



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS
PROPIEDADES INMUNOESTIMULANTES DE LA
LEVADURA *Kluyveromyces lactis* M3 Y SUS β -D-
glucanos EN PECES.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Biotecnología)

Presenta

Crystal Alejandra Guluarte Vélez

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 4 del Mes de septiembre del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Caracterización y evaluación de las propiedades inmunoestimulantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* M3 y sus β -D-glucanos en peces"


Presentada por el alumno:

Crystal Alejandra Guluarte Vélez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

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

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de tesis



Dra. María Ángeles Esteban Abad
Co-Tutora



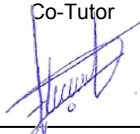
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Tutor



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-tutor



Dr. Alberto Cuesta Peñafiel
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Director de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-tutor

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-tutor

Dra. María Ángeles Esteban Abad
Universidad de Murcia
Co-tutora

Dr. Alberto Cuesta Peñafiel
Universidad de Murcia
Co-tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dra. María Ángeles Esteban Abad
Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dra. María Ángeles Esteban Abad
Dr. Alberto Cuesta Peñafiel

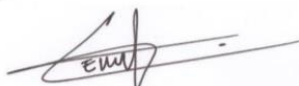
Suplentes

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Resumen

La intensificación de la acuicultura de especies marinas ha crecido en los últimos años y ha aumentado la susceptibilidad de brotes de enfermedades por bacterias patógenas como *Vibrio parahaemolyticus*, una de las especies que causa la vibriosis en peces. Por lo tanto, se requieren alternativas que mejoren la salud y disminuyan los impactos de las enfermedades de los animales en cultivo. Algunas levaduras son una alternativa ya que pueden funcionar como probióticos, que son microorganismos que cuando se consumen en cantidades adecuadas benefician la salud y aumentan la resistencia a enfermedades del hospedero. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el potencial inmunoestimulante de la levadura *Kluyveromyces lactis* cepa M3 y sus β -glucanos en la dorada (*Sparus aurata*) y en el huachinango (*Lutjanus peru*), peces de importancia acuícola en Europa y América. Primeramente, el potencial probiótico de *K. lactis* M3 (aislada de un ambiente marino extremo) se evaluó *in vitro*. También, la levadura se incorporó en la dieta y se realizó un reto con *V. parahaemolyticus*. Se obtuvieron muestras para determinar parámetros inmunológicos y de tejidos para análisis de expresión de genes. Además, se realizó un análisis *in vitro* e *in vivo* de los β -glucanos obtenidos de esta levadura y se realizó un reto experimental con *V. parahaemolyticus*. Se caracterizó un receptor que participa en el reconocimiento y respuesta inmune de β -glucanos de la levadura. Los resultados demuestran que *K. lactis* M3 tolera diferentes concentraciones de sal, sales biliares y pHs y no causa toxicidad en leucocitos de pez. La viabilidad de leucocitos fue significativa mayor comparada con el grupo control después del reto. Por otro lado, la caracterización de los β -glucanos demuestran que no causan citotoxicidad y que tienen actividad antioxidante e inmunoestimulante frente a retos con patógenos. En conclusión, la administración oral de *K. lactis* M3 estimula el sistema inmune de la dorada y reduce la citotoxicidad por *V. parahaemolyticus*, lo que demuestra su potencial probiótico para peces. Los β -glucanos de *K. lactis* M3 tienen potencial inmunoestimulante e inmunoprotector contra infecciones en peces. Una perspectiva principal de esta investigación es profundizar sobre los mecanismos y rutas de señalización del sistema inmune por el efecto de *K. lactis* M3 y sus β -glucanos en la dorada y en el huachinango.

Palabras clave: *Kluyveromyces lactis* M3, β -glucanos, probiótico, inmunoestimulante, peces.



Vo.Bo.
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Summary

Aquiculture intensification of marine species has grown in the last years and has increased the susceptibility of diseases outbreak by pathogen bacteria as *V. parahaemolyticus*, one specie that causes vibriosis in fish. Therefore, is necessary alternatives that improves health and decreased diseases loss of animals cultured. Some yeast, are an alternative because of can works as probiotics that are microorganisms that when fed in adequate amounts benefits to health and increased the resistance to diseases of host. For this, the goal of this work is characterizer the immunostimulant potentia of the yeast *Kluyveromyces lactis* strain M3 and their β -glucans in the Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and Pacific Red snapper (*Lutanus peru*), fish with aquaculture potential in Europe and America. Firstly, *in vitro* potential of *K. lactis* M3 (isolated from environmental marine extrem) probiotic was evaluated. Also, the yeast was evaluated in diets and was realized a challenge with *V. parahaemolyticus*. Samples were obtaining to determined immunological parameters and gene expression in tissues. In addition, analyses *in vitro* and *in vivo* with β -glucans from *K. lactis* M3 was realized with an experimental challenge addition *V. parahaemolyticus* and *P. damsela*. Also, the knowledge of the response of β -glucan in fish was deepened, characterizing a receptor that participle in the recognition and immune response of β -glucans. The results showed that *K. lactis* M3 is able to survive at different concentrations of salt, biliar salts and pHs moreover this yeast does not toxic to leukocytes from head kidney from fish. Interestingly, the cellular viability was improved significantly compared to control group after challenge. In the other hand, the biochemistry characterization of β -glucans demonstrated that it has an antioxidant potential and does not cause cytotoxic and immune response its increased against challenge with pathogens. In conclusion, the oral administration of *K. lactis* M3 stimulate the immune system of the fish and decreased the cytotoxic by *V. parahaemolyticus*, for this *K. lactis* M3 is a probiotic interesting for aquiculture. β -glucans from *K. lactis* M3 have a immunostimulant potential and protector against fish infections. Perspective main of this investigation was deepen about mechanism and signaling pathways of immune system for the effect of *K. lactis* M3 and their β -glucans over fish.

Keywords: *Kluyveromyces lactis* M3, β -glucans, probiotic, immunostimulant, fish.



Vo. Bo.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dedicatoria

A mis padres Jesús C. Guluarte y María Rosalía Vélez

A mi abuelita Arabella Castro

A mi abuelito Jesús Guluarte Zazueta †

Por siempre creer en mí y apoyarme a lo largo de este camino

“Nadie puede llegar a la cima armado sólo de su talento. Dios da el talento; el trabajo transforma el talento en genio”.

Anna Pavlova

Agradecimientos

Al CIBNOR por la infraestructura y material necesario para la realización de este proyecto de tesis. A la Dirección de Posgrado y a todo su personal, en especial a la Dra. Gracia Gómez Anduro, Ing. Horacio Sandoval, Tania Núñez y Lic. Osvelia por apoyarme en todo lo necesario para obtener mi grado.

A Conacyt por la beca 633272 otorgada de doctorado y la beca mixta otorgada para la realización de una estancia de investigación en la Universidad de Murcia. También a los proyectos que financiaron esta tesis: “Conservación y aprovechamiento de la biodiversidad de microorganismos marinos: Fortalecimiento de la contribución de los mares al desarrollo económico nacional” CONACyT PDCPN2014-01/248033 y “Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de la biotecnología enfocada hacia una sola salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema” CONACyT-INFR-2014-01/225924. Agradezco también a la Unión Europea y el Gobierno de España por el financiamiento a través de los proyectos: Modulación de la respuesta inflamatoria de la piel de peces Proyectos I+D+I Retos Investigación MNECO (AGL2017-83370-C3-1-R) y Fondos FEDER Entidades participantes: Universidades de Murcia y Málaga.

Al Dr. Carlos Angulo, mi director de tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Gracias por su paciencia, por sus consejos, por su empatía y su disposición a pesar de todo el trabajo que tenía continuamente. Agradezco que me ayudara a mi formación como profesional. Es una gran persona y ejemplo a seguir. Valoro mucho su tiempo y dedicación hacia mi formación. Gracias por apoyarme en mis decisiones.

A mis tutores, el Dr. Felipe Ascencio por su ayuda y consejos cada semestre, al Dr. Dariel Tovar Ramírez por su paciencia, sus consejos semestrales y su disposición para permitirme ingresar a su laboratorio cuando lo necesitaba.

A mis tutores de la Universidad de Murcia, el Dr. Alberto Cuesta, gracias por su ayuda, sus consejos y por recibirme en la estancia y ayudarme cuando tenía dudas. A la Dra. María Ángeles Esteban, también le agradezco por recibirme en una estancia de investigación, le tengo un gran cariño, gracias por permitirme ser prácticamente parte de su equipo de investigación y darme la confianza como lo hacía con sus alumnos del grupo, me ayudó mucho con sus consejos académicos y sus consejos personales para ser mejor persona, gracias por impulsarme a creer más en mí. A su equipo de investigación que le tengo un gran cariño. Gracias por la ayuda a Dr. Francisco Guardiola, asimismo gracias infinitas al grupo de Inmunología Innata en peces teleósteos por permitirme sentirme en casa y como si estuviera en mi grupo de investigación.

A la Dra. Martha Reyes-Becerril, quién no fue parte de mi comité tutorial, pero la siento como si lo hubiera sido. Gracias por sus consejos, su cariño y por permitirme trabajar en su laboratorio de investigación. Le agradezco la ayuda en las técnicas de laboratorio y en los muestreos.

Agradezco enormemente a todos mis compañeros del Grupo de Inmunología y Vacunología (GIV) así como al técnico e investigador responsables del laboratorio de biotecnología de organismos marinos, MC. René Rebollar y al Dr. Humberto Mejía. También agradecer a los técnicos que me permitieron acceso para utilizar equipo en sus laboratorios, MC. Julio Hernández, Dr. Martín, MC. Víctor Moyron.

Este espacio, quiero tomarlo para agradecer a mi familia, quién me apoyo en este camino tan bonito y difícil a la vez. Empiezo contigo papá Jesús C. Guluarte, quién fuiste la persona que más me apoyó en todo momento en mi formación académica, desde que ingresé al jardín de niños y ahora en mi grado de estudios de doctorado, siempre tenías un consejo para mí, unos brazos donde llorar, cafecitos eternos que me ayudaron a despertarme y me ayudaron a seguir, eres quién me impulsaba a continuar y a no darme por vencida en tantas veces que sentí que ya no podía más, me comprendiste y me apoyaste en cada una de mis metas, existen en este mundo pocos papás como tú, ¡Te quiero!

A mi mamá Rosalía Vélez, por apoyarme y ayudarme a cumplir las metas que me proponía, estar presente en cada uno de mis logros y por ayudarme a ser valiente, sé que no demuestras el cariño con facilidad, pero en tu interior sé que estás orgullosa de mí. ¡Te quiero!

A mis hermanos, Esmeralda y Luis Fernando. Ustedes son mi fuente de inspiración, son grandes seres humanos y sé que llegaran más lejos que yo. Los vi crecer a lo largo de este camino académico, me apoyaron muchísimo. ¡Los amo!

Agradecer infinitamente a mis abuelos, mi abuelito Jesús C. Guluarte, empezaste conmigo el camino del doctorado y no pudiste acompañarme hasta el final, sé que desde donde estás, me apoyas con tu cariño y tus sabios consejos. Siempre me dijiste que llegaría lejos, eres mi inspiración, tata. ¡Besos al cielo! Abuelita, usted me vio levantarme y caerme en este proceso de tesis doctoral, aprendí mucho de sus consejos y estuvo a mi lado apoyándome, es un gran ser humano. La adoro mucho, abuelita.

Quiero agradecer a mi familia española, a mis hermanas Diana Ceballos y Ana Salvá, sin ustedes no hubiera podido sobrevivir sola en Murcia, desde que las conocí se hicieron parte importante de mí, gracias por estar conmigo, divertirse con mis chistes malos, apoyarme en los momentos que me sentía sola por estar en otro país distinto al mío y por abrirme las puertas de sus casas. Hicieron de esta extranjera, una gran amiga, las llevo siempre en mi corazón. Agradezco también a mis amigos, que me brindaron su amistad y cariño en España: Chema, Daniel, mi Inesita (mi portuguesa favorita), Rocío, Vanessa, Nora, Amanda, José Carlos y Luciano.

A mis amigas que me acompañan como hermanas desde la preparatoria, Ana Karina, Estefanía, Anna Karen, Alejandra, Estrella, Yessi y Andrea; gracias por su apoyo en los buenos y los malos momentos. A mis amigas Cibeñas: Anais, Erika, Paulina y Carolina por apoyarme y escucharme cuando lo necesité.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xv
Lista de abreviaturas	xvi
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	3
2.1. Vibriosis	3
2.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4
2.3. Factores de virulencia y patogénesis	5
2.3.1 Adhesión	5
2.3.1.1 Factores de virulencia implicados en la vibriosis	6
2.3.1.2 Sistemas de secreción tipo III (T3SS)	7
2.3.1.3. Sistema de secreción tipo III-1 (T3SS1)	8
2.3.1.4. Sistema de secreción tipo III-2 (T3SS2)	9
2.4 Levaduras como probióticos en peces: alternativa contra patógenos	10
2.5 β -glucanos utilizados como inmunoestimulantes en peces	11
2.6. Receptores que participan en el reconocimiento de β -glucano	13
2.6.1 Dectina-1	13
2.6.2 MINCLE	14
2.6.3 Receptores de reciclaje	14
2.6.4 TLR2	15
2.6.5 CR3	15
2.6.6. Lactosilceramida	16
2.7. Respuesta inmune en peces.	16
2.7.1 Respuesta inmune innata	16
2.8 Tejido linfoide asociado a intestino	18
2.9.1.1. Células del sistema inmune innato	20
2.9.1.1.1. Monocitos y macrófagos	20
2.9.1.1.2. Leucocitos polimorfonucleares	21
2.9.1.1.2.1. Neutrófilos	22
2.9.1.1.2.2. Eosinófilos y basófilos	22
2.9.1.1.2.3. Mastocitos	23
2.9.1.1.2.4. Células Rodlet	23
2.9.1.1.2.5. Células dendríticas	23
2.9.1.2. Moléculas del sistema inmune innato (factores solubles)	24
2.9.1.2.1. Complemento	24
2.9.1.2.2. Lectinas	25
2.9.1.2.4. Lisozima y proteasas	25
2.9.1.2.5. Moco	26
2.9.2 Respuesta inmune adaptativa	26
2.9.2.1. Células B y anticuerpos	27
2.9.2.2 Células T	27
2.10. ToxA como antígeno candidato a vacuna en peces	28

3.JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5.OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos particulares	32
6.MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1. Ensayos <i>in vitro</i> de la levadura <i>Kluyveromyces lactis</i> M3	33
6.1.1 Cultivo de levaduras	33
6.1.2 Tolerancia a pH	33
6.1.3 Tolerancia a sales biliares	33
6.1.4 Tolerancia a salinidad.....	33
6.1.5 Adhesión a intestino de dorada	34
6.1.6 Ensayo de hidrofobicidad y autoagregación celular	34
6.1.7 Actividad DPPH.....	35
6.1.8 Actividad ABTS ⁺	35
6.1.9 Actividad captadora de anión superóxido.....	36
6.1.10 Ensayo de potencial reductor férrico	36
6.1.11 Perfil de ácidos grasos en <i>K. lactis</i> M3.....	36
6.1.12 Viabilidad celular	37
6.2 Ensayos <i>in vitro</i> del β -glucano aislado de <i>Kluyveromyces lactis</i> M3	37
6.2.1 Extracción del β -glucano.	37
6.2.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	38
6.2.3 Peso molecular.....	38
6.2.4 Medición del contenido de carbohidratos	38
6.2.5 Viabilidad celular	39
6.2.6 Caracterización antioxidante de β -glucano KIM3.	39
6.2.6.1 Determinación de la capacidad captadora de radical H (Ensayo DPPH). .	39
6.2.6.2 Determinación de la capacidad captadora de radical superóxido.	39
6.3 Ensayo <i>in vitro</i> de β -glucano KIM3 en leucocitos.	39
6.3.1 Diseño experimental.....	39
6.3.2 Viabilidad celular	40
6.3.4 Ensayo de fagocitosis.....	40
6.3.5 Explosión respiratoria	41
6.3.6 Actividad peroxidasa	41
6.3.7 Óxido nítrico	41
6.4 <i>In vivo</i> levadura administrada a dorada (<i>Sparus aurata</i> L.)	41
6.4.1 Cultivo de levaduras.....	41
6.4.2 Elaboración de las dietas experimentales.	42
6.4.3 Diseño experimental.....	42
6.4.4 Obtención de las muestras.....	44
6.4.5 Determinación de poblaciones celulares por la técnica de DiOC ₆	44
6.4.6. Pruebas en moco.	44
6.4.6.1 Actividad antiproteasa.	44
6.4.6.2 Actividad proteasa.....	45
6.4.6.3 Lisozima.	45
6.4.6.4 Peroxidasa	46
6.4.6.5 Elisa para detección de IgM	46

6.4.6.6 Niveles lectina Con A	46
6.4.6.7 Óxido nítrico	47
6.4.6.8 Actividad bactericida.....	47
6.4.7 Pruebas en suero	47
6.4.7.1 Elisa para detección de IgM	47
6.4.7.2 Elisa para detección de lectina.....	48
6.4.7.3 Óxido nítrico	48
6.5 Ensayo <i>In vivo</i> de β -glucano aislado de <i>K. lactis</i> M3 administrado en dieta. ..	48
6.5.1 Ensayo de fagocitosis.....	48
6.5.2 Explosión respiratoria de leucocitos aislados de riñón cefálico	48
6.5.3 Actividad peroxidasa	49
6.6 Ensayo ToxA+ β -D-glucano de <i>S. halophilus</i> 4N16	49
6.6.1 Extracción de leucocitos.....	49
6.6.2 Actividad fagocítica	49
6.6.3 Ensayo NBT	50
6.6.4 Óxido nítrico	50
6.6.5 Actividad peroxidasa	50
6.6.6 Actividad antioxidante.....	50
6.6.6.1 Superóxido Dismutasa.	50
6.6.6.2 Catalasa	50
6.6.7 Expresión de genes.....	51
6.6.8 Caracterización de MINCLE	51
6.7 Ensayo Inmunidad Innata Entrenada	52
6.7.1 Peroxidación de lípidos (Daño celular)	52
6.7.2 Parámetros del sistema inmune innato.	53
6.7.2.1 Actividad fagocítica	53
6.7.2.2 Ensayo NBT	53
6.7.2.3 Producción de óxido nítrico	53
7. RESULTADOS	54
7.1 Caracterización probiótica	54
7.2 Perfiles de ácidos grasos de <i>Kluyveromyces lactis</i> M3	58
7.3 Caracterización del β -glucano obtenido de <i>K. lactis</i> M3 (β G-KIM3)	60
7.4 Viabilidad celular de β -KIM3 en leucocitos de riñón cefálico de dorada.	65
7.5 Efecto <i>in vitro</i> de β -KIM3 en leucocitos de riñón cefálico de dorada.	66
7.6 Efecto <i>in vivo</i> de la alimentación de β -KIM3 en dorada.....	69
7.7 Caracterización del receptor Mincle	71
7.8 Expresión génica de Mincle.....	76
7.9 Parámetros del sistema inmune innato de leucocitos estimulados con ToxA y β -glu/Sh.....	77
7.10 Dieta de <i>Kluyveromyces lactis</i> M3 a juveniles de dorada (<i>Sparus aurata</i>)....	83
7.11 Inmunidad Innata Entrenada: β -glucano de <i>K. lactis</i> M3 probado en leucocitos de bazo de Jurel (<i>Seriola rivoliana</i>)	91
8. DISCUSIÓN	95
8.1 Caracterización de las capacidades probióticas de la levadura evaluado <i>in vitro</i>	95
8.2 Caracterización de β -KIM3 obtenido de <i>K. lactis</i> M3.....	96
8.3 Caracterización MINCLE	97

8.4 <i>In vivo</i> : dieta oral con <i>K. lactis</i> M3 a doradas.	100
8.5 <i>In vitro</i> : β -glucano obtenido a partir de <i>K. lactis</i> M3 en leucocitos de dorada.	102
8.6 <i>In vitro</i> : β -glucano de <i>K. lactis</i> probado en inmunidad innata entrenada en peces.	103
9. CONCLUSIONES	106
10. LITERATURA CITADA	107
11. ANEXOS	123

Lista de figuras

- Figura 1.** Fotografía electrónica de *V. parahaemolyticus*. La barra significa una medida de 1 μm . (Tomada de McCarter, 1999). 4
- Figura 2.** Estructura y factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*. Tomada de Wang et al., 2015. 10
- Figura 3.** Representación del tejido linfoide asociado a intestino en peces teleósteos, imagen tomada del libro “Mucosal Health in Aquaculture” Capítulo: Fish mucosal immunity: intestine, (Tomado de Salinas y Parra, 2012). 19
- Figura 4.** Esquema del montaje de tanques para el bioensayo in vivo. Cada tanque contenía 12 doradas, los cuáles fueron alimentados con una dieta comercial y aclimatadas una semana antes de iniciar con las dietas experimentales. 43
- Figura 5.** Línea del tiempo de muestreos e infección del ensayo de dieta de *K. lactis* M3 en dorada. 43
- Figura 6.** Características probióticas de *K. lactis* M3. (a) resistencia de *K. lactis* M3 a pH ácido, (b) resistencia de *K. lactis* M3 a sales biliares de dorada (*Sparus aurata* L), (c) resistencia de *K. lactis* M3 a diferentes concentraciones de sal y (d) adhesión de *K. lactis* M3 marcada con fluoresceína. Las barras y cada punto representan \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias entre grupos ($P < 0.05$). 55
- Figura 7.** Actividad antioxidante de *Kluyveromyces lactis* M3 medido por (a) Actividad captadora de radical ABTS, (b) Actividad captadora de radical DPPH, (c) Actividad captadora de anion superóxido y (d) Poder reductor de férrico (Por sus siglas en inglés, FRAP). Las barras representan la media \pm DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$). 57
- Figura 8.** Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con *K. lactis* atenuada a tres temperaturas (55 °C, 60 °C y 65 °C) determinado por la técnica de MTT. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 58
- Figura 9.** Espectros de ^1H RMN y FTIR de las regiones correspondientes de enlaces β -D-glucosídicos. Este β -glucano fue disuelto en DMSO- d_6 a 80 °C. En la figura superior se indica el peso molecular en kDa para el β -glucano de *K. lactis* M3 (β -KIM3). 61
- Figura 10.** a) Porcentaje de enlaces β -1-3;1-6 de β -KIM3 medido por rojo Congo (Laminarina es usado como control positivo). b) Contenido de carbohidratos de β -KIM3 medido por el método de fenol/ácido sulfúrico usando como curva estándar glucosa. Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indicant diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). 62
- Figura 11.** Capacidad antioxidante de β -KIM3. (a) Actividad DPPH usando BHT control positivo. (b) Actividad captadora SO- usando BHA como control positivo. (c) Actividad captadora OH- usando BHT como control positivo. Las barras representan la media \pm DS. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$). 63

- Figura 12.** (a) Poder reductor férrico antioxidante y (b) actividad ABTS⁺ de β -D-KIM3. TROLOX y ácido ascórbico fueron utilizados como curvas de calibración, respectivamente. Las líneas representan la media \pm DS. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$)..... 64
- Figura 13.** Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 evaluado en tres dosis distintas (20, 40 y 60 μ g/mL) determinado por la técnica de MTT. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 65
- Figura 14.** Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días determinado por la técnica de IP mediante citometría de flujo. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 66
- Figura 15.** a) Explosión respiratoria, b) habilidad fagocítica y c) capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 67
- Figura 16.** a) Niveles de óxido nítrico y b) actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 68
- Figura 17.** Capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$). . 69
- Figura 18.** Habilidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$). . 70
- Figura 19.** Estallido respiratorio encontrado en de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β - glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$). 70
- Figura 20.** Actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$). . 71
- Figura 21.** Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de MINCLE para huachinango. El codón de inicio (ATG) está subrayado, el codón de paro (TAA) está marcado como un guión, la señal de poliadenilación (aaaaaaa) está en negritas y los residuos de cisteína están marcados con C en negritas. Los dominios transmembrana están resaltados en color gris (residuos del 48-70) y la región correspondiente al dominio lectina está resaltado en color negro (residuos del 120-251). 72
- Figura 22.** Alineamiento múltiple de aminoácidos de MINCLE. Las secuencias homólogas fueron determinadas con el programa CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)..... 73

- Figura 23.** a) Diagrama mostrando la organización estructural de MINCLE en *Lutjanus peru*. La caja de color azul corresponde al dominio estructural transmembrana (residuos 48-70) y la caja de color rosa denota el dominio lectina (residuos del 120-251). La figura b) corresponde a la proteína 3D predicha por el programa Phyre 2. El modelo fue creado con un templado de receptor manosa de *Homo sapiens* con una confianza del 100 % y una cobertura del 50%...... 74
- Figura 24.** Análisis filogenético de MINCLE en *Lutjanus peru*. El árbol está basado en un alineamiento que corresponde a la proteína completa en otras especies de peces y como grupo externo utilizando a *Mus musculus* y *Homo sapiens*. El árbol fue creado en el programa MEGA versión 6.0 con un bootstrap de 10,000. Las distancias genéticas fueron calculadas en base a distintas proteínas (p-distancia). La secuencia marcada con un cuadro color negro corresponde a la secuencia de *Lutjanus peru*...... 75
- Figura 25.** Expresión relativa de MINCLE en huachinangos sanos. La expresión relativa es el promedio de expresión de genes en peces sin estimular. Se utilizó EF-1 α como gen de referencia. Se analizaron las muestras por triplicado \pm DE. .. 76
- Figura 26.** a) Capacidad fagocítica y b) explosión respiratoria encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+ β G, ToxA (5 μ g mL $^{-1}$) and β G (β -glu/Sh; 20 μ g mL $^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^8 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). 78
- Figura 27.** a) Niveles de nitritos y b) actividad peroxidasa encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+ β G, ToxA (5 μ g mL $^{-1}$) and β G (β -glu/Sh; 20 μ g mL $^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^8 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). 79
- Figura 28.** Actividad de a) Superóxido dismutasa y b) catalasa encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+ β G, ToxA (5 μ g mL $^{-1}$) and β G (β -glu/Sh; 20 μ g mL $^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^8 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). 80
- Figura 29.** Expresión de genes medidos por qPCR en tiempo real de a) MINCLE, b) MARCO, c) TLR2, d) IL-1 β y e) IL-6 en leucocitos de riñón cefálico estimulados con control y con 5ToxA+ β G, ToxA (5 μ g mL $^{-1}$) and β G (β -glu/Sh; 20 μ g mL $^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^8 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm D.E. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). 82
- Figura 30.** Viabilidad celular mediante la prueba de DiOC $_6$ en sangre total encontradas en suero de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). 84

- Figura 31.** Poblaciones celulares determinadas por DiOC₆ de leucocitos aislados de sangre periférica de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con dos dosis de *K. lactis* M3. (a) Monocitos, (b) Granulocitos, (c) Linfocitos antes y después del reto con *V. parahaemolyticus*. Cada punto representa la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos. 85
- Figura 32.** Actividades a) antiproteasa y b) proteasa respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). 86
- Figura 33.** Actividades a) niveles de nitritos y b) peroxidasa respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). 87
- Figura 34.** a) Lectina ConA y b) niveles de IgM respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). 88
- Figura 35.** Actividad bactericida contra cepas patógenas de *Vibrio* a) *V. parahaemolyticus*, b) *V. harveyi* y c) *V. angillarum* respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). 89
- Figura 36.** Parámetros inmunes a) Lectina ConA, b) niveles de IgM en suero y c) niveles de nitritos respectivamente, encontradas en suero de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). 90
- Figura 37.** Hidroxiperoxidación de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucan de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 91
- Figura 38.** Viabilidad celular de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucano de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos. 92
- Figura 39.** Fagocitosis (a) y explosión respiratoria (b) de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control

positivo un β -glucan de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos..... 93

Figura 40. Niveles de nitritos (a) y actividad de mieloperoxidasa (b) de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucan de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos..... 94

Lista de tablas

Tabla I. Hidrofobicidad de superficie celular y porcentaje de autoagregación encontrados para <i>K. lactis</i> M3.....	56
Tabla II. Composición de ácidos grasos de <i>Kluyveromyces lactis</i> M3.....	59

Lista de abreviaturas

xg: Fuerza centrífuga, gravedades

°C: grados centígrados

ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamonio, por sus siglas en inglés

ACK: Solución de lisis de Amonio-Cloruro-Potasio

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ASC: Células secretoras de anticuerpos, por sus siglas en inglés

ATP: Adenosín Trifosfato

BCR: Receptor de células B

BHA: Butil Hidroxianisol

BHT: Butil Hidroxitolueno

BSA: Albúmina sérica bovina

C3: Proteína del complemento 3

CAT: Catalasa

CD: Célula dendrítica

CD4: Cúmulo de diferenciación 4

CD8: Cúmulo de diferenciación 8

cDNA: ADN complementario

ConA: Concanavalina A

CR3: Receptor de C3.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DiOC₆: Ioduro de Dihexiloxacarbocianina; por sus siglas en inglés.

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidad Óptica

DPPH: 2,2 Difenil-1 picrilhidrazil; por sus siglas en inglés

DTAF: 5-(4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína por sus siglas en inglés

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EF-1 α : Factor de elongación 1-alfa

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; por sus siglas en inglés

FeCl₃: Cloruro Férrico

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; por sus siglas en inglés

FRAP: Potencial Antioxidante Reductor Férrico, por sus siglas en inglés

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier

g: gramos

GALT: Tejido linfóide asociado a intestino, por sus siglas en inglés

h: horas

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico
HRP: Peróxidasa del rábano
Hz: Hertz
IFN- γ : Interferón lamda
IgD: Inmunoglobulina D
IgM: Inmunoglobulina M
IgT/Z: Inmunoglobulina T ó Z.
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
IL-17: Interleucina 17
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-22: Interleucina 22
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Óxido nítrico sintasa
IP: Ioduro de Propidio
i.p.: Intraperitoneal
kDa: Kilo Daltones
KOH: Hidróxido de Potasio
kPa: Kilo Pascales
L: Litro
LPS: Lipopolisácarido
M: Molar
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas; por sus siglas en inglés.
MAM7: Proteína multivalente de adhesión número 7
MARCO: Receptor de macrófagos con estructura colagenosa
mg: miligramo
MHCI: Complejo de histocompatibilidad I
MHCII: Complejo de histocompatibilidad II
min: minutos
MINCLE: El receptor de lectina dependiente de Ca²⁺ inducible por macrófagos
mL: Mililitro
mM: micromolar
MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl: Cloruro de Sodio
NaOH: Hidróxido de Sodio
NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos
nm: nanometros
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: Marco de lectura abierta

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos
PBS: Buffer de fosfatos
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; por sus siglas en inglés
pH: Potencial de hidrógeno
PMA: Formol 12-meristato; por sus siglas en inglés
PMN: Polimorfonucleares
ppm: Partes por millón
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
rpm: Revoluciones por minuto
RRP: Receptores de reconocimiento de patógenos
s: segundos
SO: Superóxido
SOD: Superóxido Dismutasa
Syk: Proteína Tirosina-Quinasa.
Tc: Células T citotóxicas
TCA: Ácido Tricloroacético
TCR: Receptor de células T
Th: Célula T cooperadora
Th1: Células T cooperadoras de tipo 1
Th17: Células T cooperadoras de tipo 17
Th2: Células T cooperadoras de tipo 2
Th22: Células T cooperadoras de tipo 22
thd: Termolisina directa termoestable
TLR: Receptores tipo Toll
TLR2: Receptor tipo Toll 2
TLR5: Receptor tipo Toll 5
TMB: 3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
ToxA: Toxina A
ToxB: Toxina B
TPTZ: 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
Treg: Células T reguladoras
trh: Toxina hemolisina relacionada
v/v: Volumen/volumen
YPD: Medio de cultivo Dextrosa-Peptona-Extracto de levadura
 μ L: Microlitro
 μ m: Micrómetro
UFC: Unidad formadora de colonia

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha representado una fuente importante de alimentos en las últimas cuatro décadas. Sin embargo, los peces bajo cultivo intensivo se enferman por patógenos del género *Vibrio* causantes de vibriosis, provocando pérdidas económicas millonarias (FAO, 2016). En la actualidad no existe una vacuna efectiva contra la vibriosis. Como alternativa a este problema, diversos estudios demuestran que el uso de probióticos y vacunas administradas vía oral o vía intraperitoneal (i.p.) pueden mejorar la respuesta inmune y la resistencia de peces contra patógenos. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo encontramos que la levadura marina *Sterigmatomyces halophilus*, aislada de un ambiente marino extremo, posee propiedades probióticas e inmunoestimulantes para peces (Reyes-Becerril *et al.*, 2017b). Por otra parte, observamos que la administración i.p. del antígeno recombinante purificado ToxA de *V. parahaemolyticus* protege al huachinango (*Lutjanus peru*) y dorada (*Sparus aurata*) del reto infeccioso (vibriosis) (Reyes-Becerril *et al.*, 2016; Reyes-Becerril *et al.*, 2017a).

En el caso de *S. halophilus*, la administración en la dieta protege a los peces del reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* y estimula la expresión de los genes IL-1 β y TNF- α , la producción de IgM y la actividad de enzimas (p.ej. mieloperoxidasa, lisozima) asociadas a la respuesta inmune (Reyes-Becerril *et al.*, 2017b). En el caso de la ToxA, la administración i.p. induce la producción de anticuerpos IgM en huachinango y dorada que podría estar asociados a la protección. Interesantemente, el gen que codifica para el receptor de patrones moleculares asociados a patógenos TLR5 (Toll-like receptor 5, en inglés) se sobreexpresa después de la inmunización, indicando el posible reconocimiento de ToxA; y la consecuente cascada de señalización que involucra la sobreexpresión de genes de citocinas pro-inflamatorias como Interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) necesarias para la inducción inicial de una respuesta inmune efectiva.

Además, en diversos estudios se ha comprobado el potencial inmunoestimulante que puede llegar a tener los beta-glucanos (β -glucanos), generalmente

reconocidos por el receptor Dectina-1 y TLR2 presentes en macrófagos (Akula *et al.*, 2014). El reconocimiento de los β -glucanos desencadena una cascada de señalización dentro de la célula que regula la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β mediante el factor de transcripción NF- κ B. En años recientes se le ha dado un enfoque a los β -glucanos como promotores de la inmunidad innata entrenada, un fenómeno recientemente descrito cuya finalidad es crear cierta “memoria” en células del sistema inmune innato. Por otro lado, la administración de nucleótidos para fines nutricionales ha girado en un enfoque inmunomodulador, por sus propiedades como activadores de linfocitos B y T. En peces, los nucleótidos se han administrado como promotores de crecimiento para el aumento de peso y talla de los mismos, sin embargo, no se ha dado enfoque en la posible modulación que tenga sobre el sistema inmune. Estudios como el de Gil (2002) son pioneros en el estudio del efecto de nucleótidos exógenos administrados a células inmunes, observando que son activadores de células T y B.

Por ello, en este proyecto de investigación se planteó caracterizar la respuesta inmune e inmunoprotección por la administración de la levadura *K. lactis* M3 y sus β -glucanos contra la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus* en peces. También adicional a esto, se planea la caracterización de un receptor de β -glucanos en huachinango, tras la estimulación de un antígeno vacunal en combinación con un β -glucano experimental (β -glu/Sh).

