el bazo de las larvas de peces es más eritropoyético que linfopoyético (Schroder et al., 1998). El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) está conformado por linfocitos de diferente tamaño, células plasmáticas, macrófagos y algunos tipos de granulocitos, células positivas al ácido periódico de Schiff y eosinófilos. En teleósteos, las células intra epiteliales del intestino son equivalentes a linfocitos T de mamíferos, mientras que las áreas linfoides de la lámina propia contienen principalmente linfocitos B (Pabello, 2010).

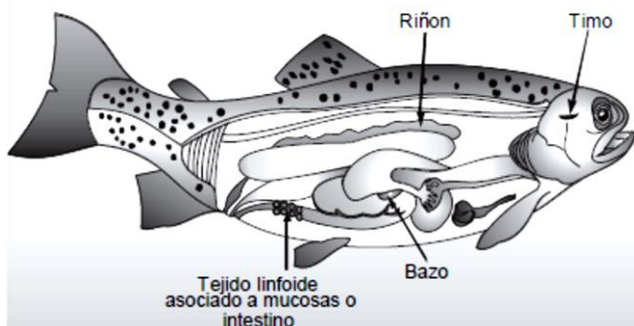


Figura 3. Principales órganos linfoides en peces teleósteos (Pabello, 2010).

2.6.1. Timo

Es un órgano par, homogéneo, representado por unas delgadas láminas ovales de tejido linfoide, dispuesto subcutáneamente en la comisura dorsal del opérculo, revestido por tejido mucoso del epitelio faríngeo (Ellis, 1988). A nivel estructural, se compone mayoritariamente de células linfoides, principalmente timocitos, en distintos

estadios de maduración, dispuestos en una red formada por células epitelio-reticulares. También pueden encontrarse células mioideas, células del tipo de los macrófagos y células granulares eosinofílicas. En ocasiones pueden aparecer nidos focales epiteliales, conocidos como corpúsculos de Hassal (Zapata, 1985; Ferguson, 1989). La alta capacidad mitótica de los timocitos, la migración de linfocitos a otros órganos linfoides, principalmente el bazo, y el tamaño relativamente grande que alcanza este órgano en juveniles de tres o cuatro meses de edad, ha hecho pensar que el timo era el principal órgano linfopoyético (Tatner y Manning, 1983; Tatner, 1985). Mediante la timectomización de truchas de diversas edades, se demostró la implicación del timo en la respuesta celular y humoral frente a antígenos T-dependientes o T-independientes a lo largo de la vida de los peces hasta que son adultos (Zapata, 1985).

2.6.2. Riñón cefálico

El riñón aparece como una hoja de tejido en posición dorsal, unida a las paredes de la cavidad general del cuerpo del pez mediante el mesotelio y parte de tejido conectivo. Macroscópicamente es un órgano homogéneo, pero puede diferenciarse un segmento anterior o riñón craneal, derivado del pronefros y constituido fundamentalmente por tejido linfo-hematopoyético, y un segmento medio y/o posterior o riñón troncal derivado del mesonefros, en el que el tejido hematopoyético forma una matriz entre las nefronas y estructuras del sistema excretor (Ferguson, 1989). Estructuralmente, el riñón anterior se compone de una red de fibras reticulares que proporcionan soporte para el tejido linfo-hematopoyético, que se encuentra disperso entre un sistema de sinusoides revestido por células reticuloepiteliales (Ellis, 1977; Press y cols., 1994). Aparecen como células principales un gran número de macrófagos, centros melanomacróforos (CMMs), y células linfoides en todos sus estadios evolutivos, mayoritariamente células Ig⁺ (linfocitos B) (Kaattari e Irwin, 1985; Press y cols., 1994). En el desarrollo del pez, el riñón cefálico es el primer órgano en el que aparecen células Ig⁺, por lo que se le considera un órgano primario en la diferenciación de células B (Irwin y Kaattari, 1986). Para la diferenciación celular es necesaria la cooperación de células del estroma, que en el caso del riñón son células reticulares y macrófagos. Por esta característica, por su capacidad hematopoyética y

de producción de células sanguíneas, y por sus características ultra estructurales e histoenzimáticas, es considerado como un órgano análogo a la médula ósea de los mamíferos, en el que se produce la eritropoyesis, granulopoyesis y linfopoyesis (Razquin y cols., 1990).

2.6.3. Bazo

Es un órgano abdominal, que suele ser único, aunque en ocasiones pueden encontrarse dos o más bazos menores. Está bien definido por una cápsula fibrosa, pero no presenta ni trabéculas ni una clara diferenciación entre pulpa blanca y pulpa roja, característico del bazo de los mamíferos. Está compuesto por un sistema de elipsoides esplénicos, CMMs y tejido linfoide que en la mayoría de las especies aparece organizado formando acúmulos alrededor de los otros dos componentes (Ferguson, 1989). Los elipsoides son capilares de paredes gruesas que se abren en la pulpa y que resultan de la división de las arteriolas esplénicas. En sus paredes aparecen macrófagos que participan activamente en la fagocitosis de antígenos, generalmente bajo la forma de complejos antígeno-anticuerpo o de productos metabólicos, material que puede ser retenido largos periodos de tiempo y jugar un papel importante en el fenómeno de memoria inmune.

2.6.4. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

El principal tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) de teleósteos es el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), tejido linfoide asociado a piel (SALT), el tejido linfoide asociado a Branquias (GIALT) y el tejido linfoide asociado a nasofaringe recientemente descubierto (NALT). El tejido linfoide asociado a mucosas no es un órgano linfoide como tal, pero se considera tejido linfoide con importantes funciones defensivas y constituye la barrera inicial en contra de la invasión de microorganismos (Dalmo et al., 1997).

Se ha reportado que los peces teleósteos carecen de un organizado tejido linfoide asociado a intestino tal como las placas de peyer en mamíferos. Al igual que en el mucus de piel y branquias, en el mucus intestinal se ha demostrado la presencia de

leucocitos, macrófagos, linfocitos, mastocitos, granulocitos y células plasmáticas capaces además de secretar anticuerpos bajo inmunización (Georgopoulou y Vernier, 1986). El MALT en peces teleósteos está compuesto de células B y células T de la mucosa con sus respectivos receptores y moléculas de señalización, que se han especializado para cumplir con las demandas específicas del medio mucosal. Generalmente, el sistema inmune de la mucosa favorece un microambiente tolerogénico que evita la constante respuesta inmune contra antígenos inocuos presentes por ejemplo en la comida o microbiota. En otras palabras, la tolerancia inmunológica para mantener la homeostasis es una característica del entorno de la mucosa (Kim et al., 2012).

En los peces teleósteos, IgT y IgM son detectables en el nivel de proteína en cierta cantidad de las secreciones mucosa mediante inmunoblotting o ELISA (Salinas et al., 2011). Células B IgT⁺ son el subconjunto de células B preponderante en GALT, SALT y NALT en comparación con el riñón cefálico, bazo, donde las células B IgM⁺ son el subconjunto principal (Zhang et al., 2010; Xu et al., 2013; Tacchi et al., 2014). Por otro lado las células T parecen ser muy abundantes en GALT, SALT y GIALT en la carpa común, representa al 50% – 70% de todas las células linfoides (Rombout et al., 1998) y se han encontrado marcadores de células T en GALT, SALT, GIALT y NALT de teleósteos (Rombout et al., 1998; Bernard et al., 2006; Rombout et al., 2014; Tacchi et al., 2014; Núñez et al., 2014). Además, estudios en carpa sugirieron que las células de T de la piel, intestino y branquias representan un subconjunto distinto de aquellas células T presentes en tejidos linfoides sistémicos (Rombout et al., 1998).

2.6.5. Centros melanomacrófagos (CMMs)

Son agregados celulares cuya denominación como centros melanomacrófagos (CMMs) fue propuesta por Roberts en 1975 por la semejanza ultra estructural de sus células con macrófagos, su alto contenido en melanina y su tendencia a agregarse (Agius, 1985). Aparecen en órganos linfoides de todos los teleósteos. En salmónidos se localizan principalmente en bazo y riñón, y más escasamente en las áreas peri portales del hígado, y a diferencia de otras especies, no están cubiertos por una cápsula externa (Zapata, 1985). Se distribuyen homogéneamente por todo el tejido esplénico y

renal, por lo que algunos autores sugieren que están estrechamente relacionados con el sistema vascular y que la entrada de los productos que acumulan se produce vía sanguínea (Herráez y Zapata, 1986; Ziegenfuss y Wolke, 1991). Se forman principalmente por acumulación de células fagocíticas que contienen material foráneo y grandes cantidades de productos de desecho celular, y células linfoides Ig+, además de otros linfocitos Ig- y células reticulares (Agius, 1985; Lamers y Parmentier, 1985; Tatner y Finlay, 1991; Press y cols., 1994).

2.7. Sistema inmune en peces

El término inmunología se utiliza para describir el estudio del sistema de defensa contra las enfermedades infecciosas. Los sistemas de defensa caen en dos categorías: inmunidad inespecífica y específica o inmunidad innata/adaptativa o inmunidad mucosa/ sistémica, la antigua es encontrada en todos los organismos vivos y se denominan inespecíficas porque la respuesta puede ser provocada por una variedad de estímulos muy diversos que van desde agentes infecciosos a irritantes inorgánicos.

El sistema específico sólo se encuentra en vertebrados y son específicos en que la respuesta se produce por y en dirección hacia la estructura molecular del estímulo y consiste en un cambio de adaptación en el sistema linfoide, dando por resultado memoria inmune específica. Mientras que los sistemas de defensa pueden ser categorizados en grupos específicos y no específicos, es importante darse cuenta de que in vivo actúan en concierto juntos, siendo interdependientes en muchos sentidos.

La suma total de los factores de defensa responsables de la inmunidad a una enfermedad particular es una compleja interrelación de mecanismos específicos e inespecíficos. La primera línea de mecanismos de defensa incluyen todos los factores no específicos ya que son constitutivos, es decir una parte de los constituyentes normales del cuerpo, aunque los niveles o actividades de estos factores pueden cambiar durante la infección. Los mecanismos inmunes específicos, que requieren cambios adaptativos en el sistema linfoide, forman la segunda línea de defensa.

2.7.1. Sistema inmune innato

Los peces mantienen su estado de salud defendiéndose a sí mismos en contra de potenciales microorganismos invasores mediante un sistema de mecanismos de defensa innatos. Estos mecanismos son de tipo constitutivos y de respuesta, que proveen protección mediante la prevención de fijación, invasión o multiplicación de microorganismos sobre o dentro de los tejidos. Los mecanismos de defensa innatos de peces en contra de bacterias incluyen la producción de un gran espectro de sustancias antimicrobianas y proteínas de fase aguda, la activación de la vía no clásica del complemento, liberación de citocinas, inflamación y fagocitosis. Los peces coexisten con patógenos altamente virulentos en un estado portador, sin mostrar signos de enfermedad, (Hiney et al., 1997) posiblemente debido a que los mecanismos de defensa innatos proveen algún grado de protección. Sin embargo los brotes de enfermedades y mortalidades, frecuentemente son el resultado del estrés en peces donde los mecanismos de defensa se encuentran comprometidos.

2.7.1.1. Barreras superficiales: Moco

Las principales puertas de entrada de microorganismos son la piel, branquias e intestino, que a su vez actúan como barreras de superficie mediante una serie de mecanismos que limitan la entrada de agentes patógenos. Están protegidas por una constante secreción de mucus, que actúa como barrera física y mantiene la estabilidad interna (Xu y Rogers, 1991) y contiene sustancias biológicamente activas, como péptidos antibacterianos, lectinas, proteasas y anticuerpos (Hodkinson y Hunter, 1970), lisozima, complemento (Alexander, 1985) o proteína C-reactiva (Szalai et al., 1994). Las células epidérmicas son capaces de reaccionar ante distintas agresiones como engrosamiento e hiperplasia celular, y su integridad es fundamental para el equilibrio osmótico, así como para evitar la entrada de agentes extraños (Hibiya, 1994). Por otra parte, se ha descrito la presencia de células con actividad defensiva, como linfocitos, macrófagos y células granulares eosinofílicas, en todas estas estructuras (Peleteiro y

Richards, 1985; Peleteiro y Richards, 1990; Sveinbjornsson et al., 1996), que parecen tener una función de defensa mediante su implicación en distintos mecanismos, como la inflamación. La superficie del epitelio está cubierta por un complejo secreción viscosa llamada moco, que cubre las células epiteliales (van der Marel et al., 2010) y es secretado por varios tipos de células epiteliales (Shephard, 1994; Spitzer, R. E. Koch. 1998). Además, el moco juega un papel fundamental en estos mecanismos de defensa, actuando como una barrera biológica natural, dinámica, física y química (Subramanian et al., 2007; Raj et al., 2011). La función inmunológica o defensiva de la mucosa epidérmica de peces es el resultado de sus propiedades físicas y bioquímicas. En primer lugar, el moco epidérmico es continuamente reemplazado y renovado y el espesor de la capa de moco y la composición previene la adherencia de patógenos a los tejidos subyacentes y proporciona un medio en el que pueden actuar mecanismos antibacterianos (Tort et al., 2003; cono. 2009). En segundo lugar, además de ser una barrera física, el moco epidérmico del pez sirve como un repositorio de numerosos componentes inmunes innatos tales como citocinas, glicoproteínas, lisozima, inmunoglobulinas, proteínas del complemento, lectinas, proteína C reactiva, flavoenzimas, enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos (Shephard, 1994; Alexander e Ingram, 1992; Lindenstrom et al., 2003; Nigam et al., 2012; Guardiola et al., 2014), que ejercen actividad inhibitoria o lítica contra patógenos (Whyte, 2007; Subramanian et al., 2008).

Los peces están expuestos continuamente a microorganismos acuáticos, los cuales entran en contacto con cada barrera epitelial del cuerpo. Los principales tejidos linfoides asociado a mucosas (MALT) de peces teleósteos es el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), tejido linfoide asociado a piel (SALT), tejido linfoide asociado a branquias (GALT) y el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT).

Estos MALT de peces teleósteos están compuestos de células del sistema inmune adaptativo e innato y moléculas que trabajan en sinergia para mantener la homeostasis de la mucosa. El tegumento entero de peces (piel, branquias y los intestinos) está cubierto por una capa de moco el cual atrapa microorganismos y la descamación continua, inhibe la colonización sobre tegumento y es la primera barrera física de defensa contra patógenos (Aranishi y Mano, 2000; Buchmann, 2001). La tasa de

producción de moco en los peces puede aumentar en respuesta a la infección o por irritantes físicos o químicos. Durante mucho tiempo se ha sabido que la mucosa de los peces es tóxica para algunos microorganismos. El rol protector del mucus de la piel ha sido demostrado, removiendo el moco con un hisopo y de haber desafiado a peces (Fouz et al., 1990; Kanno et al., 1989) con *Vibrio anguillarum* e induciendo un incremento en la mortalidad.

2.7.1.2. Mecanismos mediados por células: no específicos

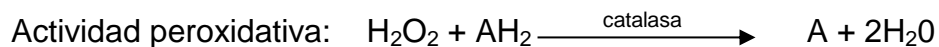
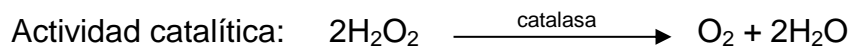
Las células fagocíticas desempeñan un papel importante en las defensas antibacterianas. Las principales células involucradas son los neutrófilos y macrófagos. Estas células pueden fagocitar bacterias y matarlas principalmente por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) durante la llamada explosión respiratoria (Secombes, 1996). Estos productos incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical libre hidroxilo (OH.) que tiene potente actividad bactericida. Además, los neutrófilos contienen mieloperoxidasa (MPO) en sus gránulos citoplasmáticos (Afonso et al., 1997). La mieloperoxidasa en presencia de iones haluro y peróxido de hidrogeno, pueden matar bacterias por halogenación de las paredes celulares bacterianas, así como la producción de iones hipohalito bactericidas (Klebanoff y Clark, 1978).

2.7.1.3. Catalasa

Es una enzima ubicua antioxidante que está presente en las células más aeróbicas. Catalasa (CAT) está implicada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno, que es un producto tóxico del metabolismo aeróbico normal. Esta enzima, cataliza la conversión de dos moléculas de peróxido de hidrogeno a oxígeno molecular y dos moléculas de agua. CAT, también muestra actividad peroxidativa, en que los alcoholes de bajo peso molecular pueden servir como donadores de electrones. Mientras que los alcoholes alifáticos sirven como sustratos

específicos para esta enzima, otras enzimas con actividad peroxidativa no utilizan estos sustratos (Scibior y Czczot, 2006).

Los niveles más altos de CAT se encuentran en hígado, riñón y los eritrocitos, donde se cree que representan la mayoría de descomposición del peróxido de hidrogeno. Un antígeno puede estimular la secreción de enzimas antioxidantes, que pueden efectivamente eliminar el exceso de radicales libres y regular el equilibrio del cuerpo de radicales libres, lo que resulta en una mejora en la capacidad antioxidante (Lee et al., 2013).

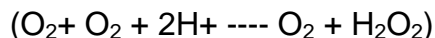


2.7.1.4. Anti proteasas

Para las bacterias invadir y crecer en los tejidos de peces, necesitan digerir las proteínas del huésped como fuente de aminoácidos. El plasma del peces contiene un número de inhibidores de proteasas, principalmente anti proteasa $\alpha 1$, $\alpha 2$ -antiplasmina y $\alpha 2$ -macroglobulina, que han demostrado tener un papel en limitar la capacidad de las bacterias a sobrevivir a in vivo (Ellis, 2001). Estas actividades parecen ser fuertemente moduladas en peces fueron inmunizados o infectados (Salinas et al., 2008). Muchas bacterias producen toxinas proteolíticas que digieren las proteínas del tejido anfitrión como fuente de aminoácidos. Una proteasa importante producida por *Aeromonas salmonicida* es resistente a la anti proteasa $\alpha 1$ de la trucha arco iris pero es inhibida por la $\alpha 2$ -macroglobulina (Ellis, 1987). La diferencia en la actividad $\alpha 2$ -macroglobulina de entre dos diferentes especies de trucha (trucha arco iris y trucha de arroyo) se ha encontrado que se relaciona con la resistencia a la infección por *A. salmonicida* (Freedman, 1991) lo que sugiere que $\alpha 2$ -macroglobulina puede desempeñar un papel en la defensa contra la forunculosis.

2.7.1.5. Superóxido dismutasa

Las Superóxido dismutasas (SODs) son la primera y más importante línea de enzimas antioxidantes del sistema de defensa en contra de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y particularmente en contra de los radicales Superóxido. SOD es una enzima que cataliza la dismutación de radicales Superóxido.



Las dos isoformas de SOD tienen cobre y zinc en su centro catalítico y ambas están localizados en compartimentos citoplasmático (CuZn-SOD o SOD1) o para elementos extracelulares (EC-SOD o SOD3). SOD 1 tiene una masa molecular cerca de 32000 Daltons y ha sido encontrada en el citoplasma, compartimentos nucleares, y lisosomas de células mamíferas (Chang et al., 1988; Keller et al., 1991; Crapo et al., 1992; Liou et al., 1993).

La enzima SOD3 existe como un homotetramero de un peso molecular de 135000 daltons con alta afinidad por la heparina (Marklund, 1982). SOD3 fue detectada primero en plasma humano, linfa, ascitis y fluidos cerebrospinales (Marklund et al., 1982).

El patrón de expresión de SOD3 está altamente restringido a tipos celulares y tejidos específicos mientras su actividad puede exceder aquella de SOD1 y SOD2. Una tercera isoforma de SOD tiene manganeso (Mn) como cofactor y ha sido localizada en mitocondria de células aeróbicas (Mn-SOD o SOD2) (Weisiger y Fridovich, 1973). Esta existe como un homotetramero con una subunidad individual de un peso molecular de alrededor de 23000 Daltons (Barra et al., 1984). SOD2 ha demostrado jugar un papel importante, promoviendo la diferenciación celular y tumor génesis (St. Clair et al., 1994) y en la protección en contra de la hiperoxia inducida por toxicidad pulmonar (Wispe et al., 1992).

2.7.1.6. Péptidos antibacterianos

Son péptidos bajo peso molecular con la capacidad de romper las membranas bacterianas. Recientemente se han aislado de la secreción de la piel de un número de especies de peces (Smith et al., 2000; Moisés Iguado, Lazarovici y Loew, 1986; carpa, Lemaitre et al., 1996 y platija de invierno, Cole et al., 1997).

2.7.1.7. Proteasas

Proteasas semejantes a tripsina y catepsina L y B, han sido encontradas en moco de piel de varias especies de peces (Aranishi y Mano, 2000). La habilidad de estas enzimas para lisar *V. anguillarum* muerto con formalina, lo que sugiere que pueden jugar un papel en la defensa en contra de bacterias, sin embargo su acción en bacterias vivas permanece desconocido.

2.7.1.8. Transferrina

El hierro es un elemento esencial en el establecimiento de la infección por muchos patógenos pero la disponibilidad de hierro en líquidos de los tejidos de vertebrados es extremadamente baja debido a que está unido con alta afinidad a la transferrina de la sangre. Solamente las bacterias con sistemas de muy alta afinidad de captación de hierro son capaces de obtener hierro para crecer in vivo (Bullen y Griffiths, 1987).

2.7.1.9. Lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas con diferentes especificidades de unión a carbohidratos (Arason, 1996).han sido encontradas en huevo de Salmón (Yousif et al., 1995) suero (Hoover et al., 1998; Ewart et al., 1999; Fock et al., 2000) y mucus (Itami et al., 1993) estas lectinas son dependientes de calcio (Ca^{2+}) y pueden aglutinar cierto número de patógenos bacterianos en peces. Las lectinas de huevo de salmón Chinook mostraron inhibir el crecimiento de *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* (Voss et al., 1978). Lectinas de huevo de Salmón

coho mostraron aglutinar a *A. salmonicida* (Yousif et al., 1994a). En ayu, la lectina en moco de piel tiene alta afinidad para el LPS de *V. anguillarum* (Itami et al., 1993). Por otro lado una lectina que se une al mananno ha sido aislada de suero de anguila japonesa (Gercken y Renwranz, 1994) y de salmón del Atlántico (Arason et al., 1994). Su rol de defensa no es muy claro, pero en mamíferos pueden tener propiedades para la activación del complemento y opsonización (Arason, 1996). Es posible que el rol de las lectinas en el moco de peces sea unirse a los carbohidratos en la superficie de las bacterias las cuales están involucradas en la unión a las células epiteliales.

2.7.1.10. Lisozima

Esta enzima puede atacar la capa de peptidoglucanos de la pared de las células bacterianas causando su lisis. La lisozima ha sido encontrada en el mucus, suero y huevos de peces (Ellis, 1999). Los macrófagos peritoneales y neutrófilos sanguíneos contienen lisozima y se piensa que son la fuente de esta enzima en suero (Murray y Fletcher, 1976). La producción de lisozima en macrófagos del Salmo atlántico in vitro es incrementada en presencia de glucanos de levadura o lipopolisacárido bacteriano (Paulsen et al., 2001). Existen varios reportes de lisozima aislada de suero y huevos de peces, siendo bactericida aun para patógenos de peces, como *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (Ellis, 1999).

2.7.1.11. Proteína C-reactiva (CRP)

Es una proteína que reacciona con fosforilcolina que es un componente distribuido en estructuras superficiales de las bacterias, hongos y parásitos. Es llamado así porque reacciona con y precipita al C-polisacárido, un componente de la pared celular del *Streptococcus pneumoniae*. Su unión es dependiente de Ca^{2+} . CRP ha sido encontrada en muchas especies animales incluyendo invertebrados (Yano, 1996). Es capaz de activar el complemento y activa las defensas fagocíticas y líticas. En los mamíferos, CRP está presente en el suero normal en concentraciones muy bajas y los niveles aumentan rápidamente durante las respuestas inflamatorias. Así en los mamíferos, la CRP es una proteína de fase aguda. Por otro lado, la CRP está presente en muy altas concentraciones en el suero normal de muchas especies de peces (cerca

de 50 mg/ml⁻¹) con aumentos de hasta 20 veces en seguida de un choque de alta temperatura o de la administración de agentes inflamatorios (Winkelhake & Chang, 1982; Kodama et al., 1989; Szalai et al., 1994). Los niveles de CRP en suero de pez solla y bagre de canal son más bajos en invierno que el verano y esto se ha considerado relevante por el incremento de la susceptibilidad de bagre de canal a la infección por *Saprolegnia* durante los meses de invierno (Szalai et al., 1994). CRP también se ha reportado en moco de piel de pescado y huevos (Yano, 1996).

2.7.1.12. Complemento

Los peces teleósteos poseen la vía de activación alterna del complemento (ACP) y la vía clásica del complemento (CCP), directamente comparable a los de mamíferos (Yano, 1996). La actividad de la ACP, la cual es independiente de anticuerpos, es muy elevada en suero de peces en comparación con el suero mamíferos (Yano, 1996), sugiriendo esta vía es más importante en los peces que los mamíferos. El sistema de complemento en peces teleósteos puede ser directamente activado por lipopolisacárido (LPS) el cual es el principal constituyente de la pared celular de bacterias gram negativas. Esta es la llamada vía alterna del complemento y resulta en la lisis de la membrana celular de muchas bacterias no virulentas, sin embargo las especies de bacterias que causan enfermedad en peces son resistentes a ser destruidas por este mecanismo (Ellis, 1999), se piensa que algunas pueden ser destruidas cuando el complemento es activado por la vía clásica que es mediada por anticuerpos. Sin embargo el sistema del complemento tiene otra función de defensa innata. Durante su activación sobre la pared de la célula bacteriana, dos componentes son importantes para el reclutamiento de células fagocíticas. El componente C5a es liberado del complejo del complemento es un potente quimio táctico para macrófagos neutrófilos. Estas células tienen receptores para el componente C3b el cual permanece fijo a la bacteria, la cual es más fácilmente fagocitada. La vía alterna del complemento es muy alta en el suero de peces (Yano, 1996) lo que sugiere que esta vía es muy importante en los mecanismos de defensa de los peces.

2.7.1.13. Mecanismos celulares no específicos

Las células fagocíticas juegan un papel importante en las defensas antibacterianas. Las principales células involucradas son los neutrófilos y macrófagos. Su papel en los mecanismos de defensa ha sido revisado por Secombes (1996). Estas células pueden fagocitar bacterias y matarlos durante la explosión respiratoria llamada principalmente por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos productos incluyen el anión Superóxido (O_2^-), H_2O_2 y el radical libre hidroxilo (OH) que tiene potente actividad bactericida. Además, los neutrófilos contienen mieloperoxidasa (MPO) en sus gránulos citoplasmáticos (Afonso et al., 1997). La MPO en presencia de iones haluro y H_2O_2 pueden matar bacterias por halogenación de las paredes celulares bacterianas, así como la producción de iones hipohalito bactericida (Klebanoff & Clark, 1978). Los Neutrófilos y macrófagos contienen lisozima y otras enzimas hidrolíticas en sus lisosomas. Los macrófagos de peces también pueden producir óxido nítrico (NO), que en los mamíferos puede formar agentes bactericidas potentes como los peroxinitritos y OH (Secombes, 1996).

2.7.1.14. Células fagocíticas

Las principales células implicadas en la fagocitosis en los peces son neutrófilos y macrófagos (Secombes y Fletcher, 1992). Estas células eliminan las bacterias principalmente por la producción de especies reactivas de oxígeno durante una explosión respiratoria. Además, los neutrófilos poseen mieloperoxidasa en sus gránulos citoplasmáticos, que en presencia de halogenuros y peróxido de hidrógeno mata bacterias por halogenación de la pared celular bacteriana. Además, estas células tienen lisozima y otras enzimas hidrolíticas de los lisosomas (Fischer et al., 2006). Asimismo, los macrófagos pueden producir el óxido nítrico en los mamíferos y pueden ser tan potentes como los agentes antibacterial, peroxinitritos y grupos hidroxilo (Secombes y Fletcher, 1992).

2.7.1.15. Factor de necrosis tumoral (TNF)

Varios estudios en peces han proporcionado directa evidencia sugiriendo que TNF- α y - β son importante activadores de macrófagos. Estudios en trucha, rodaballo, dorada (*Sparus aurata*), pez rojo (*Carassius auratus*) y bagre han demostrado que el TNF causa la activación de los macrófagos, llevando a aumento de la actividad respiratoria, la fagocitosis y la producción de óxido nítrico (Yin et al., 1997; Mulero y Meseguer, 1998; Tafalla et al., 2001).

2.7.1.16. Interferón

El interferón alfa (INF α) y beta (INF β) son citocinas con una función antiviral que se basa en la inhibición de la replicación de ácidos nucleicos dentro de las células infectadas. El interferón desempeña un papel importante en la defensa contra la infección viral en las células del hospedador vertebrado, que secretan INF α/β a partir del reconocimiento de ácidos nucleicos virales (Robertsen, 2006).

2.7.1.17. Interleucinas (IL)

La IL-1 β se ha detectado en 13 especies de peces teleósteos y participa en la regulación de la inmunidad mediante la estimulación de células T. La función de IL-1 β en estas especies de peces es análoga a la IL-1 β de mamíferos (Mathew et al., 2002; Magnadottir, 2010). En peces teleósteos, los receptores de IL-1 han sido clonados y secuenciados de la trucha arco iris y salmón del Atlántico. La expresión de los receptores de IL-1 de salmón parece ser constitutivo en todos los tejidos probados y se regula en el riñón cefálico, bazo, hígado y branquias después de la estimulación con LPS y del TNF- α , lo que sugiere un papel para el receptor de IL-1 en la regulación de IL-1 β durante la respuesta inflamatoria (Sangrador Vegas et al., 2000; Subramaniam et al., 2002). Se ha demostrado que la IL-6 también está implicada en la cascada que conduce a una respuesta inflamatoria (Savan y Sakai, 2006). Además, las citocinas implicadas en la diferenciación de leucocitos, incluyendo el factor estimulante de

colonias de granulocitos (CFS) (Arma et al., 2004), macrófagos-CSF (Hanington et al., 2007) e IL-7 (Kono et al., 2008), identificadas en todos los peces.