2. ANTECEDENTES

2.1. Vibriosis

La vibriosis es un grupo de infecciones intestinales y extraintestinales causadas por bacterias marinas del género *Vibrio* (Austin y Austin, 2016). Todas las especies de este género son anaerobios facultativos, citocromo oxidasa positivo, bacilos Gram negativos y gran parte de ellos requieren sal para su crecimiento (Ryan y Ray, 2004). Las especies del género *Vibrio* actualmente abarcan alrededor de 100 especies y son predominantemente asociadas a ambientes marinos (Takemura *et al.*, 2014). En el cultivo de peces y crustáceos, la vibriosis es una de las enfermedades bacterianas con mayor prevalencia, causando alta mortalidad y pérdidas económicas importantes para la acuicultura (Roberts, 2001). *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* son los patógenos más relevantes debido a su impacto en la salud pública, algunos mediante su transmisión zoonótica a través del consumo crudo de peces y mariscos contaminados (Gdoura *et al.*, 2016). La vibriosis en humanos causa gastroenteritis, infecciones en piel y otros tejidos, e incluso septicemia (Sawabe *et al.*, 2013). Los datos actuales sobre la vibriosis indican que el 97% de las infecciones causadas por el consumo de los organismos infectados sin proceso de cocción han prevalecido en ambientes costeros (Newton *et al.*, 2012). Incluso en países de primer mundo como en Estados Unidos, la vibriosis es una enfermedad gastrointestinal común (Paranjpye *et al.*, 2015; Iwamoto *et al.*, 2015; Froelich *et al.*, 2016). Curiosamente las vibriosis comunes que no están relacionadas con el cólera y que infectan a humanos están relacionadas con patógenos como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Estas infecciones son asociadas con gastroenteritis y septicemia (3.6%) en comparación con otras infecciones bacterianas (Weis *et al.*, 2011). En el año de 1950, Fujino y colaboradores fueron los primeros en aislar *V. parahaemolyticus* de alimentos contaminados provenientes del mar. Este, como otros vibrios, tiene la capacidad de transmisión zoonótica y es ampliamente distribuido en estuarios y ambientes marinos; sin embargo, su patogénesis ha sido poco descrita (Hlavsa *et al.*, 2011).

Por otra parte, *V. parahaemolyticus* es un patógeno relacionado con la infección en crustáceos y en peces (Austin y Austin, 2007). El perfil de los marcadores de *V. parahaemolyticus* en crustáceos y peces demuestra que se superpone, lo que se señala una transmisión directa de este patógeno entre ambos organismos (Yang *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no está claro los mecanismos de transmisión cruzada entre especies de animales marinos (Ananda *et al.*, 2017).

2.2. *Vibrio parahaemolyticus*

Esta bacteria patógena ha sido ampliamente descrita en especies marinas, principalmente en crustáceos (p.ej. camarón *Litopenaeus vannamei*) debido a su alta prevalencia (Ananda *et al.*, 2017; Kummar *et al.*, 2014). *V. parahaemolyticus* presenta características microbiológicas como crecimiento a temperaturas de 29-31°C y pHs desde 5.6 hasta 7.0, así como flagelos que le permiten moverse (Figura 1).

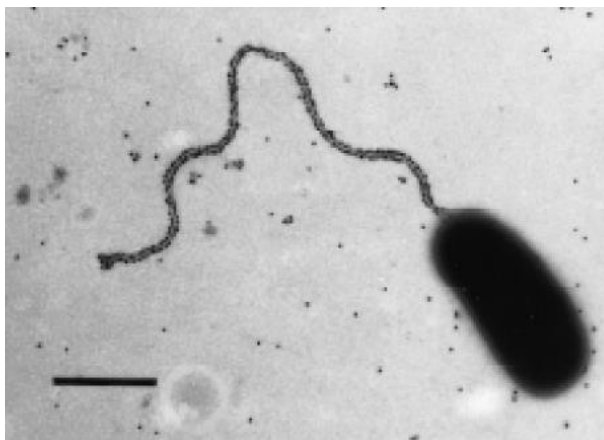


Figura 1. Fotografía *V. parahaemolyticus* Fotografía electrónica de *V. parahaemolyticus*. La barra significa una medida de 1 μm . (Tomada de McCarter, 1999).

Esta bacteria generalmente posee alta motilidad por dos flagelos localizados en ambos polos de la célula (Daniels *et al.*, 2000). Algunas cepas tienen solamente un flagelo, sin embargo, para ambos casos su motilidad suele ser alta y le permite el desplazamiento en medio líquido (McCarter, 1999). *V. parahaemolyticus* utiliza oxígeno como aceptor final de electrones cuando genera

ATP, por lo que realiza respiración aerobia y es clasificado en pruebas bioquímicas como citocromo oxidasa positivo (Mc Laughlin *et al.*, 2005).

2.3. Factores de virulencia y patogénesis

Las cepas de *V. parahaemolyticus* tienen un número distinto de factores de virulencia entre los que incluyen: hemolisinas termoestables directas (*tdh*; por sus siglas en inglés), *tdh* relacionadas a hemolisinas (*trh*) y adhesinas. Las hemolisinas en *V. parahaemolyticus* se relacionan a los sistemas de secreción tipo III designados como T3SS1 y T3SS2 (por sus siglas en inglés; Markino *et al.*, 2003). El T3SS1 tiene un número de factores de virulencia que causan la lisis de las células del hospedero y permite la salida de importantes nutrientes para asegurar su supervivencia en el ambiente (Burdette *et al.*, 2008; Paranjpye *et al.*, 2012). Además, algunas cepas de *V. parahaemolyticus* poseen el T3SS2 que contiene su propio número de genes *tdh* y *trh* que ocasiona diferentes grados de patogenicidad. Además, los sistemas de secreción del tipo III de *V. parahaemolyticus* tienen dos diferentes tipos de flagelos con funciones para nadar y desplazarse, así como otras proteínas (antígenos K) que forman una cápsula de protección (Broberg *et al.*, 2011). Por otra parte, la adhesión es el paso más importante de una bacteria para la unión inicial con la célula del hospedero. Durante la infección, la adhesión es mediada por proteínas en la superficie de la bacteria que hacen contacto con proteínas en la superficie de la célula del hospedero (Park *et al.*, 2004).

2.3.1 Adhesión

La principal proteína de adhesión conservada en muchas bacterias Gram negativas es la proteína multivalente de adhesión número 7 (MAM7; por sus siglas en inglés). Esta proteína consiste de una secuencia hidrofóbica de 44 aminoácidos en el extremo N-terminal y es necesaria para la localización y anclaje en la membrana externa (Pukatzki *et al.*, 2006). MAM7 contiene 7 dominios conservados de proteínas de entrada a células de mamífero (*mce*; por sus siglas en inglés mammalian cell entry). El gen de MAM7 es expresado constitutivamente permitiendo un establecimiento entre la célula Gram negativa y la célula huésped

desde su primer contacto, lo que conlleva a la regulación positiva de proteínas del patógeno y proteínas específicas de adhesión del huésped (Krachler y Orth, 2011). El proceso de adhesión inicia cuando MAM7 se une a la fibronectina y al ácido fosfatídico (Geissler, 2012). Incluso, la expresión heteróloga de MAM7 es suficiente para acoplar una *E. coli* no patogénica a una célula hospedero; además el bloqueo de MAM7 atenúa la citotoxicidad de *V. parahaemolyticus* o de bacterias patógenas Gram negativas que expresen MAM7 (Salomón et al., 2013a). Esta proteína es necesaria para la unión inicial con el hospedero y para la acción de los sistemas de secreción tipo III durante la infección (Hiyoshi et al., 2011). Interesantemente, esta observación provee una nueva perspectiva en las interacciones entre célula del hospedero y la bacteria patógena (Krachler et al., 2011). Por otra parte, el descubrimiento de MAM7 permitió nuevas investigaciones de otras moléculas implicadas en la colonización de células y con potencial como agentes terapéuticos contra bacterias Gram negativas, incluyendo a *V. parahaemolyticus* (Krachler et al., 2012; Salomon et al., 2013).

2.3.1.1 Factores de virulencia implicados en la vibriosis

Los brotes de enfermedades causadas por *V. parahaemolyticus* han ido incrementando (Zheng et al., 2014). Esto se ha encontrado principalmente en países con altos niveles en consumo de alimentos provenientes del mar, donde *V. parahaemolyticus* causa más de la mitad de muertes por contaminación de estos alimentos (Daniels et al., 2000a). En estos brotes, *thd* y *trh* son los dos factores de virulencia asociados con la actividad de citotoxicidad y hemólisis de *V. parahaemolyticus* sobre su célula huésped (Zheng et al., 2014). Es importante mencionar que no todas las cepas de *V. parahaemolyticus* causan mortalidad (Velázquez-Román et al., 2012). Las cepas aisladas del medio terrestre usualmente no presentan los genes de virulencia (*thd* y *trh*) que presentan las bacterias aisladas de humanos y animales marinos (Gutiérrez et al., 2013). Sin embargo, estudios realizados en Estados Unidos, países de Europa y Asia han reportado que hasta el 6% de los aislados de las muestras analizadas a partir del medio terrestre son positivas para la presencia de *thd* y/o *trh* (Kaysner et al., 2004; DePaola et al., 2000; Vuddhakul et al., 2000; Alam et al., 2003; Hervio-Heath et al.,

2002). Por otra parte, las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas a partir de humanos con gastroenteritis son diferenciadas de las cepas aisladas del ambiente terrestre. Para ello, se utiliza la prueba de Kanagawa que consiste en la habilidad *V. parahaemolyticus* para producir *tdh* que lisa las células rojas en agar base sangre (Nishibuchi *et al.*, 2006; Alipour *et al.*, 2014). Las muestras analizadas han sido positivas del 1 al 2% para este fenómeno y las demás han sido categorizadas como negativas (Alipour *et al.*, 2014). En estudios epidemiológicos moleculares han reportado que las cepas de *V. parahaemolyticus* negativas a este fenómeno no tuvieron la característica de poseer *thd*, pero si *trh* (Qadri *et al.*, 2005). Sin embargo, en otro estudio se reportó una cepa de *V. parahaemolyticus* negativa a *thd*, aislada de un brote de gastroenteritis en Maldivas en 1985 que tenía el gen *trh* (Qadri *et al.*, 2005). Por lo tanto, aunque no todas las cepas de *V. parahaemolyticus* tienen *trh*, esta proteína juega un rol similar que el de *tdh* en la patogénesis de la bacteria (Nelapi *et al.*, 2012). Ambas proteínas forman parte de los sistemas de secreción tipo III que a continuación serán explicados.

2.3.1.2 Sistemas de secreción tipo III (T3SS)

Los sistemas de secreción tipo III (T3SS; por sus siglas en inglés) son necesarios y utilizan proteínas efectoras de membrana y de secreción como maquinaria para la entrada de la bacteria al citoplasma de células eucariotas (Cornelis, 2006). Los T3SS están compuestos de 20 a 30 proteínas con un aparato de secreción que está organizado por: (1) un conjunto de proteínas que se extiende al interior y exterior de la membrana bacteriana, (2) una estructura proteica en forma de “aguja” que se extiende dentro del espacio extracelular y, (3) un poro translocón que está insertado dentro de la membrana eucariota (Izoré *et al.*, 2011; Figura 2). Curiosamente, algunas proteínas de los complejos de secreción tienen homología a proteínas flagelares mostrando altos niveles de conservación (Marlovits y Stebbins, 2010). Las moléculas diana efectoras de los T3SS tienen acción en el citoesqueleto, en la señalización en la respuesta inmune y en la autofagia en el hospedero (Stebbins, 2011). Dependiendo de las necesidades de los patógenos, los T3SS puede actuar sobre-regulándose o sub-

regulándose (Broberg *et al.*, 2011). En los siguientes subtemas se describirán los dos T3SS que tiene *V. parahaemolyticus*.

2.3.1.3. Sistema de secreción tipo III-1 (T3SS1)

El T3SS1 está presente en las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de la mayoría de los ambientes y cepas clínicas (Paranjpye *et al.*, 2012). Este sistema es similar al de *Yersinia ysc* T3SS en cuanto al número de genes, la identidad de sus genes y las características de ser inducido por el aumento de temperatura y decremento de la concentración de calcio (Paranjpye *et al.*, 2012). El T3SS1 está regulado por la interacción de 3 proteínas (conocidas como ExsC, ExsD, ExsE) que controlan la actividad de la proteína líder ExsA, un miembro que pertenece a la familia de activación de transcripción denominada AraC. Bajo condiciones no inducidas, ExsA está unida a ExsD y se encuentra desactivada; mientras ExsC, un inductor del sistema, está unido a ExsE. Bajo condiciones inductoras, cuando ExsE es secretada, ExsC es secretado y unido a ExsD lo cual permite la liberación de ExsA y activa la transcripción de T3SS1 (Zhou *et al.*, 2010). Durante la infección a las células, el T3SS1 inicia una serie de eventos en los que está envuelta la autofagia, rompimiento de la membrana, desmembramiento de las células y por último la lisis celular. Esta serie de pasos es llevada a cabo por tres principales efectores del T3SS1: VopQ (VP1680), VPA0450 y VopS (VP1686). VopQ es inducida por autofagia independiente de quinasa Pi3 tras el transporte de VopQ dentro de la célula hospedero y de esta manera previene la fagocitosis de *V. parahaemolyticus* (Sreelatha *et al.*, 2013). En caso de que VopQ esté ausente, los macrófagos infectados son capaces de fagocitar a *V. parahaemolyticus* e inducir la apoptosis. Entonces, secuestrando los nutrientes de la membrana y por inducción de la autofagia, las células huéspedes pueden fagocitar a *V. parahaemolyticus* (Sreelatha *et al.*, 2013). Por otra parte, VPA0450 es un inositol polifosato-5-fosfatasa que hidroliza el fosfato D5 a partir fosfatidilinositol-4,5-bifosfato [PI (4,5) P2] en la membrana plasmática (Broberg *et al.*, 2010). Esta acción desestabiliza la célula por el desprendimiento de la membrana plasmática a partir de la hidrólisis de la actina del citoesqueleto (Zhang y Orth, 2013). Por tanto, lo anterior conduce a crear poros en la membrana y permite la rápida lisis de la célula hospedero

(Broberg *et al.*, 2010). El tercer efector es VopS que etiqueta la actina del citoesqueleto por la acción de la enzima AMPilatina GTPasa y colapsa la actina del citoesqueleto que permite a la célula expandirse y encogerse (Broberg *et al.*, 2010; Ceccarelli *et al.*, 2013). El dominio FIC de VopS media directamente la transferencia de adenosina monofosfato a partir de ATP para activar una región de esa pequeña glicoproteína, la cual previene su unión con más efectores. Este bloqueo en la cascada de señalización regula la actina del citoesqueleto y lo lleva a su desintegración (Zhou *et al.*, 2010).

2.3.1.4. Sistema de secreción tipo III-2 (T3SS2)

El T3SS2 (sistema de secreción tipo III; 2) codifica una isla patogénica en el cromosoma 2. Este sistema es encontrado en muchos aislados clínicos y está asociado con cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas (Paranjpye *et al.*, 2012). El T3SS2 es diferente del T3SS1, pero tienen homología cercana al sistema Hrp 1 encontrado en *Pseudomonas syringae* (Park *et al.*, 2004; Cornelis, 2006). El T3SS2 está cercanamente asociado con otras islas de patogenicidad como VPAI-7 y es flanqueado por dos genes *tdh* (Zhang *et al.*, 2012). Los efectores presentes en este sistema incluyen a VopC (VPA1321), VopT (VPA1327), Vop A/P (VPA1346) y VopL (VPA1370). En modelo de conejo, los efectores de T3SS2 son translocados dentro de la célula huésped causando citotoxicidad del epitelio en el colon y enterotoxigenicidad con el hospedero (Park *et al.*, 2004).

La proteína VopC (VPA1321) tiene homología al factor citotóxico necrosante 1 (CNF1), una enterotoxina que está descrita en cepas *E. coli* patogénicas. El CNF1 activa a Rac y Cdc42 por deamidación a un residuo de glutamina en la región 2 de cada enzima previniendo la hidrólisis de GTP induciendo cambios en la actina del citoesqueleto y facilita la entrada de *V. parahaemolyticus* dentro de las células fagocíticas del hospedero (Zhang *et al.*, 2012). El segundo efector es VopT(VPA1327), una ADP ribosiltransferasa. La actividad de VopT es parcialmente responsable de la citotoxicidad observada durante la infección con algunas cepas de *V. parahaemolyticus* (Kodama *et al.*, 2007). VopA o también conocida como VopP (Vop A/P) es categorizada como una

YopJ homóloga a un bloque que activa la ruta de señalización de MAPK por la acetilación conservada de serina, treonina y lisina en MAPKK. Este evento de fosforilación y activación de la ruta MAPK, activa la inducción de citocinas (Trosky *et al.*, 2014). La actividad de Vop A/P podría ser parcialmente redundante con VopT ya que ambos bloquean la activación de la ruta de señalización ERK/MPK (Broberg *et al.*, 2011). La proteína VopL contiene tres dominios Wiskott/Aldrich (WH2). Este efector, así como otro dominio C-terminal (VCD), son responsables de la fuerza de los filamentos de actina en el núcleo (Namgoon *et al.*, 2011). Cabe destacar que VopL puede mejorar un microambiente favorable en el cuál las bacterias pueden replicarse, de este modo la invasión de *V. parahaemolyticus* se potencia.

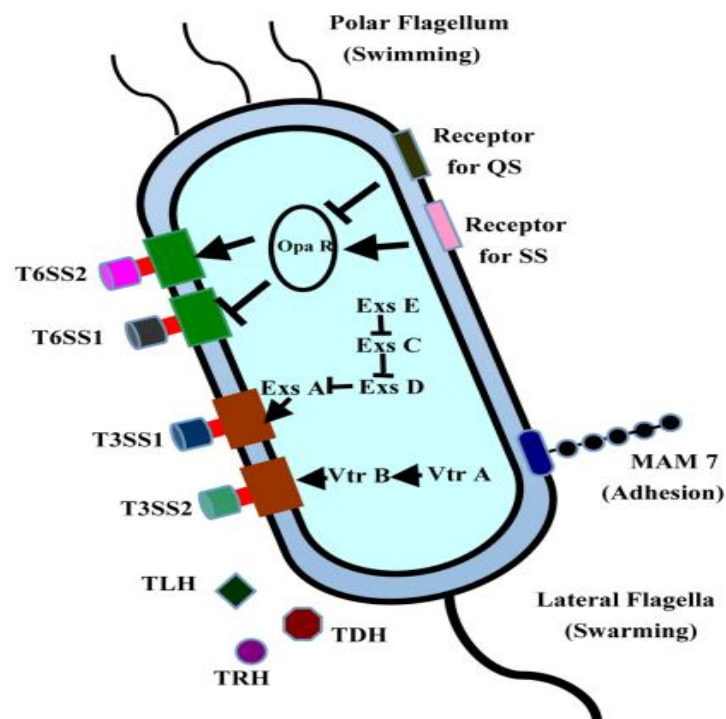


Figura 2. Estructura y factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*. Tomada de Wang *et al.*, 2015.

2.4 Levaduras como probióticos en peces: alternativa contra patógenos

La palabra probiótico fue introducida en el año 1974 por Parker, quien describió a los probióticos como organismos y sustancias que contribuyen al

balance de la microbiota intestinal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los probióticos como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedero (FAO y OMS, 2001). Dentro de los probióticos más utilizados han sido las bacterias y las levaduras. Así como en diversas especies de mamíferos, en peces han sido probadas las levaduras como probióticos, sobresaliendo *S. cerevisiae* y *D. hansenii*. Ambas levaduras han mostrado potenciar el crecimiento, la tasa de supervivencia, la maduración del intestino y el sistema inmune, así como mejorar el estatus antioxidante (Gatesoupe, 2007). Las levaduras son capaces de sobrevivir aproximadamente cien veces más que las bacterias, lo cual podría explicar que es necesario introducir baja población de levaduras (10^4 UFC/g) a través del alimento para inducir efectos beneficiosos en el hospedero (Andlid *et al.*, 1992).

El efecto de las levaduras probióticas sobre el huésped depende de la especie, la fuente de aislamiento, la concentración experimental, la concentración final y las condiciones en las que se encuentren los peces. Algunas levaduras tienen propiedades inmunoestimulantes ya que poseen compuestos como ácidos nucleicos, mananoproteínas, quitina y β -glucanos (Ortuño *et al.*, 2002; Harikrishnan *et al.*, 2011).

2.5 β -glucanos utilizados como inmunoestimulantes en peces

Los β -glucanos son una variedad de polisacáridos de diferentes longitudes y tamaños que tienen como base glucosa unidos por enlaces glucosídicos. Estas moléculas forman la estructura de la pared celular de bacterias, hongos, plantas y algas. Farmacológicamente, los glucanos son clasificados como modificadores de la respuesta biológica (BRM; por sus siglas en inglés) y tienen la capacidad de estimular el sistema inmune. Diferentes parámetros fisicoquímicos, tales como la estructura primaria, la solubilidad, el tamaño molecular, los tipos de enlaces, influyen en el tipo de respuesta biológica que inducirá (Leung *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2020). Los efectos inmunoestimulantes de los β -glucanos de enlaces tipo β -1,6 son los que están bien establecidos y caracterizados en su respuesta inmune;

demostrando que producen respuesta fuerte y prolongada desde vertebrados hasta invertebrados.

Además, en vertebrados, las capacidades inmunomoduladoras de los β -glucanos son la habilidad para activar leucocitos. Existen ciertos estudios sobre diferentes β -glucanos que relacionan sus efectos a su estructura molecular y pureza. Por otro lado, son un número diverso de receptores los implicados en las actividades ligadas a la estimulación por β -glucanos, entre los que incluyen el receptor Dectina-1, CR3, receptor lacterosilamida, receptores de reciclaje y los receptores tipo toll 2, 4 y 6 (Brown y Gordon, 2005; Kanjan *et al.*, 2017; Barreto-Bergter *et al.*, 2014). Cuando un receptor reconoce un β -glucano, las células se activan, siendo capaces de fagocitar, matar y digerir patógenos y al mismo tiempo son capaces de secretar moléculas señalizadoras como citocinas, las cuales atraen y activan células.

La estructura y la fuente de donde se obtienen los β -glucanos, como se mencionaba anteriormente, influyen sobre el tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, los β -1,3 son estructuralmente homopolímeros complejos, aislados de paredes celulares de bacteria, hongos, algas, granos de cereales y levaduras. En el reino fungi, más de la mitad de la biomasa de la pared celular son β -glucanos (Mcintosh *et al.*, 2005). La actividad de la β -glucanos es influenciada por el grado de ramificación, tamaño y peso molecular. Por otra parte, la obtención de β -glucanos influye mucho en la purificación y el proceso de extracción a partir de la biomasa. Los β -glucanos (enlaces β -1,3) tienen conformaciones moleculares en estructuras de triple hélice, hélice simple y ramificaciones aleatorias (Legentil *et al.*, 2015).

La frecuencia y naturaleza de las cadenas y su número está fuertemente ligado al efecto y habilidad del β -glucano para mediar la unión a la superficie de los receptores en las células blanco. Esto significa que el tamaño y estructura influencia la efectividad del β -glucano como inmunoestimulante (Ringø *et al.*, 2012; Penney *et al.*, 2019). Diversos reportes han mostrado que la administración diaria como dieta de β -glucanos incrementan la resistencia a infecciones como *A.*

hydrophila, *V. anguillarum* y *V. salmonicida* (Selveraj *et al.*, 2005; Robertsen *et al.*, 1990).

2.6. Receptores que participan en el reconocimiento de β -glucano

2.6.1 Dectina-1

El receptor dectina-1 es un receptor que pertenece a la familia de receptores tipo C, que contienen un dominio extracelular C-terminal tipo lectina y una región corta con dominio transmembranal de aproximadamente unos 40 aminoácidos (variando entre especies) (Ariizumi *et al.*, 2000). Este receptor es expresado principalmente por células de origen mielóide, incluyendo macrófagos, células dendríticas (CDs) y neutrófilos. Además, dectina-1 ha sido detectada en citometría de flujo en poblaciones de linfocitos B y T, aunque la función en éstas no ha sido determinada (Willment *et al.*, 2005). Dectina-1 contribuye a una cascada de señalización en estas células, incluyendo el inicio de la fagocitosis, explosión respiratoria, degranulación de neutrófilos, degradación de levaduras y hongos, así como la producción de mediadores lipídicos inflamatorios. Toda esta cascada está coordinada por citocinas y quimiocinas que activan otras células del sistema inmune (Saijo *et al.*, 2007).

El mecanismo de señalización de dectina-1 ha sido ampliamente estudiado en mamíferos superiores. Su mecanismo inicia después de la unión del β -glucano (reconocimiento tanto por enlaces β -1,3; β -1,6) al sitio de reconocimiento del receptor. Posteriormente, ocurre una fosforilación en motivos de tirosina conocido como ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif; por sus siglas en inglés). Estos ITAMs son responsables de la traducción de señales río abajo de los receptores de antígeno de las células B y T (BCR y TCR, respectivamente) los cuáles son fosforilados por una quinasa e inician la señalización (Underhill y Goodridge, 2007).

En peces, Dectina-1 no ha sido claramente descrita; sin embargo, en peces como carpa y el pez cebra se sabe que dentro de un cluster de genes que codifican a lectinas existe una secuencia homóloga a la que pudiera ser la equivalencia a Dectina-1, junto con otras lectinas (Dectina-2 y Mincle) que al

parecer incrementan su expresión en los peces tratados con dos tipos de β -glucanos: Curdlan (enlaces β -1-3) y Macrogard (enlaces β -1-3; 1-6) (Petit *et al.*, 2019).

2.6.2 MINCLE

Mincle (Por sus siglas en inglés; Lectina tipo C dependiente de Ca^{2+} inducible en macrófagos) es un receptor que se ha visto involucrado en el reconocimiento de β -glucanos. Mincle, también conocido CLEC4E o CLECF9, es un receptor expresado principalmente en macrófagos. Mincle fue identificado como una proteína inducible por lipopolisácaridos (Matsumoto *et al.*, 1999). Este receptor reconoce carbohidratos, tales como manosa, β -glucanos y trehalosa dimicolato. Mincle se activa por medio de la señalización del receptor Fc comúnmente por la cadena (FcR γ) un inmunoreceptor basado en la activación de motivos de tirosina que mediante estos residuos vía cinasa tirosina del bazo (Syk; por sus siglas en inglés) y CARD9/Bc110/MALT1 activan un complejo y subsecuentemente la activación e inducción de factores de transcripción tales como NF- κ B (Söldner *et al.*, 2018; Desel *et al.*, 2013). Esta inducción es esencial para la expresión de interleucinas, principalmente IL-1 β , IL-6 e IL-12, las cuáles polarizan respuestas del tipo Th1/Th17 (Matsumoto *et al.*, 1999; Desel *et al.*, 2013). Estudios en la evolución de Mincle indican la homología en el sitio de reconocimiento de carbohidratos entre mamíferos y peces. En peces, se ha observado que este receptor puede llegar a reemplazar o complementar las funciones de TLR4 y se ve asociado con una respuesta alta en TNF- α e IL-6 (Zoccola *et al.*, 2017).

2.6.3 Receptores de reciclaje

Dentro de los receptores de reconocimiento de entro de los receptores de reconocimiento de β -glucanos se encuentran los receptores de reciclaje. Estos comprenden un número heterogéneo de moléculas las cuales reconocen lipoproteínas de baja densidad, seleccionando ligandos polianiónicos en una variedad de microorganismos (Peiser *et al.*, 2002). Estos receptores son expresados en células de linaje mieloide y en algunas células endoteliales y han mostrado estar implicadas en la homeostasis y en la inmunidad (Rice *et al.*, 2002).

En diversos estudios se ha visto implicado el reconocimiento de β -glucanos solubles por varios receptores, incluígo MARCO (Macrophage receptor con estructura de colágeno; por sus siglas en inglés).

2.6.4 TLR2

Se ha identificado al receptor toll tipo 2 (TLR2; por sus siglas en inglés) como un receptor de β -glucanos. TLR2 es un receptor expresado en monocitos, neutrófilos y macrófagos y reconoce ligandos de la pared celular de organismos fúngicos como mananos, fosfolipomananos y β -glucanos, activando y promoviendo la fagocitosis y la producción de citocinas (Chan *et al.*, 2009). Dectina-1 media los efectos de las propiedades de los β -glucanos en cooperación con TLR2 (Gantner *et al.*, 2003). Este reconocimiento fue demostrado cuando pusieron en contacto zimosan (sustancia que está compuesta principalmente por β -glucanos, mananos, mananoproteínas y quitina elementos que han sido identificados en las paredes celulares en levaduras) observando que el zimosan [250 μ g/mL] inducía la producción de citocinas inflamatorias por macrófagos sin necesidad de internalizar las partículas de zimosan (Goodridge y Underhill, 2008; Underhill, 2003). Muchos receptores tipo Toll son activados sin necesidad de internalizar las partículas, demostrando que los receptores tipo Toll 2 y 6 se activan tras el reconocimiento de partículas de zimosan, induciendo la activación de NF- κ B y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. Las células no internalizaban ni digerían las partículas de zimosan (Elazab *et al.*, 2017; Ikeda *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2010; Von Asmuth *et al.*, 1990).

2.6.5 CR3

El receptor del complemento 3 (CR3; por sus siglas en inglés) es una proteína heterodimérica integrina compuesta de dos cadenas: α_m (CD11b) y β_2 (CD18). CR3 es expresado en células de linaje mieloide, células asesinas naturales (células NK por sus siglas en inglés) y linfocitos. Funciona como una molécula de adhesión y un receptor de la fagocitosis para una amplia variedad de patógenos. CR3 posee un dominio de reconocimiento de carbohidratos, localizado en el C-terminal de CD11b el cual reconoce principalmente β -glucanos (Ross et

al., 1999). El reconocimiento de β -glucanos por un dominio lectina ha visto implicado en el efecto de la migración de neutrófilos activados y por jugar un rol dependiente de citotoxicidad dependiente de iC3b en CR3 (Tsikitis *et al.*, 2004).

2.6.6. Lactosilceramida

Este receptor es un glicosfingolípido encontrado en muchos tipos de células y consiste de un lípido cerámida hidrofóbico y una molécula de azúcar hidrofílica que forma microdominios en la membrana plasmática. La lactosilceramida ha sido identificada como un receptor de reconocimiento de β -glucanos sobre todo de alto peso molecular (Zimmerman *et al.*, 1998). La interacción de este receptor con el β -glucano mostró potenciar la explosión respiratoria en neutrófilos y las funciones antimicrobianas por la activación del factor de transcripción NF- κ B, así como la producción de la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2; por sus siglas en inglés). Los mecanismos de señalización no se tienen aun totalmente claros, pero se sabe que podría envolver la activación de Lyn quinasa (Iwabuchi y Nagaoka, 2002).

2.7. Respuesta inmune en peces.

En vertebrados, la inmunidad es clasificada en dos grandes componentes: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa o adquirida. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra infecciones por barreras físicas, así como respuesta celular y humoral. La respuesta inmune adaptativa responde también por mecanismos celulares y humorales, y se caracteriza por el reconocimiento específico de antígenos que dirigen una fuerte y rápida respuesta secundaria específica para los patógenos. Existe una interrelación entre el sistema innato y adaptativo.

En una vista general, el encuentro con un organismo patógeno por medio de la mucosa de los tejidos tales como branquias, piel o intestino es el primer bloqueo, limitado por barreras físicas como el mucus, las escamas o el epitelio.

2.7.1 Respuesta inmune innata.

Como con todos los vertebrados, los peces incluyen la respuesta inmune celular y humoral con similitudes y diferencias a los mamíferos respecto a cada función. En

general, los peces dependen predominantemente del sistema inmune innato para atacar a los agentes patógenos. Los leucocitos tienen una importancia clave en el sistema inmune innato y adaptativo. Estas células incluyen a los linfocitos (células T, células B), macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, y células auxiliares (basófilos, mastocitos). Todas estas células están organizadas en distintos órganos y tejidos. En los peces, el timo, el riñón cefálico y el bazo son los órganos linfoides más importantes. El timo de los peces es un órgano responsable de la producción de células T, y su estructura es variable entre los distintos tipos de peces. El riñón cefálico es considerado el análogo a la médula ósea de los mamíferos y asume la función hematopoyética. Éste es el principal órgano responsable de la fagocitosis, procesamiento de antígenos y la formación de IgM y la memoria inmune a través de los centros melanomacróforos. El bazo por su parte representa un órgano hematopoyético secundario en peces. Las poblaciones de linfocitos y macrófagos que se encuentran dentro de él están altamente relacionadas en la fagocitosis y se encuentran cerca de sitios de captura de antígenos. En consecuencia, los antígenos pueden estar detenidos por largos periodos de tiempo y por esa razón el bazo tiene un rol importante en la memoria inmune.

Los receptores de reconocimiento de patógenos (RRP) inician la respuesta inmune innata a través de la detección del agente infeccioso o componentes de éste. Los RRP son expresados por las células del sistema inmune innato tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, pero también por algunas células que no están implicadas en la inmunidad, tales como células endoteliales. Los RRP pueden clasificarse en cinco grandes grupos (CLR, TLR, RLR NLR y ALR; por sus siglas en inglés), los cuáles comparten las mismas características básicas. Ellos poseen un dominio proteico para reconocer a los PAMP (Patrones moleculares asociados a patógenos; por sus siglas en inglés) y un dominio proteico que interactúa con una cascada de señalización molecular responsable de la activación de los mecanismos del sistema inmune. Los principales mecanismos de la respuesta inmune son la actividad fagocítica, la explosión respiratoria, mecanismos enzimáticos, activación del complemento y la producción de citocinas.

2.8 Tejido linfoide asociado a intestino.

El tejido linfoide asociado a intestino (GALT; por sus siglas en inglés) es uno de los 3 tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT; por sus siglas en inglés) de los peces teleósteos y su estudio es crítico en la industria de la acuicultura por un gran número de razones. Primeramente, el intestino es una de las puertas principales de entrada de patógenos; segundo porque los peces son alimentados principalmente con pellets, en los cuáles se pueden incorporar inmunoestimulantes, fármacos y vacunas; y, por último, el sistema inmune en el intestino de los teleósteos permite la colonización microbiana por simbiosis, y esta comunidad microbiana puede ser considerada un factor para modular la colonización de patógenos.

De manera general, GALT en los peces está constituido de diversos elementos y a diferencia de los endotermos, no está organizado en placas de Peyer y nódulos linfoides mesentéricos. El intestino de los peces alberga dos principales poblaciones de células inmunes: leucocitos de la lámina propia, los cuales incluyen una variedad de células inmunes tales como macrófagos, granulocitos, linfocitos y células plasmáticas; y los linfocitos intraepiteliales, compuestos principalmente por células T y algunas células B localizadas entre las células epiteliales. Junto con estas células inmunes, las células epiteliales, células productoras de moco y células neuroendocrinas también forman parte de la respuesta inmune en el intestino de los teleósteos.