2.7.1.18. Inmunoglobulinas

Los anticuerpos naturales se producen en los peces en un nivel que está regulado en la ausencia de estimulación antigénica de las células que son equivalentes a las células B1 (Boes, 2000). Estos anticuerpos naturales se encuentran en altos niveles en el suero de los peces, donde proporcionan una inmediata y amplia protección contra patógenos bacterianos y virales, haciendo a estos factores, principales componentes de la inmunidad innata. Los anticuerpos naturales también están vinculados a inmunidad adaptativa. Los peces teleósteos son capaces de generar anticuerpos naturales específicos de tipo IgM contra diversos antígenos.

2.7.1.19. Reconocimiento de lo no propio por el sistema inmune innato.

El reconocimiento de infecciones microbianas por el sistema inmune innato es el inicio para activar la respuesta de defensa en el individuo. Este reconocimiento está dado entre receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) y patrones moleculares asociado a patógenos (PAMP's) (Janeway, 1989; Kaisho y Akira, 2001).

Se cree que dos categorías de patrones moleculares inducen una respuesta inmune: patógeno asociado a patrones moleculares y patrones moleculares expuestos por daño de los tejidos del hospedador debido a infección, cambios necróticos y muerte celular natural, que es una señal de peligro para el sistema inmunológico. Los patrones moleculares que son reconocidos por estos patrones son por ejemplo peptidoglucanos y lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular bacteriana, los glucanos β 1-3 de hongos, el RNA viral de doble cadena y ADN bacteriano. Los patrones moleculares asociados de patógeno (PAMP) es el término colectivo utilizado para estas moléculas altamente conservadas que generalmente no están expresadas en los organismos multicelulares. Las señales de peligro, por otra parte, son moléculas que son liberadas o expuestas por lesión, infección, inflamación o apoptosis celular, pero normalmente no se expresan

en la superficie celular (Matzinger, 1998). Estos incluyen moléculas como DNA del anfitrión, RNA, proteínas de choque térmico y otras chaperonas y oligomanosa de las glicoproteínas secretadas. Los PRR pueden ser componentes solubles como la proteína C3 del complemento, lectinas y otros componentes humorales innatos o pueden expresarse como receptores en los fagocitos y otras células del sistema inmune. Hay pruebas para receptores de glucanos β 1-3 en macrófagos salmón (Engstat y Robertsen, 1994) y en neutrófilos de Bagre (Ainsworth, 1994). Los Receptores de unión a LPS, también se han descrito en trucha arco iris y macrófagos de dorada (Mulero et al., 2001; Kiryu et al., 2003). Los PRRs Toll-like han recibido considerable atención en los últimos años. Estos receptores toll fueron descritos en la mosca *Drosophila melanogaster* (Lemaitre et al., 1996) y genes Toll-like, ya que han sido demostrados en vertebrados y se ha demostrado estar implicados en el reconocimiento de lo no-propio (Hoffmann et al., 1996; Medzhitov et al., 1997). Homólogos de la familia TLR también se han descrito en peces (Stafford et al., 2003; Oshiumi et al., 2003).

2.7.2. Sistema inmune adaptativo

Los peces poseen sistemas de defensa inmunes tanto innata como adaptativa. La respuesta adaptativa de peces es comúnmente retardada, pero es esencial para la inmunidad de larga duración y es un factor clave en la vacunación. La respuesta inmune adaptativa es mediada por las acciones de dos grupos principales de linfocitos, linfocitos B que median las respuestas a través de anticuerpos (humoral) y células T que median la respuesta inmune celular.

En las respuestas mediante anticuerpos, se activan las células B para secretar los anticuerpos, que son formas solubles de su receptor Ig de antígeno de superficie. Los anticuerpos circulan en el torrente sanguíneo y se distribuyen a otros fluidos corporales, donde se unen específicamente al antígeno que estimuló su producción. La unión del anticuerpo inactiva virus y toxinas microbianas, bloqueando su capacidad de unirse a receptores en las células del huésped. La unión de anticuerpos también marca a los patógenos para su destrucción, principalmente por las células con receptores de

superficie celular para las moléculas de Ig, como las células fagocíticas del sistema inmune innato (Schroeder y Cavacini, 2010). En la respuesta inmune celular, se activan las células T antígeno-específicas, que reaccionan directamente contra un antígeno que se presenta en la superficie de una célula huésped. A diferencia de las células B, células T sólo pueden reconocer el antígeno que ha sido procesado y presentado por células presentadoras de antígeno a través de sus proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por lo tanto las células T pueden matar, por ejemplo, las células del huésped infectadas por virus que tienen antígenos virales en su superficie, eliminando las células infectadas antes de que el virus tenga la oportunidad de replicar. En otros casos, la célula T produce citocinas que activan las defensas naturales para destruir los microorganismos invasores (Laing y Hansen, 2011).

2.7.2.1. Mecanismos de defensa específicos

El centro de los mecanismos de defensa específicos es el linfocito, el así llamado célula inmunocompetente. Es responsable de iniciar y de mediación de los tres aspectos de la inmunidad específica: inmunidad humoral, inmunidad mediada por células (CMI) y memoria inmunológica. La Inmunidad humoral se refiere a la producción de anticuerpos solubles (inmunoglobulinas), mientras que el CMI se refiere a las respuestas que están mediadas por una variedad de células como los linfocitos y otros tipos, especialmente los macrófagos, que son reclutados y regulados por productos de linfocitos. Un aspecto importante de la inmunidad específica es la memoria, que constituye un cambio adaptativo en las poblaciones de células linfoides que en desafío subsecuente por el mismo antígeno produce una respuesta secundaria que se caracteriza por un período de latencia más corto y mayor magnitud.

Los macrófagos activados desempeñan probablemente un papel importante en la defensa contra muchos patógenos bacterianos especialmente *A. salmonicida* y *R. salmoninarum*. Los macrófagos activados de peces exhiben una mayor producción de ROS e incremento de la actividad bactericida. La activación puede ocurrir a través de diversas vías pero principalmente por el factor activador de macrófagos (interferón gamma) producida por los linfocitos T estimulados por antígenos (Secombes, 1996).

2.7.2.2. Inmunoglobulinas

Los papeles protectores de anticuerpos incluyen la neutralización de virus, toxinas y adhesinas bacterianas, activación del sistema del complemento y opsonización de partículas (por ejemplo bacterias y virus). Los anticuerpos son una clase de proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig). En los peces teleósteos existen tres clases o tipos de Ig conocido hasta la fecha, IgM, IgD e IgT también se llama IgZ (Hansen et al. 2005), en comparación con cinco clases de mamíferos. Las células B producen estas Igs que parecen ser mutuamente excluyentes, por lo menos para la producción de IgM y IgT (Zhang et al. 2010), y por lo tanto existen subconjuntos diferentes de células B en peces.

La estructura básica de Ig se compone de dos cadenas pesadas de (H) y dos cadenas ligeras (L), según la medida de peso molecular, con una cadena pesada y ligera para formar sitio de unión al un antígeno. Es las propiedades fisicoquímicas de las cadenas H que determinan la clasificación de la clase de Ig. En los mamíferos IgM en la sangre es un pentámero de esta unidad básica, mientras que en teleósteos es un tetrámero, aunque en algunas especies una forma monomérica de la IgM puede estar presente y IgT es monomérica en la sangre (Zhang et al. 2010). Ig también existe en las secreciones de moco de la piel y los intestinos y en la bilis, y la evidencia reciente sugiere que la producción de IgT por las células puede ser particularmente importante para la producción de Ig en sitios de la mucosa, con IgT presente como un polímero en el moco del intestino (Zhang et al. 2010).

Experimentos con Ig homólogo marcadas con radio, demostraron que los anticuerpos de la mucosa biliar y cutáneas no fueron derivados de suero. Ig se ha encontrado también en los huevos de algunas especies de teleósteos, lo que sugiere la transferencia de anticuerpos maternos y posiblemente también de transcriptos de Ig maternas. El estado de salud de peces reproductores puede impactar en el tipo y la cantidad de moléculas inmunes transferidas a su descendencia (Swain & Nayak de 2009).

2.7.2.3. Memoria inmunológica

En general la respuesta secundaria es más débil en peces que en mamíferos, pero los títulos de anticuerpos en esta segunda respuesta alcanzan niveles entre 2 y 8 veces superiores a los de la primera, y la cantidad de antígeno necesaria para desencadenarla es menor (Zapata, 1985; Arkoosh y Kaattari, 1999). Algunos estudios han descrito la gran capacidad de expansión y proliferación clonal de las células B (van Ginkel et al., 1992). Sin embargo, la producción de una respuesta secundaria en inmunizaciones está condicionada por numerosos factores, como la dosis de inmunización primaria, la ruta de administración, y el tiempo transcurrido entre los dos contactos con el antígeno (Zapata, 1985).

2.7.2.4. Mecanismos de defensa celulares

La inmunidad celular está mediada por linfocitos T y es necesaria cuando los agentes escapan al sistema humoral y llegan a ser intracelulares, como ocurre en las infecciones víricas, o cuando las células de propio hospedador se transforman en tumorales y es necesario destruirlas. En vertebrados superiores esta función la ejercen los linfocitos Tc y células NK. Los antígenos intracelulares son presentados a los linfocitos Tc mediante el CMH tipo I, presente en la mayoría de las células del organismo, cuyas moléculas presentan los péptidos procedentes de las proteínas del citosol. Las células citotóxicas se encargan de destruir a las células que presentan esos péptidos extraños (Bernstein et al., 1998). En los peces teleósteos, se han encontrado linfocitos pequeños y agranulares con funciones similares a las células citotóxicas (Yoshinaga et al., 1994; Yamaguchi et al., 1996) y se ha demostrado la existencia de moléculas y genes de CMH tipo I (Grimholt et al., 1993).

2.8. Inmunoestimulantes en acuicultura

El sector acuícola ha mostrado un rápido crecimiento en las últimas décadas con un aumento en los problemas de enfermedades como resultado de altas densidades de peces en estanques que los hacen susceptibles a enfermedades bacterianas debido a las condiciones de cultivo. Las enfermedades en peces causan pérdidas severas en la producción, con un gran impacto económico para el productor. Para mantener la salud de los peces y mejorar el rendimiento de producción, los inmunoestimulantes han sido utilizados como aditivos alimenticios para mejorar la ganancia de peso, eficiencia alimenticia y resistencia a enfermedades en peces cultivados.

Los inmunoestimulantes, también conocidos como inmunoestimuladores, son sustancias tal como carbohidratos, lípidos, proteínas o ácidos nucleicos que son capaces de inducir una fuerte respuesta del sistema inmune innato y adaptativo en defensa del hospedero contra ciertos patógenos que causan enfermedades. Existen dos principales categorías de inmunoestimulantes i) Los inmunoestimulantes específicos proveen una especificidad antigénica en la respuesta inmune, tal como vacunas o cualquier antígeno, ii) Los inmunoestimulantes inespecíficos, que actúan independientemente de la especificidad antigénica para aumentar la respuesta inmune de otro antígeno o estimular componentes del sistema inmune sin especificidad antigénica, tal como adyuvantes y inmunoestimuladores no específicos (Kumar et al., 2011). En acuicultura, inmunoestimulantes inespecíficos han sido ampliamente utilizados debido a la facilidad de su aplicación, así mismo, porque se ha demostrado que activan el sistema inmune de animales acuáticos e incrementan su capacidad de resistir a las enfermedades.

Entre los inmunoestimulantes más utilizados en acuicultura se encuentran los polisacáridos tales como: β -Glucanos y quitosán; Vitaminas: C, E; Hierbas como: *R. officinale*, *A. paniculata*, *I. indigotica*, *L. japonica*; Péptidos antibacterianos; Pro-bióticos tales como; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Saccharomyces* spp.; Levamisol.; Oligosacáridos como fructooligosacáridos,

mannanligosacaridos, inulina, así como drogas sintéticas y moléculas biológicamente activas. En peces, los inmunoestimulantes mejoran la capacidad fagocítica de los neutrófilos y los linfocitos, estimulan la secreción de citocinas de los linfocitos, coordinan la inmunidad celular y humoral y evocan respuestas de anticuerpos y complemento (Wang et al., 20016). Las tasas de crecimiento, las tasas de supervivencia y resistencia a enfermedades mejoran significativamente después de la adición de los inmunoestimulantes en los sistemas de acuicultura. Estos efectos pueden deberse a la diferente estructura y función de diferentes inmunoestimulantes. La expresión de genes inmunoestimulante in vivo en especies reproductoras se espera mejorar la resistencia a las enfermedades, inhibir la propagación de enfermedades y cultivar variedades resistentes a enfermedad para su uso en acuicultura. Los nuevos inmunoestimulantes podrían proporcionar una alternativa más segura al uso de antibióticos. Sin embargo, muchos aspectos de los sistemas inmunitarios del organismo acuático son aún desconocidos, y estamos lejos de entender que mecanismos inmunes confieren protección contra muchos patógenos residentes. Como muchas fuentes de inmunoestimulantes para organismos marinos llegan a ser disponibles, inmunoestimulantes que probablemente pueden ser industrializados utilizando ingeniería genética, en definitiva sustitución de antibióticos como aditivos para alimentos. Esta tecnología también tiene el potencial para mejorar la seguridad y la fiabilidad de los productos de la acuicultura.

Varios quimioterapéuticos se han utilizado para tratar infecciones bacterianas en peces cultivados cerca de los últimos 20 años (Cuadro. 2). Sin embargo, la incidencia de bacterias resistentes a los medicamentos se ha convertido en un problema importante en el cultivo de peces. La vacunación es una medida profiláctica útil para enfermedades infecciosas de los peces y ya está disponible comercialmente para las infecciones bacterianas. Además, el desarrollo de vacunas frente a patógenos intracelulares no hasta ahora ha tenido éxito. Por lo tanto, es imposible el control inmediato de todas las enfermedades de peces utilizando sólo las vacunas. Los inmunoestimulantes aumentan resistencia a las enfermedades infecciosas, no por mejorar la respuesta inmune específica, sino por mejorar los mecanismos de defensa inespecíficos. Por lo tanto, no hay ningún componente de la memoria y la respuesta

suele ser de corta duración. El uso de los inmunoestimulantes es un medio eficaz para aumentar la inmunocompetencia y la resistencia a las enfermedades de los peces. El Sistema de defensa de los peces es mejorado por los inmunoestimulantes y es básicamente similar a la descrita en mamíferos. Para los sistemas de defensa celular, los teleósteos tienen células fagocíticas similares a macrófagos, neutrófilos y NK (células asesino natural células), así como los linfocitos T y B. Los teleósteos tienen también diversos componentes de defensa humoral como la vía clásica y alterna del complemento, lisozima, hemolisina natural, transferrina y proteína C reactiva. La existencia de interferón, citocinas, interleucina 2, factores de activación de macrófagos, también se ha reportado (Secombes et al., 1996).

Los peces tratados con inmunoestimulantes generalmente muestran una actividad mejorada en las células fagocíticas. La actividad de las células fagocíticas puede detectarse por muerte, fagocitosis y quimiotaxis. La mejora de la muerte de patógenos es más importante en los macrófagos de los peces tratados con inmunoestimulantes. Los mecanismos de muerte de los macrófagos se pueden categorizar ampliamente como oxígeno-dependientes o independientes de oxígeno. El mecanismo de muerte dependiente de oxígeno como mediado el por ROS (especies reactivas de oxígeno) puede ser detectado por quimioluminiscencia y NBT (explosión respiratoria) (Sakai et al., 1983). Recientemente, la importancia de RNS (especies de nitrógeno reactivo en macrófagos, especialmente en el muerte de los agentes patógenos intracelulares, ha sido indicado. Sin embargo, no existe ningún reporte de la activación de RNS en los macrófagos de los peces tratados con inmunoestimulantes.

Los linfocitos se activan también por inmunoestimulantes. Los inmunoestimulantes mejoran las actividades de mitógeno inducidas por concanavalina-A o lipopolisacárido (LPS) y producen factores de activación de macrófagos (Hardie et al., 1991). La actividad del complemento puede activarse también por varios inmunoestimulantes. (Hardie et al. 1991) informaron que peces a los cuales se les administro gran cantidad de vitamina C aumentaron los niveles de actividad del complemento. En salmón del Atlántico inyectado con glucano de levadura también mostró mayor actividad del complemento. La actividad de la lisozima está también influenciada por la

administración de los inmunoestimulantes. Las células NK pueden ser activadas por la hormona de crecimiento (GH), y levamisol. También se puede mejorar la producción de anticuerpos por muchos inmunoestimulantes. En el Bagre de canal inyectado con glucano de levadura respondió a posterior *Edwardsiella ictaluri* inmunización con altos títulos de anticuerpos en suero en comparación con los controles. Aakre et al. 1994, informó que inyectó al salmón atlántico una bacterina con una mezcla de *Aeromonas salmonicida* y glucano de levadura y fue demostrada un incremento en la respuestas de anticuerpos, también se informó el incremento de las respuesta de anticuerpo contra *A. salmonicida* con la administración de vitamina C.

Cuadro 2. Inmunoestimulantes usados en peces y camarón.

Sintéticos químicos		Levamisol FK-565 MDP (Muramyl Dipeptido)			
Substancias biológicas	Derivados bacterianos	β - glucanos Peptidoglucanos FCA EF203 LPS Células de <i>Clostridium butyricum</i> Células de <i>Achromobacter stenohalis</i> Células de <i>Vibrio anguillarum</i> (Vacuna de Vibrio)			
		Polisacáridos	Quitina Chitosan Lentinian Schizophyllan Oligosacáridos		
			Extractos de plantas y animales	Ete (Tunicate) HDE (Abalone) Firefly squid <i>Quillaja saponin</i> (soap tree) <i>Glycyrrhizin</i> (licorice)	
				Factores nutricionales	Vitamina C Vitamina E
					Hormonas, citocinas y otros

		Hormona de crecimiento Prolactina
--	--	--------------------------------------

(Sakai., 1999)

2.9. CpG ODN

El sistema inmune innato es activado por la exposición a patrones moleculares asociados patógenos (PAMPs) que son expresados por un grupo diverso de microorganismos infecciosos (Medzhitov y Janeway, 1998). El reconocimiento de PAMPs está mediado por los miembros de la familia Toll-like receptores (TLRs) (Underhill y Ozinsky, 2002; Vasselo y Detmers, 2002). ADN bacteriano es un PAMP; diferencias en el patrón de metilación y uso de dinucleótidos CpG resulta en motivos CpG no metilados está presente en una frecuencia mucho más alta en los genomas de procariotas que de eucariotas (Razin, A. y Friedman, 1981; Cardon et al., 1994). El sistema inmune innato detecta estos motivos CpG no metilados utilizando TLR9 (Hemmi et al., 2000; Takeshita et al., 2001; Bauer et al., 2001). La liberación de CpG DNA no metilado durante una infección, proporciona una señal de 'peligro' para el sistema inmune innato, desencadenando una respuesta inmune protectora que mejora la capacidad del huésped para eliminar el patógeno (Wagner, 1999). Los oligodeoxynucleotidos CpG o CpG ODN son moléculas sintéticas cortas de ADN monocatenario que contienen un deoxinucleótidos trifosfato de citosina ("C") seguido por un deoxinucleótidos trifosfato de guanina ("G"). La "p" se refiere al enlace fosfodiéster entre nucleótidos consecutivos, aunque algunos ODN tienen una columna vertebral fosforotioato modificado (PS) en su lugar. (Weiner et al., 1997). (ODNs) que contienen motivos CpG que son similares a los encuentran en bacteriano DNA estimulan una respuesta similar (Yamamoto et al., 1989; Yamamoto et al., 1992; Krieg et al., 1995; Klinman et al., 1996). Estos inmunomoduladores ODNs tienen varios usos terapéuticos potenciales (Carpentier y Delattre, 2003).

2.9.1. Mecanismo de la actividad de CpG

Los CpG ODN son rápidamente internalizados por las células inmunes, quizás implicando fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3Ks) e interactúan con TLR9 que está presente en vesículas endocíticas (Hemmi et al., 2000; Ishii et al., 2002). Se trata de una interacción altamente específica, con la activación de las células siendo abrogada por la eliminación del motivo CpG a través de la inversión o metilación (Hemmi et al., 2000; Takeshita et al., 2001.) Las células que carecen de expresión de TLR9 no responden a la CpG de ADN, pero se pueden hacer sensibles por transfección con construcciones de genes que codifican el receptor (Hemmi et al., 2000; Takeshita et al., 2001).

Los efectos de CpG ODNs en humanos y células de ratón se han estudiado bien en tales líneas de células transfectadas, en el supuesto de que ellos reflejan actividad bajo condiciones fisiológicas. Los resultados indican que la interacción de TLR9 con CpG ODNs conduce a la hinchazón y la acidificación de las vesículas endocíticas y la generación de especies reactivas de oxígeno (Takeshita et al., 2001; Yi et al., 1998; Hacker et al., 1998). Esta secuencia de eventos es crucial para la señalización mediada por CpG, como agentes que inhiben la maduración endosomal o acidificación (como cloroquina y wortmanina) bloquean la activación inmune (Yi et al., 1998; Hacker et al., 1998). La activación celular por la mayoría de los miembros de la familia TLR (incluyendo TLR9) implica una cascada de señalización que procede a través de los genes de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), interleucina-1 (IL-1) activado del receptor quinasa (IRAK) y el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR)-asociados factor 6 (TRAF6) y culmina en la activación de varios factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear -KB (NF-κB), activación de la proteína 1 (AP1), proteína de unión a CCAAT/enhancer (CEBP) y el elemento cAMP-respuesta ligado a proteínas (CREB) (Takeshita et al., 2000; Yamamoto et al., 2002; Takeshita y Klinman, 2000; Hacker et al., 2000).

Estos factores de transcripción directamente sobregulan la expresión de genes de citocinas/quimiocinas (Hacker et al., 2000; Aderem y Ulevitch, 2000) (Figura 4). No es de extrañar las versiones dominantes negativas de MYD88, IRAK y TRAF6 que

inhiben la activación celular mediada por CpG ODN y ratones knockout que carecen TLR9 o MYD88 fallan en montar una respuesta inmune cuando se exponen a CpG ODNs (Hacker et al., 2000; Aderem y Ulevitch, 2000). Las células B y células dendríticas de plasmacytoides (PDC) son los tipos de células humanas principales que expresan TLR9 y responden directamente a la estimulación de la CpG (Hemmi et al., 2000; Takeshita et al., 2001; Gursel et al., 2002; Hornung et al., 2002). La activación de estas células por CpG ADN inicia una cascada inmunoestimulante que culmina en la maduración indirecta, diferenciación y proliferación de las células natural killer (NK), las células T y monocitos/macrófagos (Klinman et al., 1996; Sun et al., 1998; Ballas et al., 1996; Romano et al., 1997). Juntos, estas células secretan citocinas y quimiocinas que crean un medio inmune pro-inflamatorio mediante la secreción de (IL-1, IL-6, IL-18 y TNF) y TH1 (interferón- γ , IFN- γ y la IL-12) (Klinman et al., 1996; Ballas et al., 1996; Halpern et al., 1996). Estos efectos son altamente específicos de CpG: el ADN que carece de motivos CpG no resulta en la secreción de citoquinas/quimioquinas (Klinman et al., 1996; Gursel et al., 2002).

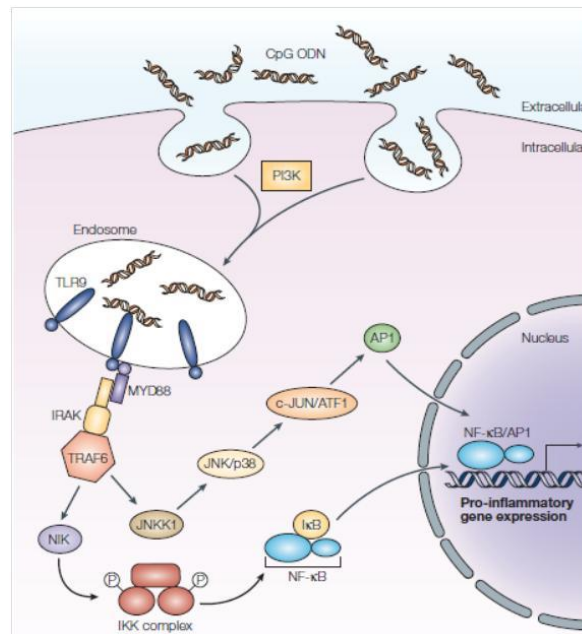


Figura 4. Señalización de CpG-ADN-TLR9-mediada por células.

2.9.2. Clases de CpG ODN

CpG ODN recientemente se han dividido en tres clases distintas, A, B y C, cada uno con sus propias actividades inmunoestimulantes en los mamíferos (Krieg, 2002). Clase ODN A (también llamada clase D) contienen sólo un motivo CpG no metilado contenido dentro de una secuencia palindrómica en un esqueleto fosfodiéster (PO), aunque la adición del fosforotioato (PS)-nucleótidos modificados en los extremos de 5' y 3' aumenta la resistencia de nucleasas (Zhao et al., 1993) y mejora la actividad de este ODN. Motivos Poli G al final 3' del ODN de clase A también son requeridos para la actividad óptima.

ODN de clase A son más eficaces en la activación de las células NK mamíferas (indirectamente) e inducen la producción de IFN-g por precursores de células dendríticas. Son pobres activadores de células B (Verthelyi et al., 2001). ODN de clase B (también conocido como clase K) son mucho más eficaces en la estimulación de las células B y se construyen en esqueleto de PS. Deben contener al menos un motivo CpG no metilado sin embargo, la incorporación de motivos múltiples en una solo ODN puede realzar su actividad (Verthelyi et al., 2001). ODN clase B no contienen motivos poli G al final 5' (Verthelyi et al., 2001). Como el ODN de clase B, ODN clase C están contruidos enteramente en esqueletos de PS. Estos contienen una secuencia palindrómica central similar a la que encuentra en ODNs clase A, pero contienen al menos dos dinucleótidos CpG y también debe contener una o dos secuencias TCG en o cerca de la final de 5' para poder funcionar con eficacia. Sus funciones son similares a los ODN clase A y clase B en donde estimulan las células B y células NK tanto como células dendríticas (Marshall et al., 2003)

2.9.3. CpG ODN 1668

Inducen la expresión de IL-1b (2 a 20 μ M) y la actividad antiviral (5 μ M) en trucha arco iris en los macrófagos de riñón cefálico. Estimulan a Leucocitos de Salmón Atlántico a producir factores antivirales (1, 2 y 5 μ M). Inducen actividad de IFN-like en células HK y la proliferación de PBL (al menos dos veces que visto en los controles) (2

y 8 μM) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Jørgensen et al., 2003). Mejora el estallido respiratorio en 10 ng mL^{-1} /0,004 μM y proliferación leucocitaria (10 y 100 ng mL^{-1} /0,004 y 0,04 μM) en fagocitos de riñón de carpa común (*Cyprinus carpio L.*) (Tassakka y Sakai, 2003). Aumenta la actividad del estallido respiratorio en fagocitos y resistencia a enfermedades en lenguado oliva (*Paralichthys olivaceus*) (1.25, 2.5, 5 y 10 mg mL^{-1} /0.5, 1.1, 2.1 y 4.3 μM) (Lee et al., 2003). Inducen la proliferación de PBL y HK leucocitos en trucha arco iris (1 mg mL^{-1} /0.4 μM) (Carrington et al., 2004). Aumento de la resistencia a la enfermedad branquial amebiana en Salmon atlántico (50 mg por pez).

2.10. TLR's

Los organismos están permanentemente expuestos a patógenos microbianos. Reacciones inmunes innatas contribuyen a la estrategia de defensa fundamental de peces en respuesta a diversos agentes infecciosos. Un paso crucial para la iniciación de los mecanismos de defensa inmunes es el reconocimiento de señales de peligro y la subsecuente activación de cascadas de señalización (Arancibia et al., 2007). Los activadores clave son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) detectando las características microbianas conservadas, el llamado " patrones moleculares asociado a patógenos " (PAMPs) (Medzhitov, 2007).

Los PRRs también detectan estructuras endógenas liberadas después de traumas de tejido, es decir, " daños asociados patrones moleculares " (DAMPs) (Matzinger, 2002). Los PRRs representan receptores evolutivos conservados incluyendo los Toll-like receptores (TLRs) que están estructuralmente relacionados con receptores de interleucina-1 (IL1Rs). Las proteínas IL1R se definen por sus dominios inmunoglobulina-like extracelulares (Subramaniam et al., 2004). La familia de receptores Toll-like (TLRs) son de los receptores inmunes innatos mejor entendidos que detectan infecciones.

TLRs son proteínas transmembranales con ectodominios que reconocen estructuras conservadas del patógeno para inducir a las moléculas efectoras inmunes. En los vertebrados, TLRs pueden distinguir entre clases de patógenos y sirven un papel

importante para organizar las respuestas inmunes adaptativas apropiadas (Takeda et al., 2003). TLRs contienen una región N-terminal extracelular con la de repetición rica en leucina (LRR), un dominio transmembrana y un c-terminal intracelular con un receptor dominio Toll/IL-1 (TIR). El dominio TIR citoplasmática alberga aminoácidos conservados que han demostrado estar implicado en la señalización, así como en la localización del TLR (Slack et al., 2000; Funami et al., 2004), mientras que la región LRR consisten en 20-30 aminoácidos plegados en una conformación de herradura-like y está involucrado en el reconocimiento de patógenos (Bell et al., 2003) (Figura 5).

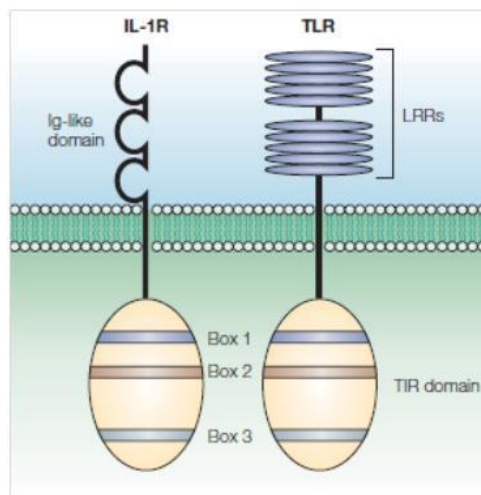


Figura 5. Estructura de TLR. Toll-like receptores (TLRs) y receptores del interleukin-1 (IL-1Rs). (Akira S. y Takeda K. 2004)

Los principales ligandos reconocidos por diferentes TLRs se resumen en el (Cuadro 3). Sorprendentemente, a pesar de la conservación entre los dominios LRR, diferentes TLRs pueden reconocer varios ligandos sin relación estructural (Janeway y Medzhitov. 2002; Medzhitov. 2001; Akira et al., 2001). La localización subcelular de los diversos TLRs se correlaciona en cierta medida con los patrones moleculares de sus ligandos. TLR1, TLR2 y TLR4 se encuentran en la superficie celular y son reclutados en fagosomas después de la activación por sus ligandos respectivos. Por el contrario, TLR3, TLR7 y TLR9, todos los cuales están implicados en el reconocimiento de estructuras como de ácidos nucleicos, no se expresan en la superficie celular (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2003; Matsumoto et al., 2003).

Cuadro 3. Receptores Toll-like y sus ligandos

TLR	Localización	Ligando
TLR1	Superficie celular	Triacyl lipopeptidos Factores Solubles
TLR2	Superficie celular	Lipoproteína/lipopeptidos Peptidoglucano Acido Lipoteicoico Lipoarabinomanano modulina fenol-soluble Glucinositol fosfolípidos Glucolípidos Lipopolisacarido atípico β -glucanos Heat-shock protein 70*
TLR3	Intracelular	RNA doble cadena Poly I:C
TLR4	Superficie celular	Lipopolisacarido Taxol Proteína de fusión Proteína de envoltura Heat-shock protein 60* Heat-shock protein 70* fibronectina* Oligosacaridos de acido hialuronico* Fragmentos de polisacáridos de heparan sulfato* Fibrinogeno*
TLR5	Superficie celular	Flagellina
TLR6	Superficie celular	Diacyl lipopeptidos Acido Lipoteicoico β -glucanos
TLR7	Intracelular	Imidazoquinolina Loxoribina Bropirimina RNA de cadena sencilla
TLR8	Intracelular	Imidazoquinolina RNA de cadena sencilla
TLR9	Intracelular (expresado en reticulo endoplasmico y es reclutado a compartimentos endosomales/lisosomales después de la estimulación)	CpG-DNA Bacteriano o viral
TLR10	Superficie celular	Lipoproteínas
TLR11	Probablemente en superficie celular	Molécula tipo Profilina
TLR12	ND	ND
TLR13	ND	ND
TLR14*	ND	ND

TLR19*	ND	ND
TLR20*	ND	ND
TLR21*	ND	CpG DNA
TLR22*	ND	dsRNA; polyI:C
TLR23*	ND	ND

(Akira S. y Takeda K. 2004)

Diecisiete tipos TLR (TLR1, 2, 3, 4, 5, 5, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23) fueron identificados en más de una docena de especies de teleósteos, nada que las características clave de la gama de receptores Toll-like y factores implicados en la cascada de señalización están estructuralmente relacionados con los de las vías de activación de TLR en mamíferos. La conservación estructural del arcaico sistema TLR sugiere que podría ser existente similar regulación de la respuesta inmune en peces y mamíferos (Bricknell & Dalmo 2005). Sin embargo, se han descubierto características notablemente distintas en cascadas TLR de teleósteos.

Seis familias principales de TLR fueron identificadas en todos taxa de vertebrados señalados como TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR11.

2.10.1. TLR9

El receptor TLR9, está predominantemente asociado con la activación de los mecanismos antivirales. TLR9 se une al ADN viral o bacteriano que contiene motivos CpG no metilados (Muller et al., 2008). Skjæveland et al (2008) observó una inducción de la expresión de TLR9 en leucocitos salmón después de desafiar con CpG y la citocina antiviral IFN-g respectivamente. El efecto estimulante de CpG, pero no por oligodeoxynucleotidos GpC, fue confirmado en la platija japonesa derivadas de células HINAE (Takano et al., 2007). In vitro, el ADN de plásmidos que codifican el gen de la glicoproteína G del rhabdovirus de la septicemia hemorrágica viral no afectó a las transcripciones de TLR9 en los órganos linfoides secundarios (Ortega-Villaizan et al., 2009).

En dorada (*Sparus aurata L.*) y la corvina amarilla grande (*Pseudosciaena crocea*), dos variantes de la miembro de la familia de TLR7 se han aislado, TLR9A y TLR9B (Yao et al., 2008). En la corvina amarilla inyectada con *Vibrio parahaemolyticus*, el nivel de transcripción de TLR9A y B aumento en sangre y disminuyo en bazo y hígado posiblemente debido al reclutamiento de TLR9-expresado las células sanguíneas. Sin embargo, en la platija japonesa infectada con *E. tarda*, TLR9 ha sido regulado en bazo, riñón, branquias y la sangre (Takano et al. 2007). En el pez cebra, la expresión de TLR9 aumentó después del desafío con *M. marinum* (Jault et al., 2004).

Las variantes del empalme del receptor tipo Toll 9 como fenómeno se limitan a besugo y corvina amarilla grande hasta el momento, como sólo una variante de mRNA de TLR9 fue detectada en el salmón del Atlántico (Strandskog et al., 2008), media lengua lisa única (*Cynoglossus semilaevis*) (Yu et al., 2009), trucha arcoiris, platija japonesa y pez cebra. Más allá de eso, no se conocen genes duplicados de TLR9 de especies de mamíferos (Goldammer et al., 2004). Considerando que la selección purificadora se ha asumido para mamíferos TLR9, Chen et al. (2008) han comparado las secuencias de la gama de genes TLR9 y sugiere la selección positiva en el gen ortologo en teleósteos. La hipótesis principal aquí es que diversos factores de TLR9 en las respectivas especies responderán adecuadamente a la rápida evolución de secuencias de CpG del ADN viral y bacteriano

2.11. β -glucanos

Los hongos se han utilizado con fines medicinales en Asia desde hace más de 2000 años y muchos de ellos se utilizan para reducir el colesterol y en forma purificada, se ha demostrado que estimulan la inmunidad innata (Williams, 1997), así mismo, estimulan respuestas antitumorales (Cheung et al., 2002; Hong et al., 2004), aumenta la resistencia a las infecciones (Williams et al., 1996), promueve la reparación de la heridas (Wei et al., 2002), han sido usados contra enfermedades inmunes y como medicina complementaria en el tratamiento tradicional del cáncer (Novak y Vetvicka, 2008; Ooi, 2008; Ren et al., 2012; Wasser, 2011). Muchos de los hongos si no es que

todos contienen, proteínas, sustancias fenólicas, esteroides, alcaloides, lactonas, terpenos, ceramidas, polisacáridos biológicamente activos y polisacáridos complejos.

Los efectos de los hongos se han atribuido a ciertos polisacáridos llamados β -glucanos encontrados en su pared celular, debido a que no son sintetizados por el cuerpo humano, son reconocidos por el sistema inmune e inducen una respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Brown y Gordon, 2005). Principalmente los polisacáridos son de diferente composición química, principalmente pertenecientes al grupo de los β -glucanos; estos tienen uniones β - (1-3) en la cadena principal del glucano y ramificaciones adicionales β - (1-6) que están presentes en diferentes cantidades (Ooi, 2008; Ruthes et al., 2015) y que son requeridos por su acción antitumoral e inmunomoduladora (Sari et al., 2016), antiviral (Zhang et al., 2007) y efectos hepatoprotectoras (Wasser, 2014). Los ejemplos incluyen schizophyllan de *Schizophyllum commune* (Komatsu et al., 1969), lentinan de *Lentinus edodes* (Chihara et al., 1970), grifolan de *Grifola frondosa*, pachymaran de *Poria cocos* y pleuran de *Pleurotus ostreatus* (Novak y Vetvicka, 2008).

Varios tipos de β -Glucanos se han utilizado con éxito para mejorar la resistencia de peces y crustáceos contra infecciones bacterianas y virales (Soltanian et al., 2009 REV). Muchos estudios han señalado la posibilidad de beta-glucanos como un adyuvante en combinación con vacunas virales, bacterianas y parasitarias (Hetland et al. 2000; Hrcckova y Velebny 2001; Yun et al., 2003; Jung et al., 2004.). Los β -glucanos elevan la inmunidad humoral (Sakurai et al. 1992, An et al. 2008) así como la inmunidad celular (Xiao et al. 2004) contra estos antígenos. Adicionalmente se ha reportado que los β -glucanos pueden inducir la expresión de genes de péptidos antimicrobianos en peces (Marel et al., 2012; Schmitt et al., 2015).

2.11.1. Hongos marinos

El ambiente marino contiene generalmente hongos osmotolerantes pero también hongos halofílicos verdaderos. Estos hongos halofílicos tienen paredes gruesas, melanizadas y estas características contribuyen a proteger la célula de las condiciones hipersalinas (Raspor et al., 2006). Lo anterior sugiere un cambio químico en su

estructura que los distingue de otros hongos y ser posible fuente de nuevas moléculas bio-activas para uso en biotecnología y bioremediación.

Se ha reportado que las citocinas pro inflamatorias IL-1b y TNFa, IL-6, COX-2 mostraron un pico fuerte después de la estimulación con los exopolisacaridos de *V. fluvialis* L21 y fue similar el caso de IL-10, donde se encontró una sobre regulación del gene del MX en leucocitos incubados con exopolisacarodos. Lo anterior sugiere que los exopolisacaridos de *V. fluvialis* L21 tienen un gran poder de estimulante en la expresión in vitro de genes relacionados con la respuesta inmune y pueden ser útiles como adyuvantes para vacunas en acuicultura (Roman et al., 2015).

2.11.2. Líquenes

Los líquenes son fuentes valiosas de plantas y se utilizan como medicina, alimentos, forraje, perfumes, especias, colorantes y para diversos propósitos en todo el mundo. Los líquenes son inherentemente resistentes a la infección microbiana debido a la producción de un gran número de metabolitos secundarios únicos (Huneck, 1999). Los metabolitos secundarios de liquen muestran una amplia gama de actividades biológicas potencialmente útiles como antimicobacterial, antiviral, antiinflamatorio, analgésico, antipirético, antiproliferativo y propiedades citotóxicas (Boustie y Grube, 2005). Es sabido que los líquenes contienen cantidades considerables de glucanos solubles en agua. Los mejor investigados son liquenina (lichenan), un β - glucano lineal soluble en agua caliente e isolichenina (isolichenan), un α -glucano soluble en agua fría (Gorin et al., 1988). Recientemente, el interés en polisacáridos extracelulares producidas por microorganismos simbióticos de organismos marinos está aumentando debido a que los microorganismos en su mayoría son nuevos o especies inadecuadamente descritas (Miranda et al., 2008). Los polisacáridos extracelulares producidos por microorganismos simbióticos de organismos marinos representan una fuente potencial a ser explorado (Dobretsov & Qian, 2004). Investigadores demostraron que el AWP aislado del líquido fermentado del hongo marino *Aspergillus versicolor* es un nuevo polisacárido extracelular diferente a los de otros microorganismos marinos (Chen et al., 2013).

2.11.3. β -glucanos como inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son compuestos naturales y sintéticos que contrarrestan el estado inmunosupresor de peces mediante la promoción de la respuesta inmune no-específica, la producción de anticuerpos o sobre-regulación de la respuesta inflamatoria (Bagni et al., 2005; Tzianabos, 2000). Los inmunoestimulantes naturales son biocompatibles, biodegradables y seguros para el medio ambiente y la salud humana (Sahoo et al., 2005; Kumari y Sahoo, 2006). El uso de inmunoestimulantes naturales en acuicultura puede mejorar la respuesta inmune de peces (Bagni et al., 2005).

En humanos y ratones, β -glucanos han demostrado estimular la respuesta inmune específica (adyuvantes de la vacuna) y no específica (Abel y Czop, 1992; Adachi et al., 1994; LeBlanc et al., 2006; Mucksova et al., 2001; Williams et al., 1989). Como tal, los β -glucanos estimulan la fagocitosis y la producción de citocinas inflamatorias por los macrófagos (Brown, 2006; Brown y Gordon, 2001). Además, los β -glucanos tienen la capacidad de estimular los neutrófilos y monocitos por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Rubin Bejerano et al., 2007; Thornton et al., 1996; Vetvicka et al., 1996; Xia et al., 1999).

2.11.4. Activación del sistema inmune mediante β -glucanos

Los receptores Toll-like como TLR2 posiblemente podrían reconocer β -glucanos y estar expresados en varias especies de peces (Pietretti y Wiegertjes, 2014), pero la presencia del receptor prototipo de lectina tipo C (CLR) para β -glucano, Dectin-1, se limita a genomas mamíferos (Sattler et al., 2012).

Los β -Glucanos son conocidos por su unión a receptores, como receptor de complemento (Ross et al., 1985) y el receptor pro inflamatorio no opsonico Dectin-1 identificado en células fagocíticas, que estimula la proliferación de linfocitos T (Ariizumi, K. et al., 2000). Estrada et al., (1997) demostraron un aumento de la producción de IL-1 α por macrófagos en presencia de β -Glucanos, mientras en bazo fue mostrada una mayor secreción de IL-2, el IFN- γ y de IL-4. La actividad

antimicrobiana de IL-12 se ha demostrado en bacterias, levaduras, parásitos y modelos virales de infección (Matsunaga et al., 2001). En conclusión los β -Glucanos de diversas fuentes en general mejoran la respuesta inmune de leucocitos, principalmente a través de la modulación en la producción de citocinas.

Un estudio en el salmón del Atlántico indica la participación de tres lectinas tipo C; SCLRA, SCLRB y SCLRC además de CR3, en el reconocimiento de β -glucanos 1-3/1-6 (Kiron et al., 2016). Una vez que el receptor de reconocimiento patrones (lectinas tipo C) de un huésped, identifica un patrón de hongos, la quinasa Src (KSYK,) se activa a través del motivo ITAM-like para causar la transducción de la cascada de señalización. Probablemente, KSYK es reclutada por un receptor fosforilado, que conduce a la formación de un complejo que involucra CARD9 (Familia de dominio de reclutamiento de caspasas); linfoma de células B 10 (BCL-10) y gen 1 de translocación de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT1); Esto induce la activación de kinasa I κ B del complejo (IKK) a través de una vía desconocida. IKK β fosforila inhibidor de NF- κ B α (I κ B α), de este modo ocurre la degradación proteasoma. Esto resulta en la liberación de factor- κ B nuclear (NF- κ B), que luego se transloca en el núcleo para posterior secreción de citocinas pro- inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, especies reactivas de oxígeno (Gross et al., 2006, Dennehy . y Brown, 2007) e IgT (Kiron et al., 2016).

II.I. LITERATURA CITADA

- Aakre, R., H. I. Wergeland, P. M., Aasjord and C. Endresen, 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1, 3-M-glucan as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(1): 47-61.
- Abel, G., and J.K., Czop. 1992. Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL- 1 beta. *Int. J. Immunopharmacol* 14: 1363–1373.
- Aburto-Oropeza, O., B., Erisman, V., Valdez-Ornelas, G., Danemann, E., Torreblanca-Ramírez, J.T., Silva Ramírez, and G.O., Manzanares. 2008. Commercially important serranid fishes from the Gulf of California: ecology, fisheries, and conservation. *Cienc. Mar. Conserv* 1: 1–44.
- Adachi, Y., M., Okazaki, N., Ohno, and T., Yadomae. 1994. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1–3)-beta-Dglucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 17: 1554–1560.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782–787.
- Afonso, A., A. E., Ellis, and M. T., Silva. 1997. The leukocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 7: 335–348.
- Agius, C. 1985. The melano-macrophage centres of fish: A review. *Fish Immunology*. M.J. Manning y M.F. Tatner. Academic Press. Londres. pp: 85-106.
- Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32 (7):1958-68.
- Ai, Q., K. Mai, L. Zhang, B. Tan, W. Zhang, W. Xu, and H. Li. 2007. Effects of dietary beta-1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish Shellfish Immunol* 22 (4):394-402.
- Ainsworth A.J. 1994. A beta-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol.* 41:141-52.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4 (7):499-511.

Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2 (8):675-80.

Alexander, J. B. and G. A Ingram. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 249–279.

Alexander, J.B. 1985. Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. *Fish Immunology*. M.J. Manning y M.F. Tatner. *Academic Press. Londres*. 133-140.

An, B.K., B.L. Cho, S.J. You, H.D. Paik, H.I. Chang, S.W. Kim, C.W. Yun, and C.W. Kang. 2008. Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived beta-glucan and single-strain probiotics. *Asian-Australian J Animal Sci*. 21(7) 1027–1032.

Appay, V., C. Jandus, V. Voelter, y col. 2006. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J. Immunol*. 177(3), 1670–1678.

Arancibia, S. A., C. J. Beltran, I. M. Aguirre, P. Silva, A. L. Peralta, F. Malinarich, and M. A. Hermoso. 2007. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40 (2):97-112.

Aranishi, F., and N. Mano. 2000. Antibacterial cathepsins in different types of ambicoloured Japanese flounder skin. *Fish Shellfish Immunol* 10 (1):87-9.

Arason G.J. 1996. Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunol* 6:277-89.

Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, 3rd, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 275 (26):20157-67.

Arkoosh, M.R. and S.L. Kaattari. 1999. Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev. Comp. Immunol* 15:279- 293.

Arma, NR, I. Hirono and T. Aoki. 2004. Characterization of expressed genes in kidney cells of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* treatment with ConA/PMA and LPS. *Fish Pathology* 39, 189–196.

Austin, B. 1988. *Marine Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish*, Fourth Edition. Springer-Praxis, Godalming, England, 457 pp.

- Bagni M, Romano N, Finoia MG, Abelli L, Scapigliati G, Tiscar PG, et al. 2005. Short and long-term effects of dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*;18(4):311-25.
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, and A. M. Krieg. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157 (5):1840-5.
- Barra, D., Schinina, M. E., Simmaco, M., Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G., Bossa, F. 1984. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 259:12595–12601.
- Bauer, S. et al. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 9237–9242.
- Bell, J. K., G. E. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies, and D. M. Segal. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24 (10):528-33.
- Bernstein, R.M., Schluter, S.F., Marchalonis, J.J.. 1998. Immunity. En: *The physiology of fishes*. D.H. Evans. 2^a ed. CRC Press LLC. USA. 215-242 .
- Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*.10:499-511.
- Boes M. 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37, 1141–1149.
- Boustie J. Grube M. 2005. Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet Reserch.* 3 (2):273-287.
- Bricknell I, Dalmo R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19:457–72.
- Brown, G. D., and S. Gordon. 2003. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19 (3):311-5.
- Brown, G.D., 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 33–43.
- Brown, G.D., Gordon, S., 2001. Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature* 413, 36–37.

- Buchmann, K. 2001. Lectins in fish skin: do they play a role in host-monogenean interactions? *J Helminthol* 75 (3):227-31.
- Bullen, J. J. & Griffiths, E. 1987. *Iron and Infection – Molecular, Physiological and Clinical Aspects*. Chichester: Wiley.
- Cardon, L. R., Burge, C., Clayton, D. A. and Karlin, S. 1994. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 3799–3803.
- Carpentier, A. F., G. Auf, and J. Y. Delattre. 2003. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 8:e115-27.
- Carrington AC, Secombes CJ. 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet Immunol Immunopathol*.112:87–101.
- Carrington AC, Secombes CJ. 2007. CpG oligodeoxynucleotides up-regulate antibacterial systems and induce protection against bacterial challenge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*.23: 781-92.
- Carrington, A. C., B. Collet, J. W. Holland, and C. J. Secombes. 2004. CpG oligodeoxynucleotides stimulate immune cell proliferation but not specific antibody production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol* 101 (3-4):211-22.
- Ceccarelli, D., N.A. Hasan, A. Hug, and R. R Colwell,. 2013. Distribution, and dynamics of epidemic, and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:97.
- Chang, L.-Y., Slot, J. W., Gauze, H. J., Crapo, J. D. 1988. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107:2169–2179.
- Chen J.S., Wang T.Y., Tzeng T.D., Wang C.Y. and Wang D. 2008. Evidence for positive selection in the TLR9 gene of teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 234– 242.
- Chen, Y., W. Mao, Y. Gao, X. Teng, W. Zhu, C. Zhao, N. Li, C. Wang, M. Yan, J. Shan, C. Lin, and T. Guo. 2013. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by the marine fungus *Aspergillus versicolor*. *Carbohydr Polym* 93 (2):478-83.
- Cheung NK, Modak S, Vickers A, and Knuckles B. 2002. Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 51:557–564.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., and Arai, Y. 1970. Antitumor polysaccharides, Lentinan and pachymaran. *Saishin Igaku*, 25(5), 1043–1048.

Chiou, C.-S., Hsu, S.-Y., Chiu, S.-I., Wang, T.-K., Chao, C.-S., 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4621–4625.

Cole, A. M., Weis, P. & Dizmond, G. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry* 272, 12008–12013.

CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). 2012. Anuario estadístico de acuacultura y pesca, edición 2012. Mazatlán, Sinaloa..

Cooper CL, Davis HL, Morris ML et al. 2004. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine* 22(23–24), 3136–3143.

Crapo, J. D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J. W., Chang, L.-Y. 1992. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10405– 10409.

Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG et al. 2006. Immunotherapy with a ragweed–Toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 355(14), 1445–1455.

Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K. & Bøgwald, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20, 241–273.

Dennehy KM. and Brown GD., 2007. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol.*;82(2):2538.

Dileep, V., Kumar, H.S., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2003. Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafood and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology* 36, 423–427.

Dobretsov, S., and Qian, P. Y. 2004. The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299, 35–50.

Ellis AE. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunol*; 9:291-308.

- Ellis, A. E. 1987. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis* 3, 167–177.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25 (8-9):827-39.
- Ellis, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11: 453-491.
- Ellis, A.E. 1988. Ontogeny of the immune system on teleost fish. En: *Fish Vaccination*. Academic Press. England. pp: 20-31.
- Engstat R.E, Robertsen B. 1994. Specificity of a beta-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev Comp Immunol*. 18:397-408.
- Erisman, B.E., Buckhorn, M.L., Hastings, P.A., 2007. Spawning patterns in the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in comparison with other aggregating groupers. *Mar. Biol.* 151, 1849–1861.
- Esteve, C., Biosca, E.G. and Amaro, C. 1993. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from european eels *Anguilla anguilla* reared in fresh-water. *Diseases of Aquatic Organisms* 16(1), 15–20.
- Estrada A, Yun C.H., Van K.A., Li B., Hauta S. Laarveld B. 1997. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo, *Microbiol. Immunol.* 41 991–998.
- Ewart KV, Johnson SC, Ross NW. 1999. Identification of a novel pathogen- binding lectin in salmon serum. *Comp Biochem Physiol part C.*; 123:9-15.
- FAO, 2017: <http://www.fao.org/americas/perspectivas/pesca-y-acuicultura/es/>.
- Ferguson, H.W. 1989. *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost.* Iowa state University Press. Ames. pp: 5-103.
- Fischer U, Utke K, Somamoto T, Kollner B, Ototake M, Nakanishi T. 2006. Cytotoxic activities of fish leuco-cytes. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 209–226.
- Fisher, W. Krupp, F. Schnneider, W. Sommer, C. Carpenter, K, E.Niem, V,H. 1995. *Gia FAO para la identificacion de especies para los fines de pesca. Pacifico centro -oriental. Volumen III. Vertebrados-parte 2.* Roma, FAO., Vol III: 1201-1813p.
- Fock WL. Chen CL, Lam TJ, Sin YM. 2000. Isolation and characterization of serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish and Shellfish Immunol*:10:489-504.
- Fouz B, Devesa S, Gravningen K, Barja JL, Toranzo AE. 1990. Antibacterial action of the mucus of turbot. *Bull Eur Fish Pathol*.10:56-59.

- Freedman, S. J. 1991. The role of α 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B, 549–553.
- Funami, K., M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Akazawa, A. Yamamoto, and T. Seya. 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 16 (8):1143-54.
- Gallardo CM, Sarabia MM, Espino BE, Anislado TV. 2010. Biological aspects of *Lutjanus peru* in Bufadero Bay, Michoacan, Mexico: growth, reproduction and condition factors. *Rev Biol Mar Oceanogr.*45:205-15
- Garcia-Ortega, A., Abdo de la Parra, I., Duncan, N.J., Rodriguez-Ibarra, E., Velasco, G., Gonzalez-Rodriguez, B., Puello-Cruz, A. and Martinez, I. 2005. Larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* under experimental conditions. In *Larvi '05 – Fish and Shellfish Larviculture Symposium* ed. Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M. and Sorgeloos, P. pp. 172–175. Oostende, Belgium: European Aquaculture Society.
- Georgopoulou, U. y Vernier, J.M. 1986. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.*, 10: 529- 537.
- Gercken, J. and Renwranz, L. 1994. A new mannan-binding lectin from the serum of the eel (*Anguilla anguilla* L.): isolation, characterization and comparison with the fucose-specific serum lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108B, 449–461.
- Goldammer T., Zerbe H., Molenaar A., Schuberth H.J., Brunner R.M., Kata S.R. and Seyfert H.M. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 174–185.
- Gomez-Gil B., E. Fajer-Avila. and F. Garcia-Vargas. 2006. Vibrios of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 from northwestern Mexico. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 1518–1526.
- Gorin PAJ, Baron M, Iacomini M. 1988. Storage products of lichens. In: Galun M, ed. *Handbook of lichenology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Vol. 3, 9–23.
- Grimholt, U., I. Hordvik, V.M. Fosse, I. Olsaker, Endrese, C., y Lie. Ø. 1993. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 37:469-473 .
- Gross O. et al., 2006. Card 9 controls a non TLR signaling pathway for innate antifungal immunity. *Nature*. 442:6516.

- Guardiola, F.A. A. Cuesta, E. Abellan, J. Meseguer, M. Esteban. 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish, *Fish. Shell Fish. Immunol.* 40. 24-31.
- Gursel, M., Verthelyi, D., Gursel, I., Ishii, K. J. & Klinman, D. M. 2002. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotides. *J. Leuk. Biol.* 71, 813–820.
- Hacker, H. et al. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigenpresenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17, 6230–6540.
- Hacker, H. et al. 2000. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeroid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J. Exp. Med.* 192, 595–600.
- Halperin S, Dobson S, McNeil S et al. 2006. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioateoligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine* 24, 20–26.
- Halperin SA, Van Nest G, Smith B et al. 2003. A Phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen coadministered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 21(19–20), 2461–2467.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander, and D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* 167 (1):72-8.
- Hanington PC, Wang T, Secombes CJ, Belosevic M. 2007. Growth factors of lower vertebrates: characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophage colony-stimulating factor-1. *Journal of Biological Chemistry* 282, 31865–31872.
- Hansen, J.D, Landis , E.D. & Phillips , R.B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy - chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 102 , 6919 – 24 .
- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ. 1991. The effect of dietary vitamin- C on the immune-response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture.* 95:201-14.
- Hartmann, G., and A. M. Krieg. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164 (2):944-53.

- Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsch, R.P. and Esch, G.W. 1978a. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the USA. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 36, 731–738.
- Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33 (11):2987-97.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740– 745.
- Herráez, M.P. y Zapata, A.G. 1986. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 117-126.
- Hetland, G, Ohno, N, Aaberge, I.S, Lovik, M. 2000. Protective effect of beta-glucan against systemic streptococcus pneumoniae infection in mice, *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 27, pp. 111–116.
- Hibiya, T. (ed.). 1994. *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features.* Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 5-125.
- Higgins, D., J. D. Marshall, P. Traquina, G. Van Nest, and B. D. Livingston. 2007. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 6 (5):747-59.
- Hiney M, Smith O, Bernoth E-M. 1997. Covert *Aeromonas Salmonicida* infections In: Bernoth E-M, Ellis AE, Midtlyng PJ, Oliver G, Smith P, editors. *Furunculosis multidisciplinary fish disease research.* San Diego:: Academic Press.,p. 54-97.
- Hjeltnes, B. and R.J. Roberts. 1993. Vibriosis. In *Bacterial Diseases of Fish* ed. Roberts, R.J., Bromage, N.R. and Inglis, V. pp. 109–121. Oxford: Blackwell Scientific.
- Hodkinson, M. y Hunter, A. 1970. Immune response of U.D.N.-infected salmon to *Saprolegnia*. *J. Fish Biol.* 2: 305-311.
- Hoffmann J.A, Reichhart J.M, Hetru C. 1996. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol.* 8:8-13.
- Hong F, Yan J, Baran J.T, Allendorf D.J, Hansen R.D, Ostroff G.R, Xing P.X, Cheung N-K.V, and Ross G.D. 2004. Mechanism by which orally administered β -1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* 173:797–806.