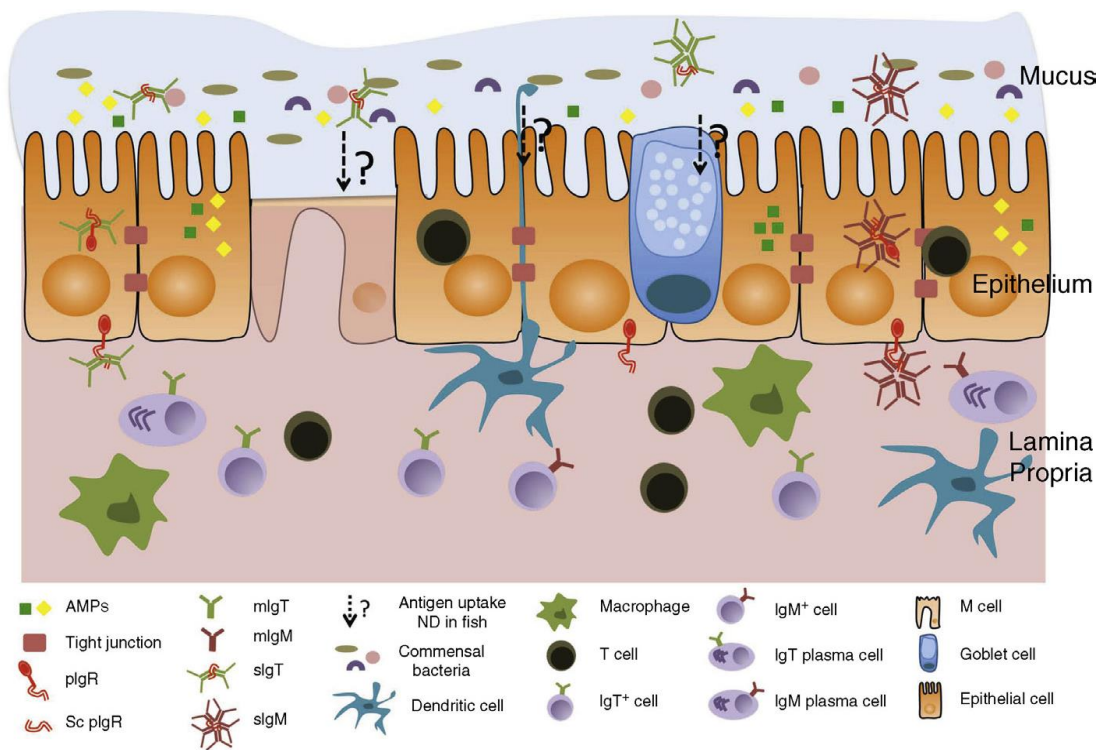


Figura 3. Representación del tejido linfoide asociado a intestino en peces teleosteos, imagen tomada del libro “Mucosal Health in Aquaculture” Capítulo: Fish mucosal immunity: intestine, (Tomado de Salinas y Parra, 2012).

Dentro de las principales células que participan en el GALT, además de las células que se explicaron anteriormente, las células globet (células productoras de moco) son el tipo de células dominantes productoras de moco en el epitelio intestinal de peces. Su núcleo está localizado en la porción basal, y en el área media, estas células se contraen y se expanden para formar un poro apical el cual descarga el moco que contienen. La principal molécula presente en este moco son las mucinas, las cuales juegan un rol importante en el mantenimiento de la barrera epitelial contra patógenos. Los gránulos de mucinas, los cuáles son predominantes en estas células y en las células globet. Estos gránulos son secretados constitutivamente y en respuesta a estímulos extracelulares, a través de un proceso altamente regulado que envuelve el transporte de los gránulos por diferentes vías, tales como remodelamiento de actina, exocitosis y por poros membranales (McGuckin *et al.*, 2011). La cantidad de células globet varía en los

intestinos de los peces según el organismo patógeno que infecte (Dezfuli *et al.*, 2012). En los peces, también es conservada la capacidad que tienen las células globet de entregar antígenos solubles a las células dendríticas en la lámina propia, tal como ocurre en los mamíferos (McDole *et al.*, 2012).

2.9.1.1. Células del sistema inmune innato

2.9.1.1.1. Monocitos y macrófagos.

Los macrófagos y sus precursores los monocitos son las principales células fagocitarias del sistema inmune. Los macrófagos están presentes en varios tejidos y órganos del cuerpo y contribuyen a la homeostasis y función inmune dentro del organismo. Sobre un tejido dañado o una infección, los monocitos son reclutados hacia el tejido afectado donde inician la diferenciación a macrófagos que pueden capturar antígenos y producir citocinas que modulan la activación de otros tipos de células. Los macrófagos presentan plasticidad y pueden cambiar a fenotipos funcionales dependiendo del ambiente. Dependiendo de distintas señales, los macrófagos se activan e inducen la producción de citocinas para activar a células Th1 o células Th2. Sin embargo, clasificaciones recientes en inmunología de mamíferos indican la activación de nuevos subtipos celulares (Forlenza *et al.*, 2011). Con el reciente conocimiento sobre los mecanismos de activación de macrófagos en peces, se adoptan cuatro diferentes fenotipos de macrófagos activados: innatos, clásicos, alternativos, y regulatorios.

Los macrófagos pueden ser activados por patógenos (o estímulos microbianos tales como PAMPs) a través de receptores tipo toll (TLR's; por sus siglas en inglés). En peces, el conocimiento que se tiene de esta activación proviene de estudios donde se estimula a estas células con moléculas antigénicas como lipopolisacárido bacteriano (LPS), peptidoglicanos, Poli I:C, flagelina o ácido lipoteicoico (Forlenza *et al.*, 2011). Los efectos que estas moléculas causan en los macrófagos de peces varía dependiendo de la especie de pez, pero en general causa la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales de nitrógeno, incrementan la fagocitosis y la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Por otra parte, los macrófagos clásicamente activados son inducidos por una combinación de IFN- γ y estímulos microbianos. El IFN- γ ha sido identificado en muchas especies de peces teleósteos. La activación y efectos son distintos en cada especie de pez. Por ejemplo, en peces como la carpa y la trucha los macrófagos activados mediante esta vía inducen la producción de varias citocinas pro-inflamatorias, fagocitosis y respuesta mediada por especies reactivas de nitrógeno. Particularmente en carpa, los macrófagos mediante esta vía no se activan solamente con la producción IFN- γ , necesitan la combinación de LPS o algún estímulo microbiano que induce la producción de especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico), la explosión respiratoria y la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

Los macrófagos activados por vía alternativa son diferenciados en la presencia de citocinas (IL-4/IL-13) para promover la respuesta Th2. En mamíferos, se tiene la evidencia de que estos macrófagos metabolizan diferente la L-arginina de los macrófagos activados por la vía innata/clásica, donde la L-arginina es convertida en L-ornitina y urea a través de la activación de la arginasa poniendo en disponibilidad para la conversión por iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) dentro de las especies reactivas de nitrógeno, actuando de esta manera como un macrófago anti-inflamatorio.

Finalmente, los macrófagos regulatorios son asociados con la presencia de la citocina regulatoria IL-10 y son entonces implicadas en el decremento de la regulación de la inflamación. Estos macrófagos pueden responder a una combinación de ligandos a TLRs y señales secundarias tales complejos inmunes, prostaglandinas, células en apoptosis, glucocorticoides o ligandos acoplados al receptor de la proteína G.

2.9.1.1.2. Leucocitos polimorfonucleares

Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs; por sus siglas en inglés) son células que tienen su origen a partir de la línea mieloide con una estructura distinta basada en la forma polimórfica de sus núcleos y en el número de gránulos presentes en el citoplasma. En peces, la forma de clasificación de las células es

distinta ya que no necesariamente se dividen por la tinción ácido o básica, y esto depende mucho de la especie de pez. Además, los diferentes tipos morfológicos de granulocitos no todos están siempre presentes en cada especie de pez. Los neutrófilos son el tipo predominante de leucocitos polimorfonucleares encontrados en la mayoría de los peces, pero en algunas especies de peces teleósteos también han sido reportados granulocitos básicos o ácidos, además de los neutrófilos.

2.9.1.1.2.1. Neutrófilos

Las células que son primeramente reclutadas en un proceso de inflamación son los neutrófilos. Son conocidos principalmente por su capacidad antimicrobiana a través de su fuerte capacidad fagocítica y de su poder de contener trampas nucleares extracelulares (NETs; por sus siglas en inglés) y su capacidad de degradación en sus gránulos citoplasmáticos que contienen mediadores solubles, enzimas, péptidos antimicrobianos y moléculas con potencial REDOX. También, poseen la capacidad de activación y maduración de otras células del sistema inmune.

2.9.1.1.2.2. Eosinófilos y basófilos

Los eosinófilos son los leucocitos PMN que retienen colorantes ácidos tal como la eosina. En mamíferos, estas células son las principalmente implicadas en la destrucción de parásitos intracelulares y las que modulan las reacciones inflamatorias presentes en alergias. Los eosinófilos han sido descritos en muchas especies de peces. En la dorada, una especie estudiada en esta tesis, se ha observado que los eosinófilos muestran una alta expresión de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II; por sus siglas en inglés) y de la capacidad fagocítica, sugiriendo con esto el rol de estas células en la presentación de antígenos (Cuesta *et al.*, 2006).

Por su parte, los basófilos son un tipo de leucocito granular poco descrito en peces, lo más que se conoce es las caracterizaciones basadas en su morfología y su contenido de grandes gránulos metacromáticos (Ellis, 1977).

2.9.1.1.2.3. Mastocitos

Los mastocitos en peces tienen propiedades estructurales y funcionales similares a las de los mastocitos en mamíferos. Los gránulos de estas células contienen fosfolípidos y mucopolisacáridos, y además presentan fosfatasa alcalina y ácida y acilulfatasas. Estudios hechos en peces teleosteos indican que, como en mamíferos, los precursores de mastocitos dejan el sistema hematopoyético y entran a los tejidos por el torrente sanguíneo y posteriormente ocurre la maduración. Posteriormente, estando en el sitio de daño o infección los mastocitos actúan degranulando y posteriormente actúan con inflamación y vasodilatación (Dezfuli y Giari, 2008).

2.9.1.1.2.4. Células Rodlet

En teleosteos, las células Rodlet son células secretoras que están localizadas en el endotelio del sistema cardiovascular, el epitelio del intestino, y en otros epitelios de muchas especies de peces. Su principal función es la degranulación de parásitos secretando sustancias que están presentes en el citoplasma y que contribuyen a la eliminación de parásitos.

2.9.1.1.2.5. Células dendríticas

En peces, no ha sido identificada una publicación bien definida de células dendríticas (DCs; por sus siglas en inglés) con las capacidades que se tienen identificadas en mamíferos. Sin embargo, algunos estudios recientes identifican leucocitos con características y funciones similares a las de las DCs. En el pez zebra, una población celular de leucocitos, con alta afinidad por la lectina aglutinante del cacahuete y con la morfología clásica de las DCs de mamíferos y con funciones similares como la capacidad de fagocitosis de bacterias y activación de linfocitos T por la presentación de antígenos fue identificada por Lugo-Villarino *et al.*, 2010. En trucha arcoíris, se implementó un protocolo a partir de mamíferos de enriquecimiento de DCs a partir de tejidos de bazo y riñón cefálico. Las células obtenidas fueron capaces de fagocitar, tenían una morfología parecida a las DC clásicas y se activan a partir de TLRs. Sin embargo, es necesario profundizar más acerca del conocimiento de estas células. Aún no es posible diferenciarlas por marcadores moleculares de las células B ya que ambas son consideradas

presentadoras de antígenos profesionales y capaces de fagocitar y presentar epitopes a través de MHC II, tal y como se realiza en mamíferos, por lo que es necesario marcadores específicos para peces entre los receptores CD19 y receptores como CD205 y llevar a cabo su caracterización completa (Johansson *et al.*, 2012).

2.9.1.2. Moléculas del sistema inmune innato (factores solubles)

2.9.1.2.1. Complemento

El sistema del complemento es un mecanismo antiguo del sistema inmune presente en organismos vertebrados e invertebrados. Consta aproximadamente de 30 proteínas, asociadas al citoplasma y la membrana citoplasmática. Tienen un amplio rango de funciones, entre las que se incluyen la eliminación del patógeno invasor, respuesta inflamatoria, la limpieza de los desechos de las células y modulación de la respuesta inmune adaptativa. Existen tres vías de activación de estas moléculas: la vía clásica, la vía alternativa y la vía lectinas. Las tres, incluyen un complejo de proteasas. La C3 convertasa inicia la formación de complejos para iniciar la degradación y eventos de activación de opsoninas, componentes quimiotácticos y la activación de C5.

La vía clásica forma parte de la respuesta inmune adaptativa y requiere de inmunocomplejos (complejos de antígeno-anticuerpo) para la activación del complejo C1 que junto con el complejo C2 y C4 conforman la formación de la proteasa C3 convertasa. Por otro lado, la vía alternativa y la vía lectina pueden activarse por la hidrólisis del complejo C3 o antígenos sin la presencia de anticuerpos como parte de la respuesta innata. En la vía alternativa, la activación espontánea de C3 y su unión a la superficie de los microbios conduce a la interacción con los factores plasmáticos B y D y finalmente conducen la formación del complejo proteasa C3 convertasa. La vía lectina, está basado en la interacción de lectinas, como la unión a manosa y ficolinas con motivos de azúcar encontrados en la superficie de los microbios activando de esta manera un sistema de proteasas asociado a serin-proteasas que activa los componentes C2 y C4 del complemento de una manera similar a la vía clásica (Nakao *et al.*, 2011).

2.9.1.2.2. Lectinas

Las lectinas son carbohidratos oligoméricos unidos a proteínas caracterizados por el reconocimiento de carbohidratos con alta afinidad a moléculas de azúcar. En su gran mayoría se encuentran ubiquitinadas y esta regula la función en la mediación interacciones célula-célula, regulación de homeostasis y para el reconocimiento de carbohidratos por el sistema inmune. En los peces, existe una gran diversidad de lectinas de las cuáles han sido descritas familias como lectinas tipo C, galectinas, pentraxinas, lectinas tipo X, calnexinas, y calreticulinas. También, lectinas descritas por únicamente en peces: las lectinas tipo F, lectinas con unión a ramanosa y las puflectinas. La expresión de estas lectinas es específica en diferentes tejidos lo que sugiere el distinto rol en la inmunidad innata y adaptativa en peces (Vasta *et al.*, 2011). Algunas lectinas se unen con ligandos exógenos, mientras que otras se unen a los azúcares presentes en la superficie de sus potenciales patógenos; además participan en su reconocimiento y opsonización, algunas lectinas juegan roles efectores adicionales como la activación del complemento y regulación de las funciones inmunes. Por otro lado, algunas lectinas en peces median procesos no inmunes a través del reconocimiento de ligandos exógenos (Vasta *et al.*, 2011).

2.9.1.2.4. Lisozima y proteasas

La lisozima es una enzima mucolítica que actúa sobre las paredes de peptidoglicano catalizando la hidrólisis de los enlaces entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil-D-glucosamina. Esta enzima es producida por monocitos-macrófagos y neutrófilos. Por tanto, abunda en tejidos linfoides, en suero y moco. La lisozima encontrada en suero ha sido identificada en prácticamente todas las especies de acuicultura y se ha demostrado su participación en respuesta ante infecciones, estrés fisiológico y en la modulación de la homeostasis (Fast *et al.*, 2002; Lie *et al.*, 1989; Saurabh y Sahoo, 2008).

Entre los otros factores humorales está la α -macroglobulina, que puede inhibir las proteasas de los patógenos actuando en contra de los patógenos (Armstrong y Quigley, 1999) y enzimas líticas como las hidrolasas y catepsinas que han sido

descritas en peces, pero su rol en el sistema inmune ha sido poco explorado. Estas enzimas son capaces de hidrolizar proteínas presentes en membrana de los patógenos, interrumpiendo así la adhesión a tejidos y, por tanto, evitando infecciones (Magnadotir, 2006).

2.9.1.2.5. Moco

El moco representa la interfase bioquímica entre los peces y el ambiente acuoso externo que está continuamente expuesto a microbios y estresores. Toda la superficie en contacto con el ambiente externo está cubierta por una capa mucosa incluyendo la piel, las branquias y el intestino. La composición, estructura y grosor del moco puede variar dependiendo de las condiciones de ubicación de los peces, las condiciones fisiológicas e inmunológicas. Las funciones de esta barrera mucosa incluyen aspectos mecánicos, inmunológicos y fisiológicos. El moco es producido por células secretorias y está compuesto de una matrix de glicoproteínas (mucinas) que confieren una estructura gelatinosa y contiene diversos factores humorales del sistema inmune con actividades bactericidas y bioestáticos contra patógenos que incluyen inmunoglobulinas, factores del complemento, péptidos antimicrobianos, proteína C-reactiva, lectinas, lisozima, enzimas proteolíticas, fosfatasas y esterases (Alexander y Ingram, 1992 y Palaksha *et al.*, 2008).

2.9.2 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa básicamente en peces es similar a la de mamíferos mediándose principalmente por los linfocitos B y T, así como las células NK (Natural Killer por sus siglas en inglés). En mamíferos, los linfocitos B y T median la respuesta inmune específica y por lo tanto una respuesta adaptativa.

Las células B expresan sus receptores de antígenos en la superficie y se conoce como receptor de células B (BCR; por sus siglas en inglés). Estas células secretan inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos; mientras que las células T contienen el receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés) que se une a receptores de superficies celulares. En ambos casos, los receptores están compuestos por la región variable múltiple (V), región diversa (D) y la región de

unión (J) estos segmentos son combinados en conjunto aleatoriamente junto con el segmento constante (C). Este receptor maduro es nombrado como receptor de antígenos VDJC. Este proceso produce un vasto repertorio de estructuras para el reconocimiento de antígenos en las células T y B.

2.9.2.1. Células B y anticuerpos

En peces, las células B producen 3 diferentes isotipos de Igs, los cuáles son IgM, IgD e IgT que está última en el pez cebra ha sido llamada IgZ (Danilova *et al.*, 2005). Las inmunoglobulinas IgM e IgD son esenciales su presencia en todos los peces teleósteos e IgT/Z solo en algunos teleósteos (Fillatreau *et al.*, 2013). En peces, al igual que en mamíferos, la principal función de las células B son la producción de anticuerpos y la presentación de antígenos; y en el caso de los peces teleósteos también incluye la activación de la fagocitosis y capacidad antimicrobiana (Salinas *et al.*, 2011). Una vez que las células B son activadas por un antígeno, parte de esta progenie se convierte en células secretoras de anticuerpos (ASC; por sus siglas en inglés), mientras que otras se convierten en células de memoria de medio y largo plazo. La presencia y características de estas células B en distintos órganos está distribuida de acuerdo a las distintas especies. Sin embargo, se conoce claramente que IgM e IgT están presentes en todos los tejidos mucosos e IgT se ha visto en su mayoría de las veces en las infecciones virales o en la vacunación con ADN. Como dato importante, en peces, la mayoría de las células B se encuentra presente en el intestino dónde la población celular es alrededor del 54.3%, seguido de la sangre, bazo y riñón cefálico (Zhang *et al.*, 2010).

2.9.2.2 Células T

Las células T son caracterizadas por la presencia del receptor de células T (TCR) para el reconocimiento de antígenos. Las células T reconocen antígenos únicamente mediante el proceso de presentación de antígenos por MHC I y II. Estas células además pueden clasificarse por las cadenas del receptor TCR los cuáles son $\alpha\beta$ -T y $\gamma\delta$ -T. Las células T $\alpha\beta$ son catalogadas como las células T convencionales, mientras que las células T $\gamma\delta$ reconocen antígenos de manera

similar que reconocimiento de patrones y están más dentro de las células de la respuesta inmune innata, presentándose en epitelio representando alrededor del 2% de todas las células T.

Las células T $\alpha\beta$, son divididas a su vez, como células Tc (Células T citotóxicas) y células Th (células T helper). Las células Th son distinguidas a su vez por la presencia de glicoproteínas en membrana en CD8 y CD4. En peces teleósteos, han sido descritos distintos tipos de células Th, entre las que predominan las Th1, Th2, Th17, Th22 y T reg (Células T reguladoras). Las células Th1 son encargadas de secretar citocinas efectoras como interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) para el control de organismos patógenos intracelulares, así como la producción IL-2. Por otro lado, las células Th2 están relacionadas a estimulación de células B y el control de organismos patógenos extracelulares a través de la secreción de anticuerpos, produciendo IL-4, IL-5 e IL-13. Por su parte, las células Th17 producen IL-17 junto con IL-21 e IL-22 y se han visto envueltas en el control de infecciones bacterianas extracelulares, así como infecciones fúngicas. Por último, las células Th22 son una población recientemente descubierta y se ha observado secreta IL-22 pero no IL-17 estando implicadas principalmente en la reparación epidermal (Kleinewietfiell y Hafler, 2013).

2.10. ToxA como antígeno candidato a vacuna en peces

Esta toxina fue identificada en *Photorhabdus luminescens*, bacteria que mantiene una relación simbiótica con nemátodos entomopatogénicos (Waterfield *et al.*, 2005). La ToxA juega un rol importante con la Tox B, ya que se requiere que actúen como toxina binaria y estas dos proteínas son codificadas por los genes *pir A* y *pir B*, y son necesarias para que exista una toxicidad en mosquitos (Blackburn *et al.*, 2006). Se ha observado que la patología de la toxina PirAB (binaria) en la larva de la polilla afecta el epitelio del intestino medio, provocando inflamación y desprendimiento de las membranas apicales (Ahantarig *et al.*, 2009). En el sector acuícola, esta toxina binaria PirAB-like se ha visto implicada en la infección causada por *V. parahaemolyticus* en camarones provocando la enfermedad de la

Necrosis Aguda del Hepatopáncreas. La patología es similar a la del intestino medio de los insectos afectados por dichas toxinas (Han *et al.*, 2015).

Lee *et al.* (2015) caracterizaron estas proteínas por cristalografía y describieron que la ToxA presentó homología estructural con el dominio III de la proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*, relacionada con la capacidad de reconocer receptores expuestos en membranas celulares. La función de este dominio presente en la proteína Cry funciona interactuando a un receptor al azúcar GalNAc en el dominio peptidasa. El enlace con este dominio ayuda a la proteína Cry a interactuar con el receptor caderina, el cual produce un oligómero que provoca la formación del poro. Por este poro e interacción de produce la desestabilización iónica y rompimiento del citoesqueleto celular. Esta similitud estructural de ambas toxinas sugiere que ToxA/ToxB de manera binaria usan una estrategia parecida para la muerte celular.

La ToxA ha sido evaluada en peces anteriormente y demostró tener un potente efecto estimulante y protector frente a un reto bacteriano (Reyes-Becerril *et al.*, 2016). Los resultados de esta investigación mostraron que los efectos son en el sistema inmune humoral (SOD, CAT, Mieloperoxidasa y actividad anti-proteasa) y expresión de los genes inmunoglobulina M (IgM) y IL-1 β después de un reto bacteriano frente a *Vibrio parahaemolyticus*.

3. JUSTIFICACIÓN

La vibriosis causa pérdidas millonarias a nivel mundial en acuicultura y no existe una vacuna comercial efectiva por lo que se requieren alternativas para el control de esta enfermedad. Entre las opciones se encuentra el antígeno ToxA y la levadura *K. lactis* y sus β -glucanos que podrían fortalecer el sistema inmune y aumentar la resistencia contra la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus*.

4. HIPÓTESIS

Si la administración de levaduras probióticas y sus β -glucanos así como la ToxA confieren protección contra la vibriosis, entonces, *K. lactis* M3, sus β -glucanos o la combinación de β -glucanos: ToxA estimularán una respuesta inmune y aumentarán la resistencia contra la vibriosis causada por *V. parahaemolyticus* en peces.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta inmune y la inmunoprotección inducida de *K. lactis* M3 y sus β -glucanos en combinación con la ToxA contra la infección por *V. parahemolyticus* en peces.

5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar *in vitro* e *in vivo* el potencial probiótico e inmunoestimulante de *K. lactis* M3.
2. Evaluar *in vitro* e *in vivo* el potencial inmunoestimulante de β -glucanos de *K. lactis* M3.
3. Caracterizar *in silico* el receptor de reconocimiento de β -glucanos, MINCLE del huachinango (*Lutjanus peru*).
4. Analizar *in vitro* e *in vivo* la actividad inmunoestimulante y protectora de la combinación de β -glucanos de *K. lactis* M3 con la ToxA recombinante.
5. Analizar la respuesta inmune innata entrenada en peces por el β -glucano obtenido de *K. lactis* M3

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Ensayos *in vitro* de la levadura *Kluyveromyces lactis* M3

6.1.1 Cultivo de levaduras

La levadura cepa M3 identificada como *Kluyveromyces lactis* fue cultivada en medio YPD líquido (peptona 20g/L, dextrosa 20g/L y extracto de levadura 10 g/L) además se le agregó 1µL/mL de medio de cloranfenicol (50 mg/mL) se incubó a las siguientes condiciones: 30°C con agitación constante a 120 rpm durante 48 horas para obtener la biomasa fresca necesaria para los siguientes procedimientos.

6.1.2 Tolerancia a pH

Para el ensayo de tolerancia a distintos valores de pH las levaduras fueron inoculadas a una dilución de 1:10 v/v en medio líquido de YPD que estaban ajustados a distintos pH (2.5, 3.5, 4.5 y 5.5) que fue ajustado con HCl al 2 M. Como control, se utilizó medio YPD ajustado a pH 6.5. Los cultivos fueron incubados a 30 °C, 120 rpm durante 30 minutos. Más tarde, se realizaron diluciones seriadas inoculando 100 µL de cada dilución en placas Petri con agar YPD por triplicado. Las placas fueron incubadas a 30 °C y se monitoreó el crecimiento durante 24 h.

6.1.3 Tolerancia a sales biliares

Biomasa de levadura fue ajustada a una concentración de 1×10^9 células/mL en tampón PBS. Para el ensayo de tolerancia de sales biliares, el medio YPD fue preparado con sales biliares de dorada en una proporción de 50% de medio YPD, 40% de PBS y 10% de bilis de dorada), posteriormente las levaduras fueron inoculadas en un 10% y se incubó durante 90 minutos a 29 °C con agitación de 150 rpm. Posteriormente se realizaron diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) y se incubaron en placa durante 24 horas.

6.1.4 Tolerancia a salinidad

El crecimiento de la levadura *K. lactis* M3 fue evaluado en medio YPD en presencia de distintas concentraciones de NaCl (Cloruro de Sodio; 0, 1.5, 3 y 6.5 %) de acuerdo a Font de Valdez y Taranto, 2001. 5 mL de medio YPD

conteniendo las concentraciones de NaCl inoculado con 50 μ L de cultivo primario de levadura. Cada tubo fue incubado a 30 °C por 24, 48 y 72 horas. Se tuvieron tubos control sin inocular como controles negativos.

6.1.5 Adhesión a intestino de dorada

Las levaduras fueron ajustados a una concentración de 1×10^9 células/mL en tampón PBS (pH 7.4) y éstas fueron marcadas con DTAF (5- (4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína) de acuerdo a la técnica de Tovar *et al.*, 2002. Para el ensayo de la capacidad de adhesión, el intestino de dorada (*Sparus aurata* L.) fueron disectados para obtener segmentos de intestino posterior. Esta sección fue lavada con PBS e incubada con 200 μ L de levaduras etiquetadas con DTAF durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS de la sección posterior a la incubación para remover el exceso de levadura marcada con DTAF. Luego, las secciones fueron ensamblados en cortes frescos y montados en portaobjetos para su visualización en microscopio.

6.1.6 Ensayo de hidrofobicidad y autoagregación celular

Para la realización de esta técnica, se cultivó la levadura un día antes y se ajustó hasta una absorbancia óptima de 0.5 ± 0.02 medida tomada a 600 nm (DO inicial). Las levaduras fueron lavadas dos veces con tampón PBS y posteriormente, 3 mL de estas células fueron puestas en contacto con 1 mL de xileno, la suspensión se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 29 °C hasta observar dos fases de separación. Se tomó la fase acuosa y se midió su absorbancia a 600 nm por triplicado (DO tiempo).

$$\% \text{ hidrofobicidad de superficie celular} = \left(1 - \frac{DO \text{ tiempo}}{DO \text{ inicial}}\right) \quad (1)$$

Para la técnica de autoagregación celular, se ajustó la absorbancia óptima de 0.3 ± 0.02 medida tomada a 600 nm (DO inicial). las células fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, 4.5 mL de esta solución fueron resuspendidas con vórtex e incubadas a 4 °C por 4 h y 24 h. Se tomó 200 μ L de suspensión y se midió la absorbancia por triplicado a 600 nm (DO tiempo). El porcentaje de autoagregación fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de autoagregación} = \left(1 - \frac{DO_{\text{tiempo}}}{DO_{\text{inicial}}}\right) \quad (2)$$

6.1.7 Actividad DPPH

La actividad captadora de radicales libres fue medida por el método de DPPH. De forma breve, se ajustó la levadura a una densidad óptica de 1.0 equivalente a 1×10^8 células/mL en buffer de PBS. Dos mililitros de levaduras intactas se añadieron en contacto con 2 mL de solución de DPPH al 0.4 mM (Preparada en metanol absoluto) y mezcladas, posteriormente se incubaron a 29 °C durante 30 minutos en oscuridad. Después de la incubación la reacción fue centrifugada a 8000 $\times g$ durante 10 minutos a 4 °C y la absorbancia del sobrenadante se leyó por triplicado a 517 nm. PBS mas solución de DPPH fue utilizada como blanco y BHT como control positivo. La capacidad captadora del radical DPPH fue reportada como:

$$\text{Actividad captadora de radical DPPH} = \left(1 - \frac{OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}}\right) \times 100 \quad (3)$$

6.1.8 Actividad ABTS⁺

La capacidad captadora del radical ABTS⁺ de las levaduras fue determinada de acuerdo al método de Ji *et al.* La captación del radical ABTS⁺ fue producida por el contacto entre el reactivo ABTS con de 5.5 mM persulfato de amonio (solución ABTS⁺) y esta solución es dejada durante toda la noche a reaccionar a temperatura ambiente. Antes del uso de la solución, la solución ABTS⁺ fue diluida con agua destilada y ajustada a una absorbancia de 0.7 a 734 nm. 150 μL de levaduras intactas en PBS fueron mezclados con 1.35 mL de solución de ABTS⁺ e incubados durante 10 min a 29 °C posteriormente, la solución fue centrifugada a 8000 $\times g$ durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue medido a 734 nm. PBS mas solución de ABTS⁺ fue utilizada como blanco y ácido ascórbico como control positivo. La capacidad captadora del radical ABTS⁺ fue reportada como:

$$\text{Actividad captadora de radical ABTS} = \left(1 - \frac{OD_{\text{muestra}}}{OD_{\text{blanco}}}\right) \times 100 \quad (4)$$

6.1.9 Actividad captadora de anión superóxido

Para el ensayo de la actividad captadora el anión superóxido primeramente se preparó un buffer con los siguientes reactivos: 50 mM de buffer fosfato sodio-fosfato monobásico, 13 mM de metionina, 100 μ M de EDTA pH 8.0, 75 μ M de NBT, 2 μ M de riboflavina. Posteriormente, se puso en contacto 50 μ L de células intactas disueltas en PBS con 1 mL del tampón anterior. Se incubó con luz directa durante 10 minutos a 29 °C y posteriormente se centrifugó a 8000 \times g durante 10 minutos a 4 °C se tomaron 200 μ L por triplicado y se realizó una lectura en espectrofotómetro a 560 nm. PBS mas el tampón fue utilizado como blanco y BHA como control positivo. La capacidad captadora del anion SO fue reportada como:

$$\text{Actividad captadora del anion SO} = \left(1 - \frac{OD \text{ muestra}}{OD \text{ blanco}}\right) \times 100 \quad (5)$$

6.1.10 Ensayo de potencial reductor férrico

Para realizar el ensayo FRAP (Por sus siglas en inglés; Ferric Reducing Antioxidant Power) se realizó de la siguiente manera, se preparó una solución FRAP con 25 mL de buffer acetato (40 mM), 2.5 mL de solución TPTZ (10 mM) y 2.5 mL de FeCl₃ (20 mM), posteriormente se incubó 75 μ L de células intactas disueltas en PBS más 1425 μ L de solución FRAP. La mezcla fue incubada en oscuridad durante 30 minutos a 30 °C, la muestra se centrifugó a 8000 \times g durante 10 minutos a 4 °C y se tomaron 200 μ L de sobrenadante y se leyeron a 593 nm.

6.1.11 Perfil de ácidos grasos en *K. lactis* M3

Los lípidos totales fueron extraídos de *K. lactis* M3 de acuerdo al método de Folch *et al.*, 1957 y metil esteres fueron generados por transesterificación de catálisis ácida de los lípidos totales de acuerdo a Morrison y Smith, 1964. La extracción fue realizada con n-hexano y las muestras fueron separadas por cromatografía de gases (GCMS-TQ8030, Duisburg, DE). La temperatura fue programada en el cromatógrafo de gases por 5 minutos a una temperatura inicial de 140 °C e incrementos a una velocidad de 3°C/min hasta 230 °C, posteriormente este

incremento se realizó a una velocidad de 2 °C/min hasta llegar a 240 °C de temperatura por 12 minutos. El inyector y la flama de ionización fueron posicionados a 260 °C. Helio fue usado como acarriador de gases a una presión de 300 kPa, y los picos fueron identificados comparando los tiempos de retención con los estándares apropiados de metil esteres de ácidos grasos. La concentración fue expresada como un porcentaje total del contenido.

6.1.12 Viabilidad celular

La viabilidad celular en leucocitos para este ensayo fue medida mediante la técnica de MTT. Esta consistió en poner en placas de 96 pozos de fondo plano los leucocitos a una concentración de 1×10^9 células/mL en contacto con *K. lactis* M3 incubadas durante 12 h y 24 h. Posteriormente, se determinó la viabilidad de las células usando la técnica de MTT el cuál se basa en la reducción de la sal soluble de tetrazolio (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) de color amarillo a color azul, formando un producto insoluble a causa de la succionato dehidrogenasa mitocondrial. Después de la incubación con la *K. lactis* M3 las células fueron lavadas con PBS y se agregaron 200 μ L por pozo de una solución de MTT (1 mg/mL). Seguido de 4 horas de incubación, la placa fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos a 23 °C y después las células fueron lavadas de nuevo y los cristales de formazan fueron solubilizados con 100 μ L de DMSO. Las placas fueron agitadas durante 5 minutos a 100 rpm en oscuridad y después la absorbancia fue leída a 570 nm y 690 nm en un lector de microplacas.

6.2 Ensayos *in vitro* del β -glucano aislado de *Kluyveromyces lactis* M3

6.2.1 Extracción del β -glucano.

Se partió de un cultivo de levaduras de acuerdo a la sección 5.1, posteriormente las levaduras fueron escaladas a matraces de cultivo de 3 L. Después, fueron cosechadas en frascos de centrifuga de 250 mL, a 6000 rpm durante 15 minutos. Después, la levadura fue liofilizada por toda la noche y el peso seco igual a 2 g fue utilizado para partir con la extracción de β -glucano.

El β -glucano a partir de biomasa liofilizada se extrajo de la siguiente manera: se agregaron 40 mL de solución de NaOH al 3% en baño maría a 100°C

durante 3 h, posteriormente, los glucanos fueron mantenidos a temperatura ambiente por una noche. Después, la suspensión se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 minutos para coleccionar el extracto insoluble y resuspenderlo en 40 mL de solución de NaOH al 3%, calentarlo en baño maría a 100°C durante 3 y mantenerlo una noche a temperatura ambiente. El material obtenido fue resuspendido con 0.5 N de ácido acético a 75 °C por 6 horas y separado por centrifugación a 8,000 rpm durante 15 minutos. La fracción final fue resuspendida en etanol absoluto, hervida y centrifugada de nuevo. Este último paso fue repetido por 3 ocasiones. Finalmente, la fracción coleccionada fue lavada cuidadosamente con agua destilada y liofilizada durante 48 horas. El producto final fue utilizado para realizar los ensayos correspondientes.