Hoover GJ, EL-Mowafi A. Simko E, Kocal TE, Ferguson HW, Hayes MA. 1998. Plasma proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss*) isolated by binding to lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*. *Comp Biochem Physiol part B*. 120:559-69.

Hornung, V. et al. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol*. 168, 4531–4537.

Hossain, M. J., D. Sun, D. J. McGarey, S. Wrenn, L. M. Alexander, M. E. Martino, Y. Xing, J. S. Terhune, and M. R. Liles. 2014. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. *MBio* 5 (3):-00848-14.

Hrckova, G, Velebny, S. 2001. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan, *J Helminthol*, vol. 75, pp. 141–146.

<http://www.mexfish.com>.

Huizinga, H.W., Esch, G.W. and Hazen, T.C. 1979. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Journal of Fish Diseases* 2, 263–277.

Huneck S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. 86: 559–570.

Igbinosa, E. O. 2016. Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health. *Microb Drug Resist* 22 (3):238-45.

Immanuel, G., V.C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam, and M.P. Marian. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture* 236. 53–65.

Irwin, M.J. y Kaattari, S.L. 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 12: 19-45.

Ishii, K. J. et al. 2002. Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J. Exp. Med*. 196, 269–274.

Itami, T., Ishida, Y., Endo, F., Kawazoe, N. & Takahashi, Y. 1993. Hemagglutinins in the skin mucus of ayu. *Fish Pathology* 28, 41–47.

- Janda, J. M. 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 4 (4):397-410.
- Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23 (1):35-73.
- Janeway CA Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54:1–13.
- Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jault C., Pichon L. and Chluba J. 2004. Toll-like receptor gene family, TIR domain adapters in *Danio rerio*. *Molecular Immunology* 40, 759–771.
- Jayasree, L., P. Janakiram, and R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *J. World Aquat. Soc.* 37:523–532.
- Ji, Y., J. Li, Z. Qin, A. Li, Z. Gu, X. Liu, L. Lin, and Y. Zhou. 2015. Contribution of nuclease to the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila*. *Virulence* 6 (5):515-22
- Jorgensen, J. B., L. H. Johansen, K. Steiro, and A. Johansen. 2003. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Virol* 77 (21):11471-9.
- José Ángel Gutiérrez Pabello. 2010. *Inmunología Veterinaria*. México DF: Manual Moderno..
- Jung, K, Ha, Y, Ha, S.K, Han, D.U, Kim, D.W, Moon, W.K. 2004. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, vol. 51, pp. 72–76.
- Kaattari, S.L. e Irwin, M.J. 1985. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Dev. Comp. Immunol*, 9: 433-444.
- Kaisho T, Akira S. 2001. Bug detectors. *Nature*. 414:701-2.
- Kang Y, Kim K. 2012. Effect of CpG-ODNs belonging to different classes on resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and *Miamiensis avidus* (Ciliata; Scuticociliata) infections. *Aquaculture*.324:39-43.

Kanno T, Nakai T, Muroga K. 1989. Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *J Aquat Anim Health*. 1:2-6.

Kawakami, H. and Hoshimoto, H. 1978. Occurrence and distribution of *Aeromonas* in surface water and algae in river water. *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry* 17, 155–164.

Keller, G.-A., Warner, T. G., Steimer, K. S., Hallewell, R. A. 1991. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7381–7385.

Khouadja et al. 2013. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *International Aquatic Research* 5:13.

Kim, S.H.; Lee, K.Y.; Jang, Y.S. 2012. Mucosal immune system and M cell-targeting strategies for oral mucosal vaccination. *Immune Netw.* 12, 165–175.

Kiron, Viswanath, Amod Kulkarni, Dalia Dahle, Ghana Vasanth, Jep Lokesh, and Odd Elvebo. 2016. Recognition of purified beta 1,3/1,6 glucan and molecular signalling in the intestine of Atlantic salmon. *Developmental & Comparative Immunology* 56:57-66.

Kiryu I, Kollner B, Kuroda A, Ototake M, Dijkstra J.M. 2003. A new putative G-protein coupled receptor gene associated with the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 15:117-27.

Klebanoff, S. J. and Clark, R. D. 1978. *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders*. Amsterdam: North Holland.

Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (7):2879-83.

Kodama, H., Yamada, F., Murai, T., Nakanishi, Y., Mikami, T. & Izawa, H. 1989. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology* 13, 123–132.

Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., and Saito, G. 1969. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gan*, 60(2), 137–144.

Kono T, Bird S, Sonoda K, Savan R, Secombes CJ, Sakai M. 2008. Characterization and expression analysis of an interleukin-7 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*. *FEBS Journal* 275, 1213–1226.

- Krieg A.M, Hartmann G, Yi AK. 2000. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol.*247:1–21.
- Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20:709-60.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374 (6522):546-9.
- Kumar, S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. 2011. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Integrative Medicine.* 9 (2): 117–128.
- Kumari J, Sahoo PK. 2006. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L). *Journal of Fish Diseases.* 29(2):95-101.
- Lafferty, K. D., C. D. Harvell, J. M. Conrad, C. S. Friedman, M. L. Kent, A. M. Kuris, E. N. Powell, D. Rondeau, and S. M. Saksida. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann Rev Mar Sci* 7:471-96.
- Laing K.J, Hansen J.D. 2011. 'Fish T cells: recent advances through genomics', *Dev Comp Immunol.*
- Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol*; 28:9-28.
- Lamers, C.H.J. y Parmentier, H.K. 1985. The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. *Cell Tissue Res.*, 242: 499-503.
- Lazarovici, P. & Loew, L. M. 1986. Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of red sea Moses sole, *Pardachirus marmoratus*). *Journal of Biological Chemistry* 261, 16704–16713.
- LeBlanc, B.W., Albina, J.E., Reichner, J.S., 2006. The effect of PGG β -glucan on neutrophil chemotaxis in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 79, 667– 675.
- Lee CY, Cheng MF, Yu MS, Pan MJ. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* 209(1):31–37.
- Lee, J. S., H. Cheng, D. Damte, S. J. Lee, J. C. Kim, M. H. Rhee, J. W. Suh, and S. C. Park. 2013. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the

growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol* 34 (3):756-61.

Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, I. & Molle, G. 1996. Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *European Journal of Biochemistry* 240, 143–149.

Letchumanan, V., W.F. Yin, L.H. Lee, and K.G. Chan. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. *Front. Microbiol.* 30:6:33.

Lightner, D.V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture* ed. Mcvey, J.P. pp. 393–486. Boca Raton, FL: CRC Press.

Lindenstrom, T. K. Buchmann, C.J. Secombes. 2003. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1b expression in rainbow trout skin, *Fish. Shellfish Immunol.* 15, 107-115.

Liou, W.; Chang, L. Y., Geuze, H. J., Strous, G. J., Crapo, J. D., Slot, J. W. 1993. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* 14:201–207.

a) Liu CS, Sun Y, Hu YH, Sun L. 2010. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine.* 28: 4153-61.

b) Liu CS, Sun Y, Hu YH, Sun L. 2010. Identification and analysis of the immune effects of CpG motifs that protect Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 29:279-85.

Magnadóttir B., Jónsdóttir H., Helgason S., Björnsson B., Solem S.T., Píllström L. 2001. Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 11 75–89.

Marel, M., Adamek, M., Gonzalez, S.F., Frost, P., Rombout, J.H., Wiegertjes, G.F., Savelkoul, H.F., Steinhagen, D., 2012. Molecular cloning and expression of two beta-defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after beta-glucan feeding. *Fish. Shellfish Immunol.* 32, 494–501.

Marklund, S. L., Holme, E., Hellner, L. 1982. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta* 126:41–51.

Marshall, J. D., K. Fearon, C. Abbate, S. Subramanian, P. Yee, J. Gregorio, R. L. Coffman, and G. Van Nest. 2003. Identification of a novel CpG DNA class and motif that

optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol* 73 (6):781-92.

Martins, L. M., R. F. Marquez, and T. Yano. 2002. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32 (3):237-42.

Masuda, Y., M. Inoue, A. Miyata, S. Mizuno, and H. Nanba. 2009. Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Int Immunopharmacol* 9 (5):620-6.

Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg van Ke-menade BM, Kwang J. 2002. Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1beta and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 85–95.

Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171 (6):3154-62.

Matsunaga K., Klein T.W., Friedman H., Yamamoto Y. 2001. *Legionella pneumophila* replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokine formation by epigallocatechin gallate, a major form of tea catechins, *Infect. Immun.* 69 (6) 3947–3953.

Matzinger P. 1998. An innate sense of danger. *Immunology.* 10:399-415.

Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296 (5566):301-5.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4–9.

Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1 (2):135-45.

Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449 (7164):819-26.

Medzhitov, R. and Janeway, C. A. 1998. Innate immunity, the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295–298.

Meyer, F.P. 1970. Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farms. In: Snieszko, S.F. (ed.) *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. American Fisheries Society Special Publication 5. Bethesda, pp. 21–29.

- Midtlyng P.J., Reitan L.J., Lillehaug A., Ramstad A. 1996. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures, *Fish Shellfish Immunol.* 6:599–613.
- Mucksova, J., Babicek, K., Pospisil, M., 2001. Particulate 1,3-beta-D-glucan, carboxymethylglucan and sulfoethylglucan—influence of their oral or intraperitoneal administration on immunological response of mice. *Folia Microbiol. (Praha)* 46, 559–563.
- Mulero V, Meseguer J. 1998. Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 8, 143–156.
- Mulero V, Pelegrin P, Sepulcre M.P, Munoz J, Meseguer J. 2001. A fish cell surface receptor defined by a mAb mediates leukocyte aggregation and deactivation. *Dev Comp Immunol.* 25:619-27.
- Muller T., Hamm S. and Bauer S. 2008. TLR9-mediated recognition of DNA. *Handbook of Experimental Pharmacology* 183, 51–70.
- Murray CK, Fletcher TC. 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J Fish Biol.* 9:329-34.
- Nayak, S., S. K. Singh, N. Ramaiah, and R. A. Sreepada. 2010. Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish Shellfish Immunol* 29 (3):544-9.
- Nelapati, S., K. Nelapati and B. K. Chinnam. 2012. *Vibrio parahaemolyticus*- An emerging foodborne pathogen-A Review. *Vet. World* 5, 48–62.
- Nigam, A.K. U. Kumari, S. Mittal, A.K. Mittal. 2012. Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches, *Fish. Physiol. Biochem.* 38. 1245-1256.
- Nishibuchi M, Kaper JB. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* 63(6):2093–2099.
- Novak, M., and Vetvicka, V. 2008. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology*, 5(1), 47–57.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2006. *Agricultural and Fisheries Policies in Mexico. Recent Achievements, Continuing the Reform Agenda.* OECD Publishing, Paris, France.

- Okuda J., M. Ishibashi, S.L. Abbott, J.M. Janda and M. Nishibuchi. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* 35(8):1965–1971.
- Ooi, V. E. C. 2008. Antitumor and immunomodulatory activities of mushroom polysaccharides. In P. C. K. Cheung (Ed.), *Mushrooms as functional foods* (pp. 147–198). Hoboken N.J: Wiley.
- Ortega-Villaizan M., Chico V., Falco A., Perez L., Coll J.M. & Estepa A. 2009. The rainbow trout TLR9 gene, its role in the immune responses elicited by a plasmid encoding the glycoprotein G of the viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Molecular Immunology* 46, 1710–1717.
- Oshiumi H, Tsujita T, Shida K, Matsumoto M, Ikeo K, Seya T. 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*. 54:791-800.
- Palumbo, S.A., Bencivengo, M.M., Williams, A.C., Buchanan, R.L. and DelCorral, F. 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 854–859.
- Pang, M., J. Jiang, X. Xie, Y. Wu, Y. Dong, A. H. Kwok, W. Zhang, H. Yao, C. Lu, F. C. Leung, and Y. Liu. 2015. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Sci Rep* 5:9833.
- Paulsen SM, Engstad RE, Robertsen B. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast B-glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunol*;11: in press.
- Peleteiro, M.C. y Richards, R.H. 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 8: 161-172.
- Peleteiro, M.C. y Richards, R.H. 1990. Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 13: 225-232.
- Perez, S., J. Bartroli, and E. Fabregas. 2013. Amperometric biosensor for the determination of histamine in fish samples. *Food Chem* 141 (4):4066-72.
- Pietretti, D., Wiegertjes, G.F., 2014. Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 205-222.
- Plant, K. P., and S. E. Lapatra. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Dev Comp Immunol* 35 (12):1256-62.

- Press, C.McL., Dannevig, B.H. y Landsverk, T. 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 79-93.
- Raj, V.S. G. Fournier, K. Rakus, M. Ronsmans, P. Ouyang, B. Michel. 2011. Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells, *Vet. Res.* 42, 92.
- Rasmussen-Ivey, C. R., M. J. Figueras, D. McGarey, and M. R. Liles. 2016. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Front Microbiol* 7:1337.
- Raspor, Peter, and Jure Zupan. 2006. Yeasts in Extreme Environments. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, edited by G. Péter and C. Rosa. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Razin, A. and Friedman, J. 1981. DNA methylation and its possible biological roles. *Prog. Nucl. Acid Res.* 25, 33–52.
- Razquin, B.E., Castillo, A., López-Fierro, P., Álvarez, F., Zapata, A. y Villena, A.J. 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, 36: 159-173.
- Ren, L., Perera, C., and Hemar, Y. 2012. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*, 3(11), 1118–1130.
- Reverter M., Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., Sasal P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives, *Aquacult.* 43350-61.
- Rhodes LD, Rathbone CK, Corbett SC, Harrell LW, Strom MS. 2004. Efficacy of cellular vaccines and genetic adjuvants against bacterial kidney disease in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish Shellfish Immunol.*16:461-74.
- Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L., 2004. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology* 91, 319–325.
- Robertsen B. 2006. The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 172–191.
- Roman, L., F. Acosta, D. Padilla, F. El Aamri, J. Bravo, B. Vega, E. Rodriguez, J. Vega, S. Deniz, and F. Real. 2015. The in vitro immunomodulatory effect of extracellular

products (ECPs) of *Vagococcus fluvialis* L21 on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* 42 (2):517-21.

Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, and E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 3 (8):849-54.

Román-Rodríguez, M.J., 2000. Estudio poblacional del chano norteno, *Micropogonias megalops* y la curvina Golfina *Cynoscion othonopterus* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae), especies endémicas del alto Golfo California, México. Instituto del Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora, México D.F, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L298.

Rombout, J.H.; Joosten, P.H.; Engelsma, M.Y.; Vos, A.P.; Taverne, N.; Taverne-Thiele, J.J. 1998. Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 22, 63–77.

Ross A.J., J.E. Martin and V. Bressler. 1968. *Vibrio anguillarum* from an epizootic in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in USA, *Bull. Off. int. Epizoot.* 69 1133-1148.

Ross, G. D., Cain J. A., and Lachmann P. J.. 1985. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* 134 (5):3307-15.

Rubin-Bejerano, I., Abeijon, C., Magnelli, P., Grisafi, P., Fink, G.R., 2007. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* 2, 55–67.

Rucker R.R. 1959. *Vibrio* infections among marine and fresh-water fish, *Prog. Fish. Cult.* 21 22-25.

Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., and Lacomini, M. 2015. D-Glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117c, 753–761.

SAGARPA,2011:http://www.gbcbiotech.com/genomica_y_pesca/en/pesca_en_mexico.html.

Sahoo PK, Kumari J, Mishra BK. 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology.* 21(20):151-5.

Sakai DK. 1983. Lytic and bactericidal properties of salmonid sera. *Journal of Fish Biology.* 23:457-6.

- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172 : 63–92.
- Sakurai, T, Hashimoto, K, Suzuki, I, Ohno, N, Oikawa, S, Masuda, A, Yadomae, T. 1992. Enhancement of murine alveolar macrophage functions by orally administered beta-glucan, *Int J Immunopharmacol*, vol. 14, pp. 821–830.
- Sala, E., Aburto-Oropeza, O., Paredes, G., Thompson, G., 2003. Spawning aggregations and reproductive behavior of reef fishes in the Gulf of California. *Bull. Mar. Sci.* 72, 103–121.
- Salinas, I., L. Abelli, F. Bertoni, S. Picchietti, A. Roque, D. Furones, A. Cuesta, J. Meseguer, and M. A. Esteban. 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 25 (1-2):114-23.
- Salinas, I.; Zhang, Y.A.; Sunyer, J.O. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1346–1365.
- Sangrador-Vegas A, Martin SA, O’Dea PG, Smith TJ. 2000. Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA. *European Journal of Biochemistry* 267, 7031–703.
- Santamaría, A. y Chávez, E.A. 1999. Evaluación de la pesquería de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) de Guerrero, México. *Rev. Biol. Trop* 47(3): 571–580.
- Santamaría-Miranda, A., M. Saucedo-Lozan, M.N. Herrera-Moreno y J. P. Apún-Molina. 2005. Hábitos alimenticios del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* y del pargo rojo *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el norte de Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(1): 33 – 44
- Sarabia-Mendez, M., M. Gallardo-Cabello, E. Espino-Barr, and V. Anislado- Tolentino. 2010. Characteristics of population dynamics of *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) in Bufadero Bay, Michoacan, Mexico. *Hidrobiologica* 20:147–157.
- Sari, M., Hambitzer, R., Lelley, J., Toepler, K., Teusch, N., and Nickisch-Hartfiel, A. 2016. Characterization of cross flow ultra filtration fractions from *Grifola frondosa* revealed distinct cytotoxicity in tumor cells. *International Journal for Medicinal Mushrooms*, 18 (in press).
- Sattler, S., Ghadially, H., and Hofer, E. 2012. Evolution of the C-type lectin-like receptor genes of the DECTIN-1 cluster in the NK gene complex. *The Scientific World Journal*, 2012.

Savan R, Sakai M. 2006. Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology D* 1, 9–101.

Schmitt, P., Wacyk, J., Morales-Lange, B., Rojas, V., Guzman, F., Dixon, B., Mercado, L., 2015. Immunomodulatory effect of cathelicidins in response to abeta-glucan in intestinal epithelial cells from rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 51, 160–169.

Schroder M.B, Villena A.J, Jorgensen T.O. 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol*; 22:507-17.

Schroeder H.W. Jr, and Cavacini L. 2010. ‘Structure and function of immunoglobulins’. *J Allergy Clin Immunol* 125: 41–52.

Secombes CJ, Fletcher TC. 1992. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2, 53–71.

Secombes, C. J. 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment* (G. Iwama & T. Nakanishi, eds) pp. 63–103. San Diego: Academic Press Inc.

Shephard K.L.. 1994. Functions for fish mucus, *Rev. Fish. Biol. Fish.* 4, 401-429.

Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. 2004. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113(6), 1144–1151.

Slack, J. L., K. Schooley, T. P. Bonnert, J. L. Mitcham, E. E. Qwarnstrom, J. E. Sims, and S. K. Dower. 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275 (7):4670-8.

Smith V.J, Fernandez J.M.O, Jones SJ, Kemp GD, Tatner MF. 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol*; 10:243-60.

Soltanian, S., E. Stuyven, E. Cox, P. Sorgeloos, and Bossier P.. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology* 35 (2):109-138.

Speiser DE, Lienard D, Rufer N et al. 2005. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J. Clin. Invest.* 115(3), 739–746.

- Spitzer, R. E. Koch. 1998. Hagfish skin and slime glands, in: J.M. Jorgensen, J.P. Lomholt, R.E. Weber, H. Malte (Eds.), *Biol. Hagfishan*, ChapmanHall, London, pp. 109-132.
- St. Clair, D. K., Oberley, T. D., Muse, K. E., St Clair, W. H. 1994. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic. Biol. Med.* 16:275–282.
- Stafford J.L, Ellstad K.K, Magor K.E, Belosevic M, Magor B.G. 2003. A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev Comp Immunol.* 27:685-98.
- Strandskog G., Skjaeveland I., Ellingsen T. and Jorgensen J.B. 2008. Double stranded RNA-, CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison, synergies. *Vaccine* 26, 4704–4715.
- Su, C. Y., and C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Res. Microbiol. Elsevier.* 24, 549–558.
- Subramaniam S, Stansberg C, Olsen L, Zou J, Secombes CJ, Cunningham C. 2002. Cloning of a *Salmo salar* interleukin-1 receptor-like cDNA. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 415–431.
- Subramaniam, S., C. Stansberg, and C. Cunningham. 2004. The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol* 28 (5):415-28.
- Subramanian, S. S. MacKinnon, N. Ross. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 148, 256-263.
- Subramanian, S.N.W. Ross, S.L. MacKinnon. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 150, 85-92.
- Sun, S., Zhang, X., Tough, D. F. and Sprent, J. 1998. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J. Exp. Med.* 188, 2335–2342.
- Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo. 2014. Instituto Nacional de la Pesca (INP). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México..146 pp.
- Sveinbjornsson, B., Olsen, R. y Paulsen, S. 1996. Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 19: 349-355.

Swain , P. and Nayak , S.K. 2009 . Role of maternally derived immunity in fish . Fish & Shellfish Immunol. , 27 , 89 – 99 .

Szalai, A.J., Bly, J.E. y Clem, L.W. 1994. Changes in serum concentrations of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) phosphorylcholine-reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature-shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp. Fish Shellfish Immunol., 4:323-326.

Tacchi, L.; Musharrafieh, R.; Larragoite, E.T.; Crossey, K.; Erhardt, E.B.; Martin, S.A.M.; LaPatra, S.E.; Salinas, I. 2014. Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. Nat. Commun.

Tafalla C, Figueras A, Novoa B. 2001. Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. Disease of Aquatic Organism 47, 101–107.

Tafalla, C., J. Bogwald, and R. A. Dalmo. 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. Fish Shellfish Immunol 35 (6):1740-50.

Taghavi Pourianazar, N., and U. Gunduz. 2016. CpG oligodeoxynucleotide-loaded PAMAM dendrimer-coated magnetic nanoparticles promote apoptosis in breast cancer cells. Biomed Pharmacother 78:81-91.

Takano T., Kondo H., Hirono I., Endo M., Saito-Taki T. and Aoki T. 2007. Molecular cloning, characterization of Toll-like receptor 9 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Molecular Immunology 44, 1845–1853.

Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 21:335-76.

Takeshita, F. et al. 2001. Cutting Edge, role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. J. Immunol. 167, 3555–3558.

Takeshita, F., and D. M. Klinman. 2000. CpG ODN-mediated regulation of IL-12 p40 transcription. Eur J Immunol 30 (7):1967-76.

Takeshita, F., K. J. Ishii, A. Ueda, Y. Ishigatsubo, and D. M. Klinman. 2000. Positive and negative regulatory elements contribute to CpG oligonucleotide-mediated regulation of human IL-6 gene expression. Eur J Immunol 30 (1):108-16.

Tassakka, A.C.M.A.R., Sakai, M., 2003. The in vitro effect of CpGODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture 220, 27–36.

- Tatner, M.F. 1985. The migration of labelled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Dev. Comp. Immunol*, 1: 107-117.
- Tatner, M.F. y Findlay, C. 1991. Lymphocyte migration and localization patterns on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, studied using the tracer sample method. *Fish Shellfish Immunol.*, 1: 107-117.
- Tatner, M.F. y Manning, M.J. 1983. Growth of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson from one to five months of age. *J. of Zool.*, 199: 503-520.
- Thornton, B.P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R.C., Ross, G.D., 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the betaglukan- binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/ CD18). *J. Immunol.* 156, 1235–1246.
- Tomas, J. M. 2012. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol* 2012:256261.
- Tort, L. J.C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses, *Trends Immunol.* 22, 277-286.
- Trower, C. J., S. Abo, K. N. Majeed, and M. von Itzstein. 2000. Production of an enterotoxin by a gastro-enteritis-associated *Aeromonas* strain. *J Med Microbiol* 49 (2):121-6.
- Trust, T.J., Bull, L.M., Currie, B.R. and Buckley, J.T. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36, 1174–1179.
- Tulic MK, Fiset PO, Christodoulopoulos P et al. 2004. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113(2), 235–241.
- Tzianabos AO. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews.*13(4):523-33.
- Uhlmann, E., and J. Vollmer. 2003. Recent advances in the development of immunostimulatory oligonucleotides. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6 (2):204-17.
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptors, key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103–110.

- Van der Marel, M., N. Caspari, H. Neuhaus, W. Meyer, M. L. Enss, and D. Steinhagen. 2010. Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with a high bacterial load. *J Fish Dis* 33 (5):431-9.
- Van Ginkel, F.W., Miller N.W., Lobb, C.J., Clem, L.W. 1992. Characterization of anti-hapten antibodies generated in vitro by channel catfish peripheral blood lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 16:139-151.
- Vasselon, T. and Detmers, P. A. 2002. Toll receptors, a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 70, 1033–1041.
- Verthelyi, D., K. J. Ishii, M. Gursel, F. Takeshita, and D. M. Klinman. 2001. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 166 (4):2372-7.
- Vetvicka, V., Thornton, B.P., Ross, G.D., 1996. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J. Clin. Invest.* 98, 50–61.
- Vollmer, J., R. Weeratna, P. Payette, M. Jurk, C. Schetter, M. Laucht, T. Wader, S. Tluk, M. Liu, H. L. Davis, and A. M. Krieg. 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34 (1):251-62.
- Von Gravenitz, A. and Mensch, A.H. 1968. The genus *Aeromonas* in human bacteriology. *New England Journal of Medicine* 278, 245–249.
- Voss, Jr, E. W., Fryer, J. L. & Banowetz, G. M. 1978. Isolation, purification and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 186, 25–34.
- Wagner, H. 1999. Bacterial CpG-DNA activates immune cells to signal 'infectious danger'. *Adv. Immunol.* 73, 329–368.
- Wang, W., Sun, J., Liu, C. and Xue, Z. 2016. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquac Res.*
- Wasser, S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1323–1332.
- Wasser, S. P. 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences and challenges. *Biomedical Journal*, 3, 345–356.

Wei D, Zhang L, Williams D.L, and Browder I.W. 2002. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair Regen* 10:161–168.

Weiner, GJ; Liu, HM; Wooldridge, JE; Dahle, CE; Krieg, AM. 1997. "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(20): 10833–7.

Weisiger, R. A., Fridovich, I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248:4793–4796.

Whyte S.K..2007. The innate immune response of finfish: a review of current knowledge. *Fish. Shellfish Immunol.* 23, 1127-1151.

Williams D.L, Mueller A, and Browder W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators: A review of their anti-infective potential. *Clin Immunother* 5:392–399.

Williams DL. 1997. Overview of (133)- β -D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm* 6:247–250.

Williams, D.L., Yaeger, R.G., Pretus, H.A., Browder, I.W., McNamee, R.B., Jones, E.L., 1989. Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 403–410.

Winkelhake, J. L. & Chang, R. J. 1982. Acute phase (C-reactive) protein-like macromolecules from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Developmental and Comparative Immunology* 6, 481–489.

Wispe, J. R., Warner, B. B., Clark, J. C., Day, C. R., Neuman, J., Glasser, S. W., Crapo, J. D., Chang, L.-Y., Whitsett, J. A. 1992. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 267:23937–23941.

Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikyrova, M., Mayadas, T., Ross, G.D., 1999. The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J. Immunol.* 162, 2281–2290.

Xiao, Z, Trincado, C.A, Murtaugh, M.P. 2004. Beta-glucan enhancement of T cell INF-Gamma response in swine, *Vet Immunol Immunopathol*, vol. 102, pp. 315–320.

Xu, D. y Rogers, W.A. 1991. Electron microscopy of infection by *Saprolegnia* sp. in channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 63-69.

- Xu, Z., D. Parra, D. Gomez, I. Salinas, Y. A. Zhang, L. von Gersdorff Jorgensen, R. D. Heinecke, K. Buchmann, S. LaPatra, and J. O. Sunyer. 2013. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (32):13097-102.
- Yamaguchi, K., Kodama, H., Miyoshi, M., Nishi, J., M., Baba, T. 1996. Inhibition of cytotoxic activity of carp lymphocytes (*Cyprinus carpio*) by antithymocyte monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51:211-221.
- Yamamoto, M. et al. 2002. Cutting edge, a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668–6672.
- Yamamoto, S. et al. 1989. Antitumor effect of nucleic acid fraction from bacteria. *Proc. Jpn. Soc. Immunol.* 48, 272–281.
- Yamamoto, S. et al. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148, 4072–4076.
- Yano, T. 1996. The nonspecific immune system: Humoral defense. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment* (G. Iwama, & T. Nakanishi, eds) pp. 105–157. San Diego: Academic Press.
- Yao C.L., Kong P., Wang Z.Y., Ji P.F., Cai M.Y., Liu X.D. and Han X.Z. 2008. Cloning, expression analysis of two alternative splicing toll-like receptor 9 isoforms A, B in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 648–656.
- Yi, A. K. et al. 1998. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* 160, 4755–4761.
- Yin Z, Lam TL, Sin YM.1997. Cytokine-mediated anti-microbial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 7, 93–104.
- Yoshinaga, K., Okamoto, N., Kurata, O., Ikeda, Y.. 1994. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, 29:1-4.
- Yousif, A. N., Albright, L. J. & Evelyn, T. P. T. 1994. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 20, 127–136.

- Yu Y., Zhong Q., Li C., Jiang L., Yan F., Wang Z. and Zhang Q. 2009. Isolation, characterization of Toll-like receptor 9 in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 492–499.
- Yun, C.H, Estrada, A, Van Kessel A, Park, B.C, Laarveld, B. 2003. Betaglucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 35, pp. 67–75.
- Zapata, A. 1985. Inmunología de peces teleósteos. En: Primer curso teórico-práctico sobre acuicultura. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. pp: 123-205.
- Zhang, L., and K. Orth. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol* 16 (1):70-7.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., and Wang, Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4–19.
- Zhang, Q., X. Dong, B. Chen, Y. Zhang, Y. Zu, and W. Li. 2016. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Dev Comp Immunol* 55:159-68.
- Zhang, X. H., and B. Austin. 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* 98 (5):1011-9.
- Zhang, Xujie, Wuming Yang, Han Wu, Xiaoning Gong, and Aihua Li. 2014. Multilocus sequence typing revealed a clonal lineage of *Aeromonas hydrophila* caused motile *Aeromonas* septicemia outbreaks in pond-cultured cyprinid fish in an epidemic area in central China. *Aquaculture* 432:1-6.
- Zhang, Y.A.; Salinas, I.; Li, J.; Parra, D.; Bjork, S.; Xu, Z.; LaPatra, S.E.; Bartholomew, J.; Sunyer, J.O. 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827–835.
- Zhao, Q., S. Matson, C. J. Herrera, E. Fisher, H. Yu, and A. M. Krieg. 1993. Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Res Dev* 3 (1):53-66.
- Ziegenfuss, M.C. y Wolke, R. 1991. The use of fluorescent microspheres in the study of piscine macrophage aggregate kinetics. *Dev. Comp. Immunol.*, 15: 165-171.

CAPITULO 3

Artículos generados durante el presente estudio

III. ARTÍCULOS GENERADOS DURANTE EL PRESENTE ESTUDIO

3.1. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Vibrio parahaemolyticus*.

Tomás Cárdenas-Reyna ^b, Carlos Angulo ^a, Sawako Hori-Oshima ^b, Esteban Velazquez-Lizarraga ^a, Martha Reyes-Becerril ^{a*}.

^aImmunology & Vaccinology Group, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. 23090, México.

^bInstituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera San Felipe Km. 3.5, Fraccionamiento Laguna Campestre, Mexicali, Baja California 21386, México.

Artículo publicado en la revista *Developmental and Comparative Immunology*.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci

B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) exposed to *Vibrio parahaemolyticus*



Tomás Cárdenas-Reyna^b, Carlos Angulo^a, Sawako Hori-Oshima^b,
Esteban Velázquez-Lizárraga^a, Martha Reyes-Becerril^{a,*}

^a Immunology & Vaccinology Group, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. 23090, Mexico

^b Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera San Felipe Km. 3.5, Fraccionamiento Laguna Campestre, Mexicali, Baja California 21386, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2016

Received in revised form

30 April 2016

Accepted 30 April 2016

Available online 30 April 2016

Keywords:

CpG ODN 1668

Innate immunity

TLR9

IgM

Gene expression

Vibrio parahaemolyticus

ABSTRACT

B-class CpG ODN 1668 is known to possess clear immunostimulatory properties. In this study, we investigated the potential ability of CpG ODN 1668 to enhance the immune response of Pacific red snapper exposed to *Vibrio parahaemolyticus*. Four different treatments were evaluated in Pacific red snapper: (1) stimulatory CpG ODN 1668, (2) stimulatory CpG ODN 1668 and *V. parahaemolyticus*, (3) exposure only to *V. parahaemolyticus* and (4) PBS. Samples were taken at 24, 72, 168 and 240 h of stimulation/infection. The results show that intraperitoneal injection of CpG-ODN 1668 enhanced the anti-protease, superoxide dismutase and catalase activities in serum. CpG ODN 1668 upregulated TLR9 and IgM gene expression in head-kidney, intestine and skin, with higher expression in head-kidney. A higher correlation was observed between TLR9 and IgM in head-kidney and intestine. Finally, no histopathological damages were observed in fish stimulated with CpG ODN 1668. In contrast, melanomacrophages-like structures were present in higher numbers in infected fish. Taken together, these results indicate that CpG ODN 1668 activates innate immune response and upregulate the TLR9 and IgM-mediated immune response. These results may be exploited for the control of vibriosis in farmed Pacific red snapper.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The most significant factor affecting aquaculture is the incidence of microbial pathologies, mainly of bacterial origin. One of the major bacterial diseases is caused by Gram-negative bacterium *Vibrio parahaemolyticus*, which causes diseases known as vibriosis affecting a wide variety of fish, shellfish and other aquatic animals (Zhang et al., 2016). Recently several workers have reported the role of immunotherapy to increase fish resistance to disease by enhancing non-specific and specific defense mechanisms (Kang and Kim, 2015). Data in several recent studies have shown the importance and clinical potential of CpG ODNs as a vaccine adjuvant or therapeutic agent against virus, parasites and bacterial infections in aquaculture (Zhou et al., 2014; Kang and Kim, 2015; Kwon and Kang, 2016). CpG oligodeoxynucleotides (ODNs),

containing unmethylated CpG dinucleotides in their certain flanking sequences (CpG motifs), are one type of important immunomodulators which could induce or enhance various immune responses (Scheiermann and Klinman, 2014). These unmethylated CpG dinucleotides are a type of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and are relatively common in the genomes of most bacteria and DNA viruses (Krieg, 2006). Based on the backbone structure and oligonucleotides sequences, CpG ODNs are characterized into three classes with distinct structural and biological properties, including A-type, B-type and C-type (Krieg, 2002). CpG-A ODNs are designed with a phosphodiester backbone and are very effective in activating dendritic, antigen-presenting and NK cells (Uhlmann and Vollmer, 2003). Class-B ODNs, completely designed with phosphorothioate backbone, have much stronger stimulatory effect on B lymphocytes and Ig production (Krieg et al., 1995; Kang and Kim, 2012). Finally, C-class ODNs are also constructed on PS backbones and combine the properties and effects of both A and B class ODNs, activating

* Corresponding author.

E-mail address: mreyes04@cibnor.mx (M. Reyes-Becerril).

dendritic, B cells, and NK cells (Vollmer et al., 2004). In mammals, Toll-like receptor (TLR) 9 recognizes CpG motifs (Akira and Takeda, 2004); and the motifs are then internalized into acidified endosomal vesicles (Hemmi et al., 2000), and released to trigger immune stimulation through a signaling inductive cascade that involves the up-regulation of NF- κ B (Krieg et al., 2000). Overall, Antigen Presenting Cells (APCs) triggered by CpG-ODNs up-regulate the expression of co-receptor molecules and secrete variety of cytokines, including IL-12, IL-6, IL-1 and TNF- α (Stacey et al., 1996; Chase et al., 1997; Lipford et al., 1997). CpG-B ODNs primarily stimulate proliferation of B cells leading to the secretion of Igs that mediates attacks against invasive pathogens in humans (Verthelyi and Zeuner, 2003; Hartmann et al., 2003). Interesting, CpG-B ODNs stimulate IgM production and protect turbot (*Scophthalmus maximus*) and coibia (*Rachycentron canadum*) against bacterial infections (Liu et al., 2010; Byadgi et al., 2014). Particularly, CpG ODN 1668, a B-class ODN, was shown to bind strongly to leucocyte surface and activates leucocyte immune responses (Cuesta et al., 2008). Studies showed that CpG-ODN 1668 was effective in protecting fish against scuticociliatosis in olive flounder fingerlings (Kang and Kim, 2015), and edwardsiellosis in Japanese flounder (Lee et al., 2003).

Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) is an important fish specie in the Gulf of California, Mexico, due to its fast growth and high market value, which is sufficient to be considered for aquaculture. In recent years, disease outbreaks caused by microbial pathogens such as *Vibrio* have become a severe problem in Aquaculture industries in Mexico. Therefore, the need for the development of effective means of disease control is urgent. To our knowledge, no effective CpG ODNs have been reported as an alternative treatment against microbial infections of Pacific red snapper. The aim of this study is to evaluate the immune response to CpG-B ODN 1668 intraperitoneal injection in Pacific red snapper infected with *V. parahaemolyticus*. We evaluated the humoral parameters in serum and TLR9 and IgM gene expression especially in immune-related organs (head-kidney) and mucosal-epithelial barriers (gut, skin); and finally we analyzed the histopathological changes in the intestine in response to stimulation by CpG ODN 1668 and *Vibrio parahaemolyticus* infection.

2. Materials and methods

2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

The *Vibrio parahaemolyticus* strain studied was provided by Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, Mexico) and belongs to the bacterial collection of CIBNOR. Briefly, *Vibrio parahaemolyticus* was cultured in TSB (tryptic soy broth, BD #211825) supplemented with 2.5% NaCl and incubated at 28 °C for 24 h. Bacteria were harvested in the mid-to late-exponential growth phase by centrifugation at 8000g for 20 min at 4 °C, and washed twice with PBS. The supernatant fluid was removed and the bacteria pellet was suspended in saline solution (0.85% NaCl) to 1×10^8 cell/ml as the stock bacterial suspensions for the study.

2.2. Experiment 1: *Vibrio parahaemolyticus* test

To examine the pathogenicity of *V. parahaemolyticus*, Pacific red snappers (250 \pm 11 g mean body weight) were divided into two groups: one group ($n = 6$) injected with sterile PBS as the control and the other group ($n = 6$) was injected with *Vibrio parahaemolyticus* (1×10^8 cell ml $^{-1}$). Each group was organized in three tanks (2 fish/tank) and each fish was injected intraperitoneally with 200 μ l of bacterial dilution or PBS. Injected Pacific red snapper were cultured in tanks with the same cultured conditions as for the

acclimatized fish, and their incidence and mortality were monitored and recorded daily for 10 days. Liver and spleen segments from PBS and *V. parahaemolyticus* injected fish were fixed in 10% neutral formalin for histological examination. Liver and intestine were homogenized in 10 ml of saline solution using a stomacher lab blender, streaked on selective TCBS agar, and incubated overnight at 28 °C for *V. parahaemolyticus* counts (Aldridge and Schiro, 1994). Finally, after pure cultures were obtained, all reisolates that were positive for *V. parahaemolyticus* were confirmed by PCR using primers specific for the thermolabile hemolysin (th y trh) gene as a specific marker for *V. parahaemolyticus*. In addition, we sequenced the *V. parahaemolyticus* strains reisolated from the infected Pacific red snapper using the 16S rRNA methods, and confirmed the results of sequence submitted to NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3. Experiment 2: Immunotherapy with CpG ODN 1668

2.3.1. CpG ODN 1668

CpG ODN 1668 (B-Class) was obtained from Eurogentec (USA). The ODN was phosphorothioate, modified throughout the sequence. Sequences of ODNs are (phosphorothioate, modifications are marked with * and CG and GCs are in bold), T***C***C*A*T*G*A*C*G*T*T***C***C*T*G*A*T*G*C*T. CpG ODN were suspended in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and stored at -20 °C until further use.

2.3.2. In vivo stimulation by CpG ODN 1668 and infection test

Ninety six juvenile Pacific red snapper, *L. peru* (250 \pm 11 g mean body weight) were randomly placed in twelve running seawater tanks (8 fish per tank) (flow rate 1500 l h $^{-1}$). Fish were subjected to preventive bath of formaldehyde 37% (1%, 30 min) (Panreac), and were quarantined for a month before the start of the study without showing any symptom of diseases. Water quality was monitored weekly and water temperature was maintained at 26 °C (with a 12 h dark/12 h light photoperiod), dissolved oxygen at 4.3–6.9 mg l $^{-1}$ and pH at 7.7–8.1. Total ammonia and nitrite concentration remained below 0.02 mg l $^{-1}$.

Four groups were used for *in vivo* stimulation and challenge test: 1. CpG ODN 1668; 2. CpG ODN 1668 plus *V. parahaemolyticus*; 3. *V. parahaemolyticus*; and 4. Control or PBS.

Pacific red snapper were intraperitoneally injected with CpG ODN (10 μ g/fish) and 48 h post-stimulation were infected (i.p.) with 100 μ l of *V. parahaemolyticus* (1×10^8 cell/ml) that had been suspended in PBS (Group: CpG+Vp). The other treatments (CpG or Vp alone) were injected at 48 h post-CpG injection of the CpG+Vp treatment to start sampling point (24h) at the same time for all treatments. For CpG alone treatment, fish were injected intraperitoneally (i.p.) with 100 μ l of CpG ODN 1668 (10 μ g/fish). A group (Vp) was only infected with 100 μ l (i.p.) of *Vibrio parahaemolyticus* (1×10^8 cell/ml), and finally another group was injected (i.p.) with PBS and serves as control. Two fish from each tank were randomly sampled at 24, 72, 168 and 240 h (six fish/time point/treatment) and head-kidney, intestine and skin were collected.

2.3.3. Fish sample collection

Fishes were anesthetized in diluted clove oil solution at the concentration of 100 mg l $^{-1}$. Blood samples were taken from the caudal vein with a 27-gauge needle and 1-ml syringe and allowed to clot at 4 °C for 4 h. Serum was obtained by centrifugation (10 min, 2000 g, 4 °C) and then stored at -20 °C until used for antioxidant and humoral immune parameters determination. Head-kidney, intestine and skin were also sampled and immediately stored at -80 °C in TRIzol Reagent (Invitrogen) for RNA extraction. Intestine segments were fixated in 10% neutral formalin for histological examination.

2.3.4. Humoral immune parameters

Total protein was measured by the method described by Bradford (1976). Total myeloperoxidase (MPO) activity in serum samples was measured according to Quade and Roth (1997) with slight modifications. Total antiprotease activity was determined as indicated by the capacity of serum to inhibit trypsin activity (Ellis, 1990).

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the percentage reaction inhibition rate of enzyme with WST-1 (water soluble tetrazolium dye) substrate and xanthine oxidase using SOD Assay Kit (Sigma, 19160) according to the manufacturer's instructions. Catalase (CAT) activity was assayed by the method of Clairborne (1985), by following the decrease in absorbance of H₂O₂ at 240 nm. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to degrade 1 mmol of H₂O₂ in 1 min and is expressed as U/mg protein.

2.3.5. Primer design and evaluation

TLR9 and IgM primers were designed by using PRIMER 3 and Fast PCR software [31]. All designed primers were tested with genomic DNA and cDNA on agarose gel prior to real-time PCR for the presence of primer dimers and for the verification of product sizes (Reyes-Becerril et al., 2015). The primers finally used for qPCR and their size products are shown in Table 1.

2.3.6. Analysis of gene expression

Total RNA was extracted from tissues with TRIzol reagent (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. Samples were treated with Amplification grade DNase I (1 U/mg RNA, Life Technologies). The SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Life Technologies) was used to synthesize first-strand cDNA with oligo-dT (18) primer from 1 µg total RNA at 50 °C for 50 min. Real-time PCR was conducted to analyze the TLR9 and IgM gene expression. Each treatment featuring different stimulants was performed at least 3 times in parallel. PCR was performed with a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad, using Ssofast™ EVAGreen® Super Mix. The reaction mixtures were incubated for 30 s at 98 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 98 °C, 10 s at 60 °C, and finally at 65–95 °C (In 0.5 °C Inc) for the melt curve. The specificity of the qPCR product was analyzed by a dissociation curve performed after amplification, a single peak was observed at the expected melting temperature (T_m). To maintain consistency, the baseline was set automatically by a software. RNA templates were included as negative controls for each sample to rule out the possibility of genomic DNA contamination. The relative mRNA expression level of the target gene was normalized to the most stable house-keeping gene elongation factor-1α (EF1-α) (Mohapatra et al., 2014).

2.3.7. Histological examination

Samples were embedded in paraffin, sectioned to 5 µm, and stained with hematoxylin-eosin according to the method described by Drury et al. (1976). Three permanent slides per fish were examined under a microscope, and digital photographs were taken

in longitudinal cross-sections. The computer program Image Pro Plus V4.5 was used in observations and measurements of intestinal sections. Computerized morphometric measurements were made of the following: (1) microvilli height (MH), (2) epithelial cell vacuolization (EV) and (3) intraepithelial leucocytes (ILs). MH was evaluated with 10 measurements per picture from the basis to the tip; EV was evaluated as the total area occupied by vacuoles as the percent per area of epithelium layer; and the measurements of 3–6 were counts made per area of epithelium layer. Ten random pictures were taken per slide.

2.3.8. Statistical analysis

All bioassays and measurements were performed in triplicate and the (mean ± standard deviation, SD) for each group and sampled time was calculated. A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effects of CpG ODN 1668, CpG+Vp or Vp on immunological parameters and TLR9 and IgM gene expression using SPSS v.17.0 software (SPSS, Richmond, VA, USA). Means were separated by a Tukey multiple range test. Differences were considered significant at P < 0.05.

For gene expression, data are expressed as fold increase (mean ± SD), obtained by dividing each sample value by the mean control (PBS) value at the same sampling time. Values higher than 1 express an increase while values lower than 1 express a decrease in the indicated gene (Pfaffl, 2001). Correlation analysis between TLR9 and IgM gene expression was accomplished by Pearson's correlation test (r). Differences were considered statistically significant when P < 0.05.

3. Results

3.1. Experiment 1. *Vibrio parahaemolyticus* infection

No fish died in any of the groups over the course of the first trial, including the group infected with *V. parahaemolyticus*. However, examination of sections by histology indicated that *V. parahaemolyticus* caused severe lesions in liver (Fig. 1). Especially in the liver, Pacific red snapper showed serious hydropic degeneration. Spleen showed signs of severe hemosiderosis in *V. parahaemolyticus* fish infected compared with control group (Fig. 1cd). Finally, intestinal Vibrio count (UFC) was highest in the intestine than in liver (Data not shown). The BLAST results of the sequence of putative *V. parahaemolyticus* 16S rRNA showed similarity ≥99% to those of *V. parahaemolyticus* strains in the NCBI database.

3.2. Experiment 2. Effect of CpG ODN 1668 on innate immune response in Pacific red snapper

To examine the effect of CpG ODN 1668 on humoral immune response against *Vibrio parahaemolyticus*, serum of Pacific red snapper was collected and analyzed for total protein, myeloperoxidase, antiprotease, superoxide dismutase and catalase activities (Table 2). The results showed that compared to PBS, CpG ODN 1668

Table 1
Sequences of the primers used in this study.

Gen	Gen abbreviation	Accession No.	Length of product (bp)	Primer sequence (5'–3')
Toll like receptor-9	TLR9	KM507866.1	199	ATGAGCCAGACTTTGAAGAATG CTCGAATGMACTTAAACGATG
Immunoglobulin M	IgM	DQ324424.1	113	AACGATAAACAAGTCGAAGAAGTG CAGTCTGCAGTTTIGATAATCAG
Elongation factor-1α	EF-1α	KM669764.1	139	CTGCAGGACGTCTACAAAATC GGTGCATCTCACAGACTTAAAC

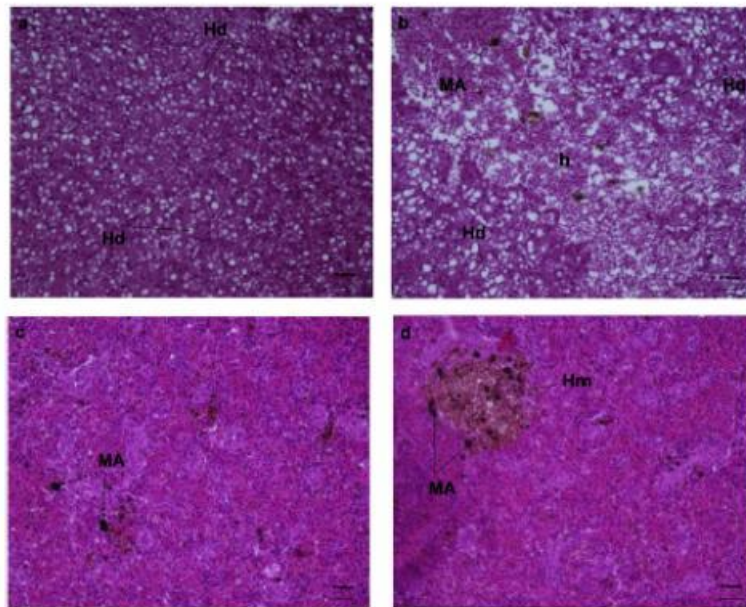


Fig. 1. Histopathological observations of Pacific red snapper liver and spleen experimentally infected with control PBS (a, c) and *V. parahaemolyticus* (b, d) at seven days post-infection. Letters in the figure are denoted as MA: melanomacrophages centers, Hd:hydropic degeneration, Hm: hemosiderosis, h: Hepatic hemorrhage. Hematoxylin and eosin staining. Magnification: 40X, Scale bars: 10 μ m.

significantly increased the total protein at 24 and 168 h post stimulation; however fish infected with *V. parahaemolyticus* significantly increased this parameter at 72 and 168 h of stimulation. No significant differences were observed at 240 h with any treatment compared with control. Myeloperoxidase activity analysis showed that fish treated with CpG ODN 1668 including that infected with *V. parahaemolyticus* 48 h post stimulation with CpG were significantly higher than that of the control at 24 h of sampling time. Curiously, at 72 h of sampling time, all treatments were significantly decreased compared with PBS (control). At 168 h, we observed a significant increase in CpG ODN 1668, CpG+Vp and Vp treatments compared with control group. Finally, at 240 h post-

stimulation, CpG ODN 1668 and infected group were significantly higher than that of the PBS group.

Serum anti-protease activity increased in fish infected with *V. parahaemolyticus* at 24 h post-infection compared with PBS group ($P < 0.05$). No significant differences among groups were observed at 72 h post-stimulation compared with control. However, after 168 h of sampling time a significant decreased was observed in CpG ODN 1668 and *V. parahaemolyticus* treatment compared with PBS group.

Serum antioxidant capabilities of the Pacific red snapper were presented in Table 2. Regarding enzymes involved in the metabolism of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase

Table 2

Physiological parameters (total protein) and enzymatic activities (myeloperoxidase, anti-proteases, superoxide dismutase SOD, catalase CAT) found in serum samples of Pacific red snapper injected with different treatments.

Sampling periods (h)	Treatments	Total protein (mg/ml)	Myeloperoxidase activity (U/ml)	Anti-protease activity (%)	SOD (U mg ⁻¹ protein)	CAT (nmol/min/ml)
24	PBS or control	18.2 \pm 2.89 ^a	42.7 \pm 4.77 ^a	55.1 \pm 2.19 ^a	73.8 \pm 1.15 ^a	1.6 \pm 0.14 ^e
	CpG ODN 1668	33.5 \pm 4.01 ^b	70.2 \pm 9.53 ^b	50.0 \pm 1.75 ^a	71.8 \pm 9.01 ^a	4.0 \pm 0.63 ^b
	CpG+Vp ¹	24.2 \pm 3.54 ^a	103.2 \pm 12.9 ^c	61.3 \pm 3.05 ^a	65.7 \pm 1.22 ^a	1.4 \pm 0.48 ^a
	Vp ²	25.6 \pm 3.65 ^a	49.9 \pm 14.8 ^a	65.4 \pm 3.122 ^b	68.2 \pm 3.45 ^a	1.6 \pm 0.38 ^a
72	PBS or control	18.3 \pm 2.78 ^a	105.3 \pm 2.02 ^c	48.7 \pm 0.85 ^a	53.4 \pm 2.49 ^a	2.3 \pm 0.40 ^a
	CpG ODN 1668	26.0 \pm 3.87 ^a	79.4 \pm 19.6 ^b	51.5 \pm 2.98 ^a	68.3 \pm 6.05 ^b	2.0 \pm 0.28 ^a
	CpG+Vp	21.6 \pm 3.12 ^a	44.7 \pm 9.69 ^a	59.7 \pm 3.33 ^a	68.3 \pm 3.56 ^b	1.2 \pm 0.22 ^a
	Vp	35.2 \pm 4.58 ^b	75.6 \pm 15.10 ^b	55.6 \pm 1.68 ^a	56.9 \pm 4.43 ^a	1.8 \pm 0.69 ^a
168	PBS or control	19.5 \pm 2.48 ^a	55.2 \pm 0.57 ^a	56.7 \pm 1.06 ^b	62.1 \pm 1.72 ^a	2.0 \pm 0.14 ^e
	CpG ODN 1668	31.0 \pm 3.99 ^b	88.5 \pm 3.98 ^c	39.1 \pm 0.54 ^a	54.5 \pm 4.27 ^a	2.5 \pm 0.34 ^b
	CpG+Vp	24.6 \pm 3.78 ^a	62.0 \pm 6.33 ^b	56.1 \pm 5.03 ^b	59.1 \pm 1.78 ^a	1.3 \pm 0.32 ^a
	Vp	37.7 \pm 4.12 ^b	62.2 \pm 4.92 ^b	64.7 \pm 1.23 ^b	74.5 \pm 4.34 ^b	1.2 \pm 0.43 ^a
240	PBS or control	17.2 \pm 2.56 ^a	30.2 \pm 17.46 ^a	51.3 \pm 0.31 ^b	65.3 \pm 3.31 ^a	3.0 \pm 0.19 ^a
	CpG ODN 1668	19.3 \pm 2.45 ^a	74.0 \pm 33.4 ^b	16.6 \pm 2.08 ^a	76.5 \pm 4.71 ^b	8.4 \pm 0.68 ^b
	CpG+Vp	19.1 \pm 2.13 ^a	46.5 \pm 17.5 ^a	48.0 \pm 5.81 ^b	65.6 \pm 3.68 ^a	1.9 \pm 0.30 ^a
	Vp	20.9 \pm 3.46 ^a	59.7 \pm 26.4 ^b	26.5 \pm 1.29 ^a	70.6 \pm 4.38 ^a	1.2 \pm 0.10 ^a

Different alphabetical letters are significantly different ($P < 0.05$).

Data represent the mean \pm SD ($n = 6$).

¹ CpG+Vp: CpG ODN 1668 (stimulated during 4 h) and infected with *Vibrio parahaemolyticus*.

² Vp: *Vibrio parahaemolyticus*.

(SOD) activity at 72 h was higher in CpG ODN 1668 and CpG+Vp groups than PBS group. Thereafter, at 168 h of experimental stimulation, a significant increase was observed in SOD activity in *V. parahaemolyticus* infected group ($P < 0.05$). Finally, SOD activity was significantly increased at 240 h during CpG ODN 1668 treatment compared with PBS group. Interestingly, the fish catalase activity was significantly increased each time in injected with CpG ODN 1668 group than that of the control group (Table 2).

3.3. CpG ODN 1668 induced TLR9 and IgM gene expression

Real time PCR of immune gene expression in head-kidney, intestine and skin of Pacific red snapper revealed a significant up-regulation with each time of stimulation. In this study, TLR9 mRNA transcript in the head-kidney was significantly up-regulated in fish stimulated with CpG or *V. parahaemolyticus* at any time compared with the control group (PBS) (Fig. 2a). Interestingly, we can observe that expression profile of TLR9 in head-kidney with CpG ODN 1668 resulted in constant increase after 24 h post-stimulation and peaked significantly higher at 240 h. On the other hand, TLR9 gene expression in organism stimulated with CpG and infected with *V. parahaemolyticus* (CpG+Vp) gradually decreased with time. Finally, in *V. parahaemolyticus* infection, expression of TLR9 increased significantly (~3 folds) until 24 h and then decreased at 240 h post-stimulation-infection (~1 folds).

The expression profile of TLR9 in the intestine with CpG ODN 1668 showed fluctuated expression (Fig. 2b). The TLR gene expression increased at 24 post-stimulation (~6 folds) and decreased at 72 h (~3 fold), and bottomed at 168 h (~19 fold) and decreased at 240 h (~5 fold). CpG+Vp treatment reached the highest level at 24 h (~16 fold) but the decrease reached the lowest level at 72 h post-stimulation-infection (~1.37 folds). Pacific red snapper infected with *V. parahaemolyticus* showed relative constant expression of TLR9 at 24, 72, 168 and 240 h (~1.94, 2.4, 2.8 and 1.4 fold, respectively).

TLR9 gene in skin showed the lowest level of expression compared with head-kidney and intestine (Fig. 2c). TLR9 gene expression during CpG ODN 1668 treatment was constant at any time of the experiment. Interestingly, CpG+Vp and *V. parahaemolyticus* infection treatments were gradually increasing with higher TLR9 gene expression at 240 h (~9.5 and 5.7 folds, respectively).

Through interaction with TLR9, CpG-B ODN typically increases IgM gene levels due to either recruitment/proliferation of B-cells or from the cells switching from membrane IgM expression to secretory IgM expression in stimulated tissues. CpG ODN 1668 was investigated by analyzing the expression of IgM gene at 24, 72, 168 and 240 h post injection in order to understand whether CpG ODN stimulate immunoglobulin production in Pacific red snapper.

IgM gene expression in head-kidney was significantly high ($P < 0.05$) in CpG+Vp treatment at 24 (~23 folds), 72 (~7.4 folds) and 240 (~18.3 folds) h (Fig. 3a). IgM gene expression in this organ was increased gradually at 24 h post-stimulation (~1.4 fold) and peaked (~8.5 folds) at 240 h in CpG treatment. In contrast, infected fish tended to decrease IgM expression gradually until the end of the experiment in head-kidney.

In the intestine, CpG+Vp treatment induced the highest (~97.4 folds) IgM gene expression at 24 h and decreases gradually until the end of the experiment (~5.4 folds) (Fig. 3b). A similar expression profile, but with lower IgM gene expression levels, was observed in the intestine of Vp-treated fish. In contrast, intestinal IgM expression in fish treated with CpG ODNs 1668 was variable and similar to the TLR9 gene expression profile with the same treatment.