6.2.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

25 mg de β -glucano fueron disueltos en DMSO- d_6 y llevados a análisis de RMN de H^1 . El análisis fue corrido a 80 °C en un espectrómetro Bruker Avance 600 Mhz. Los desplazamientos químicos por RMN fueron referidos para el residual DMSO- d_6 de protón múltiple de resonancia a 2500 ppm. El datos espectrales y condiciones fueron las siguientes: 25 ppm de ancho espectral centrado a 5 ppm, 32768 puntos de datos, 15 s de pausa, 32 exploraciones y 0.2 Hz de apodización exponencial.

6.2.3 Peso molecular

El peso molecular de β -glucano fue determinado por cromatografía de exclusión de tamaño con dispersión de luz multi-ángulo (SEC-MALS, Wyatt, Santa Barbara, CA) con una columna de retención (Shodex OHPAK SB804 HQ + SB 803HQ in series, Shodex, Tokio, JP). Se utilizó estándar (P-MWBGS, Megazyme Inc., Chicago, USA) de 650,000 g/mol a 35,600 g/mol para calibrar el método de determinación del peso molecular del β -glucano.

6.2.4 Medición del contenido de carbohidratos

Para la realización de esta prueba se disolvió β -glucano aislado de *Kluyveromyces lactis* M3 a una concentración de 2.5 mg/mL fueron calentados en autoclave a 135 °C durante cuatro horas. Se tomaron muestras una hora y cuatro horas posterior y

el sobrenadante fue filtrado a través de filtro de 0.2 μm . El contenido de carbohidratos fue determinado por el método de fenol-ácido sulfúrico de acuerdo al método de Dubols *et al.*, 1956. Por lo tanto, se añadieron 12.5 μL de fenol (80% peso/volumen) y se añadió 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado a las muestras. Después, las muestras fueron incubadas en baño maría a 25 °C por 30 minutos. La densidad óptica fue medida a 490 nm. Glucosa se utilizó como curva estándar de referencia.

6.2.5 Viabilidad celular

Fue realizada de acuerdo a la técnica de MTT explicada en la sección 5.11.

6.2.6 Caracterización antioxidante de β -glucano KIM3.

5.2.6.1 Determinación de la capacidad captadora de radical H (Ensayo DPPH).

La actividad captadora de radical superóxido fue analizada de igual manera que la sección 5.9. El β -glucano KIM3 fue disuelto en metanol a concentraciones de 50-300 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.6.2 Determinación de la capacidad captadora de radical superóxido.

La actividad captadora de radical superóxido fue analizada de igual manera que la sección 5.8. El β -glucano KIM3 fue disuelto en metanol a concentraciones de 50-300 $\mu\text{g/mL}$.

6.3 Ensayo *in vitro* de β -glucano KIM3 en leucocitos.

6.3.1 Diseño experimental

Para este experimento, se probaron 2 dosis de β -D-glucano aislado de *K. lactis* M3 y un control para evaluar la protección de este frente a un reto con dos bacterias patógenas de peces, *V. parahaemolyticus* y *P. damseale*. Se administró en dieta 125 mg y 250 mg por kilogramo de pez diariamente a doradas durante 20 días. Al finalizar, se extrajeron leucocitos de riñón cefálico como se describe en la sección 5.2. Una concentración final de leucocitos de 1×10^6 células/mL fueron retados durante 24 horas con las bacterias *V. parahaemolyticus* y *P. damseale* a una concentración de 1×10^9 células/mL. Al finalizar ese tiempo, se realizaron los siguientes análisis que se describen a continuación.

6.3.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida por citometría de flujo, de acuerdo a la técnica de IP (Ioduro de Propidio). 50 μ L leucocitos fueron puestos en tubos FACS de 5 mL y se añadieron 50 μ L de Ioduro de Propidio (IP; 400 μ g/mL; Sigma-Aldrich) a cada tubo muestra. Los tubos fueron mezclados gentilmente y analizados en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickson, Madrid, Spain) con un láser de argón ajustado a una densidad óptica de 488 nm. El análisis fue llevado a cabo con una adquisición de 5000 células a una velocidad de 300 células/s. Los datos fueron colectados por dos parámetros de granularidad versus tamaño y se midió el porcentaje de células teñidas con IP estimándose con este el porcentaje de células muertas (células fluorescentes en color rojo detectadas por el canal FL2). Las células no teñidas con IP (detectadas por el canal FL1) fueron tomadas como células viables.

6.3.4 Ensayo de fagocitosis

Este estudio fue realizado por citometría de flujo. Células liofilizadas y atenuadas por calor de *S. cerevisiae* cepa S288C fueron lavadas dos veces y ajustadas a una concentración de 10^8 células/mL en medio suplementado de RPMI. Las levaduras fueron marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés; a una concentración de 5 mg/mL) a 22 °C con agitación constante durante 15 minutos. Las levaduras fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el FITC que se encontraba libre en la solución. Para el ensayo de fagocitosis, 60 μ L de levaduras marcadas fueron incubados con 100 μ L de leucocitos estimulados. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 23 °C. Posteriormente, se resuspendieron y se incubaron a 23 °C durante 30 minutos en oscuridad. Al final de la incubación, para detener la reacción se añadió 400 μ L de PBS frío a cada reacción. La fluorescencia de las células que no fueron fagocitadas fueron apagadas añadiendo 50 μ L de azul de tripán frío. Todas las muestras fueron analizadas en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) con un láser de argón ajustado a 488 nm.

6.3.5 Explosión respiratoria

La técnica de explosión respiratoria fue realizada de acuerdo al método de quimioluminiscencia. Brevemente, 100 μ L de tampon Hanks balanceado en sales que contenía 1 mg/mL de forbol meristato acetato (PMA) y 10^{-4} M de luminol y se añadieron a 100 μ L de leucocitos incubados previamente a las condiciones anteriores. Las placas fueron agitadas e inmediatamente leídas en un quimioluminometro (BMG, FluoStar Galaxy). Las medidas fueron desarrolladas en 30 ciclos durante 2 minutos cada una. Las cinéticas de cada reacción fueron analizadas y el máximo de la pendiente de cada curva fue calculado. Las muestras control contenían leucocitos que no tenían la levadura.

6.3.6 Actividad peroxidasa

El ensayo se realizó con leucocitos tratados con levadura atenuada a distintas temperaturas. Posteriormente, 20 μ L de leucocitos tratados se incubaron durante 10 minutos con 0.002% de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) a 60 rpm. Posteriormente, 100 μ L de 10 mM de TMB y 5 mM de H_2O_2 fueron añadidos y dos minutos después la reacción se detuvo con 50 μ L de 2M de ácido sulfúrico. La absorbancia de las muestras se leyó a 450 nm en un lector de microplacas. Las muestras control se utilizaron leucocitos sin levadura.

6.3.7 Óxido nítrico

La producción de óxido nítrico fue determinada de acuerdo a Neumann *et al.*, 1995. Se agregaron 100 μ L de moco y fueron incubados con un volumen igual de solución de reactivo de Griess (1 mg/mL) en placas de 96 pozos, se mezclaron y se incubaron en obscuridad durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a una densidad óptica de 562 nm.

6.4 *In vivo* levadura administrada a dorada (*Sparus aurata* L.)

6.4.1 Cultivo de levaduras.

La levadura M3 identificada como *Kluyveromyces lactis* fue cultivada en medio YPD líquido y fue crecida de acuerdo a la sección 5.1.

6.4.2 Elaboración de las dietas experimentales.

Se realizó la elaboración de dos dietas experimentales que fueron elaboradas de acuerdo a Civera y Guillaume (1989). Las dietas fueron suplementadas con el 1.1% y 0.55% de *Kluyveromyces lactis* M3, así como una dieta control que no contenía la levadura. Pellets de comida para peces fueron pulverizados en seco y tamizados a través de un filtro de 0.5 mm después se añadió la levadura fresca a los porcentajes correspondientes y se añadió agua en un 40% del peso total de las dietas a preparar. Posteriormente, el producto fue pasado a través de una máquina para elaborar pasta, los pellets resultantes fueron dejados secar a temperatura ambiente durante 24 h, después los pellets fueron tamizados a un tamaño aproximado de 2 mm. Las dietas contenían 45% de proteína cruda, 13% de lípido, 3% de fibra cruda, 9% de cenizas y 30% de nitrógeno.

6.4.3 Diseño experimental.

Se evaluaron dos dietas experimentales y una dieta control las cuáles fueron administradas por vía oral diariamente en un 2% del peso total de cada pez. Para este experimento se utilizaron un total de 72 peces de dorada (*Sparus aurata*) de un peso aproximado de 20 ± 10 g (Figura 1). Los peces fueron aclimatados en los tanques donde se llevó a cabo el experimento durante una semana y fueron alimentados con dieta comercial. Cada tratamiento estuvo por duplicado y cada tanque tenía un total de 12 peces. La temperatura del agua se mantuvo en 25 ± 2 °C, oxígeno disuelto y una salinidad de 20 ppm. Las dietas fueron administradas diariamente durante un periodo total de 37 días. El esquema consistió en un muestreo al día 15 y 30 de alimentación de las dietas (n=6; peces por tratamiento). El día 31, se realizó un reto infeccioso con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* a una dosis de 1×10^6 células/mL la cual se administró vía intraperitoneal en 10 µL de tampón de fosfatos (PBS). Posterior al reto infeccioso, el día 37 se realizó un muestreo final (Figura 2).

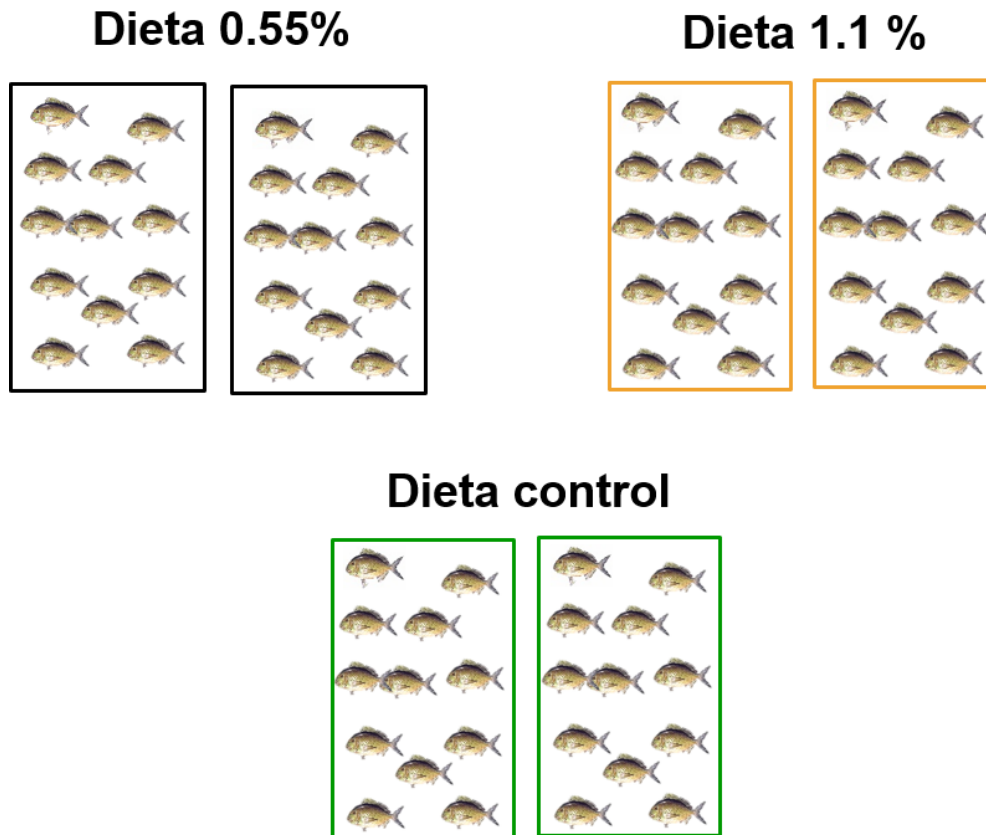


Figura 4. Esquema del montaje de tanques para el bioensayo *in vivo*. Cada tanque contenía 12 doradas, los cuáles fueron alimentados con una dieta comercial y aclimatadas una semana antes de iniciar con las dietas experimentales.

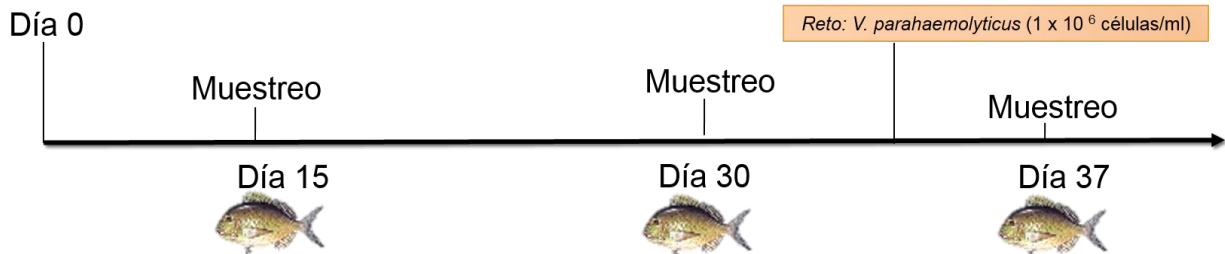


Figura 5. Línea del tiempo de muestreos e infección del ensayo de dieta de *K. lactis* M3 en dorada.

6.4.4 Obtención de las muestras

Se tomaron tres peces de cada réplica (6 peces por tratamiento) y fueron sacrificados a tres tiempos diferentes: día 15, día 30 y una semana posterior a la infección con *V. parahaemolyticus* (día 37). En cada muestreo, los peces fueron anestesiados con aceite de clalvo (0.2 %) y posteriormente sacrificados de acuerdo al código de ética profesional de la Universidad de Murcia. Se tomaron muestras de moco de piel, sangre, intestino en PBS, intestino en ácido fosfórico (0.1%) y para análisis de expresión de génica se tomaron muestras de bazo, riñón cefálico, hígado, intestino y piel las cuáles fueron depositadas en nitrógeno líquido y llevadas inmediatamente a ultracongelación (-80°C).

6.4.5 Determinación de poblaciones celulares por la técnica de DiOC₆

Leucocitos de sangre periférica de dorada se obtuvieron para la determinación de esta prueba. Se preparó una solución de DiOC₆ (3,3-dihexiloxacarbocianina) a una concentración de 500 µg/mL en etanol absoluto. Posteriormente, la solución fue diluida en una relación 1:10 en buffer Hanks. 10 µL de leucocitos fueron incubados en obscuridad por 30 minutos y mezclados con 40 µL de solución DiOC₆ y esto fue examinado en un citómetro de flujo (FACSCalibur). Los análisis fueron analizados por tamaño y complejidad para crear las regiones de poblaciones celulares.

6.4.6. Pruebas en moco.

6.4.6.1 Actividad antiproteasa.

El análisis de actividad antiproteasas se llevó de la siguiente manera: Se preparó tripsina a una concentración de 1mg/mL y azocaseína a una concentración de 1.6 mg/mL ambas disueltas en solución amortiguadora de fosfatos. Se prepararon microtubos estériles con 10 µL de cada una de las muestras de moco y se agregaron 30 µL de tripsina. Se tuvieron dos controles uno positivo y otro negativo. El control positivo se preparó de la siguiente manera: 40 µL de tripsina + 250 µL de azocaseína. El control negativo de la siguiente: 40 µL de solución amortiguadora de fosfatos + 250 µL de azocaseína. Posteriormente se agregaron a las muestras los 250 µL de azocaseína. Las muestras se incubaron

por 1 hora tapadas con aluminio en agitación (Cada 10 minutos se agitaron) a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 6000 ×g por 5 min. Se tomó 100 µL de sobrenadante y se pusieron por duplicado en placa para cada muestra. Se leyó en espectrofotómetro a 490 nm.

El % de inhibición de tripsina se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de tripsina} = \frac{\text{Abs control positivo} - \text{Abs de la muestra}}{\text{Abs control positivo}} * 100 \quad (6)$$

6.4.6.2 Actividad proteasa.

La actividad proteasa presente en el moco fue cuantificada utilizando la hidrólisis de azocaseína de acuerdo con el método descrito por Ross *et al.*, () 10 µL de las muestras de moco fueron incubadas con 100 mM de tampón de bicarbonato de amonio que contenía 0.7% de azocaseína durante 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético (TCA; por sus siglas en inglés), entonces la mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a una placa de 96 pozos y se añadió 0.5 N de hidróxido de sodio (NaOH) y la placa se midió a 450 nm en un espectrómetro. El control positivo fue utilizando tripsina (100% de actividad) en lugar de moco y como control negativo utilizando tampón (0% de actividad).

6.4.6.3 Lisozima.

De acuerdo al método descrito por Lange y Rudolph, 2005, la actividad fue determinada en el moco de los peces estimulados con la levadura durante la dieta experimental de la siguiente manera: en una placa de 96 pozos se agregaron 100 µL de una suspensión de *Micrococcus lysodeiticus* (0.4 mg/mL) en PBS. Posteriormente, se inició la reacción añadiendo 100 µL de moco. La densidad óptica fue tomada a 570 nm durante 60 minutos. Una unidad de actividad de lisozima fue definida como una la cantidad de moco que causa el decremento en la absorbancia de 0.001 unidades por minuto.

6.4.6.4 Peroxidasa

El análisis de mieloperoxidasa se llevó a cabo por duplicado en placa de 96 pozos, se agregaron 10 μ L de suero a cada pocillo. Mientras tanto, en un tubo separado se agregaron 40 mL de agua destilada, 1 pastilla de sustrato TMB (Num. de catálogo #S5814, Sigma®) y se agregó peróxido de hidrógeno al 30% de dicha mezcla se agitó en obscuridad hasta desvanecer completamente la pastilla y se agregaron 50 μ L a cada pocillo. Después de la conversión se paró la reacción con ácido sulfúrico 2 M (con 50 μ L). Se leyó la placa a 450 nm en espectrofotómetro.

6.4.6.5 Elisa para detección de IgM

Se cuantificó la IgM total en mucus por la técnica de ELISA indirecta. Se realizó en placa de 96 pozos, dónde se recubrieron las placas con 100 μ L de mucus a una dilución 1:200 y fueron incubados toda la noche a 4°C. Después los pozos fueron bloqueados con albumina sérica bovina (BSA; por sus siglas en inglés) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 μ L de anticuerpo policlonal IgM (Aquatic Diagnostic) a una dilución 1:1000 a cada pozo e incubados por 1 hora y 30 minutos a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos-Tween 20 y se incubó con 100 μ L de anticuerpo secundario anti-ratón con HRP conjugada por 1 hora y media a 37°C. De igual forma se realizaron 3 lavados con PBS -Tween 20. Se reveló la placa en oscuridad con TMB. La reacción fue detenida con 25 μ L de H₂SO₄ 2M y se midió absorbancia a 490 nm.

6.4.6.6 Niveles lectina Con A.

Se cuantificaron los patrones de reconocimiento de azúcares por un ELISA de lectinas. Se realizó en placa de 96 pozos, dónde se recubrieron las placas con 100 μ L de moco a una dilución 1:200 y fueron incubados toda la noche a 4°C. Después los pozos fueron bloqueados con albumina sérica bovina (BSA; por sus siglas en inglés) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 100 μ L de lectina biotinilada Con A (*Canavalina ensiformis*) a una dilución 1:100 a cada pozo e incubados por 1 hora y 30 minutos a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 y se incubó con 100 μ L de estreptavidina con HRP conjugada a una dilución 1:1000 por 1 hora y media a 37°C. De igual forma se

realizaron 3 lavados con PBS -Tween 20. Se reveló la placa en oscuridad con TMB. La reacción fue detenida con 25 μL de H_2SO_4 2M y se midió absorbancia a 450 nm.

6.4.6.7 Óxido nítrico.

La producción de óxido nítrico fue determinada de acuerdo a Neumann *et al.*, 1995. Se agregaron 100 μL de moco y fueron incubados con un volumen igual de solución de reactivo de Griess (1 mg/mL) en placas de 96 pozos, se mezclaron y se incubaron en oscuridad durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a una densidad óptica de 562 nm.

6.4.6.8 Actividad bactericida

La actividad bactericida de 3 especies de *Vibrio* patógenas (*V. angillarum*, *V. harveyi* y *V. parahemolyticus*) fueron usadas para determinar la actividad bactericida de muestras de moco de los peces que fueron estimulados y retados con *V. parahaemolyticus*. Colonias frescas de 1-2 mm fueron diluidas en 5 mL de medio TSB líquido y crecidas durante 24 h a 25°C con 250 rpm. Después, para medir la actividad bactericida del moco, se procedió a añadir 25 μL de las diferentes cepas de *Vibrios* fue incubada con 100 μL de moco durante 5 horas a 25°C en placas de fondo cónico. Posteriormente, a las placas se les añadió 20 μL de MTT (1 mg/mL disuelto en PBS) y se incubó durante 20 minutos. Después, las placas fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Después se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 μL de DMSO y el sobrenadante se transfirió a una placa de fondo plano. La densidad óptica de las placas de fondo plano fue leída a 620 nm y 520 nm. Muestras sin moco fueron utilizadas como control positivo (100 % de crecimiento de las bacterias y 0 % de actividad bactericida).

6.4.7 Pruebas en suero.

6.4.7.1 Elisa para detección de IgM

Para esta técnica se utilizó el suero de doradas estimuladas con las dietas experimentales diluido a una concentración 1:500 en buffer de carbonatos, pH 9.6. Posteriormente, se utilizó la misma metodología de la referencia no.

6.4.7.2 Elisa para detección de lectina

De la misma forma, para esta técnica se utilizó el suero de doradas estimuladas con las dietas experimentales diluido a una concentración 1:500 en buffer de carbonatos, pH 9.6. Posteriormente, se utilizó la misma metodología de la referencia anterior.

6.4.7.3 Óxido nítrico.

Se realizó de la misma manera ya descrita.

6.5 Ensayo *In vivo* de β -glucano aislado de *K. lactis* M3 administrado en dieta.

6.5.1 Ensayo de fagocitosis

Este estudio fue realizado por citometría de flujo. Células liofilizadas y atenuadas por calor de *S. cerevisiae* cepa S288C fueron lavadas dos veces y ajustadas a una concentración de 10^8 células/mL en medio suplementado de RPMI. Las levaduras fueron marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés; a una concentración de 5 mg/mL) a 22 °C con agitación constante durante 15 minutos. Las levaduras fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el FITC que se encontraba libre en la solución. Para el ensayo de fagocitosis, 60 μ L de levaduras marcadas fueron incubados con 100 μ L de leucocitos estimulados. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 23 °C. Posteriormente, se resuspendieron y se incubaron a 23 °C durante 30 minutos en oscuridad. Al final de la incubación, para detener la reacción se añadió 400 μ L de PBS frío a cada reacción. La fluorescencia de las células que no fueron fagocitadas fue apagada añadiendo 50 μ L de azul de tripán frío. Todas las muestras fueron analizadas en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) con un láser de argón ajustado a 488 nm.

6.5.2 Explosión respiratoria de leucocitos aislados de riñón cefálico

La técnica de explosión respiratoria fue realizada de acuerdo al método de quimioluminiscencia. Brevemente, 100 μ L de tampon Hanks balanceado en sales que contenía 1 mg/mL de forbol meristato acetato (PMA) y 10^{-4} M de luminol y se añadieron a 100 μ L de leucocitos incubados previamente a las condiciones anteriores. Las placas fueron agitadas e inmediatamente leídas en un

quimioluminometro (BMG, FluoStar Galaxy). Las medidas fueron desarrolladas en 30 ciclos durante 2 minutos cada una. Las cinéticas de cada reacción fueron analizadas y el máximo de la pendiente de cada curva fue calculado. Las muestras control contenían leucocitos que no tenían la levadura.

6.5.3 Actividad peroxidasa

El ensayo se realizó con leucocitos tratados con levadura atenuada a distintas temperaturas. El ensayo se realizó igual que en la sección anterior.

6.6 Ensayo ToxA+ β -D-glucano de *S. halophilus* 4N16

6.6.1 Extracción de leucocitos.

Se aisló leucocitos de riñón cefálico de juveniles sanos de huachinango bajo condiciones estériles. Se tamizó el riñón cefálico en tamices de 40 μ m con medio RPMI-1640 con 3% de heparina. Posteriormente los leucocitos fueron centrifugados a 1500 rpm a 23 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 10 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10%. Se hicieron dos lavados de las células y al final se hizo un tratamiento con solución ACK (Cloruro de amonio más Tris-HCl) para lisar los glóbulos rojos que pudieran quedar. Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células/mL y se procedió a repartir 1 mL de las células en cajas de 24 pozos para agregar los siguientes tratamientos:

1. 5 μ g/mL de ToxA + 20 μ g/mL de β -glucano 4N16
2. 5 μ g/mL de ToxA
3. 20 μ g/mL de β -glucano
4. Leucocitos sin estímulo (Control)

6.6.2 Actividad fagocítica

La fagocitosis de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) fue estudiada después de la estimulación de leucocitos de riñón cefálico con ToxA (5 μ g/mL) + β -glucano (20 μ g/mL) y analizada en un citómetro de flujo (S3e Cell Sorter, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El ensayo se realizó como en la sección anterior.

6.6.3 Ensayo NBT

La explosión respiratoria de leucocitos fue medida como la producción de intermediarios de especies reactivas de oxígeno usando la reducción del azul nitro tetrazolio (NBT). Se agregaron 100 μ L de leucocitos y fueron incubados con solución NBT (1 mg/mL) en obscuridad por 2 horas, lavadas e incubadas por 10 minutos con metanol al 70%, después se lavaron y resuspendieron en 2 M KOH-DMSO. La densidad óptica fue leída a 655 nm en un lector de microplaca.

6.6.4 Óxido nítrico

La producción de óxido nítrico en leucocitos estimulados fue determinada por la reacción de Griess la reacción se realizó como en la sección anterior.

6.6.5 Actividad peroxidasa

La actividad de la peroxidasa en leucocitos fue determinada. 20 μ L de leucocitos estimulados fueron incubados con 100 μ L de 20 mM de TMB y 5 mM de H_2O_2 . Ambos reactivos y sustratos fueron preparados en el mismo día. La reacción fue parada con 50 μ L de 2 M de ácido sulfúrico después de 2 minutos y se leyó la absorbancia a 450 nm.

6.6.6 Actividad antioxidante.

6.6.6.1 Superóxido Dismutasa.

La actividad de superóxido dismutasa fue medida en los leucocitos de riñón café estimados con ToxA + β -glucano por el porcentaje de inhibición de la reacción enzimática de la xantina oxidasa con el colorante cloruro de tetrazolio usando el KIT de ensayo de SOD (Sigma, 19160) de acuerdo con las condiciones de manufactura. Después de 20 minutos incubados a 37 ° C, al final de la reacción, la absorbancia fue medida a 490 nm. La actividad de SOD fue expresada en porcentaje de inhibición.

6.6.6.2 Catalasa.

La actividad de catalasa, fue realizada por el método de Clairborne, se desarrolló de la siguiente manera. El análisis de catalasa se siguió de la siguiente manera. Primeramente, se agregaron 25 μ l de "buffer assay diluted" (el cual

estaba preparado con 2 ml de buffer de fosfatos de potasio 100mM y 18 ml de agua grado HPLC), 25 μ l de metanol y 5 μ l de peróxido de hidrógeno diluido (30%). A cada pocillo se realizó la mezcla y se agregaron 50 μ l de muestra, se incubó en movimiento por 20 min a T.A. Posteriormente se terminó la reacción agregaron 25 μ l de hidróxido de potasio 10 M y 50 μ l de reactivo de purpald. Se cubrió la placa con aluminio y se incubó por 10 min en agitación. Posteriormente se agregó 25 μ l de periodato de potasio 192 mM se incubó por 5 min en agitación a temperatura ambiente (25 °C) con agitación y se leyó en espectrofotómetro a 655 nm.

6.6.7 Expresión de genes.

Para la expresión de genes se realizó una extracción de ARN total con el reactivo de TRIzol (Life Technologies), siguiendo las instrucciones de manufactura. Las muestras fueron tratadas con DNAsa I (1 U/mg) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la reacción se paró la reacción a 70 °C con EDTA. Se sintetizó el cDNA con Oligo-dT (18) a partir de 1 mg de ARN total a 50 °C por 50 minutos. El PCR en tiempo real fue hecho para analizar los niveles de expresión de genes. Cada tratamiento se desarrolló por triplicado. Las condiciones de PCR fueron las siguientes, primeramente, se incubaron las reacciones a 98 °C por 30 segundos, 60 °C por 10 segundos. La especificidad de los productos de la reacción fue analizada por la disociación de la curva melt. La expresión relativa de los productos fue normalizada con el gen de referencia (EF-1 α).

6.6.8 Caracterización de MINCLE.

Se realizó la caracterización del gen CLEC4E o MINCLE (Por sus siglas en inglés; Receptor tipo lectina de macrófagos inducible por Ca²⁺) a partir de un transcriptoma generado de ARN total de riñón cefálico en huachinango (*Lutjanus peru*). La secuencia fue identificada en el transcriptoma y se desarrollaron primers específicos forward y reverso complementario dentro del marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés, ORF). La identidad y similaridad fue comparado con varias secuencias de MINCLE descrita en otros peces disponibles en la base de

datos GenBank. Posteriormente, el punto isoeléctrico y el peso molecular de MINCLE fueron predichos por la herramienta en línea, ExPASy (<http://www.expasy.org/>). Los dominios y motivos presentes en la proteína fueron presentados por el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Además se realizó un alineamiento múltiple en el servidor en línea ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y se obtuvo el árbol filogenético respectivo con el programa MEGA versión 5.0.

6.7 Ensayo Inmunidad Innata Entrenada

Para el ensayo de inmunidad innata entrenada se realizó un aislamiento de leucocitos de bazo como se describió en la sección 5.6.1. Posteriormente, los leucocitos a la concentración celular de 1×10^6 células/mL se repartieron (1 mL) en cajas de 24 pozos y se agregaron los siguientes tratamientos:

1. β G-KIM3 (20 μ g/mL)
2. β G-KIM3 (40 μ g/mL)
3. β G-KIM3 (60 μ g/mL)
4. β -glucano (β -D-Glucan from Barley; Sigma-Aldrich ®) comercial aislado de *S. cerevisiae* (20 μ g/mL)
5. β -glucano (β -D-Glucan from Barley; Sigma-Aldrich ®) comercial aislado de *S. cerevisiae* (40 μ g/mL)
6. β -glucano (β -D-Glucan from Barley; Sigma-Aldrich ®) comercial aislado de *S. cerevisiae* (60 μ g/mL)
7. Leucocitos sin estímulo (Control).

6.7.1 Peroxidación de lípidos (Daño celular)

El ensayo de peroxidación de lípidos se llevó a cabo de acuerdo a la metodología del reactivo FOX (Nourooj-Jadeh *et al.*, 1996.). Se preparó el reactivo FOX con los siguientes elementos: 250 μ M de sulfato de amonio, 100 μ M de Naranja de xilenol, 25 mM H₂SO₄ y 4 mM BHT (disuelto en 90% de metanol). Esta solución tiene una duración aproximada de un mes. De manera general, 90 μ L de

leucocitos a una concentración de 1×10^6 células/mL por tratamiento fueron utilizados y se agregó 10 μ L de TPP (Trifenilfosfina) en metanol en el caso de las muestras a analizar. Las muestras son analizadas cuando son incubadas 30 minutos a TA. Después se añaden 900 μ L de reactivo FOX. Las muestras son centrifugadas a $12,000 \times g$ por 10 minutos, se determina absorbancia a 560 nm. Metanol fue utilizado como blanco.

$$\% \text{ de peroxidación} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} * 100 \quad (7)$$

6.7.2 Parámetros del sistema inmune innato.

6.7.2.1 Actividad fagocítica

El ensayo de fagocitosis fue medido de acuerdo a la técnica de rojo neutro. Para medir la habilidad fagocítica de los leucocitos, se realizó el estímulo, 24 horas después el medido fue removido de la placa y 0.1% (peso/volumen) de rojo neutro en medio RPMI-1640 sin rojo fenol fue añadido a cada pozo e incubado durante 4 horas. Después de 3 lavados con PBS estéril, 100 μ L de solución de lisis celular (ácido acético/etanol = 1:1, v/v) fue añadido a cada pozo e incubado durante 1 hora a 4°C. Después la absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de placa. El porcentaje de fagocitosis fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de fagocitosis} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} * 100 \quad (8)$$

6.7.2.2 Ensayo NBT

La explosión respiratoria de leucocitos fue medida de la misma manera que la citada anteriormente.

6.7.2.3 Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico en leucocitos estimulados fue determinada de la misma manera que la citada anteriormente.

6.7.2.4 Actividad peroxidasa

La actividad de la peroxidasa en leucocitos fue determinada de la misma manera que la citada anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización probiótica.

K. lactis M3 tuvo un crecimiento similar en pH 4.5 y 5.5 comparado con el pH control (pH 6.5). En contraste, el crecimiento de la levadura se vio afectado significativamente a pH 2.5 y 3.5 como se muestra en la Fig. 1a. Por otro lado, *K. lactis* M3 crece en medio YPD suplementado con 10% de bilis de *S. aurata* y se observó el mismo crecimiento comparado con el grupo control (Fig. 1b). *K. lactis* M3 creció de manera similar que el grupo control que cuando este medio fue suplementado con NaCl, con al 1.5% y 2.5%. Sin embargo, el crecimiento se vio reducido al cultivarse en 4.5 o 6.5% de NaCl (Fig. 1c). Además, se observó que la levadura es capaz de unirse al intestino de dorada medido por microscopia de fluorescencia (Fig. 1d).

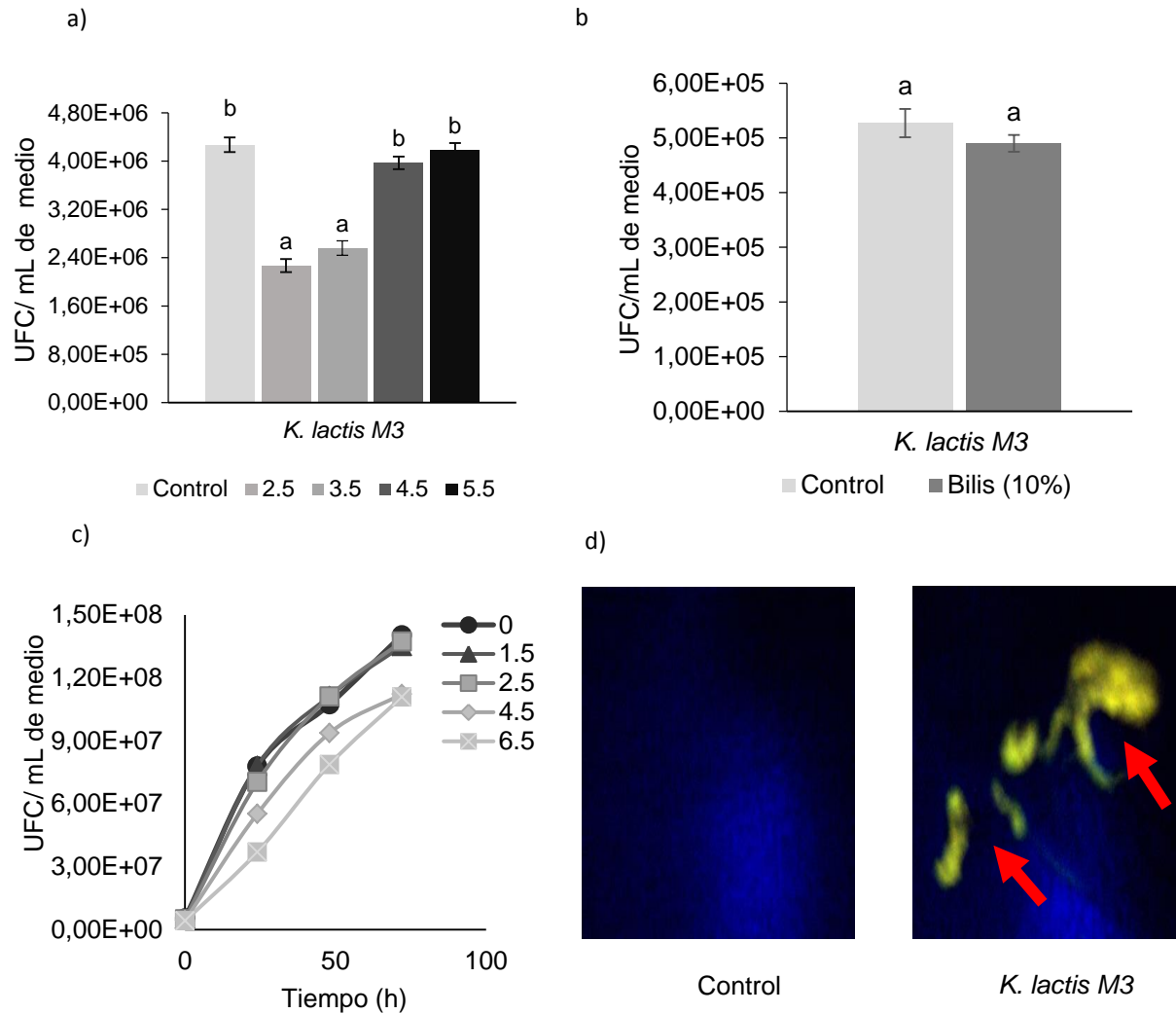


Figura 6. Características probióticas de *K. lactis* M3. (a) resistencia de *K. lactis* M3 a pH ácido, (b) resistencia de *K. lactis* M3 a sales biliares de dorada (*Sparus aurata* L), (c) resistencia de *K. lactis* M3 a diferentes concentraciones de sal y (d) adhesión de *K. lactis* M3 marcada con fluoresceína. Las barras y cada punto representan \pm DE. Las diferentes letras indican diferencias entre grupos ($P < 0.05$).

En la tabla 1 se muestra los resultados de superficie celular y porcentaje de autoagregación de *K. lactis* M3. Observándose que *K. lactis* M3 tiene un alto porcentaje de hidrofobicidad de superficie (80.6%) y de autoagregación 47.18% y 87.30% a las 4 y 24 h, respectivamente.

Tabla I. Hidrofobicidad de superficie celular y porcentaje de autoagregación encontrados para *K. lactis* M3.

Levadura	Hidrofobicidad de superficie celular (%)	Autoagregación (%)	
		4 h	24 h
<i>K. lactis</i> M3	80.665 ± 0.076	47.178 ± 5.519 ^a	87.303 ± 0.994 ^b

La capacidad antioxidante de *K. lactis* M3 se muestra a continuación. Como se esperaba las actividades ABTS+, DPPH, y la capacidad captadora de anion superóxido fueron menores que el grupo control (antioxidantes comerciales). Sin embargo, el potencial reductor férrico fue similar entre *K. lactis* M3 y el antioxidante comercial (Figura 2).

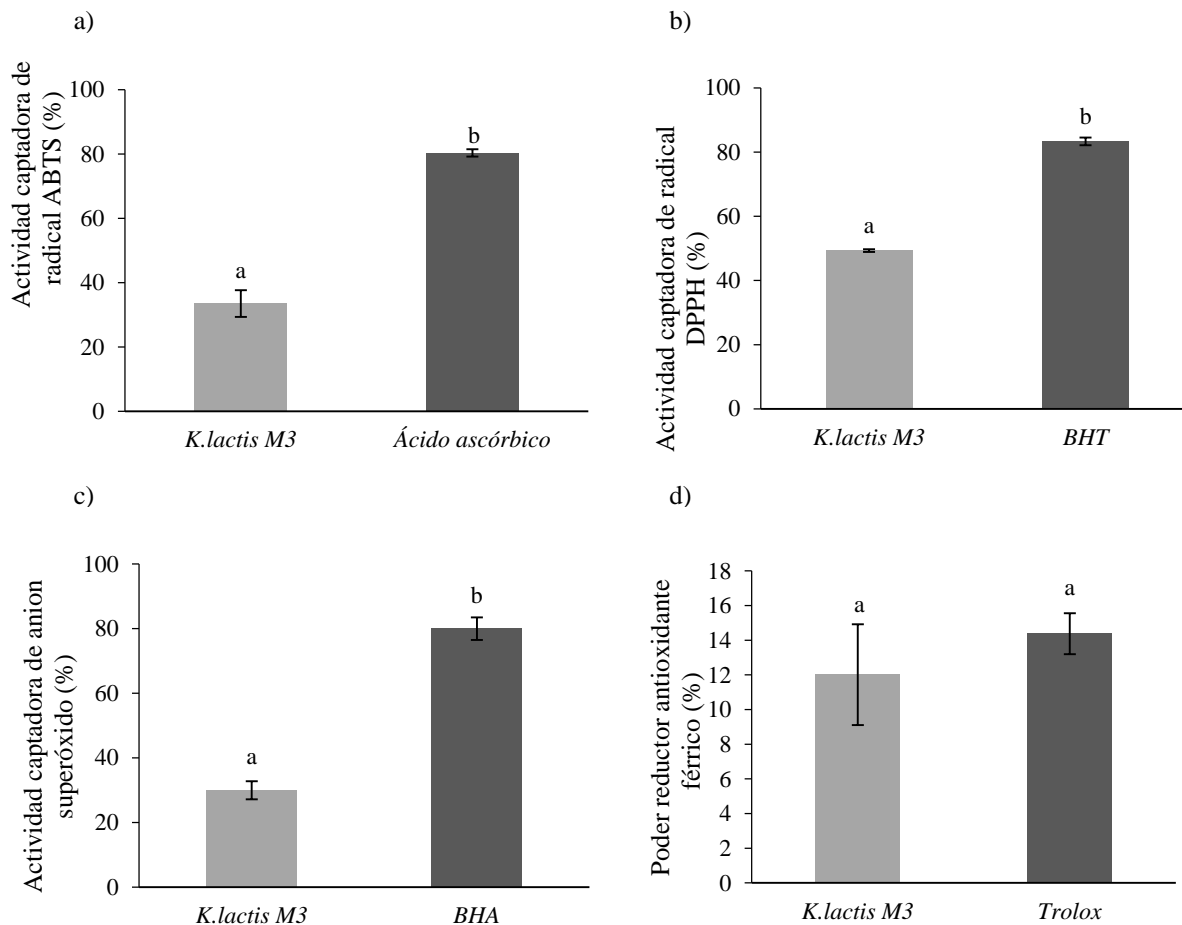


Figura 7. Actividad antioxidante de *Kluyveromyces lactis* M3 medido por (a) Actividad captadora de radical ABTS, (b) Actividad captadora de radical DPPH, (c) Actividad captadora de anion superóxido y (d) Poder reductor de férrico (Por sus siglas en inglés, FRAP). Las barras representan la media \pm DE. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (P < 0.05).

La viabilidad celular de los leucocitos de riñón cefálico no se vio afectada comparado con el grupo control al tratarlos con levaduras atenuada e 55, 60 y 65 °C, respectivamente, comprobando que no existe toxicidad por parte de la levadura a nivel *in vitro*.

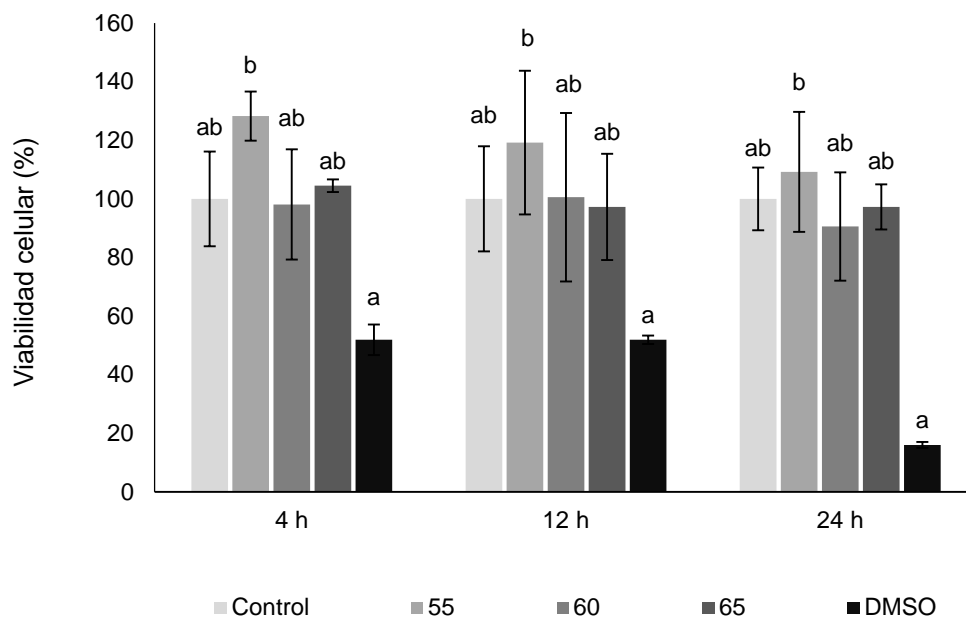


Figura 8. Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con *K. lactis* atenuada a tres temperaturas (55 °C, 60 °C y 65 °C) determinado por la técnica de MTT. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

7.2 Perfiles de ácidos grasos de *Kluyveromyces lactis* M3

El perfil de ácidos grasos de *K. lactis* M3 indicó que tiene un alto contenido de ácido palmitico (16:0), palmitoleico (16:1n-7), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) y α -linoleico (18:3n-3). En general, la levadura muestra tener un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (69.99%) seguido de poliinsaturados (15.58%).

Tabla II. Composición de ácidos grasos de *Kluyveromyces lactis* M3

Saturados	%	Monoinsaturados	%	PUFA (n-6)	%	PUFA (n-3)	%
14:0	0.415 ±0.108	14:1n-5	0.159±0.044	18:2n-6	15.559±0.297	18:3n-3	1.500±0.037
15:0	0.131±0.024	15:1n-5	0.000±0.000	18:3n-6	0.018±0.018	18:4n-3	0.000±0.000
16:0	9.594±0.534	16:1n-7	34.214±0.065	20:2n-6	0.000±0.000	20:3n-3	0.021±0.021
18:0	2.290±0.113	18:1n-9	33.354±0.502	20:3n-6	0.000±0.000	20:5n-3	0.041±0.041
20:0	0.179±0.008	18:1n-7	0.981±0.058	20:4n-6	0.000±0.000	22:5n-3	0.000±0.000
22:0	0.250±0.019	20:1n-9	0.277±0.014	22:2n-6	0.000±0.000	22:6n-3	0.000±0.000
		22:1n-9	0.000±0.000	22:4n-6	0.000±0.000		
		24:1n-9	1.009±0.210				
Total saturados	12.862±0.777	Total monoinsaturados	69.996±0.523	Total PUFA n-6	15.578±.285	Total PUFA n-3	1.563±0.034
Total PUFA	17.141±0.284						
n-3/n-6	0.100±0.003						
Lípidos totales	0.344±0.002						

7.3 Caracterización del β -glucano obtenido de *K. lactis* M3 (β G-KIM3)

El β -glucano obtenido de *K. lactis* M3 (β G-KIM3) fue caracterizado por RMN de H_1 mostrando tener picos característicos de los β -D-glucanos en 5.2, 4.3 y 3.5 correspondientes a enlaces β -1,3; 1-6. Por otro lado, el peso molecular de éste fue determinado por cromatografía de exclusión de tamaño, obteniéndose un β -glucano de alto peso molecular (26,840.61 kDa). Por otro lado, el espectro de FTIR confirma la presencia de grupos carbonilos y enlaces carbono-hidrógeno característicos de los β -glucanos (Figura 5).

La concentración de enlaces β -1,3; 1-6 también fue medida por la técnica de rojo Congo, mostrando una aproximación de más de 50% de enlaces en esta conformación. El contenido de glucosa muestra un crecimiento conforme el paso del tiempo, comprobando la presencia de este componente en el β -KIM3 (Figura 6).

La actividad DPPH de β G-KIM3 mostró tener diferencias significativas respecto al control positivo en las primeras concentraciones (100 y 200 μ g/mL). Posteriormente, la capacidad captadora de anión superóxido fue medida encontrándose un patrón similar al control positivo BHA, mostrando diferencias significativas en la concentración de 100 μ g/mL. De igual manera, la capacidad captadora de anión hidroxilo fue similar a la del grupo control BHT, sin mostrar diferencias significativas respecto al grupo control, pero si un crecimiento de la capacidad captadora conforme incrementaba la concentración de β G-KIM3 (Figura 7). El porcentaje reductor férrico de β G-KIM3 muestra diferencias significativas en las dosis más altas 400 y 500 μ g/mL. Por otro lado, la actividad ABTS⁺ también muestra un patrón de incremento conforme aumenta la dosis, con diferencias significativas en las tres últimas dosis (Figura 8).

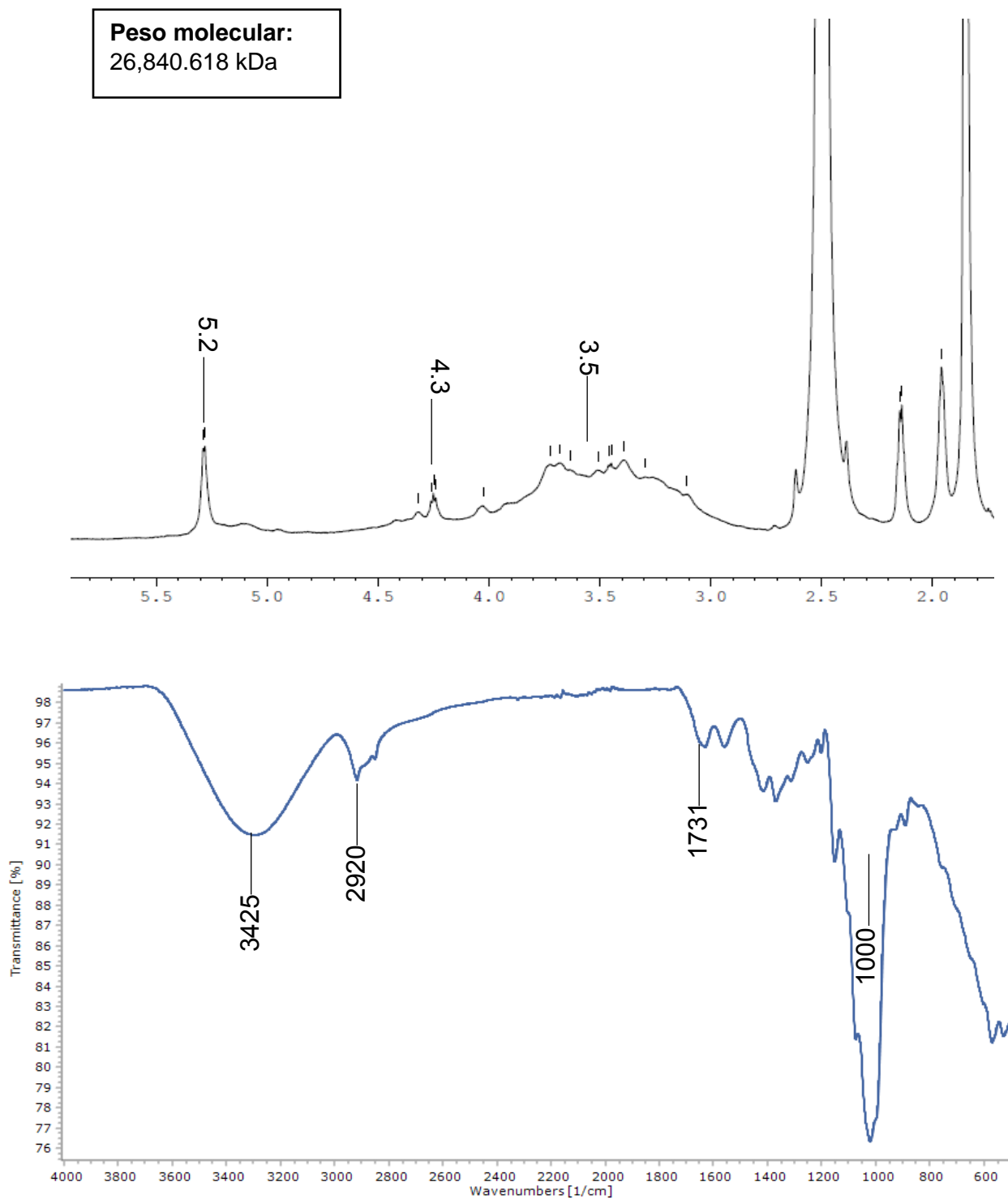


Figura 9. Espectros de H^1 RMN y FTIR de las regiones correspondientes de enlaces β -D-glucosidicos. Este β -glucano fue disuelto en DMSO-d_6 a 80°C . En la figura superior se indica el peso molecular en kDa para el β -glucano de *K. lactis* M3 (β -KIM3).

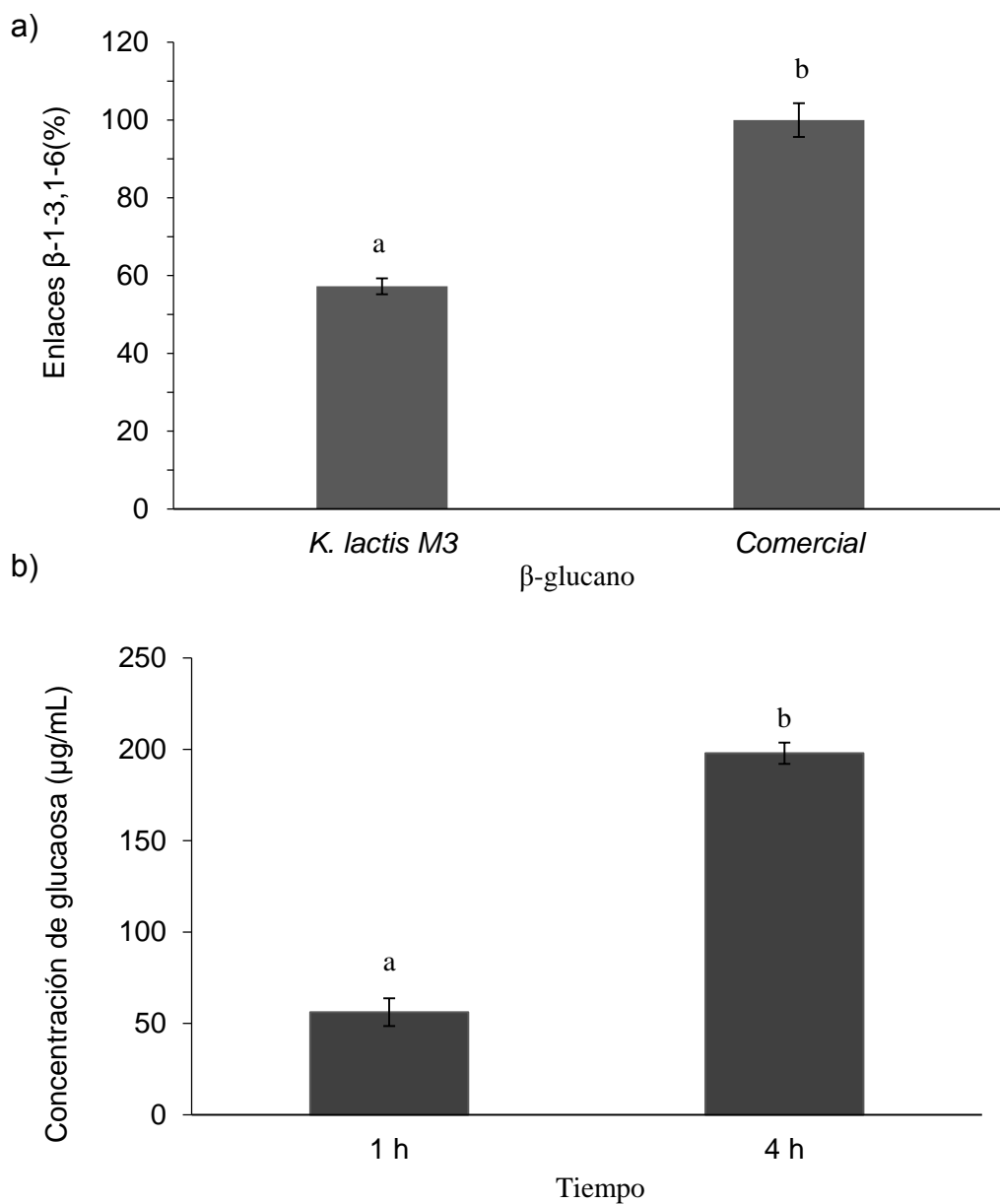


Figura 10. a) Porcentaje de enlaces β -1-3;1-6 de β -KIM3 medido por rojo Congo (Laminarina es usado como control positivo). b) Contenido de carbohidratos de β -KIM3 medido por el método de fenol/ácido sulfúrico usando como curva estándar glucosa. Las barras representan la media \pm DE. Las diferentes letras indicant diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

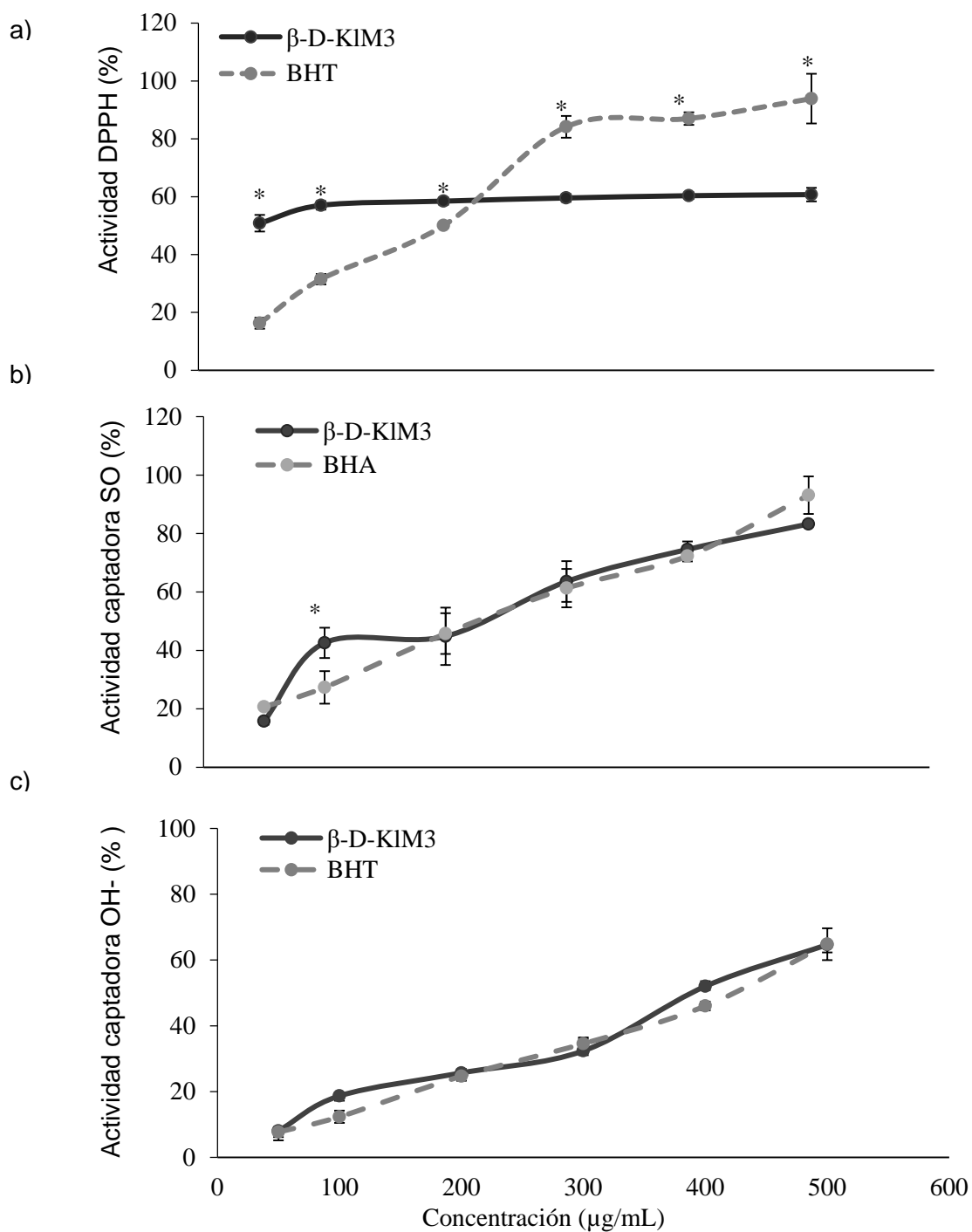


Figura 11. Capacidad antioxidante de β -KIM3. (a) Actividad DPPH usando BHT control positivo. (b) Actividad captadora SO- usando BHA como control positivo. (c) Actividad captadora OH- usando BHT como control positivo. Las barras representan la media \pm DS. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

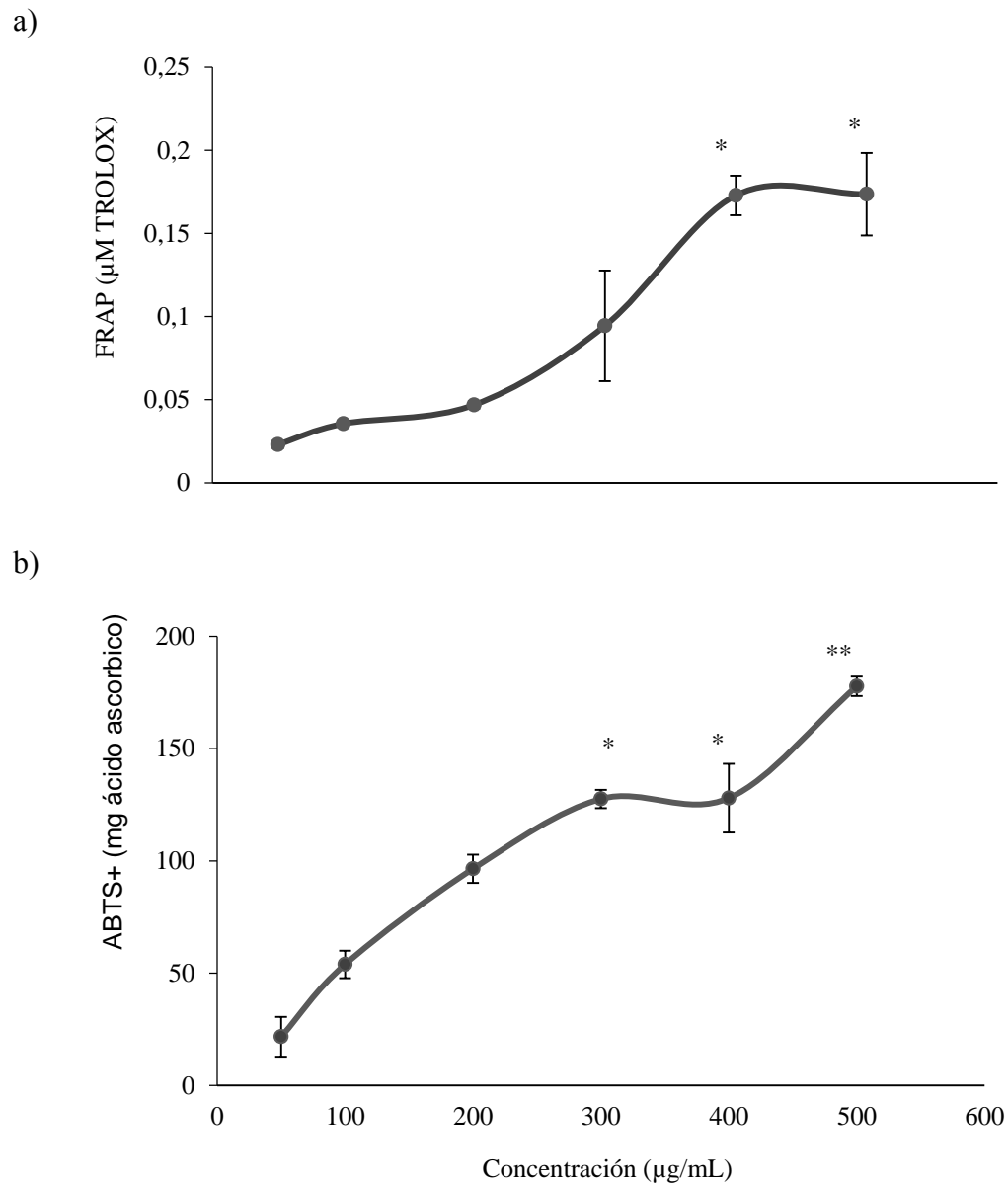


Figura 12. (a) Poder reductor férrico antioxidante y (b) actividad ABTS⁺ de β -D-KIM3. TROLOX y ácido ascórbico fueron utilizados como curvas de calibración, respectivamente. Las líneas representan la media \pm DS. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$).

7.4 Viabilidad celular de β -KIM3 en leucocitos de riñón cefálico de dorada. La viabilidad de leucocitos de riñón cefálico se evaluó ante la exposición de β -KIM3 en tres dosis distintas. Ninguna de las dosis mostró tener efecto citotóxico ya que comparado con el control DMSO (agente citotóxico) se observó diferencias significativas. Comparado con el control de leucocitos sin tratar la viabilidad fue similar.

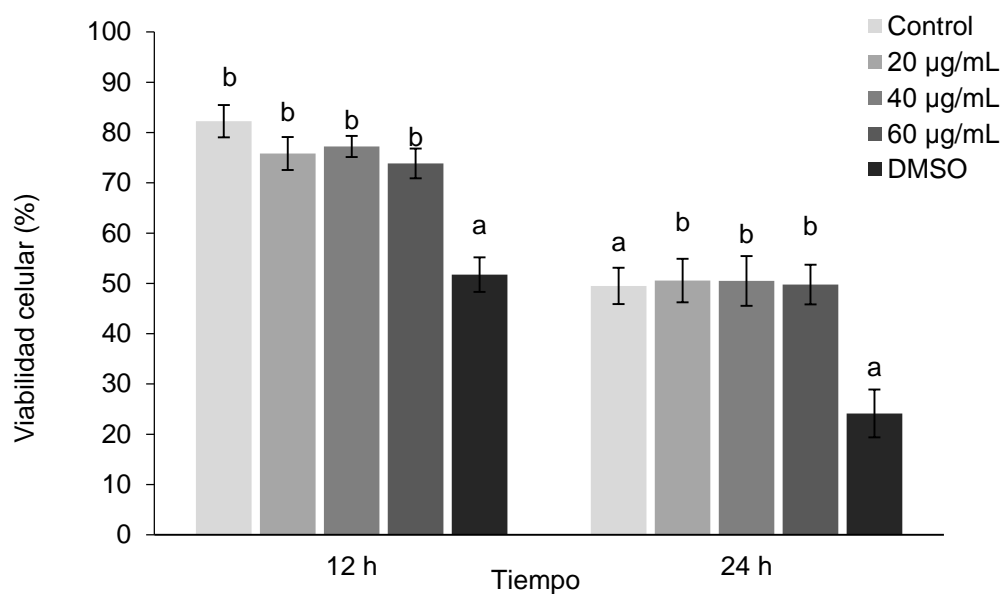


Figura 13. Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 evaluado en tres dosis distintas (20, 40 y 60 μ g/mL) determinado por la técnica de MTT. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

7.5 Efecto *in vitro* de β -KIM3 en leucocitos de riñón cefálico de dorada.

Mediante un análisis *in vitro* se observó el potencial inmunoestimulante de β -KIM3 después de alimentar doradas durante 20 días en combinación con la dieta. Se observó que la viabilidad celular no fue afectada y que después de un reto bacteriano con dos bacterias patógenas (Figura 10). En contraste con esto, el β -KIM3 fue capaz de activar el estallido respiratorio, así como la habilidad fagocítica en ambas dosis (125 y 250 mg) antes y después del reto bacteriano (Figura 11) con *V. parahaemolyticus* y *P. damseale*. Por otro lado, los niveles de óxido nítrico no muestran diferencias significativas, pero si un incremento después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* y *P. damseale* en ambas dosis. La actividad MPO muestra diferencias significativas antes y después del reto en ambas dosis (Figura 12).