IgM gene expression in skin was variable but higher in CpG+Vp treated group compared with other groups (Fig. 3c). The Vp group

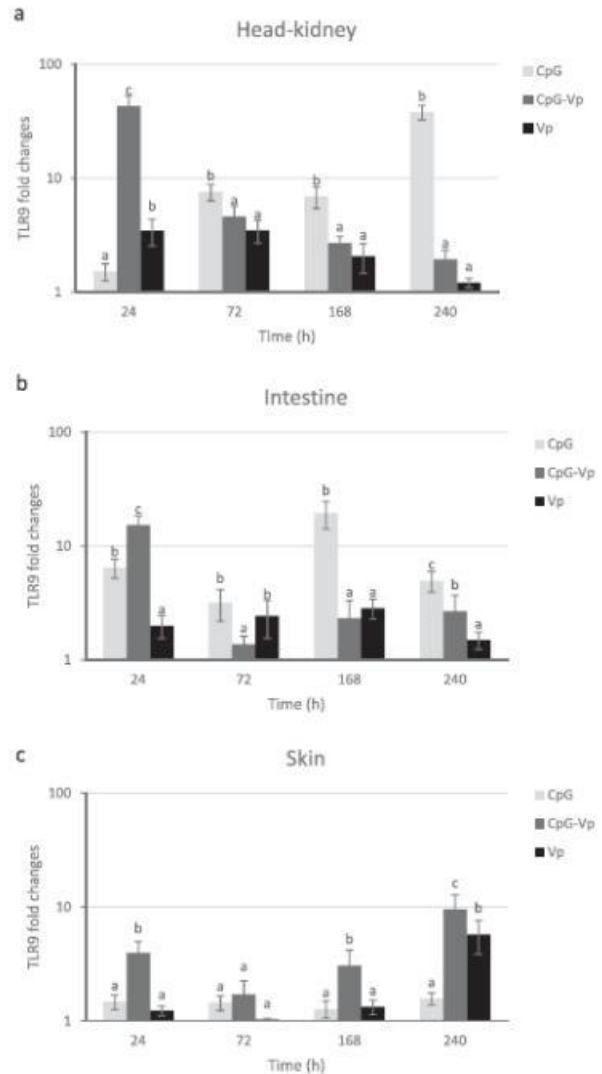


Fig. 2. Relative mRNA expression of TLR9 in Pacific red snapper head-kidney (a), intestine (b) and skin (c) after stimulation with CpG ODN 1668, CpG+Vp and infected with *V. parahaemolyticus*, measured by quantitative real-time PCR. The sampling was carried out at 24, 72, 168 and 210 h post stimulation. TLR9 transcripts were normalized to the expression level of the housekeeping gene (*EF-1 α*) by the delta-delta CT method. Bars represent the mean \pm SD ($n = 6$). Different letters above column denotes significantly different from control ($P < 0.05$).

showed variations and similar behavior profile in IgM gene expression as CpG+Vp group. The IgM gene expression increased at 24 post-stimulation (~4.6 folds) and decreased at 72 (~3.2 folds)-168 (~1.4 fold) h, and increased again at 240 h (~5 folds) in CpG treated group.

Interestingly in this study, TLR9 and IgM gene expression have high correlation ($P < 0.05$) in head-kidney or intestinal tissues with highest correlation percent in fish CpG ODN 1668 treatments; where positive correlation of TLR9 and IgM gene expression in head kidney -CpG (87%) and -CpG+Vp (72%) was observed. In the intestine, the correlation of TLR9-IgM gene expressions was 86 and 95% for CpG and CpG+Vp, respectively. TLR9 and IgM gene expressions showed no significant correlations in skin.

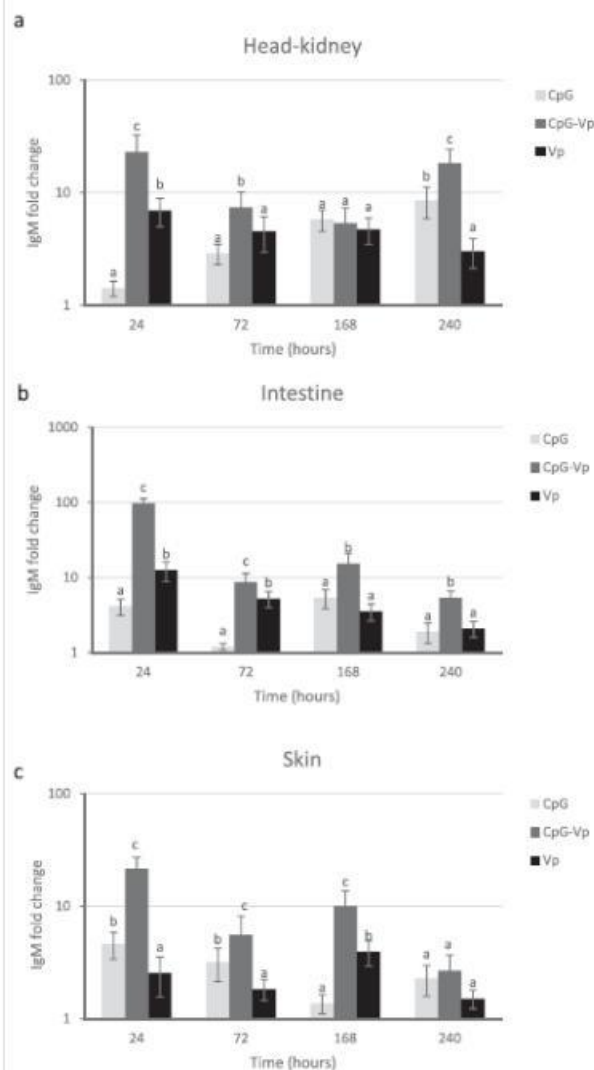


Fig. 3. Relative mRNA expression of IgM in Pacific red snapper head-kidney (a), intestine (b) and skin (c) after stimulation with CpG ODN 1668, CpG+Vp and infected with *V. parahaemolyticus*, measured by quantitative real-time PCR. The sampling was carried out at 24, 72, 168 and 240 h post stimulation. IgM transcripts were normalized to the expression level of the housekeeping gene (EF-1 α) by the delta-delta CT method. Bars represent the mean \pm SD ($n = 6$). Different letters above column denotes significantly different from control ($P < 0.05$).

3.4. Histological examination

The effects of treatments on Pacific red snapper intestine samples were monitored by light microscopy (Fig. 4). Normal gross morphology of the intestinal wall of Pacific red snapper was examined using light microscopy (LM) after hematoxylin and eosin staining in all groups. Fig 4ab (PBS or control) shows typical view of healthy intestine with mucosa, submucosa, muscularis mucosa and villi. Morphometric measurements were determined in all groups, with significant differences ($P < 0.05$) between specimens from the experimental and control groups (Table 3).

The measurement of microvilli height showed no significant differences between control and CpG ODN groups at any time of

treatment (Table 3). The mucosa of the intestine is lined by simple columnar epithelium, composed primarily of absorptive cells (enterocytes), with microvilli, goblet cells and vacuoles (Fig. 3c-h). The most prominent histological characteristic is the presence of great number of vacuoles of different sizes in the enterocyte cytoplasm which was more detectable after 72 h in fish infected with *V. parahaemolyticus* with or without previous CpG ODN stimulation (Fig. 3g-h, Table 3).

The number of intraepithelial leucocytes (IL) was significantly ($P < 0.05$) higher in fish stimulated with CpG ODN 1668 at 24 h post-stimulation. In contrast, at 72 h, we observed significant increase of IL in PBS and *V. parahaemolyticus* groups compared with CpG ODN groups. On the other hand, at 168 and 240 h we observed major number of IL in *V. parahaemolyticus* group compared with the other groups.

Also, enlarged intraepithelial and submucosal macrophages morphologically similar to melanomacrophages (melanomacrophages-like) were present with higher numbers in *V. parahaemolyticus* treatments (Fig. 4e-h).

4. Discussion

Vibriosis is a common disease that causes high mortality in aquaculture and wild fish. Appropriate strategies using immunotherapy may be the most effective method for preventing vibriosis and other bacterial infectious diseases. In this study, first, the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific red snapper was investigated with an *in vivo* assay using histopathological and microbiological methods. Infected fish generally exhibit marked histopathological symptoms, and lesions are particularly prominent in tissues such as liver and spleen (hydropic degeneration and hemosiderosis, respectively), indicating acute pathology. From the above description, it can be concluded that the spleen, kidney and liver are the main target organs of vibrio infection (Bruno et al., 1986; Lamas et al., 1994). The severely infected organs are the principal sites of proliferation of bacteria and subsequent accumulation of toxins (Fouz et al., 1995).

In a second, experiment, we analyzed the potential application of CpG ODN 1668 as an immunostimulant against *V. parahaemolyticus* infection in Pacific red snapper. The response to the stimulation of CpG ODN 1668 humoral immune parameters in serum were evaluated in Pacific red snapper. There are few reports about the effects of CpG ODNs on innate immune responses in serum, thus the underlined mechanisms and detailed processes are still far from well understood. Since the humoral immune responses is the first line of fish defense mechanism against invasion by pathogens, the information about the humoral responses in serum triggered by CpG ODNs may be indispensable for better understanding of the mechanism of their activation on immune system.

Overall, hematological parameters are typically used as indicator of health status and to detect physiological changes in several fish species (Atamanalp and Yanik, 2003). Data for the total serum protein is a reflection of innate immunity (Wiegertjes et al., 1996). According to the results, the serum protein was increasing during CpG ODN 1668 or *V. parahaemolyticus* infection all through the experiment. Accumulating evidences have shown that, like mammalian CpG ODNs, fish CpG ODNs stimulate innate immune responses (Tassakka and Sakai, 2003; Carrington et al., 2004). In our study, in general, we found that CpG ODN 1668 significantly increased Pacific red snapper enzymatic activities such as myeloperoxidase, antiprotease, superoxide dismutase and catalase. As indicated before, published data about *in vivo* CpG ODN effects on non-specific immune response in serum are scarce. In vertebrates, the activation of phagocytic cells is able to generate superoxide

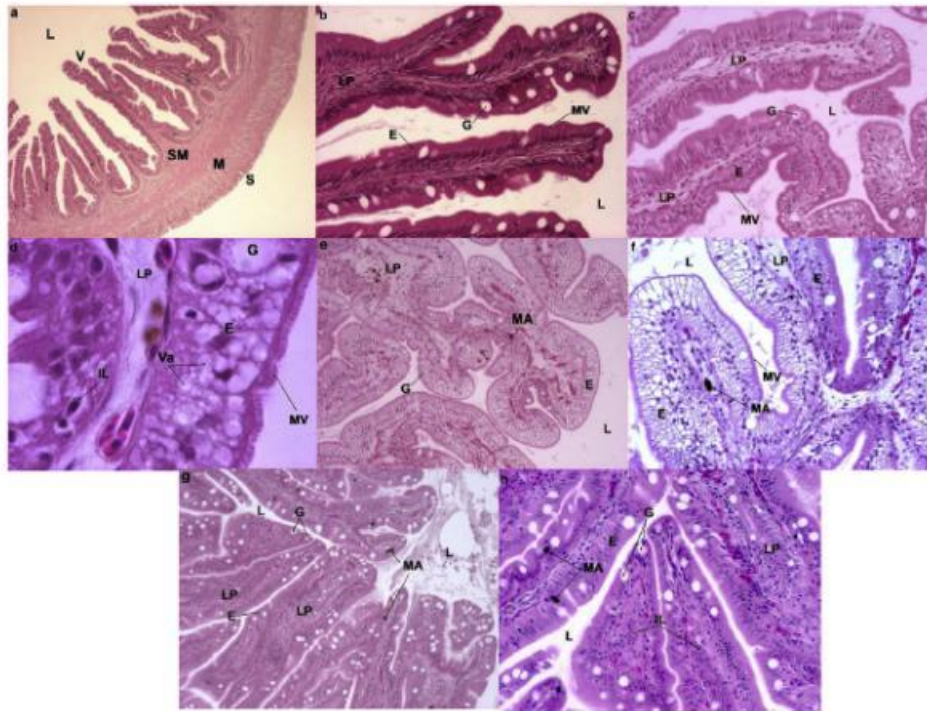


Fig. 4. Histopathological observations of Pacific red snapper intestine injected with control PBS (a-b), CpG ODN 1668 (c-d), CpG+Vp (e-f) and infected with *V. parahaemolyticus* (g-h) at different times of stimulation. Letters in the figure are denoted as M: mucosa epithelium, L: lumen, ML: muscular layer, SM: submucosa, LP: lamina propria, S: serosa, and G: goblet cells, MA: melanomacrophages centers, V: villi, E: epithelium, MV: microvilli, IL: intraepithelial leukocyte.

Table 3

Histological scores for intestine of *Lutjanus peru* injected with CpG ODN 1668, *Vibrio parahaemolyticus* and control treatments sampling at different times. Data represent mean \pm SD from four replicates per group (n = 6); values followed by different superscript letters in each row are significantly different (P < 0.05).

Histological observation (h)	Treatments	MH	EV	IL
24	PBS	1.43 \pm 0.06 ^a	0.63 \pm 0.52 ^a	31.0 \pm 7.54 ^a
	CpG ODN 1668	1.62 \pm 0.08 ^a	0.82 \pm 0.03 ^a	53.0 \pm 2.57 ^b
	CpG+Vp	1.38 \pm 0.57 ^a	1.17 \pm 0.01 ^a	53.5 \pm 0.70 ^b
	Vp	1.69 \pm 0.75 ^a	1.30 \pm 0.10 ^a	38.6 \pm 8.10 ^a
72	PBS	1.91 \pm 0.66 ^a	0.60 \pm 0.10 ^a	52.0 \pm 2.80 ^a
	CpG ODN 1668	1.66 \pm 0.66 ^a	6.93 \pm 1.59 ^b	53.5 \pm 4.94 ^a
	CpG+Vp	1.70 \pm 0.95 ^a	36.0 \pm 1.41 ^d	62.0 \pm 1.40 ^b
	Vp	1.16 \pm 0.57 ^a	16.45 \pm 2.75 ^c	53.0 \pm 1.00 ^a
168	PBS	2.28 \pm 0.11 ^a	1.00 \pm 0.16 ^a	49.3 \pm 3.05 ^a
	CpG ODN 1668	2.71 \pm 0.10 ^a	0.80 \pm 0.10 ^a	68.5 \pm 7.77 ^b
	CpG+Vp	1.31 \pm 0.17 ^a	2.61 \pm 0.55 ^b	72.0 \pm 1.41 ^c
	Vp	2.14 \pm 0.72 ^a	33.44 \pm 2.19 ^c	74.5 \pm 2.12 ^c
240	PBS	1.68 \pm 0.15 ^a	0.60 \pm 0.10 ^a	43.0 \pm 3.60 ^a
	CpG ODN 1668	2.01 \pm 0.40 ^a	0.75 \pm 0.07 ^a	45.5 \pm 0.70 ^a
	CpG+Vp	1.60 \pm 0.07 ^a	9.85 \pm 2.12 ^c	54.3 \pm 3.21 ^c
	Vp	2.60 \pm 0.02 ^a	4.46 \pm 0.04 ^b	56.5 \pm 4.94 ^b

MH: Microvilli height (mm).

EV: Enterocyte vacuolization (%).

IL: Intraepithelial leucocytes.

anion (O_2^-), which is a measure of respiratory burst activity, as well as hydrogen peroxide, nitric oxide, peroxydinitrite, hypochlorous acid and hydroxyl radical. All of these products are highly microbicidal (Secombes, 1996). In this work, myeloperoxidase activity, involved in hypochlorous acid production, was significantly increased in serum of CpG ODN 1668 fish after 168 h of stimulation. Cuesta et al. (2008) observed that injection of CpG ODN 1668 in gilthead seabream significantly increased peroxidase activity with dependent

variations of the sampling time. In addition, the main enzymes involved in reactive oxygen species detoxification (SOD, CAT and glutathione peroxidase) are abundant in fish tissues (Di Giulio et al., 1993). In this study, SOD and CAT activities were found significantly increased when Pacific red snapper was stimulated with CpG ODN 1668. As immunomodulators, CpG ODNs may enhance phagocytic activity and increase the production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages that are consequently detoxified in part by

antioxidant enzymes (Tassakka and Sakai, 2003; Carrington and Secombes, 2007; Liu et al., 2010). The present results are in agreement with that of Harikrishnan et al. (2012) where CpG ODN significantly increased the SOD activity in *Epinephelus bruneus*. Here, we observed that CAT activity, also involved in ROS elimination, was higher in CpG ODN group than the rest of the groups. Similarly, Sun et al. (2013) reported that CpG ODNs employed as supplements in diets enhanced CAT activity and survival rate of crab *Eriocheir sinensis* against the invasion of bacteria *Aeromonas hydrophila*. Taken all together, humoral parameters in Pacific red snapper and in other species were affected by CpG ODN stimulation and suggest that they can be related with CpG immunostimulatory properties to combat bacterial infections in aquatic animals.

The recognition of CpG motifs by the innate immune system requires engagement of Toll-like receptor 9, which induces cell signaling and thereafter mediates the induction of cell signaling pathways (Akira and Takeda, 2004). In teleost, administration of CpG ODNs have been found to increase TLR9 expression in Atlantic salmon (Skjæveland et al., 2008), seabream (Cuesta et al., 2008), zebrafish (Yeh et al., 2013) and cobia (Byadgi et al., 2014).

In the present work, TLR9 gene considered to be important and representative was selected to test the effect of CpG ODN 1668 on gene expression in three organs: head-kidney (the main haematopoietic organ in fish), intestine (considered to be one of the main entry surfaces for infection and host-pathogen interactions) and skin (constitutes a very large area for the possible microbial invasion). To examine the effect of CpG ODN 1668, Pacific red snapper was immunostimulated with or without *V. parahaemolyticus* infection, and the expression of TLR9 was examined by qRT-PCR at 24, 72, 168 and 240 h.

Interestingly, head-kidney and intestine TLR9 gene expressions have similar behavior throughout the sampling times. The results showed that fish treated with CpG ODN 1668 alone or after infection (CpG+Vp), TLR9 gene expression was enhanced for a long time; however, TLR9 gene expression was lowest and constant during the experimental study in fish only injected with *V. parahaemolyticus*. Hence, these CpG motifs can serve as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of vertebrate immune system (Liu et al., 2010). In addition, the increased in TLR9 mRNA after bacterial challenge may be due to up-regulation of gene expression as well as proliferation and recruitment of TLR9-expressing cells in the tissues. To date several CpG ODNs with immunopotentiating properties have been identified for a number of farming fish species including gilthead seabream (Cuesta et al., 2008), olive flounder (Lee and Kim, 2009; Kang and Kim, 2015), cobia (Byadgi et al., 2014), and tilapia (Kwon and Kang, 2016). However, it is largely unclear whether the immune effects of these CpG ODNs are species-specific. Although the expression of TLR9 also varied with time and type of ODNs, in this work, head-kidney shows a high expression compared with skin using ODN 1668. Likely, maximum TLR9 transcript level using this CpG ODN has been found in peripheral blood leukocytes, gill, spleen and head-kidney, with lower expression in brain, gut, liver and thymus, and undetected in skin of gilthead seabream (Cuesta et al., 2008).

In mammals and fish, B cells are the principal immunoglobulin producers. In fish, the IgM expression levels can be related to recruitment of B cells, upregulation of the B cell receptor (membrane IgM) associated with increased phagocytic activity, and/or from activation of B cells leading enhanced secretory IgM expression (Coscia et al., 2014; Gao et al., 2014). Interesting, CpG-B ODNs primarily stimulate proliferation of B cells as well as secretion of Igs, IL-6, and IL-10 (Verthelyi and Zeuner, 2003; Hartmann et al., 2003). In this study, we quantify the IgM gene expression after stimulation with CpG ODN 1668 and infection with *V. parahaemolyticus* at

different times. The IgM expression levels were increased in Pacific red snapper by CpG ODN 1668 treatment, which suggests that this CpG might evoke B cell-mediated responses against bacterial pathogens. On this regard, the mechanisms involved after immune stimulation could be due to either recruitment/proliferation of B cells or from the plasma cells induced secretory IgM gene expression (Saha et al., 2005; Liu et al., 2010; Byadgi et al., 2014). Therefore, IgM transcripts at each tissue may provide an indication of the potential functional role by any antigenic stimulation such as immunostimulatory CpG ODNs (Salinas, 2015; Hordvik, 2015). On this regard, Yi et al. (1996, 1998) show that CpG-B ODNs protect B cells and dendritic cells against spontaneous apoptosis and have been shown to rescue WEHI-231 B cells from apoptosis. Recently, Byadgi et al. (2014) evaluated IgM gene expression using CpG-B ODN 2006 stimulation and observed a significant high fold change in spleen and liver of cobia. Similar results in IgM expression were observed in turbot stimulated with CpG motif of ODN 205, which were related with antibacterial immune responses against *Vibrio harveyi* infection (Liu et al., 2010). It is important to note that the particular type and amount of CpG ODN required to elicit immune responses does vary among species to be successful in inducing specific antibody production in fish (Carrington et al., 2004).

At the end of the experiment, the anterior intestine morphology was analyzed under light microscope, evaluating CpG ODN 1668 influence on gut integrity, villi length, enterocyte vacuolization and intraepithelial leukocytes. Briefly, microvilli height parameter was not affected significantly by any treatments; however a higher percentage of vacuolization and intraepithelial leukocytes were observed during CpG ODN 1668 or CpG+Vp treatments after 72 h of stimulation, suggesting that i.p. injection of CpG ODN 1668 may promote leucocyte recruitment in intestine. Finally, we observed major melanomacrophages centers and lamina propria dilation only in the intestine of fish infected with *V. parahaemolyticus*, which has been related with antigen trapping and presentation to lymphocytes during vibriosis in fish (Brattgjerd and Evensen, 1996; Agius and Roberts, 2003). There is scarce information in literature about CpG ODNs effects on intestinal morphology. The presence of vacuoles inside the enterocytes is normal in the process of digestion, absorption, and transport of lipids, but an excessive accumulation may result in functional alterations of the enterocytes (Olsen et al., 2000). Fish gut associated lymphoid tissue (GALT) comprises intraepithelial leukocytes (IL) scattered throughout the mucosa that kill infected cells and attract other immune cells (Isolaure et al., 2001). IL are mainly T lymphocytes, and increase in IL populations play crucial role in the maintenance of oral tolerance, intestinal inflammation processes and protection against pathogens (Watzl et al., 2007; Urán et al., 2008). Similar to our results, Byadgi et al. (2014) observed that 10 µg CpG ODNs added to the vaccine formulation did not cause undesired side effects, such as lamina propria dilation and epithelial cell necrosis, at the site of injection as indicated by the histological observation. The above mentioned suggest the biosafety of CpG ODNs and particularly CpG ODN 1668 as a potential immunostimulant in the Pacific red snapper aquaculture.

In conclusion, CpG ODN 1668 significantly triggered immune response, resulted in higher levels of antioxidant activity (anti-protease, SOD and CAT activities). Results revealed that the expressions of TLR9 and IgM genes were up-regulated during CpG ODN 1668 treatments and increased during *V. parahaemolyticus* infection. No signs of tissue damage and overwhelming inflammatory responses were observed at the site of injection with CpG ODN 1668. Application of CpG ODNs may be used to increase disease resistance indicating the potential use of CpG ODN 1668 against diseases in Pacific red snapper.

Acknowledgments

We thank IBQ, Erika Alamillo Mendoza for their molecular technical support and Ms Pablo Monsalvo and Gabriel Robles Villegas for technical support with fish. The project was funded under CONACYT grants: INFR-2014-01/225924 and PDCPN2014-01/248033.

Reference

- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish. Dis.* 26, 499–509.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Aldridge, K.E., Schiro, D.D., 1994. Anaerobic susceptibility testing. Slight differences in inoculum size can make a difference in minimum inhibitory concentrations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 191–195.
- Atamanalp, M., Yanik, T., 2003. Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 27, 1213–1217.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brattgjerd, S., Evensen, O., 1996. A sequential light microscopic and ultra structural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.). *Vet. Path.* 33, 55–65.
- Bruno, D.W., Hastings, T.S., Ellis, A.E., 1986. Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 1, 163–168.
- Byadgi, O., Puteri, D., Lee, J.W., Chang, T.C., Lee, Y.H., Chu, C.Y., Cheng, T.C., 2014. The effect of TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotides on the intestinal immune response of cobia (*Rachycentron canadum*). *J. Immunol. Res.* 2014, 273284.
- Carrington, A.C., Collet, B., Holland, J.W., Secombes, C.J., 2004. CpG oligodeoxynucleotides stimulate immune cell proliferation but not specific antibody production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101, 211–222.
- Carrington, A.C., Secombes, C.J., 2007. CpG oligodeoxynucleotides up-regulate antibacterial systems and induce protection against bacterial challenge in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Shellfish Immunol.* 23, 781–792.
- Chase, J.H., Hooker, N.A., Mildenstein, K.L., Krieg, A.M., Cowdery, J.S., 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN- γ production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84, 185–193.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, 1985. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Coscia, R.M., Simoniello, P., Giacomelli, S., Oreste, U., Motta, C.M., 2014. Investigation of immunoglobulins in skin of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. *Fish. Shellfish Immunol.* 39, 206–214.
- Cuesta, A., Salinas, I., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2008. Unmethylated CpG motifs mimicking bacterial DNA triggers the local and systemic innate immune parameters and expression of immune-relevant genes in gilthead seabream. *Fish. Shellfish Immunol.* 25, 617–624.
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1–22.
- Drury, R.A., Wallington, E.A., Cannon, R., 1976. *Carlton's Histopathological Techniques*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, London, New York.
- Ellis, A.E., 1990. Serum antiproteases in fish and lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven NJ, pp. 95–103.
- Fouz, B., Novoa, B., Toranzo, A.E., Figuras, A., 1995. Histopathological lesions caused by *Vibrio damsela* in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): inoculations with live cells and extracellular products. *J. Fish Dis.* 18, 357–364.
- Gao, Y., Yi, Y., Wu, H., Wang, Q., Qu, J., Zhang, Y., 2014. Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot. *Fish. Shellfish Immunol.* 40, 354–361.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S., 2012. Poly d,l-lactide-co-glycolic acid-liposome encapsulated ODN on innate immunity in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 147, 77–85.
- Hartmann, G., Battiany, J., Poock, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S., Endres, S., 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- γ induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 1633–1641.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., et al., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Hordvik, I., 2015. Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo Salar*. *Bio-molecules* 5, 166–177.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S., 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 444S–50S.
- Kang, Y.J., Kim, K.H., 2015. Immunotherapy with doxycycline and CpG-ODN 1668 for treatment of scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 435, 143–145.
- Kang, Y.J., Kim, K.H., 2012. Effect of CpG-ODNs belonging to different classes on resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and *Miamiensis avidus* (Ciliata: Scuticociliatia) infections. *Aquaculture* 324–325, 39–43.
- Krieg, A.M., Hartmann, G., Yi, A.K., 2000. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 247, 1–21.
- Krieg, A.M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549.
- Krieg, A.M., 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709–760.
- Krieg, A.M., 2006. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471–484.
- Kwon, H.C., Kang, Y.J., 2016. Effects of a subunit vaccine (FlA) and immunostimulant (CpG-ODN 1668) against *Vibrio anguillarum* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 454, 125–129.
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A.E., Anadón, R., 1994. A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Pathol.* 29, 79–89.
- Lee, C.H., Jeong, H.D., Chung, J.K., Lee, H.H., Kim, K.H., 2003. CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*. *Dis. Aquat. Org.* 56, 43–48.
- Lee, E.H., Kim, K.H., 2009. CpG-ODN increases resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Phikasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatia) infection. *Fish. Shellfish Immunol.* 26, 29–32.
- Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H., Heeg, K., 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.* 27, 2340–2344.
- Liu, C.-s., Sun, Y., Hu, Y.-h., Sun, L., 2010. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine* 28, 4153–4161.
- Mohapatra, C., Patra, S.K., Panda, R.P., Mohanta, R., Saha, A., Saha, J.N., et al., 2014. Gene structure and identification of minimal promoter of Pou2 expressed in spermatogonial cells of rohu carp *Labeo rohita*. *Mol. Biol. Rep.* 41, 4123–4132.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringe, E., Mayhew, T., 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish. Physiol. Biochem.* 22, 207–216.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29–45.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248.
- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Ascencio, F., 2015. Humoral immune response and TLR9 gene expression in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) experimentally exposed to *Aeromonas veronii*. *Fish. Shellfish Immunol.* 42, 289–296.
- Salinas, I., 2015. The mucosal immune system of teleost fish. *Biology* 4, 525–539.
- Saha, N.R., Suetake, H., Suzuki, Y., 2005. Analysis and characterization of the expression of the secretory and membrane forms of IgM heavy chains in the pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Mol. Immunol.* 42, 113–124.
- Scheiermann, J., Klinman, D.M., 2014. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* 32, 6377–6389.
- Secombes, C.J., 1996. The non-specific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 63–103.
- Skjæveland, I., Iliev, D.B., Zou, J., Jørgensen, T., Jørgensen, J.B., 2008. A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN- γ in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Comp. Immunol.* 32, 603–607.
- Stacey, K.J., Sweet, M.J., Hume, D.A., 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 2116–2122.
- Sun, R., Yue, F., Qiu, L., Zhang, Y., Wang, L., Zhou, Z., Zhang, H., Yi, Q., Song, L., 2013. The CpG ODNs enriched diets enhance the immuno-protection efficiency and growth rate of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish. Shellfish Immunol.* 35, 154–160.
- Tassakia, A.C.M.A.R., Sakai, M., 2003. The in vitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 220, 27–36.
- Uhlmann, E., Vollmer, J., 2003. Recent advances in the development of immunostimulatory oligonucleotides. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 6, 204–217.
- Urán, P.A., Gonçalves, A.A., Taverne-Thiele, J.J., Schrama, J.W., Verreth, J., Rombout, J.H.W.M., 2008. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish. Shellfish Immunol.* 25, 751–760.
- Verthelyi, D., Zeuner, R.A., 2003. Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends Immunol.* 24, 519–522.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Thuk, S., Liu, M., Davis, H.L., Krieg, A.M., 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* 34, 251–262.
- Watzl, B., Gierbach, S., Röller, M., 2007. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *Br. J. Nutr.* 98, 49–55.
- Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K., van Muiswinkel, W.B., 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparable approach. *Dev. Comp.*

- Immunol. 20, 365–381.
- Yeh, D.W., Liu, Y.L., Lo, Y.C., Yuh, C.H., Yu, G.Y., Lo, J.F., Luo, Y., Xiang, R., Chuang, T.H., 2013. Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 17, 20711–20716.
- Yi, A.K., Chang, M., Peckham, D.W., Krieg, A.M., Ashman, R.E., 1998. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.* 160, 5898–5906.
- Yi, A.K., Hornbeck, P., Lafrenz, D.E., Krieg, A.M., 1996. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of *c-myc* and *bcl-xL*. *J. Immunol.* 157, 4918–4925.
- Zhang, Q., Dong, X., Chen, B., Zhang, Y., Zu, Y., Li, W., 2016. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Dev. Comp. Immunol.* 55, 159–168.
- Zhou, Z-x., Zhang, J., Sun, L., 2014. C7: A CpG oligodeoxynucleotide that induces protective immune response against megalocytivirus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) via toll-like receptor 9-mediated signaling pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 124–132.