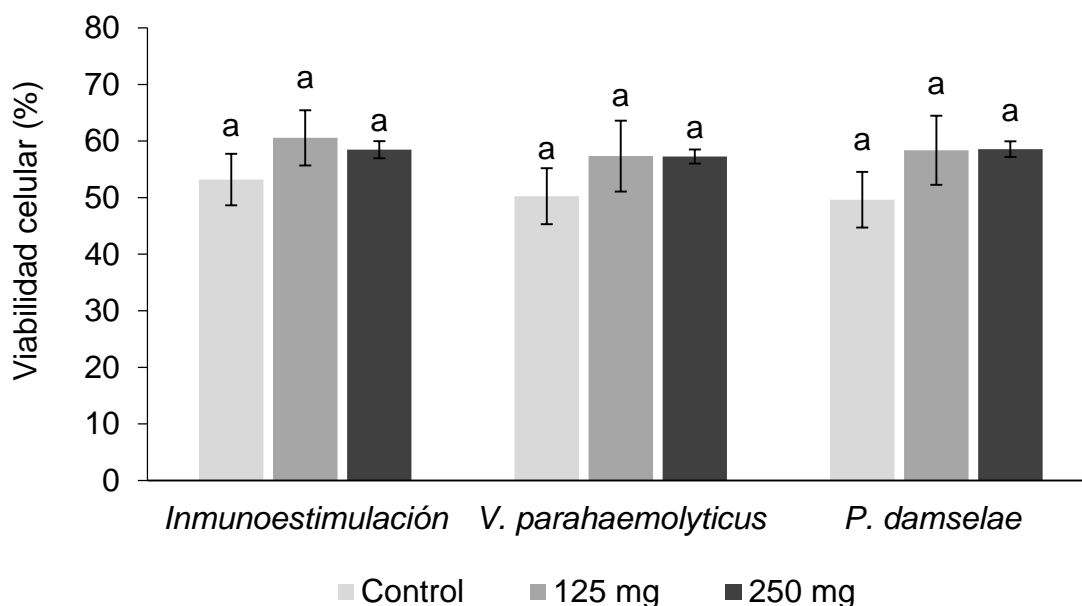


Figura 14. Viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días determinado por la técnica de IP mediante citometría de flujo. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

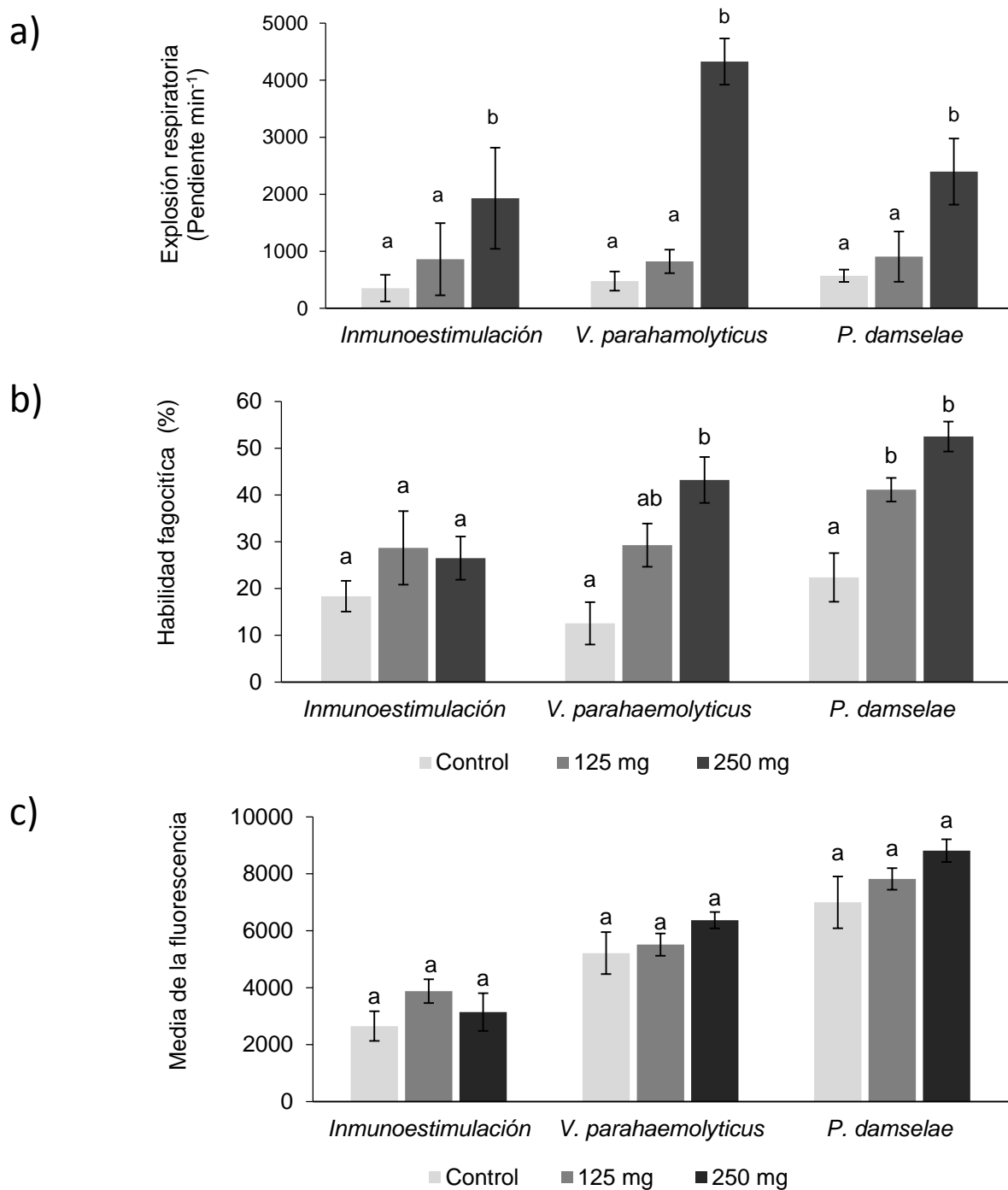


Figura 15. a) Explosión respiratoria, b) habilidad fagocítica y c) capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

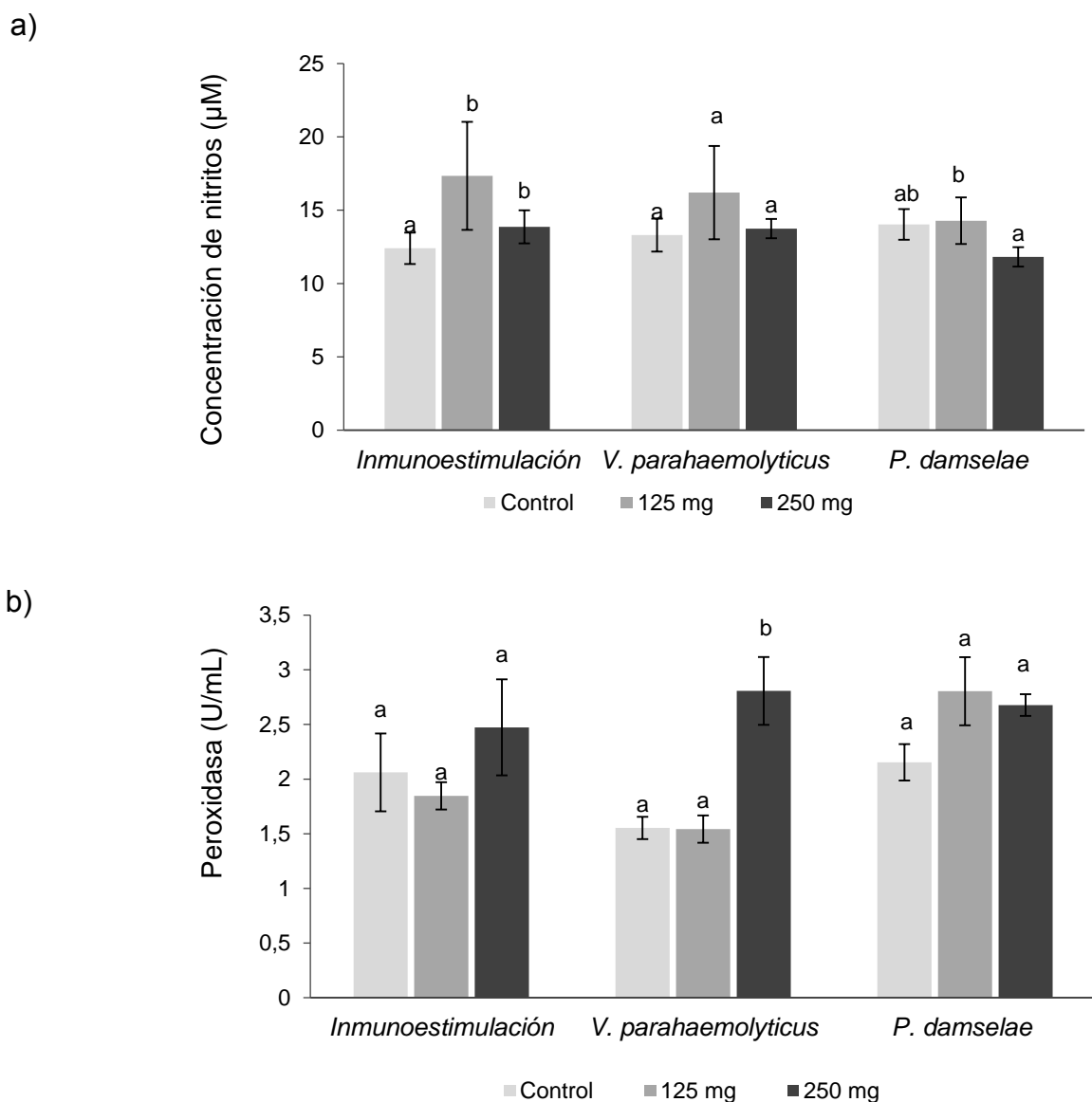


Figura 16. a) Niveles de óxido nítrico y b) actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.) de peces alimentados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3 (β -KIM3) durante 20 días. Las barras representan la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

7.6 Efecto *in vivo* de la alimentación de β -KIM3 en dorada.

De manera general después de la administración en dieta de β -KIM3 (125 mg/kg de pez) se observan diferencias significativas respecto al grupo control al día 15 y el día 30 en la habilidad fagocítica y capacidad fagocítica. De igual manera, el estallido respiratorio muestra diferencias significativas el día 15 y 30 de la administración respecto al grupo control. La actividad MPO solo se ve afectada el día 30 respecto al grupo control.

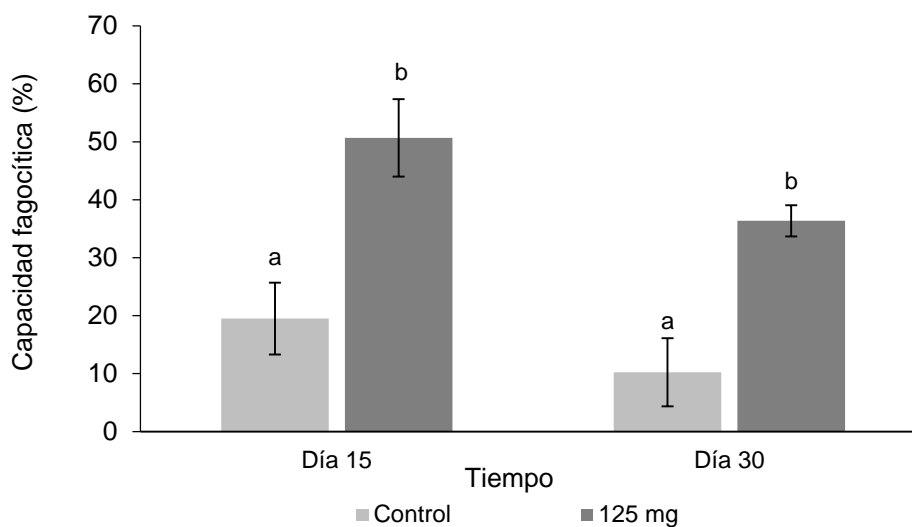


Figura 17. Capacidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

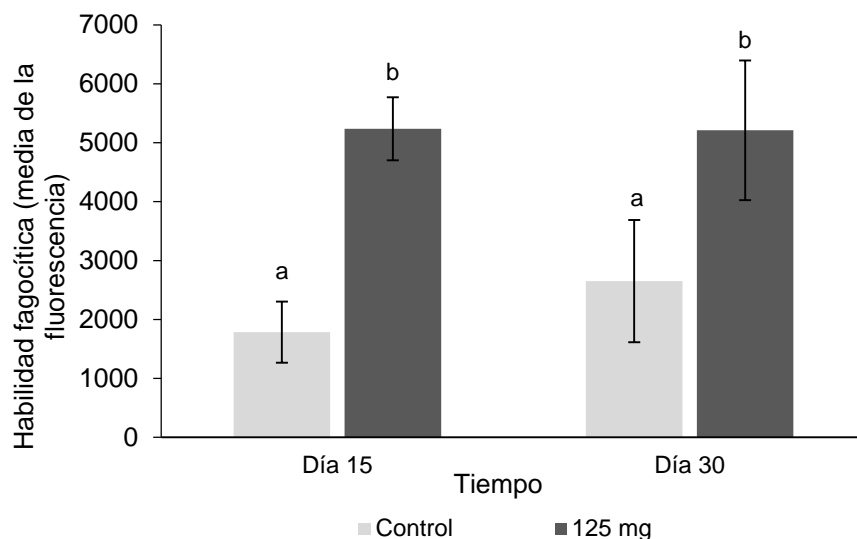


Figura 18. Habilidad fagocítica de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

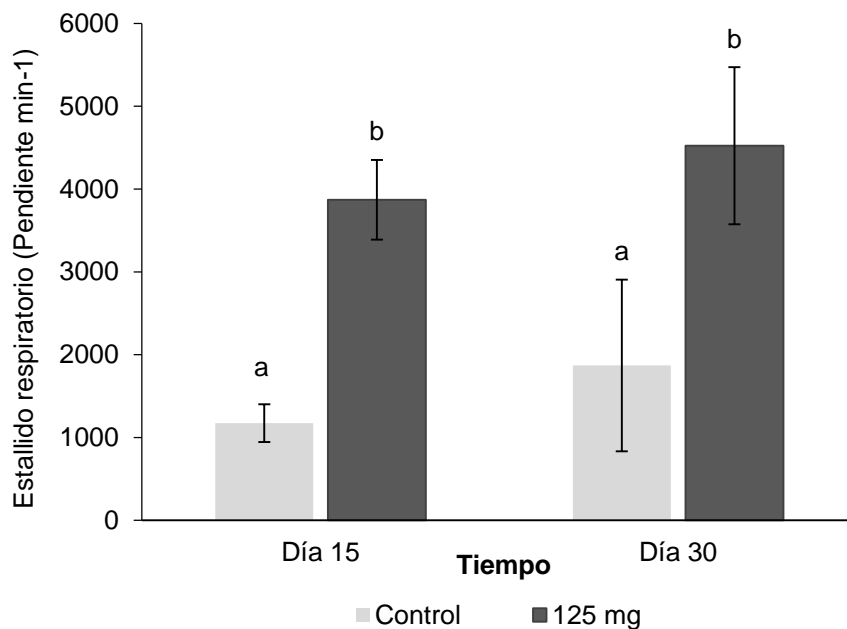


Figura 19. Estallido respiratorio encontrado en de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β - glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

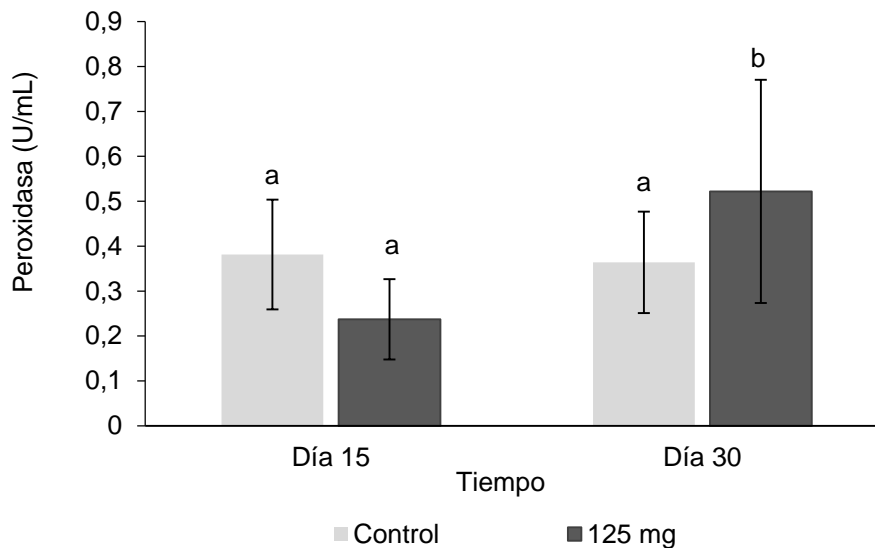


Figura 20. Actividad peroxidasa de leucocitos de riñón cefálico estimulados con β -glucano aislado de *K. lactis* M3. Las barras representan la media de los grupos \pm DE. Las diferentes letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$).

7.7 Caracterización del receptor Mincle

La caracterización bioinformática de Mincle se obtuvo a partir del cDNA, este receptor consiste de un total de 1670 pb con un marco de lectura abierta de 1187 pb que codifican para un total de 258 aminoácidos (Fig. 14 y 15). Se calculó también el punto isoeléctrico el cual fue de 5.27 y el peso molecular corresponde a 29.31 kDa. El alineamiento múltiple que se realizó muestra que de manera conservada existe motivos de unión a calcio (Fig. 16). También se observó que el receptor cuenta con un dominio lectina de tipo C y una región transmembranal. El alineamiento también mostró una alta similitud del 100% e identidad (81%) comparado con otros peces teleósteos. Respecto a *Homo sapiens* y *Mus musculus* muestra una similitud de 56% y una baja identidad de 38%.

El análisis filogenético (fig. 17) indica que esta proteína se agrupa dependiendo del tipo de ambiente (agua marina o agua dulce). Siendo el receptor de *Seriola dumerili* el más cercano al de *Lutjanus peru*.

```

1   aagtgagaaaacgagtgttaacaagggcagggcagcagccatgacggaggggagagaaaac
                                     M T E G R E N
61  tacagcagcctgcaggagttcacagagcagccgacacctggaggaacagcctcatcctc
   Y S S L Q E F T E Q P T P G G N S L I L
121 caaaacagaaatggctcccagggactgagggcgggtgttgagtgtttgaggagtcgggct
   Q N R N G S Q G L R R G V E C L R S R A
181 ggcctcctgatgcttattggctttttggcctccatctgcgccaacatcgcaactgactgtg
   G L L M L I G F L A S I C A N I A L T V
241 ctcttgggttggcaggcccggttccagctgttgaacctctggactcttcacctctgggtctg
   L L V G R P V P A V E P L D S S P L G L
301 aagttagcctcgctgcggagacgttacatccagctgtgagggactacaccgcccagggg
   K L A S L R R R Y I Q L C E D Y T A Q G
361 cagaactgttcaaagccagttaagcagtgccgggagtgctcctgaaggggtgcttcatatc
   Q N C S K P V K Q C G E C P E G W L H I
421 ggagatcagtgttaccacttttagcagggacaagctggactggctgaagagcagagacagc
   G D Q C Y H F S R D K L D W L K S R D S
481 tgtgaggagatgggcccctcttaccatactgcacaccatggaacagcatgaggctctg
   C E E M G A H L T I L H T M E Q H E A I
541 gaaaaagaagtcaggagaatcggtggatttgattatcacttctggatcggcctgtctgat
   E K E V R R I G G F D Y H F W I G L S D
601 atagagacggaggagactggagatgggtggacaacacaacactgcaacacaagtactgg
   I E T E G D W R W V D N T T L Q H K Y W
661 gatcagtgagctcagagccagataaccaccagtcaggaggggagcagggagaggactgc
   D Q W S S E P D N H Q S G G E Q G E D C
721 gccaccttagacagccactcaaaaaacatggtttgatgttccttggatcacatttataaa
   A T L D S H S K T W F D V P C D H I Y R
781 cggatctgccagacggatgcgattcagctcagctgagccctgcacagaactggaacaac
   R I C Q T D A I Q L S -
841 acatcattgtgacattaaaaaaaaacaacaactattgtttacgtgtttgggattatagaaa
901 ctacacccaaaatgtattttttgtgacacacaacgcacagacatattgttttcttt
961 ttattgaagatatagttgctgaaaatctgtgcattgtgtttagatatcacttattggaat
1021 gaatatctggacataaagagggcatatgagtcaaagtaataaataactaacgctaaaaagg
1081 tctccattttgcaaacgtaaatgccatgaatgcagtcactgtgtcccgggggtttggaca
1141 cgattattgtctgattttgtgcaaaatcacaacgcaaaactgagctgcaaaattatgtcaga
1201 agtaaacactgtagattttattttttacatttgttttcccattaagactaacatgtctgct
1261 tctctgcaactccttcagacatttgaggctaaatgaatgtcaataaaac

```

Figura 21. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de MINCLE para huachinango. El codón de inicio (ATG) está subrayado, el codón de paro (TAA) está marcado como un guión, la señal de poliadenilación (aaaaaa) está en negritas y los residuos de cisteína están marcados con C en negritas. Los dominios transmembrana están resaltados en color gris (residuos del 48-70) y la región correspondiente al dominio lectina está resaltado en color negro (residuos del 120-251).

```

M. musculus -----MNSTKSPASHHTERGCFKNSQVLSWITAGAS----
H. sapiens -----MNSSKSSETQCTERGCFSS--SQMFLWIVAGIP---
C. idella --MEDIENYTSLQEFTEDETAHSGNRPILTS--QSKQGVQKGAKCLRGQAALVLLIALLLTSVC
C. auratus --MEDIENYTSLQEFTEDEVYHGGNRPILTS--QKQGVHKGAKCLTGQASVLLVALLTSVC
M. zebra --MEQRENYSSLHEFTLEPRPGANRLVPOYSQSGQLKQGVKCLRSKTSLLLLIGFLASTIC
S. dumerili --MEEGRENYSSLQEFTEFTEPTGGNRPILHSDGSSQGRKRIGIECLRSQTALLMLIGFLASTIC
L. peru MTEGRENYSSLQEFTEFTEPTGGNRPILHSDGSSQGRKRIGIECLRSQTALLMLIGFLASTIC
P. altivelis --MENVENYTSLHEFTEDISPRGNKPILYTNNTSQGLKRGVGCCLRREMAVLLIGFLASTIC
E. lucius --MDNVENYTSLQEFTEDEINSRGNPILNN--Q--SGLKRGTECCQRQTAQVAVFLIGLLASTIC
O. kisutch --MEEVENYTSLHEFTEDISSRGNKPIILNN--HNAQELKRGSECLRGQTALFVLLIGLLASTIC
O. tshawytscha --MEVENYTSLHEFTEDISSRGNKPIILNN--HSAQGLKRGSECLRGQTALFVLLIGLLASTIC
O. mykiss --MEVENYTSLHEFTEDISSRGNKPIILNN--HSAQGLKRGSECLRGQTALFVLLIGLLASTIC
.
.
.
M. musculus -ILFLSGCFITRCVVITYRS-----SQI-----SG-QNLQPHRNIKELSCYSEAS
H. sapiens -ILFLSACFITRCVVIFRI-----FQT-----CDEKKFQLPENFTELSCYNYGS
C. idella ANIVLGVLLVNSHRSSVTVPEPKDSESEAAASLSLKLTAQERFSLHCSEYITLIG--QTCS
C. auratus ANIVLGVLLVNSHRPD--TVKPVKNDESEAAASLSLKLTAQERFSLHCSEYITLIG--QTCS
M. zebra GNIVLAVLLISRPVPTAFL-----ESSSSALGLKSMQRRYIQLCEDYTAGL--QCSC
S. dumerili ANIVLTVLLIGRPQPGAS-----VDSSSPGQKLNVSVHRRYIQLCKDYTAGL--LSCS
L. peru ANIALTVLLVGRPVPAVEP-----LDSSPLGLKLSLRRRYIQLCEDYTAGL--QMSC
P. altivelis GNIVLSVLLFSRPLSGNIP-----QETTAMTLKLNVSQNRVYIQLCEDYITLIG--QSCS
E. lucius ANIALSVLLFSRPLPGVP-----LESAALALKLNVSQGRFVRLCDDYSKLG--QSCS
O. kisutch ANIALSVLLFSRPLPSVP-----LEAASLTLKLNVSVRGRYVRLCDDYSKLG--QSCS
O. tshawytscha ANIALSVLLFSRPLPSVP-----LETASLTLKLNVSVRGRYVRLCDDYSKLG--QSCS
O. mykiss ANIALSVLLFSRPLPSVP-----LETASLTLKLNVSVRGRYVRLCDDYSKLG--QSCS
.
.
.
M. musculus GSVKNC--CPLNWKHYQSSCYFFSTTTTLTWSSSLKNCSDMGAHLVVIDTQEEQEFLFRTK
H. sapiens GSVKNC--CPLNWEYFQSSCYFFSTDTITISWALSLLKNCAMGAHLVVISQEEQEFLSYK
C. idella KSVIRCSPCPENWIHLERCYFFSDDKLDWQHSKESCAMGGYLTILHSHEQHHTLEGVA
C. auratus KPVKICRCPEDWLHLEGRCYFFSDDKLDWQHSKESCAMSGSHLSILHSHQHHALEVA
M. zebra KTVKQCRECEGWLHIGNQCYFFSNDRLDWRVSRDSCSEMGSHTILHTIEQHDALEKA
S. dumerili KTVKQCRECEGWLHIGVQCYFFSDDKLDWLSRDSCEMGGHLLTILHTVEQHETLEKA
L. peru KPVKQCGECEGWLHIGDQCYHFSRDKLDWLSRDSCEMGAHLTILHTMEQHEALEKEV
P. altivelis KTVKRCRECVDGWIIHADKCYKFSKQKQDWLTSSQSCSAMGSHLTLHSKEHDALEKA
E. lucius KPVKRCRECEPDWIIHDDKCYFFSDDKMDWPSRDSCEMGGHLLTVLHSHQHHDALEKA
O. kisutch KTVKRCRECEGWLHIGVGEKCYFFSNDKMDWPSRDSCTSLGSHLTLHSKEHDALEKA
O. tshawytscha KTVSKCRECEGWLHIVDEKCYFFSNDKMDWPSRDSCTSLGSHLTLHSKEHDALEKA
O. mykiss KTVSKCRECEGWLHIVDEKCYFFSNDKMDWPSRDSCTSLGSHLTLHSKEHDALEKA
* . * * * . : ** ** * * . . * : . : * : : : : . *
.
.
.
M. musculus PK----RKEFYIGLTDQVVEGQWQVDDTPTFESLSFWDA--GEPNNIV----LVEDCAT
H. sapiens PK----MREFFIGLSDQVVEGQWQVDDTPTLTKSLSFWDV--GEPNNIA----TLEDCA
C. idella RNHGGFDYHFWIGLSDIETEGVWKVVDNTLVNKT--YWNEWHEEPNNHSGGIGHGEDCAV
C. auratus RSRGGVDYHFWIGLSDIETEGVWKVVDNTLVNRT--FWSEGDKPENNHSGGIGHGEDCAV
M. zebra KRIGGFYHFWIGLSDIETEGVWKVVDNTLLEHK--YWDQASSEPDNHTGGEHGEDCAT
S. dumerili RRIGGFYHFWIGLSDIELEGDWRVVDNTTLQHK--YWDQWSSSEPDNHSGGIGHGEDCAT
L. peru RRIGGFYHFWIGLSDIETEGDWRVVDNTTLQHK--YWDQWSSSEPDNHSGGIGHGEDCAT
P. altivelis RRIGGFYHFWIGLSDIEKEGEWVVDNTTLQNK--YWDQWNEEPNNIQSGGMEGEDCAV
E. lucius CRIGGFYHFWIGLSDIEKEGEWVVDNTTLKKH--VLE-----
O. kisutch RRIGGFYHFWIGLSDREKEGDWRVVDNTTLTKN--YWNEYSSEPDNHSGGIGHGEDCAT
O. tshawytscha RRIGGFYHFWIGLSDIEKEGDWRVVDNTTLTKN--YWNEYSSEPDNHSGGIGHGEDCAT
O. mykiss RRIGGFYHFWIGLSDIEKEGDWRVVDNTTLTKN--YWNEYSSEPDNHSGGIGHGEDCAT
. : : : : * * * * : * * * * *
.
.
.
M. musculus IRDSSNSRKNWNDIPCFYSMPWICEMPEISPLD-----
H. sapiens MRDSSNPRQNWNDVTCFLNYFRICEMVGINPLNKGKSL
C. idella LDSR---SKTWFDVPCDFSYKRICEMDPITLNI-----
C. auratus LDSR---SKTWFDVPCDFSYKRICEMD-----
M. zebra LDSH---SKTWFDVPCDHYKRICQMDAIQLN-----
S. dumerili LDSH---SKTWFDVPCDHYKRICQMDAIQLN-----
L. peru LDSH---SKTWFDVPCDHYKRICQMDAIQLS-----
P. altivelis LDSF---SLTWFDVECENIYKRICQMDAIMLN-----
E. lucius -----
O. kisutch LDSH---SQTWFDVPCDHYKRICQMDAIRLD-----
O. tshawytscha LDSH---SQTWFDVPCDHYKRICQMDAIRLD-----
O. mykiss LDSH---SQTWFDVPCDHYKRICQMDAIRLD-----

```

Figura 22. Alineamiento múltiple de aminoácidos de MINCLE. Las secuencias homólogas fueron determinadas con el programa CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

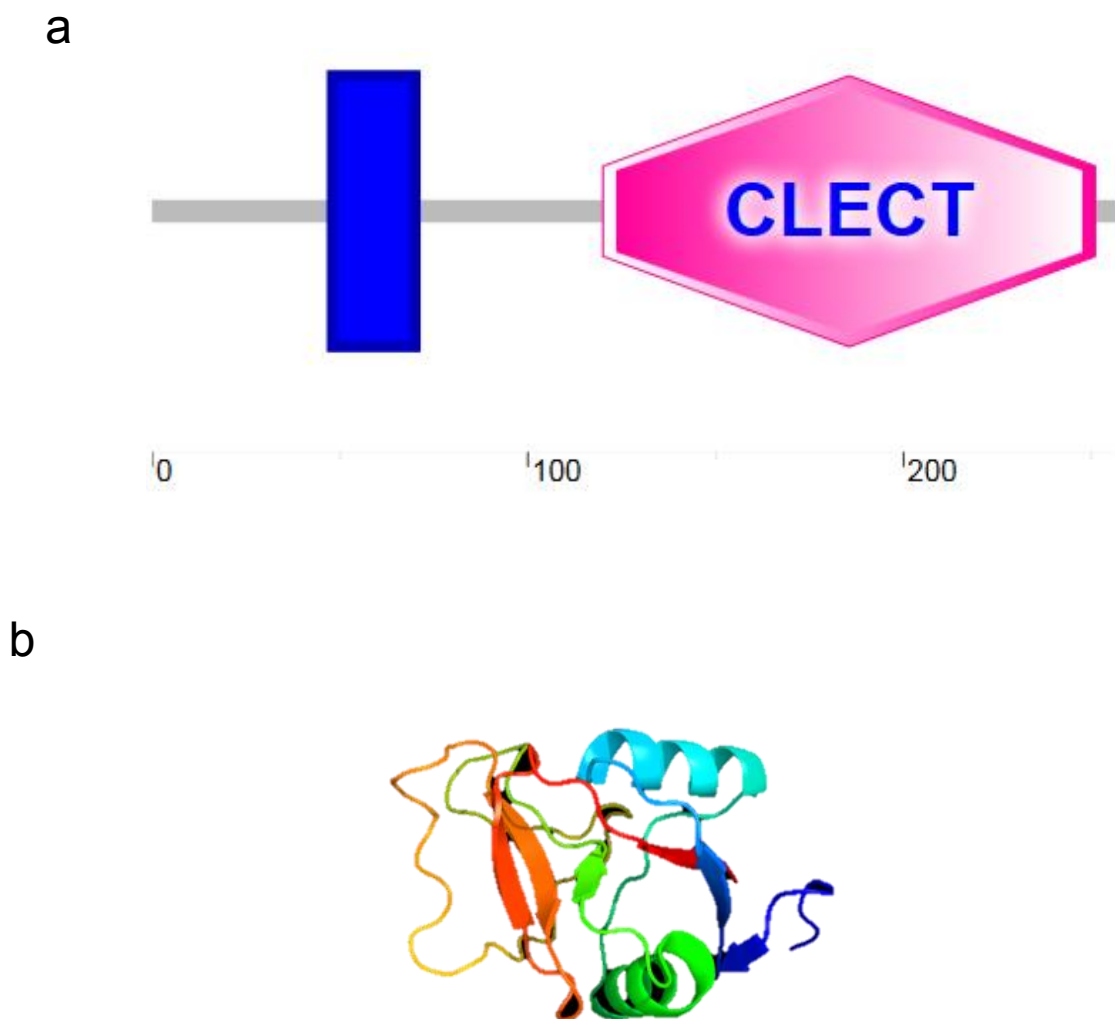


Figura 23. a) Diagrama mostrando la organización estructural de MINCLE en *Lutjanus peru*. La caja de color azul corresponde al dominio estructural transmembrana (residuos 48-70) y la caja de color rosa denota el dominio lectina (residuos del 120-251). La figura b) corresponde a la proteína 3D predicha por el programa Phyre 2. El modelo fue creado con un templado de receptor manosa de *Homo sapiens* con una confianza del 100 % y una cobertura del 50%.

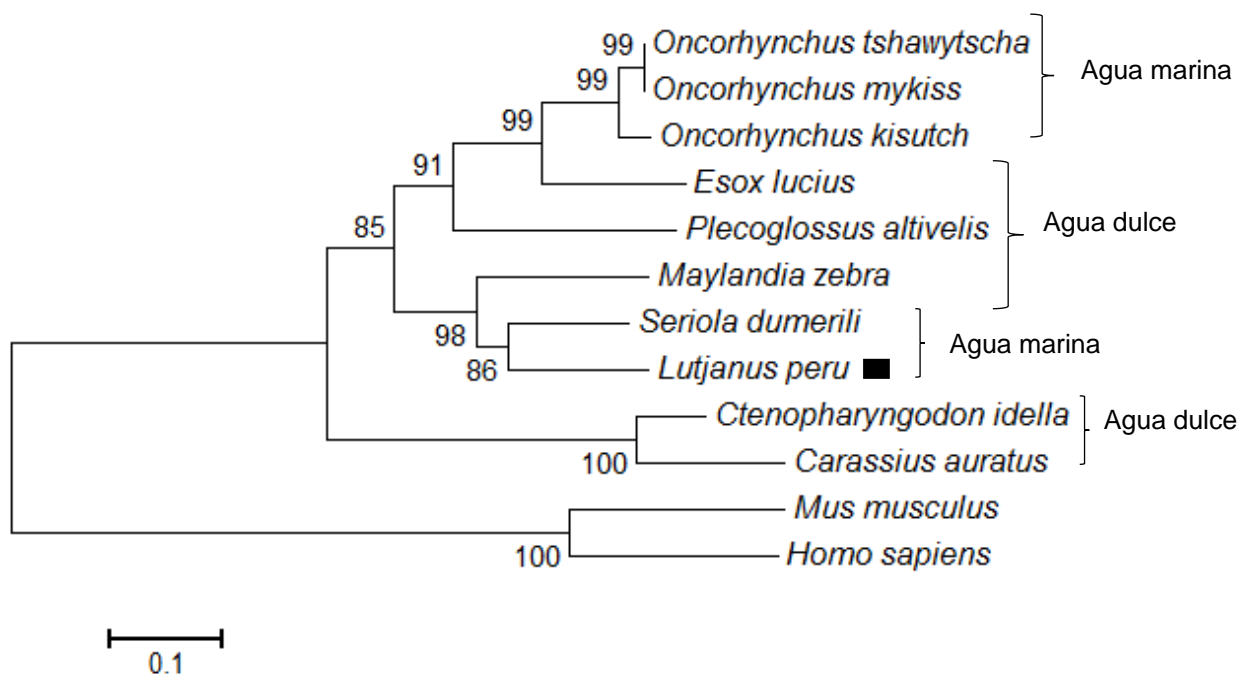


Figura 24. Análisis filogenético de MINCLE en *Lutjanus peru*. El árbol está basado en un alineamiento que corresponde a la proteína completa en otras especies de peces y como grupo externo utilizando a *Mus musculus* y *Homo sapiens*. El árbol fue creado en el programa MEGA versión 6.0 con un bootstrap de 10,000. Las distancias genéticas fueron calculadas en base a distintas proteínas (p-distancia). La secuencia marcada con un cuadro color negro corresponde a la secuencia de *Lutjanus peru*.

7.8 Expresión génica de Mincle

La expresión relativa de Mincle en peces sanos de huachinango muestra que los órganos en los que se expresa principalmente es intestino, ojos y el riñón cefálico.