3.2. Immunostimulatory properties of marine and lichen fungal glucans in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells

Tomás Cárdenas-Reyna^b, Carlos Angulo^a, Crystal Guluarte^a, Sawako Hori-Oshima^b, Martha Reyes-Becerril^{a*}.

^aImmunology & Vaccinology Group. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz B.C.S. 23090, México

^bInstituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera San Felipe Km. 3.5, Fraccionamiento Laguna Campestre, Mexicali, Baja California 21386, México

*Corresponding authors: mreyes04@cibnor.mx (M. Reyes)

Artículo publicado en la revista *Developmental and Comparative Immunology*.



In vitro immunostimulatory potential of fungal β -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells



Tomás Cárdenas-Reyna^b, Carlos Angulo^a, Crystal Guluarte^a, Sawako Hori-Oshima^b, Martha Reyes-Becerril^{a,*}

^a Immunology & Vaccinology Group, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS 23090, Mexico

^b Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera San Felipe Km. 3.5, Fraccionamiento Laguna Campestre, Mexicali, Baja California 21386, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2017
Received in revised form
5 September 2017
Accepted 5 September 2017
Available online 6 September 2017

Keywords:

Fungal β -glucans
Immune response
Gene expression
Leukocytes
Pacific red snapper

ABSTRACT

This study attempts to describe the immunostimulatory effects of three fungal glucans on innate immunity responses in an *in vitro* assays using Pacific red snapper leukocytes. First, the yield glucans obtained was higher in *Aspergillus niger*, followed by *Aspergillus ochraceus* and *Alternaria botrytis* (40, 20 and 10%, respectively). Structural characterization of these fungal glucans by proton nuclear magnetic resonance (NMR) indicated structures containing (1–6)-branched (1–3)- β -D-glucan. The immunostimulatory activity of fungal glucans were assessed in head-kidney leukocytes at 24 h using colorimetric assays and molecular gene expression. In addition, the response against bacterial infection using *Aeromonas hydrophila* was evaluated by flow cytometry with annexin V/propidium iodide. Leukocytes responded positively to fungal glucans where the viability was higher than 80%. Interestingly, *A. niger* β -glucans enhanced the phagocytic ability and capacity in head-kidney leukocytes. Immunological assays revealed an increased in nitric oxide production, myeloperoxidase, superoxide dismutase and catalase activities, in fish stimulated with *A. niger* β -glucans. Induction of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-12) were more pronounced in *A. niger* β -glucans leukocytes stimulated compared to other group. Finally, flow cytometry assay showed that *A. botrytis* and *A. niger* β -glucans were able to inhibit apoptosis caused by *Aeromonas hydrophila* in the Pacific red snapper leukocytes indicating an immunostimulant potent response by fungi derived-glucans. These results strongly support the idea that fungal β -glucans can stimulate the immune mechanism in head-kidney leukocytes and that *Aspergillus niger* β -glucan possess immunostimulatory properties cell increasing viability, and reducing necrotic cell death caused by *Aeromonas hydrophila*.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hostile environments host a huge biodiversity of microorganisms, and fungi make up a large part of them: they show a high biodiversity, a specific habitat composition and seem to be important from both ecological and biotechnological points of view. Marine fungi encompass a wide range of saprotrophs, parasites, symbionts, endophytes and epiphytes (Panno et al., 2013). They can be found in all marine habitats including planktonic communities, marine plants (i.e. algae, seagrasses, driftwood), marine

invertebrates (sponges, coral, ascidians, bivalves, crustaceans, etc.), vertebrates (mainly fishes) and lichen (Shivanna and Garampalli, 2014, 2015).

Lichens hold potential medicinal value because they produce unique secondary metabolites which are not found in other plant resources (Babiah et al., 2014). Fungi-derived natural products have been an excellent source of pharmaceuticals (Evidente et al., 2014). The polysaccharide β -D-glucans are components that are found in some macrofungi (such as mushrooms), and unicellular fungi such as yeast (baker's yeast and *Candida albicans*) (Samuelsen et al., 2014). β -Glucans are not synthesized by mammals, so these compounds are recognized by our immune systems as non-self-molecules, inducing both innate and adaptive immune responses (Brown and Gordon, 2005). Therefore, the feed additive β -glucan is

* Corresponding author.

E-mail address: mreyes04@cibnor.mx (M. Reyes-Becerril).

well known for its immunomodulatory effects and its ability of increasing immune protection against pathogens (Dalmo and Bøgvold, 2008).

β -glucans are a heterogeneous group of glucose polymers, they consist of linear $\beta(1 \rightarrow 3)$ -linked backbones with $\beta(1 \rightarrow 6)$ -linked side chains of varying length and distribution, and can form complex tertiary structures stabilized by interchain hydrogen bonds (Brown and Gordon, 2005). Fungal β -glucans are recognized as potent immunological stimulators in humans and these β -glucans appear to possess potential for treating several diseases (Chen and Seviour, 2007). It can directly activate leukocytes, and further stimulate their phagocytic, cytotoxic, and antimicrobial activities (Du et al., 2015). For example, in Japan, lentinan is approved for clinical treatment of gastric and colorectal cancers, and encouraging survival rates have been reported (Nakano et al., 1999; Munemoto et al., 2002). Investigations of Pillai et al. (2014) reveal that β -glucans from *Ganoderma lucidum* protect from radiation induced DNA damage in human lymphocytes. In fish, yeast β -glucans can be a potential immunostimulant with clear effects, in particular, on innate immunity (Gopalakannan and Arul, 2010; Huu et al., 2016; Jiang et al., 2016; Dawood et al., 2017). However, the basic knowledge on immunostimulant properties of fungus-derived glucans in aquaculture is still scarce. The interest of researchers in fungi as natural sources of active compounds has noticeably increased during the past decade and particular attentions have been paid to the polysaccharide components.

Taken into account all these previous considerations, in the present work we isolated and characterized fungus glucans and evaluated the immunostimulant potential in Pacific red snapper leukocytes. First, we analyzed the immunological properties such as phagocytosis, antioxidant immune response and gene expression of immune-related genes and the known mechanisms underlying their biological effects; and second, we evaluated the immune response of leukocytes stimulated with glucans after infection with *Aeromonas hydrophila* in order to better understand their potential roles against bacterial infections in Pacific red snapper, an important farmed marine fish in Mexico. Finally, in this study, we suggest why structurally different fungal β -glucans may have different efficiencies of action, and how they might be better applied clinically, safely and effectively in finfish aquaculture.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification of lichen fungi

Three fungal strains were isolated from lichen on the Pacific coast of Mexico's Baja California Peninsula. Fungi biomass was prepared using swab inoculation on Yeast Molt broth (15 g; YMB, 15 g; Artificial sea salt, 24.4 g; Chloramphenicol, 0.2 g; pH 7.4 to 7.8 adjusted with NaOH/HCl; distilled water, fill up to 1000 ml). Cultures were kept at 20 °C under daylight. The harvested biomass was separated by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C in a refrigerated centrifuge (Beckman, USA) and dried at -80 °C for 24 h. The molecular identification of fungal strains was carried out by obtaining the region ITS1-5.8s-ITS2 of rDNA, using the primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990). DNA samples were obtained from the mycelial mass using the method described by Raeder and Broda (1985). PCR amplifications were performed with a thermocycler (Thermal Cycler 170–9701 Bio-Rad) using the protocol described by Ochoa et al. (2007). The products obtained were sequenced by GENEWIZ, Inc., and the molecular identity was obtained by multiple alignment analysis using Blast tool in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2. Fungal glucan extraction

Glucan was extracted from the dried fungi biomass following the method of Williams et al. (1991) with slight modifications. Briefly, 2 g dried biomass suspended in 40 ml of 3% NaOH was maintained at 100 °C for 3 h in a water bath and was kept at room temperature over-night. The suspension was centrifuged at 8000 rpm for 15 min to collect the insoluble residue. Then, the residue was resuspended in 3% NaOH and the procedure was repeated (2 \times). The residue was extracted using 0.5 N acetic acid at 75 °C for 6 h and separated by centrifugation. The insoluble fraction was resuspended in ethanol, boiled and centrifuged at 8000 rpm to collect the residue and the procedure was repeated (3 \times). Finally, the residue was thoroughly washed with distilled water and dried in vacuum at -80 °C for 48 h and the final product (glucan) was used for the study. Glucan was diluted to 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS and stored in small aliquots frozen at -80 °C.

2.3. Structural characterization of the cell wall glucan

Spectral data were collected on a Bruker Avance 600 Mhz spectrometer using a $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 715N cryoprobe operating at 345 K (72 °C). 10–25 mg of the glucan was dissolved in 1 ml of DMSO- d_6 at 80 °C. A few drops of trifluoroacetic acid- d (99.8% deuterated, Cambridge Isotope Laboratories) were added to the solution to shift the water and hydroxyl proton resonances downfield. NMR chemical shifts were referenced to the residual DMSO- d_6 multiplet proton resonance at 2.50 ppm. The NMR spectral collection and processing parameters were the following: 25 ppm spectral width centered at 5.0 ppm, 32,768 data points, 15 s relaxation delay, 32 scans, and 0.2 Hz exponential apodization. Interpretation of spectra of the anomeric protons of the β -1,3- and β -1,4-linkages were determined by integration of the spectral regions 4.85–4.70 ppm and 4.62–4.45 ppm, respectively, using different references (Dinadayala et al., 2004; Ruthes et al., 2013; Synytsya and Novak, 2014). NMR was used as fast and reliable diagnostic technique to quantify the polysaccharides of interest.

2.4. *Aeromonas hydrophila*

Pathogenic *A. hydrophila* strain Ah-315 (Reyes-Becerril et al., 2014) was isolated from skin of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) during an experimental infection and maintained at the Laboratory of Microbial Pathogenesis of the Center of Biological Investigation of Northwest (CIBNOR), La Paz, B. C. S., Mexico. Just before the experimental *in vitro* challenge in Pacific red snapper leukocytes, some bacteria were reactivated and cultured on Luria-Bertani, L3152 (LB, SIGMA) agar plates for 24 h at 30 °C. Biomass was recovered from plates and resuspended in 10 ml of phosphate buffered saline (PBS 7.4). The bacterial cells were then collected by centrifugation (2000 rpm, 10 min) and washed three times with PBS. The pellet obtained was suspended in PBS at a concentration of 1×10^8 cells ml^{-1} for the *in vitro* assay.

2.5. Fish and sampling

Twelve Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) (100 \pm 20 g mean body weight) were obtained from hatched eggs and reared to the juvenile stage in the larviculture laboratory at CIBNOR according to Gracia et al. (2004). The animals were fed with a commercial pellet diet (Skretting, Canada) at a rate of 1% bw day^{-1} . A quarantine period of fifteen days before the start of the study was applied to ensure that the fish had no symptoms of disease. Water quality was monitored weekly and water temperature was maintained at 26 °C (with a 12 h dark/12 h light photoperiod), dissolved oxygen at

4.3–6.9 mg l⁻¹ and the pH at 7.7–8.1. Total ammonia and nitrite concentration remained below 0.02 mg l⁻¹. The Bioethical Committee of the CIBNOR approved the studies described in this manuscript. For the *in vitro* study, fish were anaesthetized with eugenol (50 mg l⁻¹). After bleeding, the head-kidney leukocytes were isolated from each fish under sterile conditions. Briefly, tissues were removed and passed through 100 µm cell strainers (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) in sRPMI [RPMI-1640 culture medium (Gibco) with 0.35% sodium chloride, 100 IU ml⁻¹ penicillin (Flow), 100 mg ml⁻¹ streptomycin (Flow), 10 IU ml⁻¹ heparin (Sigma), and 5% fetal bovine serum (Gibco)]. The volume of the cell suspension was adjusted to 2 ml. All samples were carefully layered over 51% Percoll gradient (Sigma-Aldrich, USA) and centrifuged at 500 g for 45 min at 23 °C without brake. The leukocyte layer was collected, and washed with sRPMI medium by centrifuging at 800 g for 10 min at 23 °C. Head-kidney leukocytes were observed and counted with a TC20 Coulter Particle Counter (BioRad, Hercules, CA, USA) and adjusted to 10⁶ cells ml⁻¹ of sRPMI. A drop of leukocyte suspension was stained with trypan blue (Sigma, Cat. T-8154) to calculate viability, and leukocyte suspension with a viability of more than 95% was used for *in vitro* experiment (Reyes-Becerril et al., 2016).

2.6. Stimulation test of head-kidney leukocytes

Head-kidney leukocytes were dispensed into wells of flat-bottomed 24-well (Nunc) containing 1 × 10⁶ cells ml⁻¹ by well. Afterward, leukocytes were stimulated with 20 µl of fungal glucan (200 µg ml⁻¹) for 24 h at 25 °C, with 85% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere. As a positive control, leukocytes by triplicate were incubated with zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA, Z4250, 50 µg/ml) and as a negative control we used leukocytes incubated with PBS. Leukocytes were collected at 24 h post-incubation with glucans. For gene expression, stimulated-leukocytes were centrifuged at 11,000 g at 10 °C for 1 min, supernatant was discarded and cells were resuspended in one ml Trizol reagent (Invitrogen, USA), mixed well by vortexing for 1 min, and stored at -80 °C for RNA extraction. In parallel per treatment, 500 µl of leukocytes were taken for triplicate. Samples were filtered and placed in 5 ml tubes (Falcon, Becton Dickinson) for flow cytometry analysis in S3e Cell Sorter (Bio-Rad). Finally for immunological assay leukocytes were dispensed into 96-well microtitre plates (Nunc) by triplicate for nitric oxide, mieloperoxidase, SOD and CAT activities (100, 10, 20 and 50 µl, respectively).

For infection test, 1 mL of head-kidney leukocytes were dispensed into wells of flat-bottomed 24-well containing 1 × 10⁶ cells ml⁻¹ by well. Afterward, leukocytes were incubated with glucans (200 mg ml⁻¹). Eight hours later, *A. hydrophila* was added (5 µl; 1 × 10⁸ cells ml⁻¹) and incubated for 16 h. Before using flow cytometry, head-kidney leukocytes were passed through a cell strainer (40 mmmesh size, BD Bioscience) and apoptosis was analyzed (see section 2.8.5).

2.7. Cell viability

Resazurin is a cell permeable redox indicator that can be used to monitor viable cell number (Borra et al., 2009). Viable cells with active metabolism can reduce resazurin into the resorufin product which is pink and fluorescent. Leukocytes were plated in 96-well plates at 1.0 × 10⁶ cells well⁻¹ plus 20 µl well⁻¹ of glucans and water (control) and cultured overnight. To measure viability, resazurin (Resazurin sodium salt, Sigma, Cat: R7017) was dissolve in DPBS (pH 7.4) to 0.15 mg/ml. After exposure, cells were stained with resazurin for 4 h at 26 °C and 5% CO₂. Viability was measured when the medium in control wells turned from blue to pink. Resazurin

fluorescence was measured in a Millipore CytoFluor 2300 automated plate-reading fluorometer, with excitation at 530 nm and emission at 590 nm.

2.8. Immunological assays

2.8.1. Phagocytosis

The phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by Pacific red snapper leukocytes stimulated at 24 h was also studied by flow cytometry (Rodrigues et al., 2003). Briefly, to label the yeast cells with fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma), they were stirred in a plate shaker (IUL) at 40 cycles/min and incubated with 5 mg/ml FITC at 22 °C, in the dark, for 15 min. After the yeast cells were labelled, free FITC was removed by washing the cells twice in PBS and adjusted to 5 × 10⁷ cells ml⁻¹ of sRPMI and used for flow cytometric study. Leukocytes were washed and 60 µl of labelled-yeast cells added, mixed, centrifuged (400 g, 5 min, 22 °C), resuspended and incubated at 22 °C for 30 min. At the end of the incubation time, samples were placed on ice to stop phagocytosis and 400 ml ice-cold phosphate buffered saline (PBS) was added to each sample. The fluorescence of the extracellular yeast cells was quenched by adding 40 µl ice-cold trypan blue (0.4% in PBS). Standard samples of FITC-labelled *S. cerevisiae* or leukocytes were included in each phagocytosis assay. All samples were analyzed in a flow cytometer set to analyze the phagocytic cells, showing highest FSC and moderate SSC. Phagocytic ability was defined as the percentage of cells with one or more ingested yeast (green-FITC fluorescent cells) within the phagocytic cell population whilst the phagocytic capacity was the mean fluorescence intensity. Trypan blue (0.04%) was used as a quenching agent to differentiate between membrane attachment and ingestion of yeast.

2.8.2. Nitric oxide (NO) production assay

The nitric oxide (NO) production in the leukocytes was determined according to Neumann et al. (1995). Head-kidney leukocytes were used for the determination of extracellular NO production based on Griess reagent that quantifies the nitrite content of the leukocytes supernatants, since NO is an unstable molecule and degrades to nitrite and nitrate. Briefly, 100 µl of leukocytes was incubated with an equal volume of Griess reagent in 96-well plate and mixed properly followed by 15 min incubation at room temperature in dark. Reduced nitrite was measured by taking OD at 562 nm in a microplate reader.

2.8.3. Myeloperoxidase activity

Total myeloperoxidase (MPO) activity in head-kidney leukocytes was measured according to Quade and Roth (1997) with slight modifications. Thus, 10 µl of leukocytes was incubated with 35 µl of 20 mM 3, 3', 5', 5'- tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB) (Genei, India) and 5 mM H₂O₂. Both reagents are substrates of MPO and they were prepared on the same day. The colorimetric reaction was stopped after 2 min by adding 35 µl of 4 M sulphuric acid (H₂SO₄). The optical density (OD) was read at 450 nm in a microplate reader.

2.8.4. Superoxide dismutase and catalase assays

SOD activity was measured in head-kidney leukocytes by the percentage reaction inhibition rate of enzyme with WST-1 (water-soluble tetrazolium dye) substrate and xanthine oxidase using a SOD Assay Kit (Sigma, 19160) according to the manufacturer's instructions. Each endpoint assay was monitored at 450 nm, which is the absorbance wavelength for the colored product of the WST-1 reaction with superoxide. Lectures were conducted after 20 min of reaction time at 37 °C. Percent inhibition was normalized by mg protein and presented as SOD activity units.

Catalase (CAT) activity was assayed by the method of Clairborne (1985), following the decrease in absorbance of H₂O₂ at 240 nm. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to degrade 1 mmol of H₂O₂ in 1 min.

2.8.5. Assessment of apoptotic and necrotic cells caused by *Aeromonas hydrophila*

Evaluation of apoptosis in head-kidney leukocytes was performed using the APC annexin V and propidium iodide (PI) staining assay described by Muñoz-Atienza et al. (2015). At 24 h after immunostimulation and exposition with *A. hydrophila*, head-kidney leukocytes were washed with ice-cold culture medium and stained with 5 µl of APC annexin V (Biolegend, Cat. 640920, 5 mg/ml) and 3 µl PI (Sigma Aldrich Corporation, Cat. P4864, PI was added to a final concentration of 0.5 mg/ml). After incubation at room temperature for 15 min in the dark, cells were analyzed using the S3e Cell Sorter (BioRad). Annexin V-FITC and PI were detected using green (FL1) and red fluorescence (FL3) detectors, respectively. Approximately 10,000 counts were made for each sample. Flow cytometry results were expressed as percentages of viable (annexin V⁻/PI⁻), early apoptotic (annexin⁺/PI⁻) and necrotic (or late apoptotic) (annexin⁺/PI⁺) leukocytes.

2.9. Analysis of gene expression

Relative gene expression was analyzed in six fish per treatment using real-time PCR and the 2^{-ΔΔCT} method (Livak and Schmittgen, 2001). Total RNA was extracted from leukocyte pellets with TRIzol reagent (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. Samples were treated with Amplification grade DNase I (1 U/mg RNA, Life Technologies). The SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Life Technologies) was used to synthesize first-strand cDNA with oligo-dT (18) primer from 1 µg total RNA at 50 °C for 50 min. Real-time PCR was conducted to analyze pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 (CXCL8) and IL-12 (subunit p40) mRNA expression patterns (Supplementary Table 1). Each treatment featuring different stimulants was performed at least three times in parallel (three replicate wells of the same culture). Quantitative PCR was performed with a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad, using Ssofast™ EVAGreen® Super Mix. The reaction mixtures were incubated for 30 s at 98 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 98 °C, 10 s at 60 °C, and finally at 65–95 °C (In 0.5 °C Inc) for the melt curve. The specificity of the real-time PCR product was analyzed by a dissociation curve performed after amplification, a single peak being observed at the expected melting temperature (T_m). To maintain consistency, the baseline was set automatically by the software. RNA templates were included as negative controls for each sample to rule out the possibility of genomic DNA contamination. The relative mRNA expression level of the target gene was normalized to the most stable house-keeping gene elongation factor-1 alpha (EF1-α) (Mohapatra et al., 2014). The relative expression of the target gene in the immunostimulant groups vs. the control group was calculated by Pfaffl equation (Pfaffl, 2001). Data for real-time PCR are expressed as fold increase (mean ± standard deviation, SD), obtained by dividing each sample value by the mean of unstimulated control value at the sampling time. Values higher than one in a parameter express an increase while values lower than one express a decrease in a parameter.

2.10. Statistical analysis

All measurements were performed in triplicate, and the mean ± standard deviation (SD) for each group and sampled time were calculated. A one-way ANOVA was performed to determine

the effects of lichen fungal glucans on immune response parameters using SPSS v.19.0 software (SPSS, Richmond, VA, USA). Means were separated by a Tukey multiple range test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Molecular identification of lichen fungus isolates

The molecular identification of fungal strains showed 100% identity with *Aspergillus ochraceus* (strain 183), *Alternaria botrytis* (strain 194) and *Aspergillus niger* (strain 197A).

3.2. NMR spectra and glucan yield of different fungal glucans isolates

The yield of glucan extracted from various fungus ranged from 20, 10.94 and 40.9% from *A. ochraceus*, *A. botrytis* and *A. niger*, respectively. The Proton NMR spectra of carbohydrate region of water insoluble particulate glucans from three different fungus isolates is shown in Fig. 1. The expansion of the spectral region from 4.81 ppm for *Aspergillus ochraceus*, 4.76 ppm for *Alternaria botrytis* and 4.86 ppm for *Aspergillus niger*, shows the multiple inflection points in the resonances for the anomeric proton suggesting a (1 → 3)-β-D-glucan. Three β-glucans were found to be linear. It was not our intention to study a detailed structure of the researched polysaccharides with NMR.

3.3. Viability

A. ochraceus and *A. niger* glucans no reduced significantly the viability of Pacific red snapper head-kidney leukocytes compared to untreated cells or zymosan group (viability > 87%). Curiously, *A. botrytis* glucan reduced its viability significantly at 75% compared with the other groups (Fig. 2).

3.4. Immunological response

Head-kidney leukocytes stimulated with *A. ochraceus*, *A. botrytis* and *A. niger* glucans significantly increase the phagocytic ability compared with the control group (non-stimulated leukocytes) (Fig. 3). Interestingly, phagocytic capacity was enhanced in leukocytes stimulated with *A. niger* glucans compared with control or zymosan groups.

In this study, as shown in Fig. 4a, the nitric oxide levels in *A. botrytis* and *A. niger* glucan treated cells showed a significant increase compared with control group. Myeloperoxidase activity was significantly increased ($p < 0.05$) in leukocytes stimulated with *A. niger* glucan compared with leukocytes of control or zymosan groups (Fig. 4b).

Regarding the antioxidant enzyme activities studied in this work, SOD and Catalase activities significantly increased over control levels in *A. niger* glucan compared with control or zymosan treatments (Fig. 5a and b).

3.5. Fungal β-glucans prevents *A. hydrophila*-induced cell apoptosis

Flow cytometry was utilized to detect the effect of *A. ochraceus*, *A. botrytis* and *A. niger* on *A. hydrophila*-induced cell apoptosis and necrosis using Annexin V-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) and propidium iodide (PI) (Table 1). Interestingly, we can observe that stimulated-leukocytes with glucans and exposed to *A. hydrophila* have a major viability (>40%) compared with that *A. hydrophila* leukocytes group (29.55% viable cells). *A. ochraceus*, *A. botrytis* and *A. niger* glucans reduced the amount of early

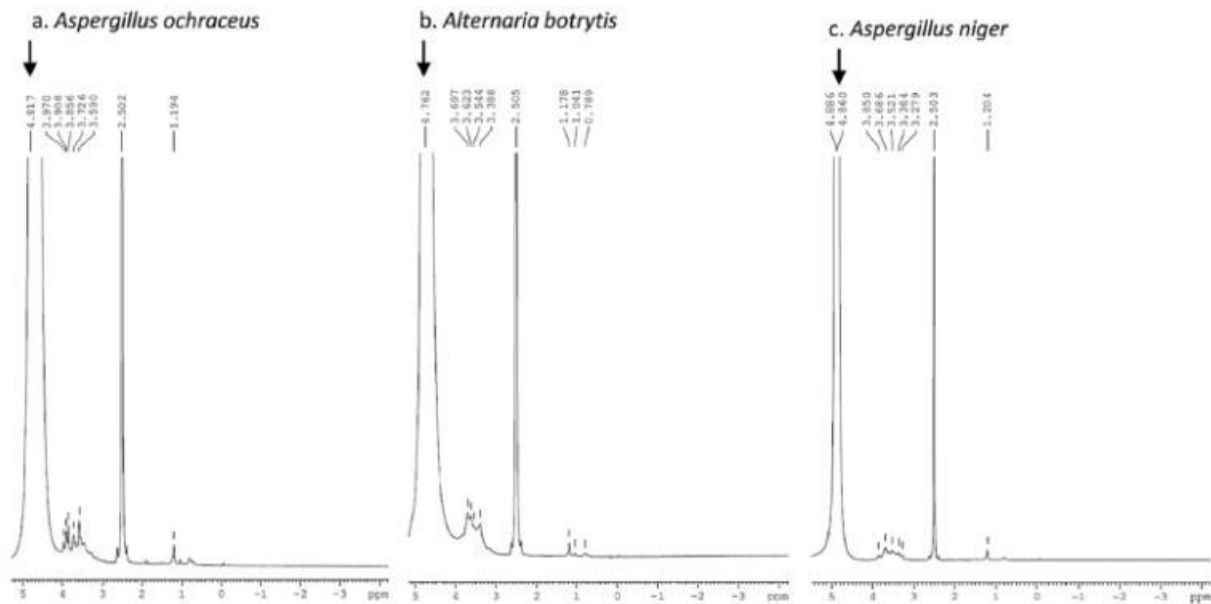


Fig. 1. The Proton NMR spectra of carbohydrate region of water insoluble particulate glucan in a mixed solvent (DMSO-d_6) at $80\text{ }^\circ\text{C}$ from three different fungus isolates, (a) *Aspergillus ochraceus* (183) (b) *Alternaria botrytis* (194) and (c) *Aspergillus niger* (197A).

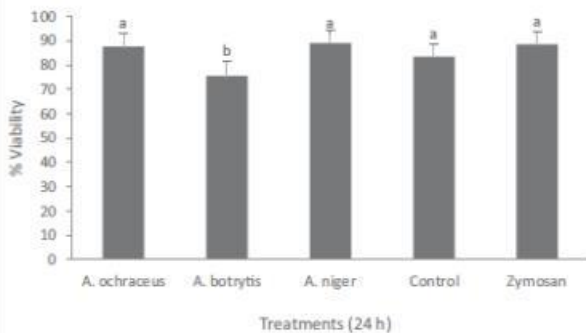


Fig. 2. Effect of glucans on viability of head-kidney leukocytes. Viability was assessed at the end of 24 h by measuring resazurin fluorescence. Data shown are from $n = 12$ fish. Different superscripts indicate significant ($p < 0.05$) difference among groups.

apoptotic cells induced by *A. hydrophila*.

3.6. Gene expression

The transcript levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 (CXCL8) and IL-12 (subunit p40) genes were also evaluated in head-kidney leukocytes at 24 h of stimulation with glucans (Fig. 6). Interestingly, the expression levels of all transcripts evaluated were significantly up-regulated in those cells treated with *A. niger* glucan follow by *A. ochraceus* respect to zymosan group.

4. Discussion

The glucans yield in fungus evaluated in this study showed that *Aspergillus niger* had the maximum (40%) and *Alternaria botrytis* the minimum (10%) glucan content. Wilson et al. (2015) showed that *Debaryomyces* sp. and *Hortaea werneckii* had a maximum glucan content of 27.5%, whereas and minimum in *Candida*

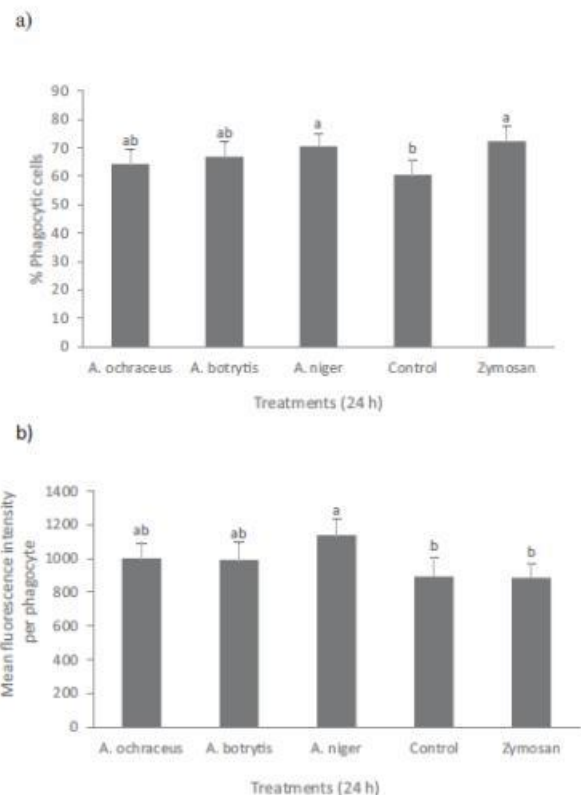


Fig. 3. Phagocytic ability of head-kidney leukocytes stimulated with glucans and zymosan as positive control at 24 h. Data are presented as mean \pm SD. Data shown are from $n = 12$ fish. Different superscripts indicate significant ($p < 0.05$) difference among groups.

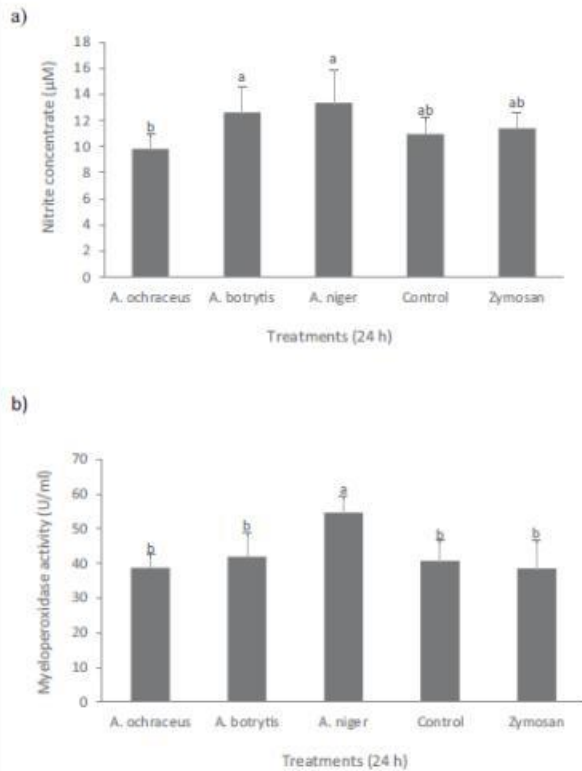


Fig. 4. (a) Nitric oxide production and (b) myeloperoxidase activity in head-kidney leukocytes immunostimulated with glucans and zymosan as positive control. Data are presented as mean \pm SD. Data shown are from $n = 12$ fish. Different superscripts indicate significant ($p < 0.05$) difference among groups.

spencermartinsiae (12.5%). This result is important due that *A. niger* is widely used in biotechnology to produce various enzymes (e.g., amylases and pectinases), organic acids (e.g., citric acid) (Schuster et al., 2002; Park et al., 2017); and in medicine, fungal chitin-glucan from *A. niger* has potential beneficial effects with respect to the development of atherosclerosis (Berecochea-Lopez et al., 2009). The present study also showed by the proton NMR study, fungus glucan isolates are (1–3)- β -D-glucan as reported by Ohno et al. (1999), Sukumaran et al. (2010) and Wilson et al. (2015) it shows differences in the level of (1–6)-linkages in the various fungus or yeast-glucan isolates. Fungi-derived glucan has received great attention due to its bioactive and medicinal properties such as immune-stimulating, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and antitumor (Yadomae and Ohno, 1996; Kogan, 2000; Evidente et al., 2014). This study highlights the immunostimulatory properties of fungal glucans in Pacific red snapper cells. We have performed functional *in vitro* studies evaluating viability, phagocytosis, antioxidant immune responses and cytokine gene expression with colorimetric assays, flow cytometry and molecular tools. In a first study, the *in vitro* treatment with fungi derived-glucans did not affect the viability of leukocytes at the concentrations tested, indicating that the direct effect of glucans on leukocyte did not cause cytotoxic effects and they can be considered safe. Ideal probiotics or natural immunostimulants should stimulate the immune response without causing cytotoxicity to the host cells (Kim and Austin, 2006). Overall, β -glucans are known as modulators of the immune system in fish (Gopalakannan and Arul, 2010). These

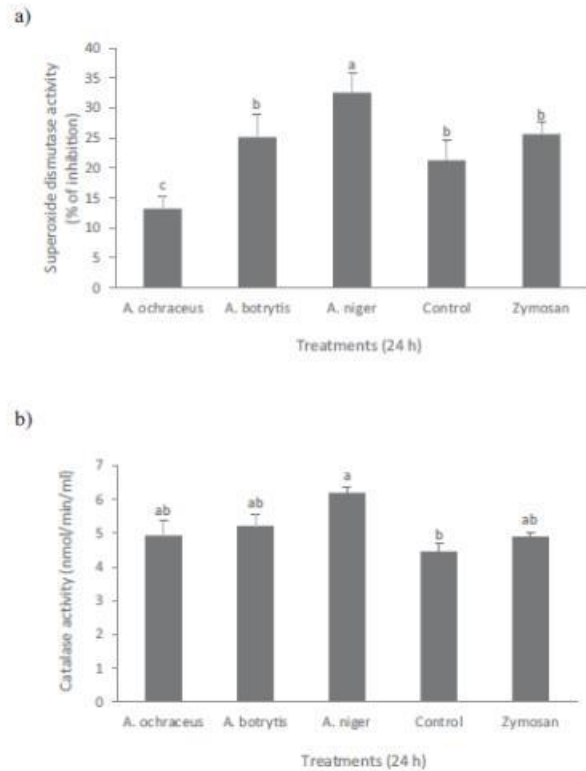


Fig. 5. (a) Superoxide dismutase and (b) catalase activities in head-kidney leukocytes immunostimulated with glucans and zymosan as positive control. Data are presented as mean \pm SD. Data shown are from $n = 12$ fish. Different superscripts indicate significant ($p < 0.05$) difference among groups.

beneficial effects are connected among others to the ability of β -glucans to activate phagocytosis, reactive oxygen species production and cytokines (Brown et al., 2003; Levitz, 2010). Phagocytosis is a form of endocytosis where particles are ingested into endocytic vesicles called phagosomes (Øverland et al., 2010). In this study, the results from flow cytometry analysis of phagocytosis using *S. cerevisiae* clearly show that fungal glucans stimulated leukocytes from Pacific red snapper by pronounced phagocytic ability, principally with the *A. niger*-derived glucan. In higher vertebrates, the binding of β -glucans to dectin-1 induced a cascade of innate and adaptive immune response such as phagocytosis, oxidative burst, and the production of cytokines and chemokines in dendritic cells and macrophages (Batbayar et al., 2012). As mentioned above, β -glucans from fungi exhibit a broad spectrum of biological activities including anti-tumor and immune-modulating properties (Du et al., 2015). Nitric oxide is a chemical modulator of inflammation and an important molecule that influences antimicrobial activity of macrophages (Du et al., 2015). In this work, nitrite levels were increased in leukocytes stimulated with *A. niger* and *A. botrytis* compared with control group. Dubey et al. (2014) demonstrated that *Aspergillus fumigatus* alkali-insoluble cell wall fragments (AIF), composed of chitin linked covalently to glucans, enhanced immune responses when compared with individual cell wall polysaccharides. Curiously, the microbicidal activity of leukocytes was activated by *A. niger* glucan, which indicate inducing significant oxygen consumption by the NADPH oxidase system followed by high production of intracellular oxidant species. Fish neutrophils

Table 1

Annexin-V and PI staining after stimulation of Pacific red snapper head-kidney leukocytes with glucans and infected with *Aeromonas hydrophila*.

Treatment + <i>A. hydrophila</i>	Cells:		
	Viabiles	Early apoptotic	Necrotic
<i>A. ochraceus</i>	45.13 ± 3.06 ^b	25.20 ± 2.57 ^b	20.62 ± 2.88 ^b
<i>A. botrytis</i>	51.58 ± 3.11 ^b	28.06 ± 2.51 ^b	15.36 ± 1.52 ^b
<i>A. niger</i>	49.42 ± 2.98 ^b	27.58 ± 2.58 ^b	16.0 ± 1.95 ^b
Zymosan	49.59 ± 3.66 ^b	30.36 ± 1.06 ^b	14.14 ± 1.58 ^b
<i>Aeromonas hydrophila</i>	29.55 ± 2.89 ^a	43.24 ± 4.56 ^c	17.69 ± 1.28 ^b
Control (non-infected)	90.81 ± 3.05 ^c	4.77 ± 2.35 ^a	4.41 ± 0.60 ^a

Results are expressed as percentages (mean ± S.D.) of annexin-V⁺/PI⁻ (viable), annexin-V⁺/PI⁺ (early apoptotic) and annexin-V⁻/PI⁺ (necrotic and late apoptotic) leukocytes from Pacific red snapper head-kidney after 24 h of incubation in the presence of *Aeromonas hydrophila* (10⁸ cfu/ml). Different letters indicate significant difference between groups ($p < 0.05$).

have phagocytic, chemotactic and bactericidal functions, an intense respiratory burst, and peroxidase (myeloperoxidase, MPO) activity (Rodrigues et al., 2003). The process of degranulation is essential for the release of MPO and activation of the halide production pathway, as well as release of a diverse cocktail of antimicrobial enzymes (Menegazzi et al., 1992). In vertebrates, phagocytic process is followed by the production of reactive oxygen species, such as superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH[•]), all of which are highly microbicidal (Bachere et al.,

1995; Muñoz et al., 2000). The main enzymes which detoxify reactive oxygen species in all organisms are superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, all of them abundant in fish tissues (Di Giulio et al., 1993). In this study, superoxide dismutase and catalase activities were increased in leukocytes stimulated with fungal glucans, being the major increase observed again with *A. niger* glucan. Interestingly, the ability of fungal β-glucans to act as free radical scavengers was studied by Slamenova et al. (2003); and in animal models, glucans and glycoproteins extracted from fungi protect the macrophages from the damages caused by lipoperoxide accumulation, mainly by activating the transcription of genes related to the macrophage antioxidant response (Yuan et al., 1996).

Apoptosis can be considered as a contributor to the pathology of many diseases, including disorders of the immune function (Ekert and Vaux, 1997). Some studies have reported the direct effect of probiotics on apoptosis of fish non-immune cells (Lazado and Caipang, 2014; Salinas et al., 2008) but little is known with respect to their effect on apoptosis in fish immune cells. In this study, we evaluated the potential of glucans to stimulate the Pacific red snapper leukocytes exposed to *A. hydrophila*. Interestingly, *A. botrytis* and *A. niger* glucans were capable to diminish the apoptotic and necrotic cells, and increased the viability around 51% compared with zymosan group. β-Glucan dietary administration defend fish from various bacterial infections such as *A. hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*) (Brogdén et al., 2012), *Aeromonas*

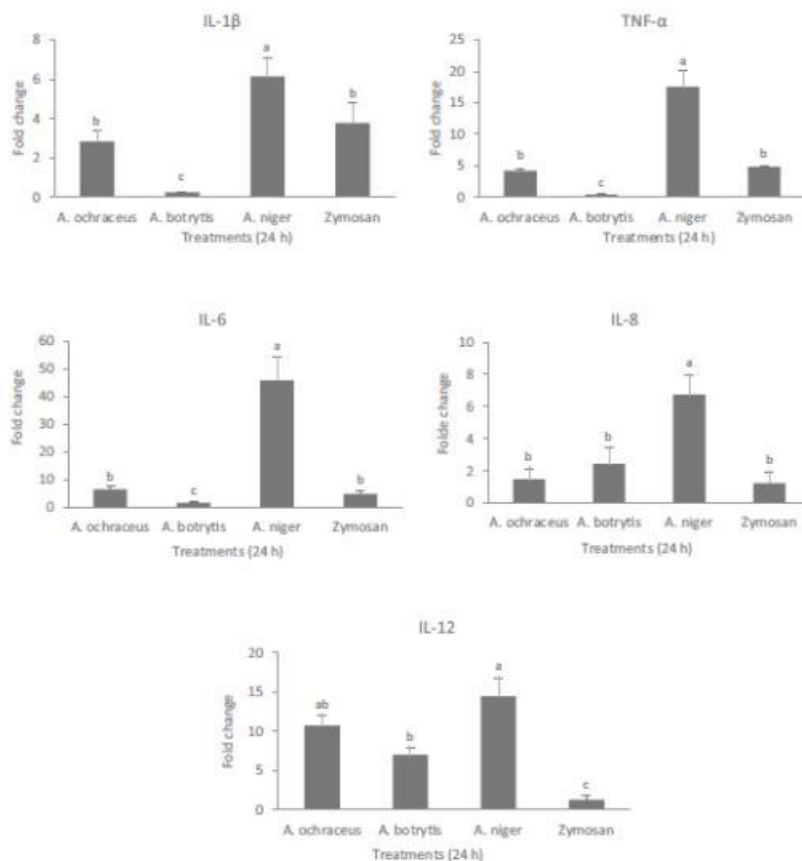


Fig. 6. Gene expression of pro-inflammatory cytokines in head-kidney leukocytes measured by quantitative real-time PCR. Glucan exposition after 24 h of immunostimulation. Data are presented as mean ± S.D. fold increase relative to control. Data shown are from $n = 12$ fish. Different letters denotes significant difference among treated groups ($p < 0.05$).

salmonicida in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Ji et al., 2017), and *Vibrio alginolyticus* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) (Chang et al., 2013). In general, *in vitro* studies have suggested that β -glucans can directly activate leukocytes, stimulating their phagocytic and antimicrobial activities, which include the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates (Williams et al., 1996). In addition, some studies have shown that β -glucans are able to activate leukocytes, stimulating the production of pro-inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α , and IL-8 *in vivo* and *in vitro* (Jaehrig et al., 2007; Sonck et al., 2010). Real-time PCR was performed to analyze the expression of principal pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 (CXCL8) and IL-12 (subunit p40) genes in head-kidney leukocytes. The present work demonstrates for the first time in Pacific red snapper leukocytes that glucans derived fungus up-regulated the expression of these five genes in the head-kidney leukocytes, one of the main haemopoietic organ. Data presented in this study clearly demonstrated that *A. niger* glucan could increase secretion of pro-inflammatory mediators including IL-1 β and TNF- α , which are important chemical messengers for the induction of many biological responses (Miguel, 2010). Ishibashi et al. (2001) observed the antitumor activity of grifolan (a fungal glucan) against solid ascites tumor and they found a significant increase of cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF) production by macrophages. TNF is a key cytokine of the cytokine network related with apoptosis. In agreement this result, *A. niger* glucan significantly increase TNF gene expression. Sparan, a six-branched β -1,3 glucan obtained from the medicinal mushroom *Sparassis crispa* significantly induces dendritic cells (DC) maturation by increasing the expression of MHC-I/II and costimulatory molecules (CD40, CD80, and CD86) and enhances the production of IL-12, IL-1, TNF- α , IFN- α / β , IL-2 and the proliferation of allogenic T cells. This activation of DCs by sparans, which has been demonstrated *in vitro*, occurs through TLR4 via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- κ B signaling pathways (Kim et al., 2010). Purified β -glucans and/or *Candida albicans* pre-incubated with human peripheral blood monocytes (PBMCs) can induce an increased production of the cytokines IL-6 and TNF- α that affords protection against reinfection (Quintin et al., 2012). Based on all of these properties, fungal β -glucans have a long history of use as adjuvants to promote immune responses, being these compounds an important component for the development of vaccines in aquaculture.

5. Conclusion

Glucans have great biotechnological and immunostimulant properties potential in fish. In the present research, we developed the first study where fungi isolates from lichens and their extracted glucans were evaluated to investigate the immunological properties in head-kidney leukocytes from Pacific red snapper. The results shown that the assayed fungal glucans are able to modulate the immune system by promoting cell viability, phagocytic activity, antioxidant immune response and immune-related gene expression. Interestingly, *Aspergillus niger*- β -glucan showed the best results. All of these properties make to fungus-derived glucans as valuable potential immunostimulant in fish aquaculture. The next step will be focused on the description of *Aspergillus niger*- β -glucan as well as those receptors involved during glucan recognition in fish. Furthermore, one interesting topic will be to know whether chemical or enzymatic treatments could improve the observed immunostimulatory and antifungal activity in fish.

Acknowledgments

We thank Dra. Ana María de Godos de Francisco from Servicio de

Apoyo a la Investigación of the Universidad de Murcia (España) for NMR facility for this work. We are also thankful to Dr. Minerva Maldonado and Francisco Encarnacion for their technical support with fish. The project was funded under CONACYT-INFR-2014-01/225924 and CONACYT-PDCPN2014-01/248033 grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.003>.

References

- Babiah, P.S., Upreti, D.K., John, S.A., 2014. Fungicidal efficacy of a foliose lichen *Flyvoparmelia coperata* (L.) Hale against phytopathogenic fungi. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 1, 38–44.
- Bachere, E., Mialhe, E., Noe, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17–32.
- Bathayar, S., Lee, D.H., Kim, H.W., 2012. Immunomodulation of fungal β -glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomol. Ther.* 20, 433–445.
- Berecoba-Lopez, A., Decordé, K., Ventura, E., Godard, M., Bornet, A., Teissède, P.L., Cristol, J.P., Rouanet, J.M., 2009. Fungal chitin-glucan from *Aspergillus niger* efficiently reduces aortic fatty streak accumulation in the high-fat fed hamster, an animal model of nutritionally induced atherosclerosis. *J. Agric. Food Chem.* 11, 1093–1098.
- Borra, R.C., Lotufo, M.A., Gaglioti, S.M., Barros Fde, M., Andrade, P.M., 2009. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res.* 23, 255–262.
- Brogden, G., von Köckritz-Blickwede, M., Adamek, M., Reuner, F., Jung-Schroers, V., Naim, H.Y., Steinhagen, D., 2012. β -Glucan protects neutrophil extracellular traps against degradation by *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish. Shellfish Immunol.* 33, 1060–1064.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119–1124.
- Brown, G.D., Gordon, S., 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell Microbiol.* 7, 471–479.
- Chang, C.S., Huang, S.L., Chen, S., Chen, S.N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 115–125.
- Chen, J., Seviour, R., 2007. Medicinal importance of fungal β -glucans. *Mycol. Res.* 111, 635–652.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Dalmo, R.A., Bøgvold, J., 2008. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 384–396.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., El-Sabagh, M., Masum, B.M.D., Zaineldin, A.I., Zayed, M.M., El-Dein, O.A.A., 2017. Changes in the growth, humoral and mucosal immune responses following β -glucan and vitamin C administration in red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 470, 214–222.
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.* 26, 1–22.
- Dinadayala, P., Lemassu, A., Granovski, P., Céranola, S., Winter, N., Daffé, M., 2004. Revisiting the structure of the antineoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J. Biol. Chem.* 279, 12369–12378.
- Du, B., Lin, C., Bian, Z., Xu, B., 2015. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends Food Sci. Technol.* 41, 49–59.
- Dubey, L.K., Moeller, J.B., Schlosser, A., Sorensen, G.L., Holmskov, U., 2014. Induction of innate immunity by *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharides is enhanced by the composite presentation of chitin and beta-glucan. *Immunobiology* 219, 179–188.
- Ekert, P.G., Vaux, D.L., 1997. Apoptosis and the immune system. *Bc. Med. Bull.* 53, 591–603.
- Evidente, A., Kornienko, A., Kornienko, A., Andolfi, A., Lefranc, F., Mathieu, V., et al., 2014. Fungal metabolites with anticancer activity. *Nat. Product. Rep.* 31, 617–627.
- Gopalakannan, A., Arul, V., 2010. Enhancement of the innate immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of beta-glucan and whole cell yeast. *Aquac. Res.* 41, 84–92.
- Gracia, L.V., Kiewek, M.M., Maldonado, G.M., 2004. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture* 237, 485–498.
- Huu, H.D., Sang, H.M., Thanh Thuy, N.T., 2016. Dietary β -glucan improved growth performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 402–410.
- Ishibashi, K., Miura, N.N., Adachi, Y., Ohno, N., Yodamae, T., 2001. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3- β -D-Glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65,

- 1993–2000.
- Jaehrig, S.C., Rohm, S., Kroh, L.W., Fleischer, L.G., Kuz, T., 2007. In vitro potential antioxidant activity of (1-3), (1-6)- β -D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4710–4716.
- Ji, L., Sun, G., Li, J., Wang, Y., Du, Y., Li, X., Liu, Y., 2017. Effect of dietary β -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 64, 56–67.
- Jiang, C., Wang, P., Li, M., Liu, S., Zhang, S., 2016. Dietary β -glucan enhances the contents of complement component 3 and factor B in eggs of zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 107–113.
- Kim, D.H., Austin, B., 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 297–304.
- Kim, H.S., Kim, J.Y., Ryu, H.S., Park, H.G., Kim, Y.O., Kang, J.S., et al., 2010. Induction of dendritic cell maturation by β -glucan isolated from *Sparus crispus*. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1284–1294.
- Kogan, G., 2000. 1-3,1-6-b-D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 23, 107–152.
- Lazado, C.C., Caipang, C.M., 2014. Probiotics-pathogen interactions elicit differential regulation of cutaneous immune responses in epidermal cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 113–119.
- Levitz, S.M., 2010. Innate oxygen production of fungal cell walls. *PLoS Pathog.* 6, e1000758.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Menegazzi, R., Zabucchi, G., Knowles, A., Cramer, R., Patriarca, P., 1992. A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* 52, 619–624.
- Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* 15, 9252–9287.
- Mohapatra, C., Patra, S.K., Panda, R.P., Mohanta, R., Saha, A., Saha, J.N., et al., 2014. Gene structure and identification of minimal promoter of Pou2 expressed in spermatogonial cells of rohu carp *Labeo rohita*. *Mol. Biol. Rep.* 41, 4123–4132.
- Munemoto, Y., Iida, Y., Abe, J., Saito, H., Fujisawa, K., Kasahara, Y., Mitsui, T., Asada, Y., Miura, S., 2002. Significance of postoperative adjuvant immunotherapy after curative resection of colorectal cancers: association between host or tumor factors and survival. *Int. J. Oncol.* 20, 403–411.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W.P., Mialhe, E., Bacher, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89–107.
- Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Lluch, N., Hernandez, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M., Magadan, S., 2015. Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 214–223.
- Nakano, H., Namatame, K., Nemoto, H., Motohashi, H., Nishiyama, K., Kumada, K., 1999. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Kanagawa Lentinan Research Group. Hepatogastroenterology* 46, 2662–2668.
- Neumann, N.F., Fagan, D., Belosevic, M., 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 473–482.
- Ochoa, J.L., Hernández-Montiel, L.G., Latisnere-Barragán, H., León de La Luz, J.L., Larralde-Corona, C.P., 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5, 352–359.
- Ohno, N., Uchiyama, M., Tsuzuki, A., Tokunaka, K., Miura, N.N., Adachi, Y., et al., 1999. Solubilisation of yeast cell wall β -(1-3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. *Carbohydr. Res.* 316, 161–172.
- Overland, H.S., Pettersen, E.F., Rønneseth, A., Wergeland, H.J., 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 28, 193–204.
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., Varese, G.C., 2013. Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *N. Biotechnol.* 25, 685–694.
- Park, H.-S., Jun, S.-C., Han, K.-H., Hong, S.-B., Yu, J.-H., 2017. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29–45.
- Pillai, T.G., Maurya, D.K., Savi, V.P., Janardhanan, K.K., Nair, C.K.K., 2014. Fungal beta glucan protects radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Ann. Transl. Med.* 2, 13.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248.
- Quintin, J., Saeed, S., Martens, J.H., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Iffrim, D.C., Logie, C., et al., 2012. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* 12, 223–232.
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Let. Appl. Microbiol.* 1, 17–20.
- Reyes-Becerril, M., Alamillo, E., Sanchez-Torres, L., Ascencio-Valle, F., Perez-Urbola, J.C., Angulo, C., 2016. Leukocyte susceptibility and immune response against *Vibrio parahaemolyticus* in *Totaba macdonaldi*. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 258–267.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio, F., Gracia-Lopez, V., Macías, M.E., Cadena, R.M., Esteban, M.A., 2014. Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish Physiol. Biochem.* 40, 1169–1180.
- Rodrigues, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Phagocytosis and peroxide release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec. A* 272A, 415–423.
- Ruthes, A.C., Carbonero, E.R., Córdova, M.M., Baggio, C.H., Santos, A.R.S., Sassaki, G.L., et al., 2013. *Lactarius rufus* (1-3), (1-6)- β -D-glucans: structure, anti-nociceptive and anti-inflammatory effects. *Carbohydr. Polym.* 94, 129–136.
- Salinas, I., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2008. Antiproliferative effects and apoptosis induction by probiotic cytoplasmic extracts in fish cell lines. *Vet. Microbiol.* 126, 287–294.
- Samuelsen, A.B., Schrezenmeir, J., Knutsen, S.H., 2014. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: a review. *Mol. Nut. Food Res.* 58, 183–193.
- Shivanna, R., Garampalli, R.H., 2014. Efficacy of lichen extracts as biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* F. Sp. Capsici. *Adv. Appl. Sci. Res.* 5, 273–277.
- Shivanna, R., Garampalli, R.H., 2015. Evaluation of fungistatic potential of lichen extracts against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc causing Rhizome rot disease in Ginger. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5, 067–072.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., Van Dijk, P.W., 2002. On the safety of *Aspergillus Niger* a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 426–435.
- Slamenova, D., Labaj, J., Krizkova, L., Kogan, G., Sandula, J., Bresgen, N., Eckl, P., 2003. Protective effect of fungal (1-3)- β -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Lett.* 198, 153–160.
- Sonek, E., Stuyven, E., Goddeeris, B., Cox, E., 2010. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 199–207.
- Sukumaran, V., Lowman, D.W., Sajeewan, T.P., Philip, R., 2010. Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquac. Res.* 41, 1799–1805.
- Syrystya, A., Novak, Miroslav, 2014. Structural analysis of glucans. *Ann. Transl. Med.* 2, 17.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif, pp. 315–322.
- Williams, D.L., McNamee, R.B., Jones, E.L., Prebus, H.A., Ensley, H.E., Browder, I.W., et al., 1991. A method for the solubilisation of a (1e3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* 219, 203–213.
- Williams, D.L., Mueller, A., Browder, W., 1996. Glucan-based macrophage stimulators. A Review of their Anti-Infective Potential. *Clin. Immunother.* 5, 392–399.
- Wilson, W., Lowman, D., Antony, S.P., Puthumana, J., Bright Singh, I.S., 2015. Philip R5. Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 346–356.
- Yadomae, T., Ohno, N., 1996. Structure-activity relationship of immunomodulating (1,3)- β -D-glucans. *Recent Res. devel. Chem. Pharm. Sci.* 1, 23–33.
- Yuan, C., Zhou, M., Shangxi, L., Yi, L., 1996. PSK protects macrophages from lipoperoxide accumulation and foam cell formation caused by oxidatively modified low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 124, 171–181.

CAPITULO 4

Conclusiones Generales

IV. CONCLUSIONES GENERALES

Para concluir, los presentes resultados demuestran que la administración intraperitoneal de CpG 1668, logró estimular la actividad antioxidante así como la sobre expresión de los genes TLR9 e IgM con activación de células B, en diferentes tejidos y órganos linfoides del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). No fueron observados cambios histológicos en los tejidos de los peces tratados con CpG ODN 1668. Por lo tanto CpG ODN 1668 puede ser considerado un potente inmunoestimulante para uso en vacunas en el huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). Futuras investigaciones son necesarias para probar sus beneficios preventivos y/o terapéuticos en desafíos con bacterias patógenas en que afectan la acuicultura.

Por otro lado, los glucanos tienen propiedades con un gran potencial biotecnológico e inmunoestimulante en peces. En la presente investigación, se desarrolló el primer estudio aislando β -glucanos de hongos obtenidos de ambientes extremos y sus propiedades inmunológicas fueron evaluadas en leucocitos de riñón cefálico del huachinango del Pacífico. Los resultados mostraron que los glucanos de hongos analizados fueron capaces de modular el sistema inmune promoviendo la viabilidad celular, la actividad fagocítica, la respuesta inmune antioxidante y la expresión génica relacionada con la inmunidad. Los glucanos extraídos de los hongos 197A, 1697B, 166 y 07NH4 mostraron los mejores resultados. Todas estas propiedades hacen de los glucanos derivados de hongos como un potencial inmunoestimulante en acuicultura de peces.

Finalmente, los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas tanto con el uso de β -glucanos siendo inmunoestimulantes naturales, como CpG ODN 1668 un inmunoestimulante de origen sintético, sobre la respuesta inmune innata, humoral y antioxidante en el Huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*), sugieren su uso como potenciales alternativas preventivas y terapéuticas frente a las enfermedades que afectan los cultivos de este pez, con el propósito de preservar la inocuidad alimentaria y bienestar animal.