Los dos primeros son órganos que se encuentran expuestos al exterior. (Fig. 18)

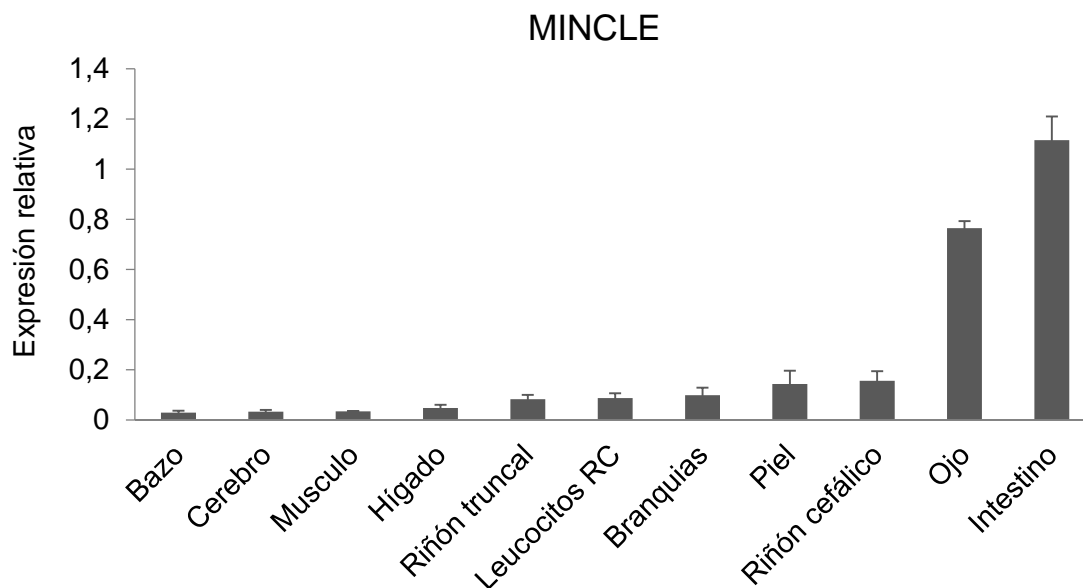


Figura 25. Expresión relativa de MINCLE en huachinangos sanos. La expresión relativa es el promedio de expresión de genes en peces sin estimular. Se utilizó EF-1 α como gen de referencia. Se analizaron las muestras por triplicado \pm DE.

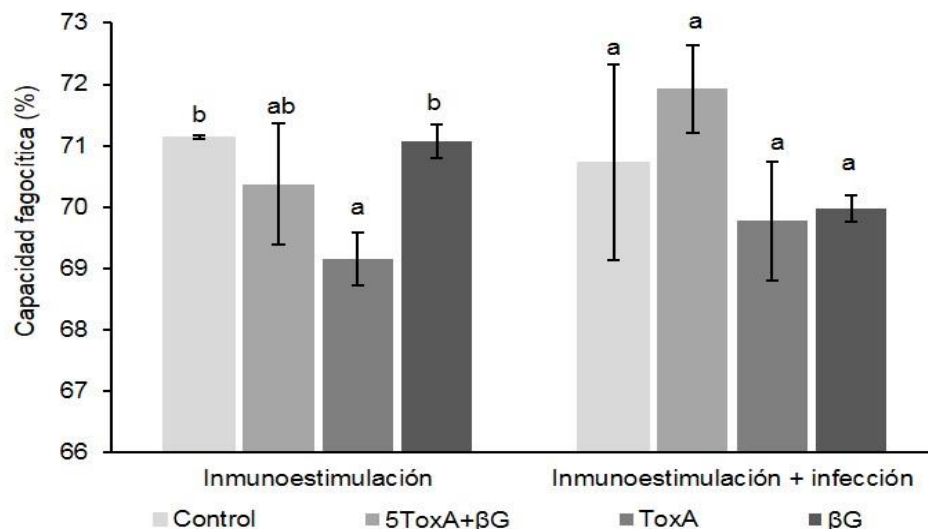
7.9 Parámetros del sistema inmune innato de leucocitos estimulados con ToxA y β -glu/Sh

Los leucocitos de riñón cefálico estimulados con ToxA y el β -glucano experimental obtenido de *S. halophilus* 4N16 (β -glu/Sh) solo o combinado con el antígeno vacunal no mostró tener efectos sobre la habilidad fagocítica antes o después del reto con *V. parahaemolyticus* N16 comparado con el grupo control (Fig. 19a). En contraste, la explosión respiratoria fue significativamente potenciada en leucocitos estimulados con ToxA comparados con el grupo control (Fig. 19b). Después del reto, la explosión respiratoria incrementó en leucocitos tratados con ToxA sola o en combinación con β -glu/Sh comparado con el grupo control.

Los niveles de nitritos (Fig. 20a) fue significativamente alta en leucocitos estimulados con ToxA y β -glu/Sh así como su combinación comparado con el grupo control. Después del reto, los niveles se muestran de manera similar entre todos los grupos. La actividad de MPO (Fig. 20b) fue significativamente alta en el tratamiento con ToxA antes del reto bacteriano comparado con el grupo control.

La actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa también fue medida en los leucocitos tratados. La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue significativamente más alta en leucocitos tratados con ToxA y β -glu/Sh de manera independiente, después del reto bacteriano (Fig. 21a). La actividad de catalasa fue significativamente mayor en leucocitos tratados solo con ToxA o β -glu/Sh antes y después del reto con 4N16.

a)



b)

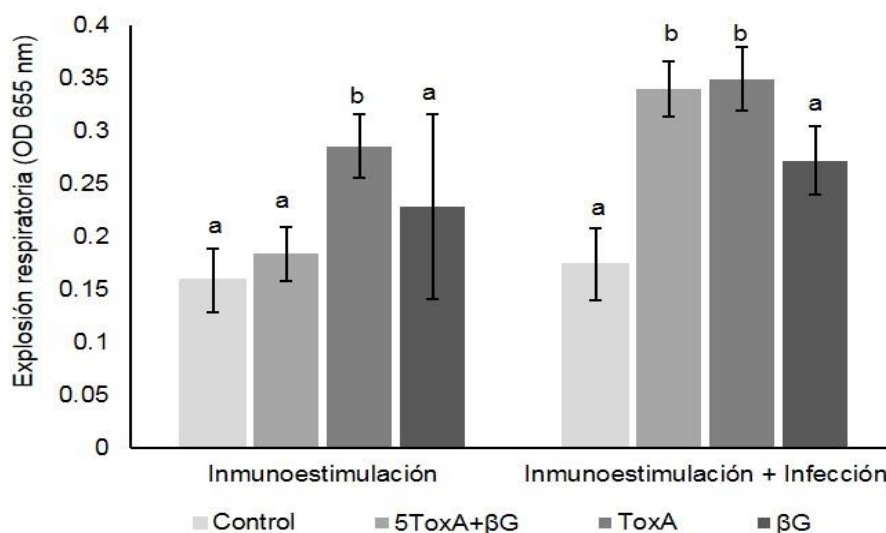


Figura 26. a) Capacidad fagocítica y b) explosión respiratoria encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+βG, ToxA ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and βG ($\beta\text{-glu/Sh}$; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^8 ufc mL^{-1}). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

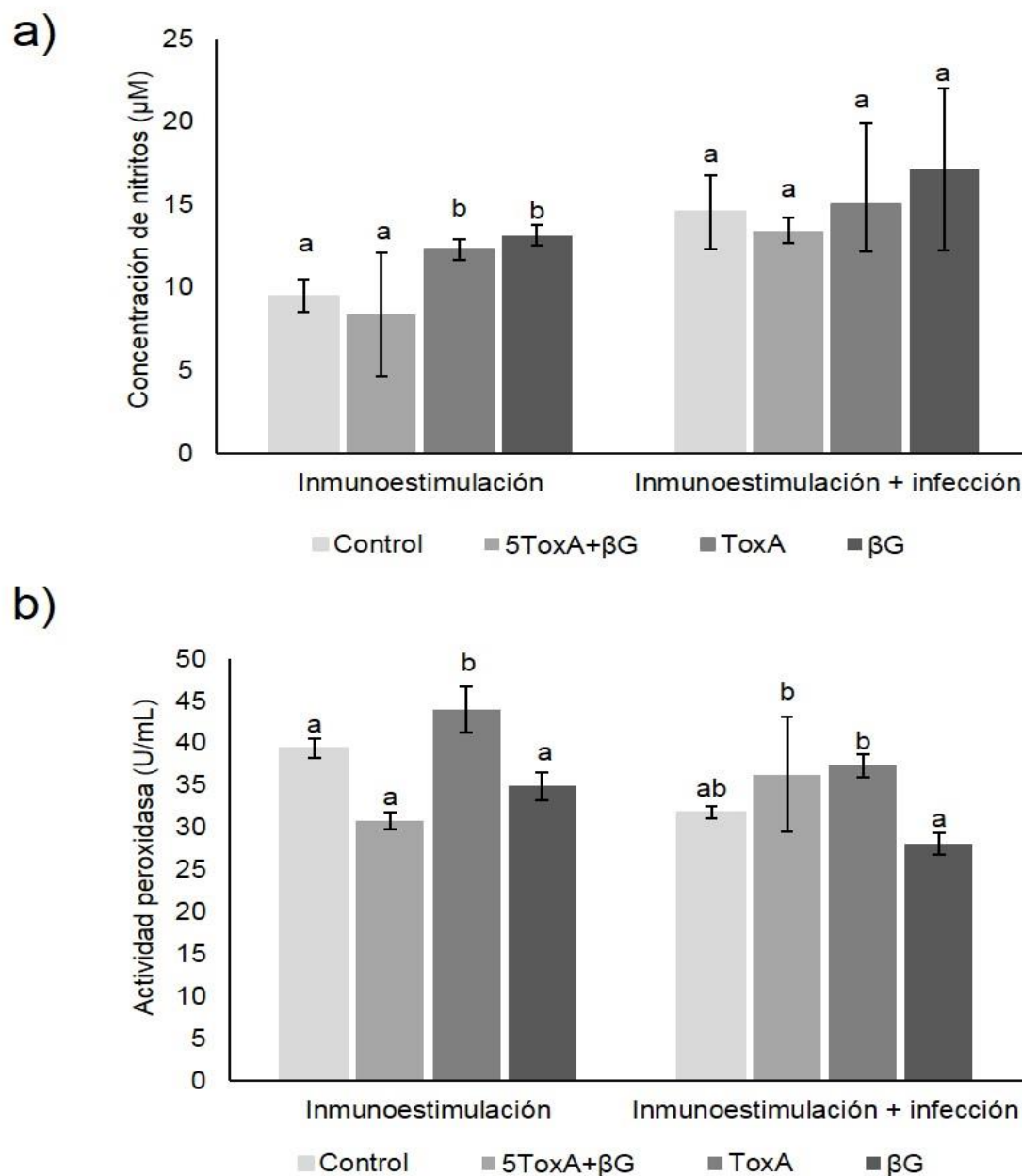


Figura 27. a) Niveles de nitritos y b) actividad peroxidasa encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+βG, ToxA ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and βG ($\beta\text{-glu/Sh}$; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* ($1 \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

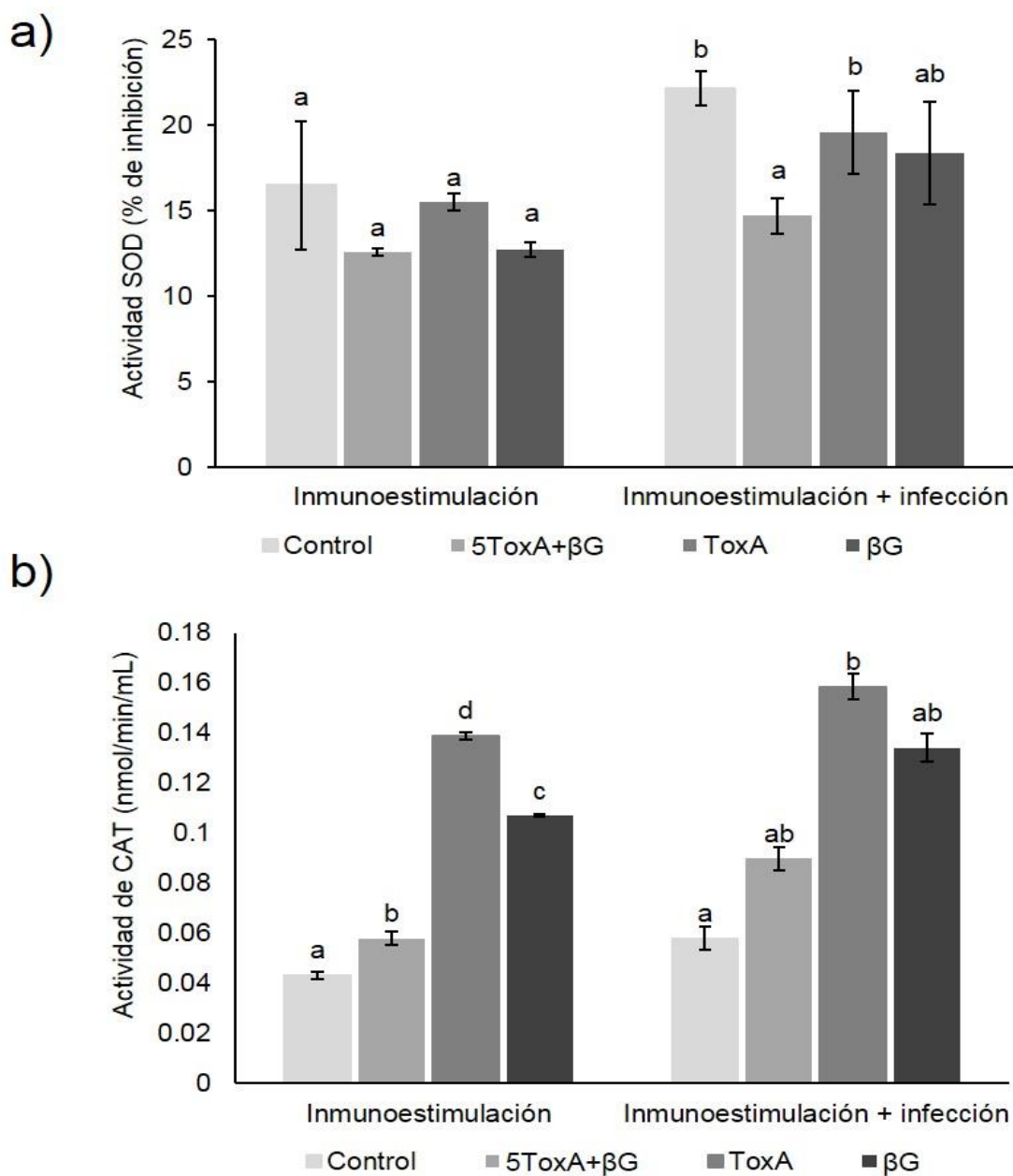


Figura 28. Actividad de a) Superóxido dismutasa y b) catalasa encontrada en leucocitos de riñón cefálico de huachinango estimulados con 5ToxA+βG, ToxA ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and βG ($\beta\text{-glu/Sh}$; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* ($1 \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Los transcritos de los receptores Mincle, MARCO, TLR2 y las citocinas IL-1 β e IL-6 fueron evaluados en leucocitos de riñón cefálico a las 12 y 24 h después de estimulación con un β -glucano experimental y un reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* N16. La expresión de Mincle fue sobre expresada tras la exposición del β -glucano antes y después del reto bacteriano. Mientras que MARCO y TLR2 fueron altamente sobre expresados después del reto bacteriano.

La expresión de las principales citocinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 fueron sobre expresados donde se combinó al β -glucano experimental con un potencial antígeno vacunal (ToxA). En contraste, con el β -glucano experimental solo se sobre expresaron ambas citocinas pro-inflamatorias antes y después del reto bacteriano.

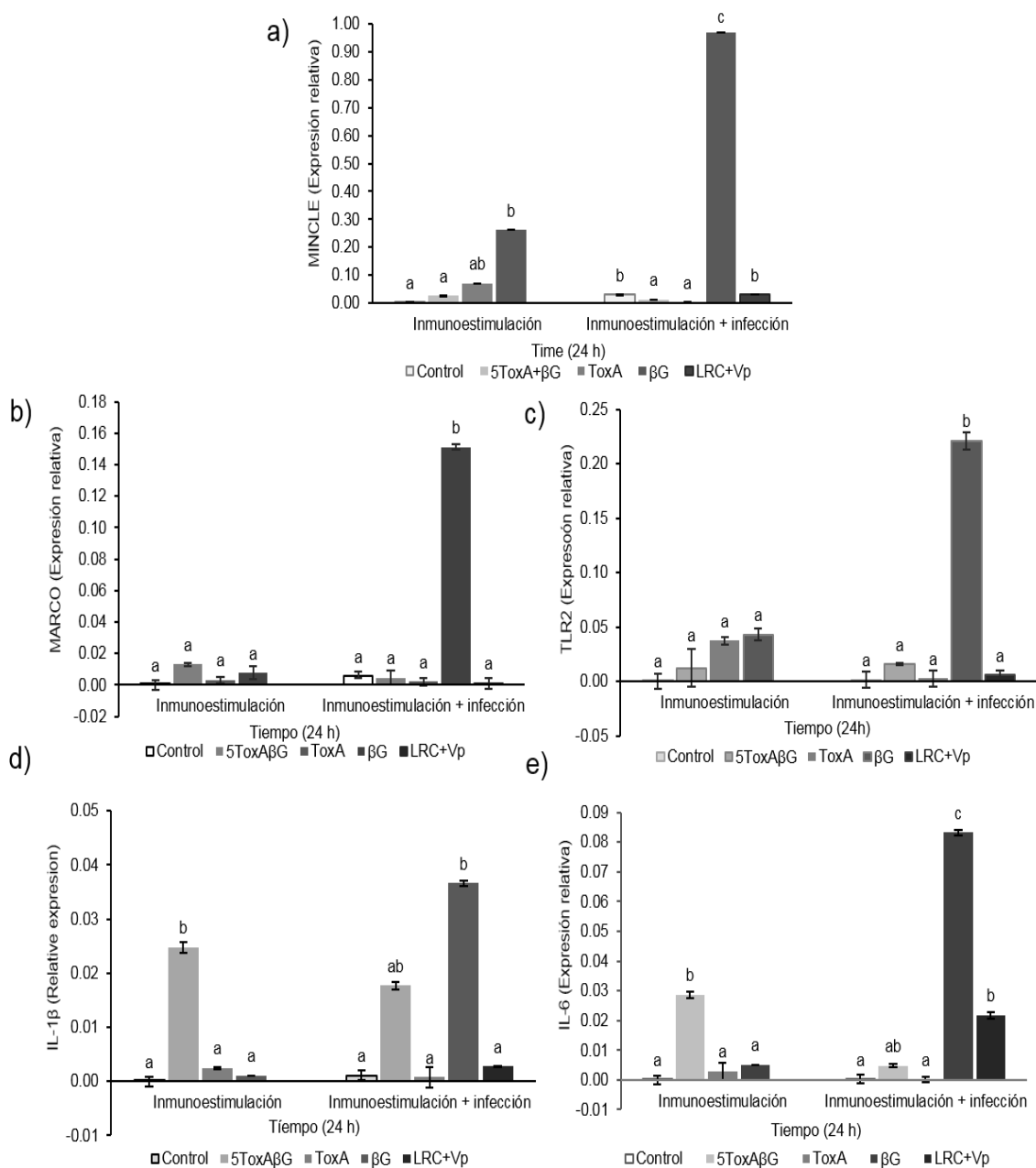


Figura 29. Expresión de genes medidos por qPCR en tiempo real de a) MINCLE, b) MARCO, c) TLR2, d) IL-1 β y e) IL-6 en leucocitos de riñón cefálico estimulados con control y con 5ToxA+ β G, ToxA (5 μ g mL $^{-1}$) and β G (β -glu/Sh; 20 μ g mL $^{-1}$) antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1 \times 10 8 ufc mL $^{-1}$). Las barras representan la media \pm D.E. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

7.10 Dieta de *Kluyveromyces lactis* M3 a juveniles de dorada (*Sparus aurata*)

La viabilidad celular fue analizada en leucocitos de sangre periférica en peces alimentados en dos dosis de *K. lactis* M3. Los resultados demuestran que la viabilidad celular fue similar en ambas dietas comparadas con el grupo control. Curiosamente la viabilidad celular en peces se observa un decremento significativo y en los peces alimentados con las dietas, se mantiene viable (Figura 26). Las poblaciones celulares de los peces tratados con la levadura en dieta oral mostraron tener diferencias significativas después del reto con *V. parahaemolyticus* N16 en el porcentaje de monocitos (65%) y linfocitos (hasta un 12%) en ambas dosis 0.55 y 1.1 % (Figura 27).

El moco de peces tratados en dieta con *K. lactis* M3 mostró tener diferencias significativas en la actividad anti-proteasa al día 15 en la dosis más alta. El mismo efecto se observó para la actividad proteasa (Figura 28). Por otro lado, los niveles de óxido nítrico y actividad peroxidasa muestran diferencias significativas en todos los tiempos en ambos tratamientos respecto al grupo control (Figura 29). Los niveles de concanavalina A (ConA) son estadísticamente significativos antes y después del reto con *V. parahaemolyticus* N16 en la dosis de 0.55%. Por otro lado, los niveles de IgM son significativamente altos solo al día 15 con la dosis de 0.55% (Figura 30).

La actividad bactericida en moco fue significativamente alta, en todos los tratamientos contra tres bacterias del género de *Vibrio*: *Vibrio parahaemolyticus* N16, *V. harveyi* Lg 16/00, and *V. anguillarum* CECT 43442 comparado con el grupo control, al día 15, día 30 y esta actividad bactericida continuó hasta después del reto bacteriano (Figura 31).

En suero fueron analizados los parámetros de ConA, IgM y óxido nítrico. Curiosamente, la dosis de 0.55% incrementó los niveles de ConA en todos los tiempos. Los niveles de IgM fueron significativamente altos sólo en el día 15 en los peces alimentados con 0.55% de levadura. Los niveles de nitritos, fueron significativamente mayores en los peces alimentados con 1.1 % al día 15 y 30 de la administración (Figura 32).

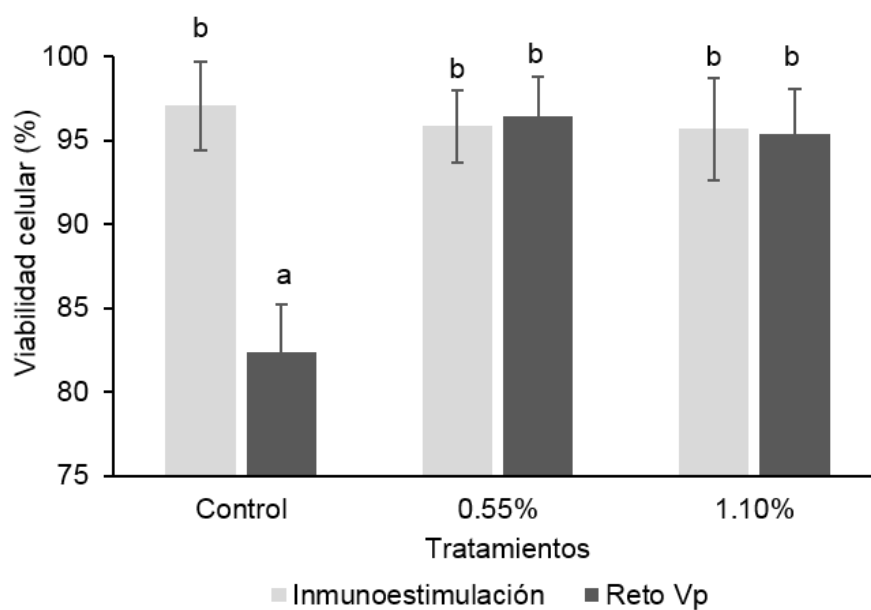


Figura 30. Viabilidad celular mediante la prueba de DiOC₆ en sangre total encontradas en suero de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

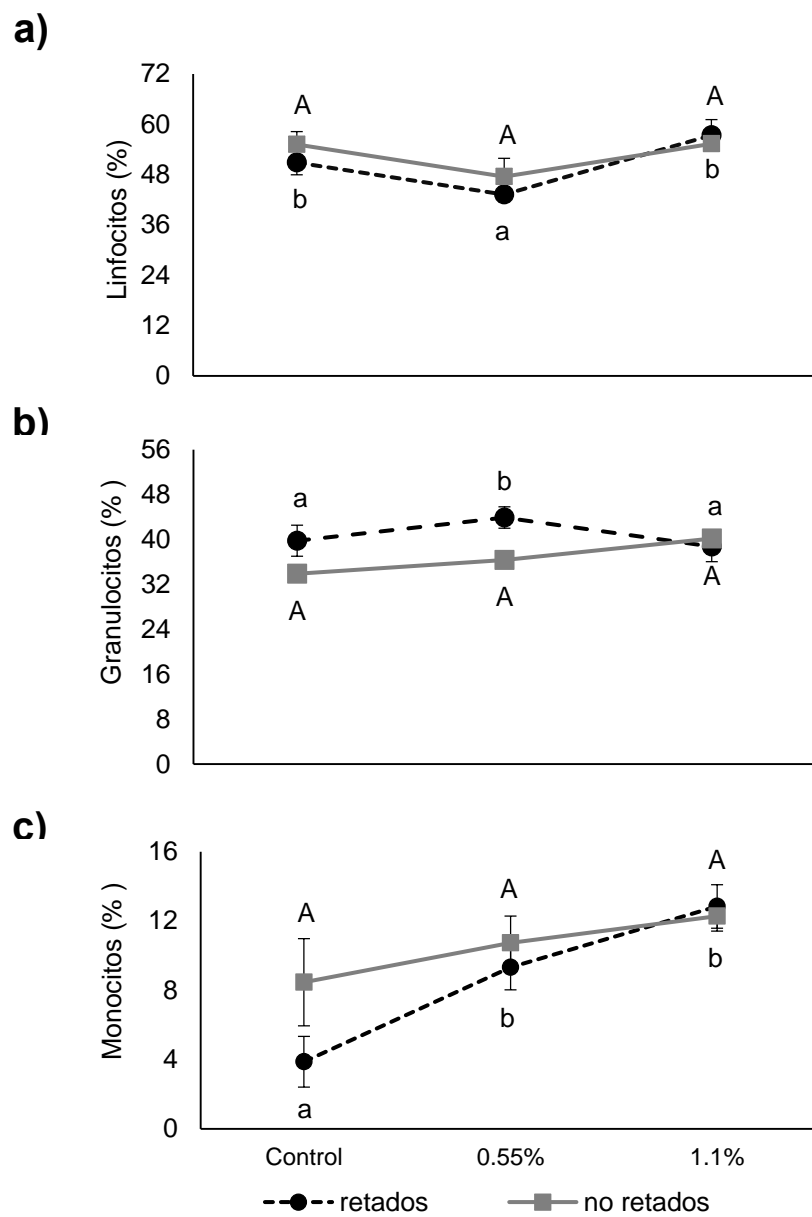


Figura 31. Poblaciones celulares determinadas por DiOC₆ de leucocitos aislados de sangre periférica de dorada (*Sparus aurata* L.) estimulados con dos dosis de *K. lactis* M3. (a) Monocitos, (b) Granulocitos, (c) Linfocitos antes y después del reto con *V. parahaemolyticus*. Cada punto representa la media \pm DE. Las distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos.

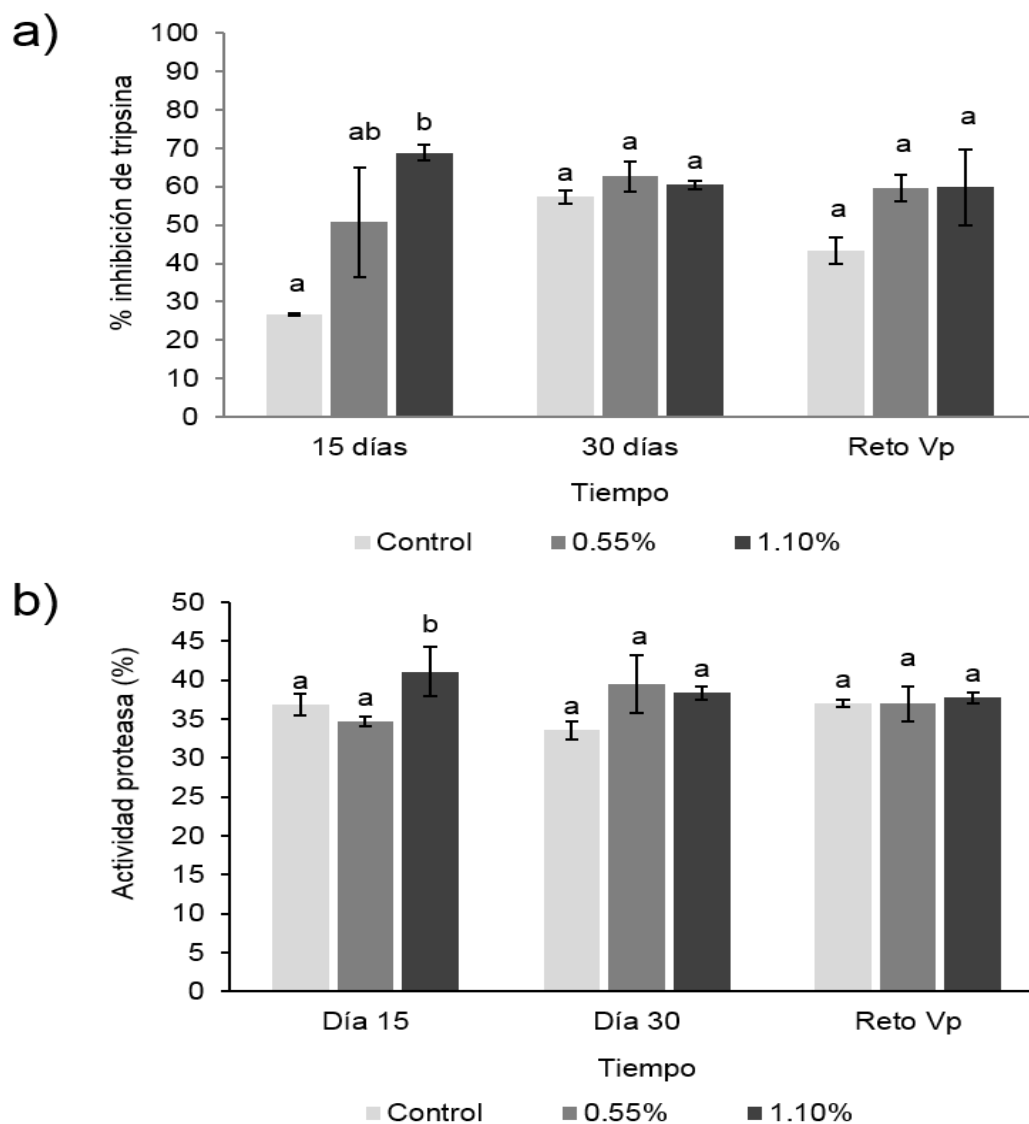


Figura 32. Actividades a) antiproteasa y b) proteasa respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

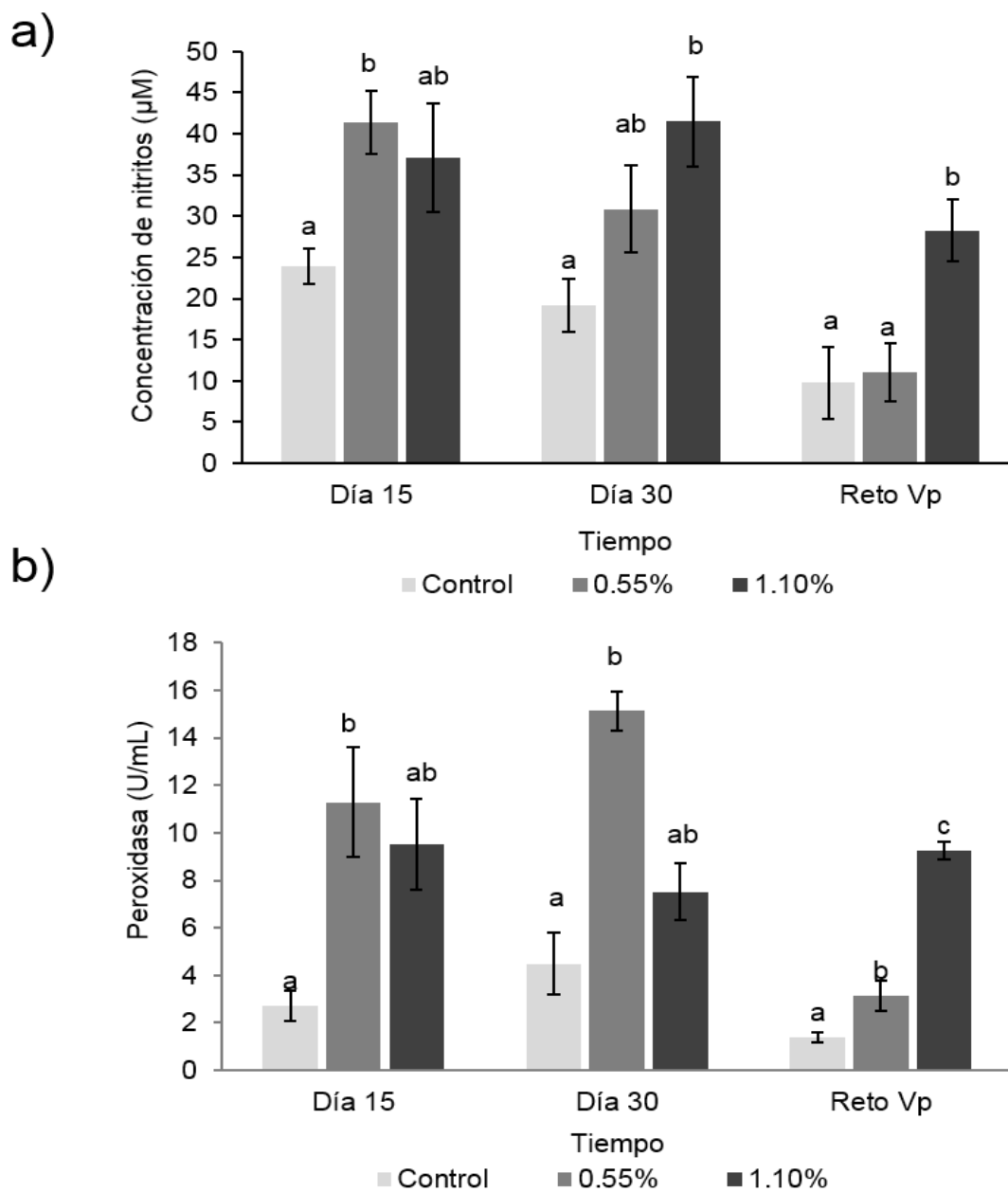


Figura 33. Actividades a) niveles de nitritos y b) peroxidasa respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

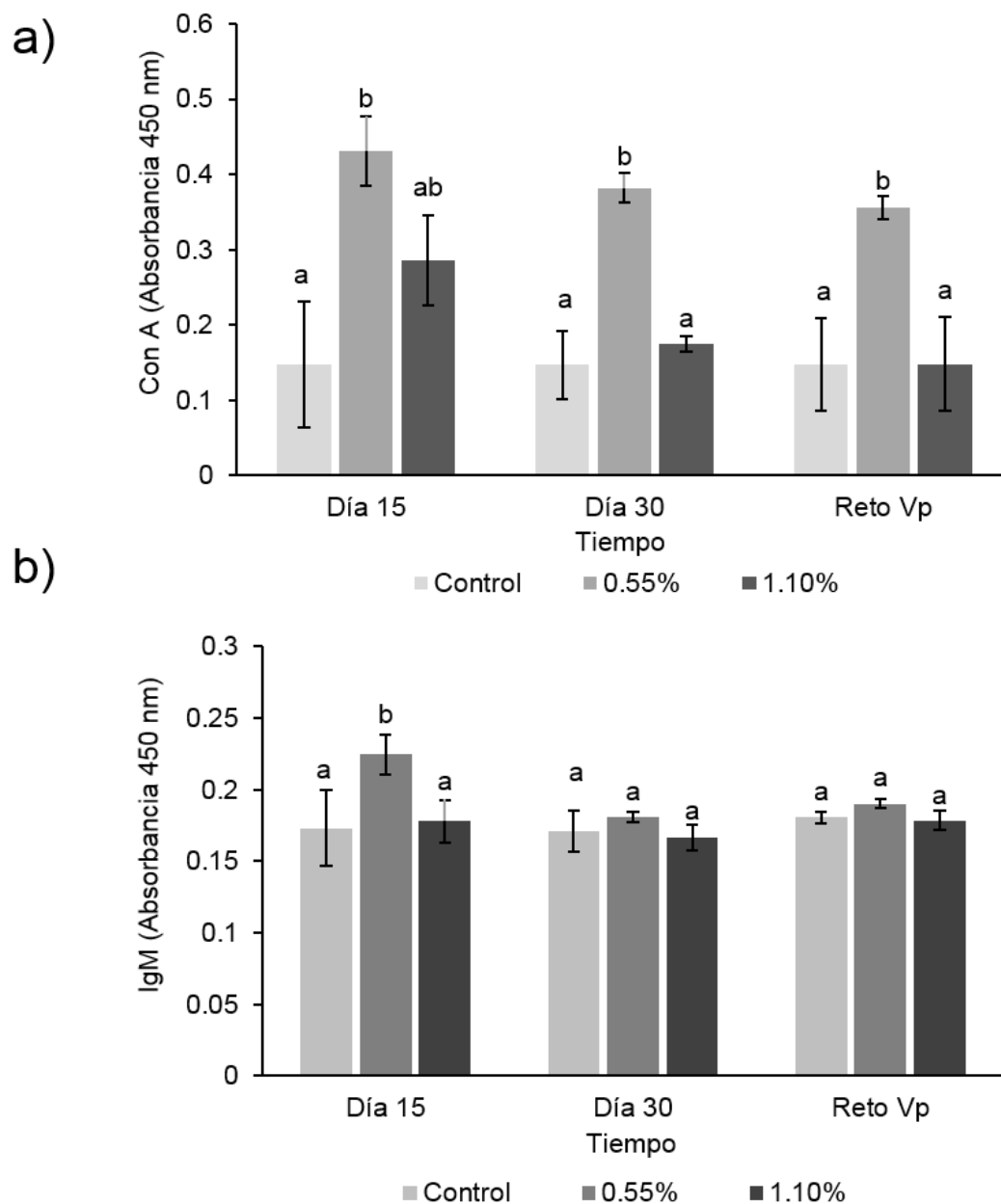


Figura 34. a) Lectina ConA y b) niveles de IgM respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

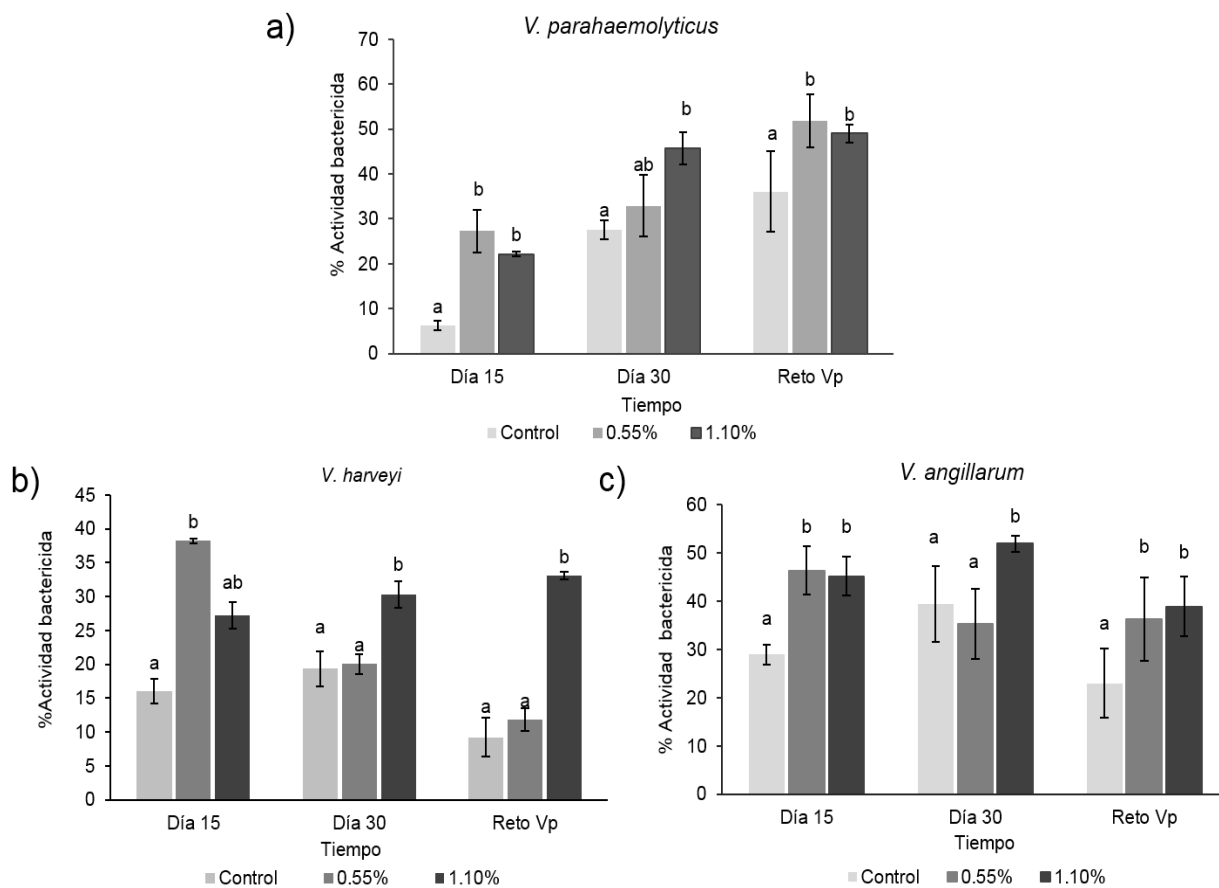


Figura 35. Actividad bactericida contra cepas patógenas de *Vibrio* a) *V. parahaemolyticus*, b) *V. harveyi* y c) *V. angillarum* respectivamente, encontradas en moco de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.10.1 Resultados en suero.

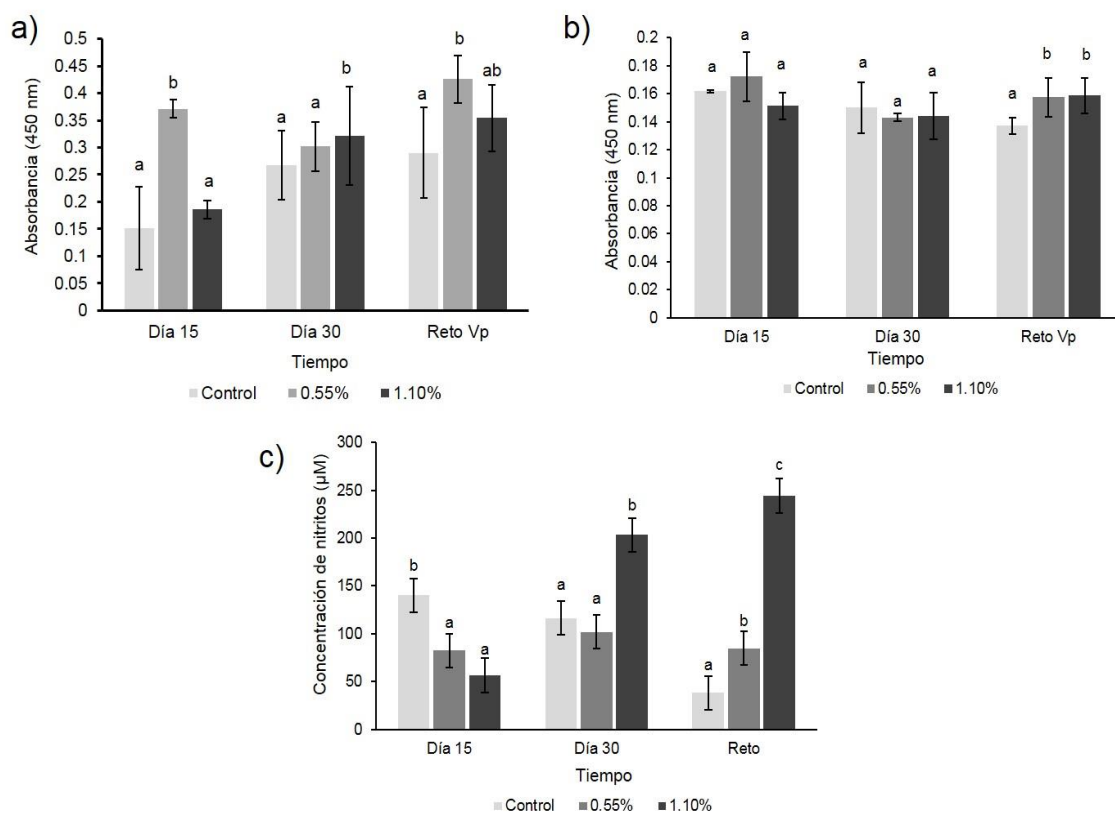


Figura 36. Parámetros inmunes a) Lectina ConA, b) niveles de IgM en suero y c) niveles de nitritos respectivamente, encontradas en suero de doradas (*S. aurata*) estimulados con *K. lactis* M3 antes y después del reto bacteriano con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 ufc mL⁻¹). Las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

7.11 Inmunidad Innata Entrenada: β -glucano de *K. lactis* M3 probado en leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*)

La peroxidación de lípidos es un proceso clave en muchos eventos patológicos. En los resultados, se observa que, respecto al control positivo, el daño celular de leucocitos estimulados con β -glucano de *K. lactis* M3 (β -KIM3) es significativamente menor comparado con un control positivo de daño (Leucocitos + DMSO). Comparado con el grupo control (Leucocitos sin tratar) en cuanto al porcentaje de peroxidación lipídica no existió diferencias significativas. La gráfica se muestra en la figura 33.

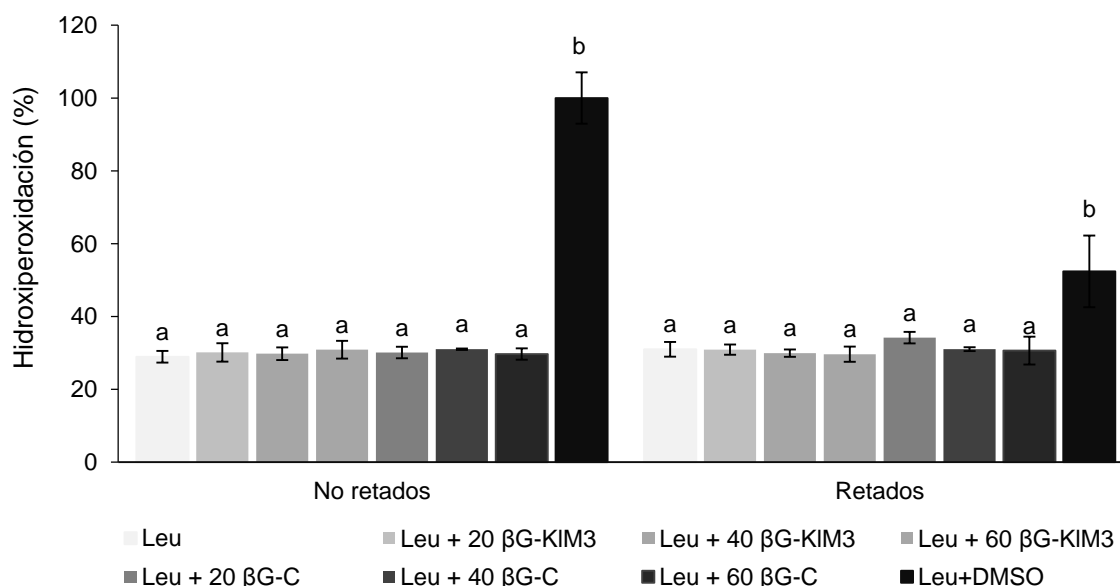


Figura 37. Hidroxiperoxidación de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucano de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

7.11.1 Parámetros de sistema inmune innato.

La activación del sistema inmune innato es un proceso clave en la defensa en los peces. Se midió la actividad del sistema inmune innato mediante los siguientes mecanismos: Viabilidad celular se observó que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 34). Sin embargo, respecto al control DMSO si existieron diferencias significativas. El porcentaje fagocitosis de los esplenocitos tratados con β -KIM3 no se observaron diferencias significativas al inicio de la estimulación. Sin embargo, después del reto con LPS tiende a incrementarse. La explosión respiratoria no muestra diferencias significativas entre grupos y tiempo, solo se ve un ligero incremento en la dosis más baja después del reto con LPS (Figura 35). En los niveles de nitritos se observan diferencias significativas en el β -glucano comercial y un incremento ligero en la dosis más baja de β -KIM3 después del reto con LPS. La actividad de mieloperoxidasa mostró incrementarse ligeramente en las dosis más altas de β -KIM3, pero no existieron diferencias significativas (Figura 36).

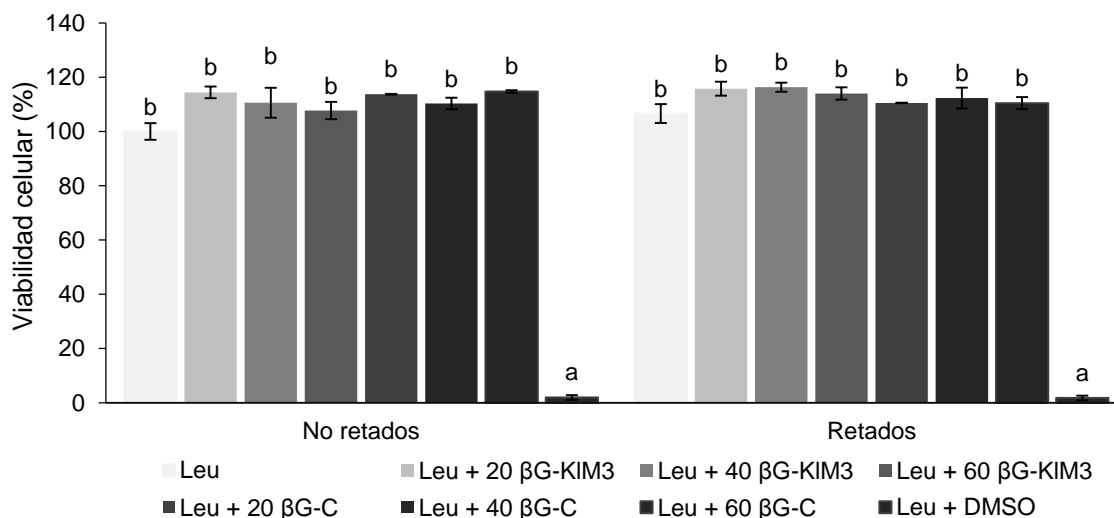


Figura 38. Viabilidad celular de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucano de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

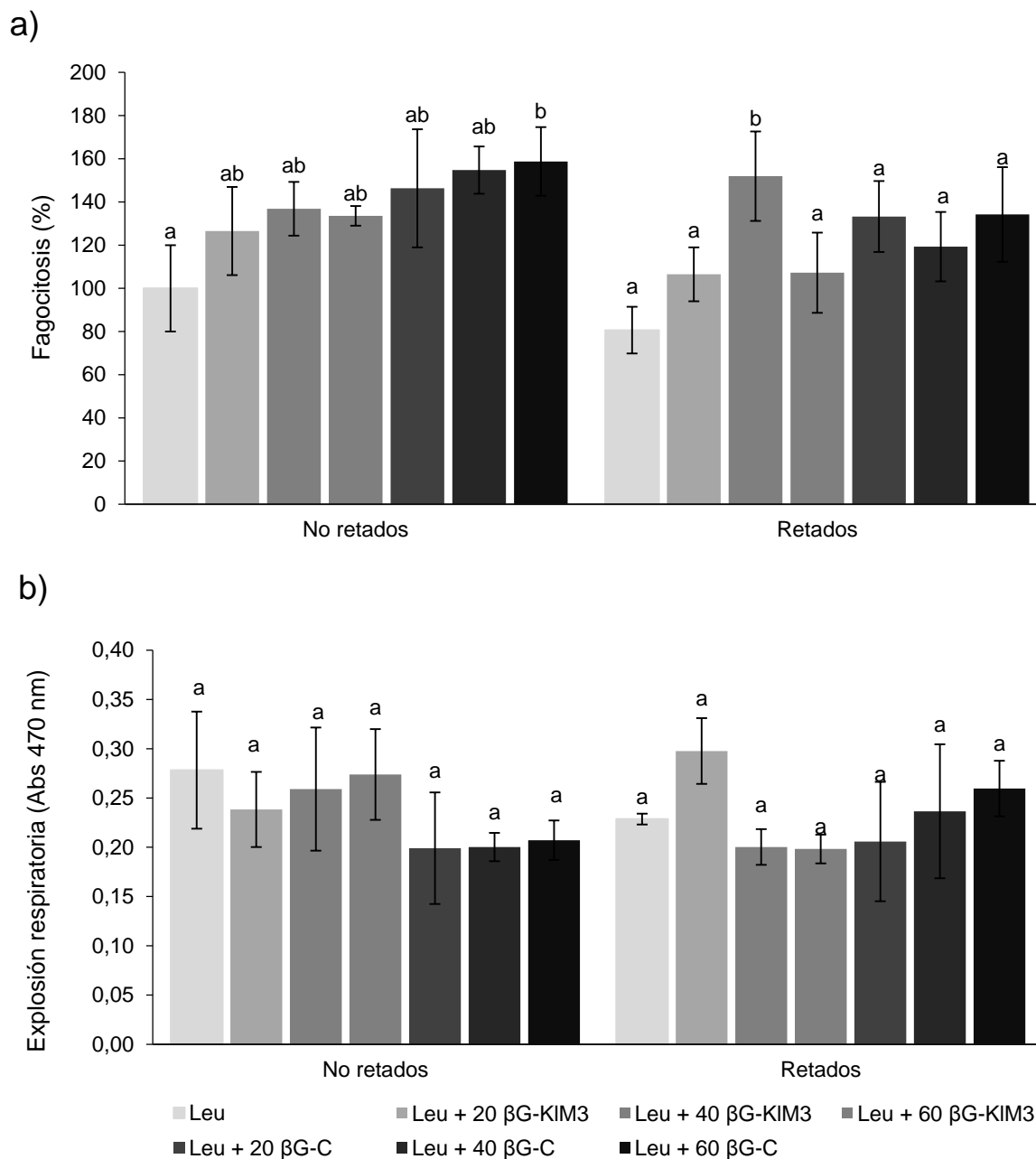


Figura 39. Fagocitosis (a) y explosión respiratoria (b) de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 μ g/mL) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucan de *S. cerevisiae* (β G-C) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

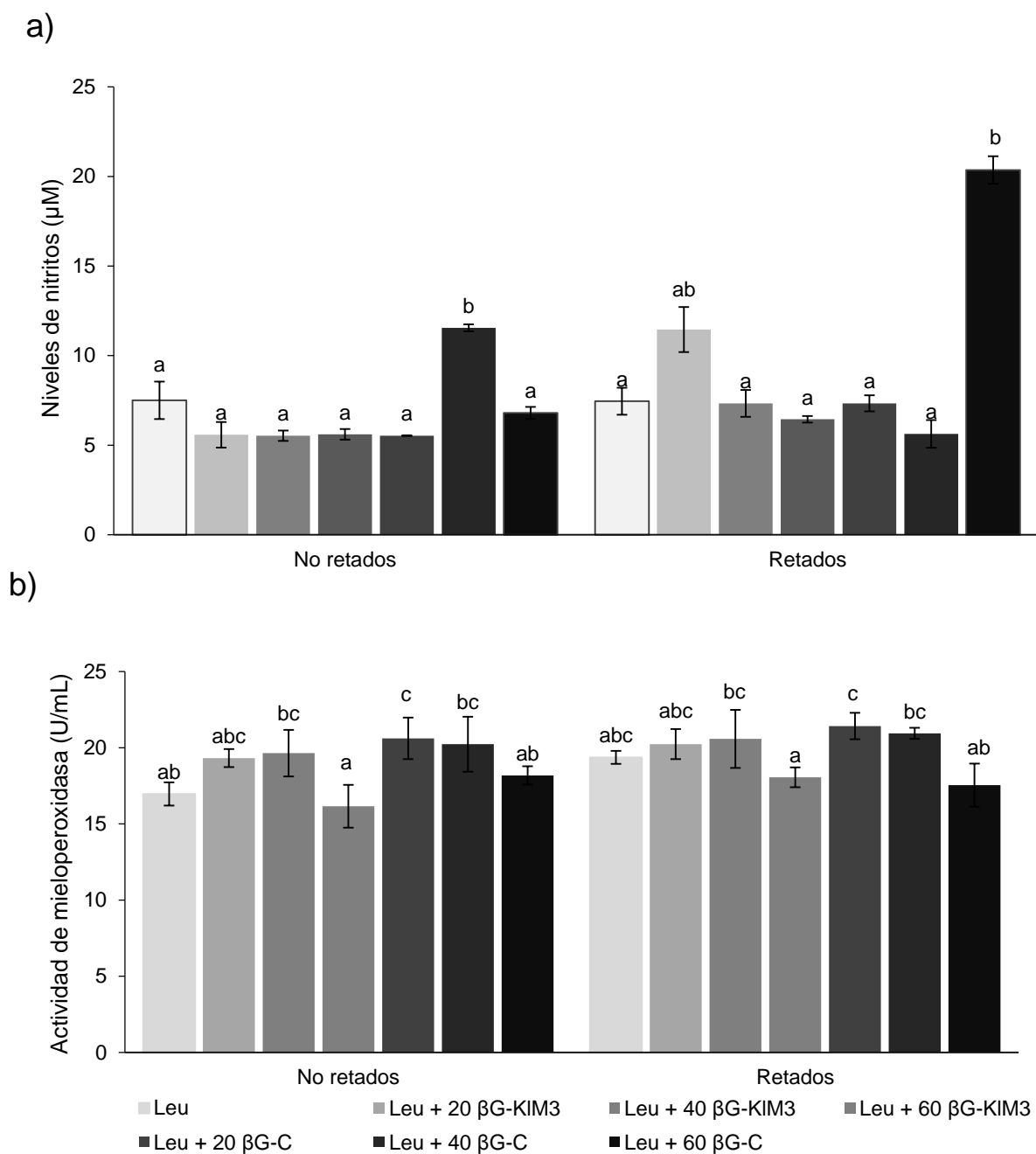


Figura 40. Niveles de nitritos (a) y actividad de mieloperoxidasa (b) de leucocitos de bazo de Jurel (*Seriola rivoliana*) estimulados con tres concentraciones de β -KIM3 (20, 40 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) antes y después del reto con LPS (100 ng/mL). Se utilizó como control positivo un β -glucan de *S. cerevisiae* ($\beta\text{G-C}$) y DMSO como control negativo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de las capacidades probióticas de la levadura evaluado *in vitro*

Las levaduras probióticas son comúnmente utilizadas como suplementos alimenticios o aditivos inmunomoduladores. *K. lactis* es generalmente conocido como seguro y ha sido estudiado como hospedero de expresión de proteínas heterólogas (Dujon *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). Estas propiedades biológicas y biotecnológicas hacen a *K. lactis* un candidato probiótico o inmunoestimulante para la producción animal. Este estudio, probó los principales parámetros microbiológicos usados para la búsqueda de probióticos potenciales. *K. lactis* M3 fue capaz de resistir a pH de 4.5-6.5, crecer a salinidades mayores a 1.5% y su crecimiento no se vio afectado por las sales biliares de dorada (*Sparus aurata* L.) Además, también tuvo alto valor de hidrofobicidad (> 80%) y capacidad de alta de autoagregación (> 87%), atributos que indican que *K. lactis* M3 tiene un alto potencial de colonización en el epitelio intestinal (Kaushik *et al.*, 2009). Las propiedades de mejoramiento a la salud de los probióticos están altamente asociadas a la adhesión al tracto intestinal (Mohanty *et al.*, 2019). Por otro lado, la tolerancia a las sales biliares de los peces es una característica importante para un probiótico, que favorece el crecimiento y la supervivencia en el intestino de los peces (Balcazar *et al.*, 2008). Fadda *et al.*, (2018) demostraron que cepas las diferentes cepas de *K. lactis* tienen diferentes propiedades probióticas, mostrando que *K. lactis* KEFYRKL1 tuvo la capacidad más alta para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales y a las sales biliares. Además, la alta hidrofobicidad y la autoagregación de varias cepas de *K. lactis* fue de 59 y 79 %, respectivamente, resultados que son inferiores a los de *K. lactis* M3. Similar a estos hallazgos, otras cepas con potencial probiótico han sido reportadas, (Kumura *et al.*, 2004; Ceugniz *et al.*, 2017; Gut *et al.*, 2019). Por lo tanto, los resultados preliminares de la búsqueda *in vitro* son esenciales para seleccionar el candidato ideal como probiótico.

Los perfiles lipídicos de las levaduras son características importantes relacionadas con la condición ambiental. Las membranas citoplasmáticas están compuestas de glicerol-esfingolípidos, ergosterol, proteínas y fosfolípidos (Sorger y Daum 2003). Los principales ácidos grasos en levaduras incluyen al ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2) y ácido linolenico (18:3) (Suutari y laakso, 1994). *K. lactis* M3 tuvo un alto contenido en ácidos grasos y fueron principalmente monosaturados o ácidos grasos omega-9, tales como el palmitico, palmitoleico, oleico y linoleico. Interesantemente, la composición de ácidos grasos de *Kluyveromyces marxianus* es relacionada con su termo tolerancia a altas temperaturas, (Mejia-Barajas *et al.*, 2018), indicando que una especie filogenéticamente relacionada podría tener variabilidad en su composición debido a la respuesta al estrés inducida por condiciones térmicas. También, los probióticos promueven la actividad antioxidante para prevenir o reducir el daño oxidativo causado por radicales libres, nulificando el estrés oxidativo en el hospedero (Lima *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo ocurre cuando los antioxidantes, tales como las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa son insuficientes para neutralizar los radicales libres (Halliwell y Gutteridge 1989). *K. lactis* M3 está reportada en este estudio con una alta capacidad antioxidante, especialmente el poder reductor férrico (FRAP) cuando es comparada con un antioxidante purificado. En un estudio previo, Ceugniz *et al.*, (2017) observaron que *K. maxianus* S-02-5 tenía una alta capacidad antioxidante y esto justifica su evaluación como probiótico. La capacidad antioxidante de los probióticos puede resultar en su maquinaria enzimática, como superóxido dismutasa y catalasa (Angulo *et al.*, 2017) o de la producción de metabolitos antioxidantes (Wang *et al.*, 2017).

8.2 Caracterización de β -KIM3 obtenido de *K. lactis* M3

La cuantificación del contenido de β -glucano se realizó mediante el desplazamiento batocrómico de los átomos presentes en los enlaces tipo β -1,3-

1,6, obteniendo un 50.33%. Resultados similares han sido reportados por Semedo *et al.*, 2015 y Angulo *et al.*, 2018. Además, por ^1H RMN se detectó la presencia de enlaces β -glucosídicos, comprobándose que existían los enlaces glucosídicos presentes en un β -glucano obtenido de una levadura (1,3-1,6) en conformación β , según diversos autores como William *et al.*, 2015 y Mayti *et al.*, 2015.

Por otro lado, se comprobó que el β -glucano está compuesto por glucosa, mediante mediciones de concentraciones de glucosa después de su descomposición en monómeros. Resultados similares se observaron con un β -glucano experimental obtenido de *Yarrowia lipolytica* por Velázquez-Carriles *et al.*, 2018. En cuanto a la comprobación de interacciones de enlaces que estén presentes en los β -glucanos, se comprobó por la técnica de FTIR que existiera las vibraciones de los enlaces existentes entre C-C (Carbono-Carbono), C-O (Carbono-Oxígeno) y H-H (Hidrógeno-Hidrógeno) donde el espectro obtenido mostró los picos característicos de este tipo de compuestos (Laminarina, Curdlan, Zimosan) y que el β G-KIM3 también mostró.

En cuanto a la actividad antioxidante, mediante la captación de radicales y aniones libres, el β G-KIM3 mostró tener alta actividad captadora de radicales (medido mediante las técnicas de DPPH, actividad captadora de anión superóxido, actividad captadora de OH^- , ABTS+, actividad quelante de Fe^{3+} y FRAP) incluso superior a la de otros β -glucanos reportados (Mayti *et al.*, 2014; Mayti *et al.*, 2015; Nandi *et al.*, 2014).

8.3 Caracterización MINCLE.

El receptor lectina tipo C inductor de macrófagos (MINCLE; por sus siglas en inglés) es un receptor altamente expresado en macrófagos conocido por su habilidad en reconocer patrones presentes en levaduras u hongos, como tehalosa-6, glicolípidos, manosa y glucanos (Ishikawa *et al.*, 2009; Hattori *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2008) a través de la señalización interna en el citoplasma por ITAM y mediadores de la ruta como Syk y la producción de IL-6 (Matsumoto *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2007).

La caracterización del receptor MINCLE en el huachinango (LpMINCLE) ha mostrado tener una alta relación filogenética entre secuencias de peces y un grupo separado con las secuencias de mamíferos. Basado en análisis bioinformáticos LpMINCLE tiene 1670 pb con un marco de lectura de 1187 pb. La proteína LpMINCLE consistió de dos dominios: Un dominio transmembrana (de los residuos 48-70 aa) y un dominio tipo C-lectina (residuos del 120-251 aa) estos resultados concuerdan con los publicados por Zoccola *et al.*, 2017. El dominio C-lectina es un dominio altamente conservado en mamíferos y entre especies de peces. Los resultados mostraron un LpMINCLE con un dominio conservado y homólogo con la secuencia de MINCLE de otras especies de peces tanto de agua dulce como de agua marina.

En este estudio, además se evaluaron varios parámetros del sistema inmune innato de los peces relacionados al mecanismo de los glucanos con el sistema inmune. La fagocitosis, por ejemplo, es una función en la cual células como neutrófilos y macrófagos capturan patógenos y los degradan por diversos métodos en los que se incluyen dependientes e independientes de oxígeno. Los resultados de este estudio indican que entre una mayor concentración de una proteína antigénica (ToxA) combinada con un potencial estimulante, en este caso un glucano obtenido a partir de una levadura (*S. halophilus* 4N16) potencial probiótico (β -glu/Sh) incrementa la fagocitosis. Resultados similares fueron obtenidos por Reyes-Becerril *et al.*, 2018 cuando fueron estimulados leucocitos obtenidos a partir de célula sanguíneas (PBLs; por sus siglas en inglés) de huachinango con el β -glu/Sh. Además, ToxA más β -glu/Sh es capaz de incrementar esta capacidad de fagocitosis por parte de los leucocitos.

Además, los β -glucanos tienen un potencial como fuente de neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS; por sus siglas en inglés). Esta característica debe ser evaluada cuando un nuevo β -glucano es obtenido por técnicas como la captación de radicales libres: DPPH, captación de radical hidroxilo y captación de radical anión superóxido. Los resultados mostrados para

el glucano β -glu/Sh estuvieron correlacionados con los mostrados por Giese *et al.*, 2015 y Maity *et al.*, 2017 que demuestra la capacidad de captación cuando se incrementa la concentración de β -glu/Sh y respecto a la captación de radical anión superóxido demostró un potencial considerable.

Por otro lado, la explosión respiratoria es un proceso que ocurre cuando los fagocitos comienzan con la internalización de partículas patógenas. En este caso, la explosión respiratoria incrementó en todas las dosis administradas de ToxA más β -glu/Sh comparado con el grupo control. De forma interesante, este efecto fue encontrado en fagocitos de trucha y en dorada cuando fue evaluado distintos β -glucanos sobre leucocitos en cultivo primario (Castro *et al.*, 1999).

Como producto de la explosión respiratoria, existe el óxido nítrico que es producido por células fagocíticas como los macrófagos tras la activación y degradación de las partículas. En este caso, los niveles de nitritos incrementaron significativamente en todos los tratamientos comparados con el grupo control. Estos resultados concuerdan con los de Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017 cuando se estimuló leucocitos con β -glucano de hongos.

La mieloperoxidasa o peroxidasa (PO) es una enzima secretada cuando los neutrófilos son activados en la respuesta inmune innata. La PO utiliza el peróxido de hidrógeno y produce ácido hipocloroso que es altamente tóxico cuando se intercala en la pared celular de las bacterias patógenas. En este caso, la PO incrementó significativamente después del reto bacteriano con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* en todos los tratamientos comparados con el grupo control. Este efecto concuerda con Reyes-Becerril *et al.*, 2016 cuando fue inyectado un lisado de *V. parahamolyticus* y ToxA a huachiangos.

En otro sentido, la CAT y SOD tienen actividades importantes en el sistema inmune innato removiendo el exceso de radicales libres dentro de las células del sistema inmune. Cuando leucocitos de riñón cefálico fueron estimulados con un potencial antígeno (ToxA) más β -glu/Sh se incrementó la actividad de la enzima

CAT en todos los tratamientos. Por otro lado, la actividad de SOD se incrementó moderadamente comparada con el grupo control. Estos resultados coinciden con los de Taju *et al.*, 2017 y Bano *et al.*, 2017, que indican cuando un estrés oxidativo se presenta en los leucocitos, las actividades de SOD y CAT tienden a incrementarse en la defensa celular.

Este trabajo, además evaluó tres receptores con importancia en el reconocimiento de β -glucanos: MINCLE, MARCO y TLR2, así como interleucinas que participan muy cercanamente en esta ruta: IL-1 β e IL-6. Los leucocitos estimulados con β -glu/Sh sobreexpresaron todos los genes después del reto bacteriano con *V. parahamolyticus*. Estos resultados fueron observados cuando en leucocitos de sangre periférica de huachinangos fueron estimulados con β -glu/Sh y retados con *A. hydrophila* (Reyes-Becerril *et al.*, 2018). Curiosamente, después del reto bacteriano los leucocitos son sobre expresado en todos los genes analizados. Esto podría ser explicado debido a que MINCLE, MARCO y TLR2 están implicados en el reconocimiento de β -glucano y la consecuencia de estas rutas es la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y IL-1 β (Zhang *et al.*, 2018; Brietzke, *et al.*, 2016).

8.4 *In vivo*: dieta oral con *K. lactis* M3 a doradas.

La seguridad de una levadura es obligada para el uso como probiótico en las granjas acuícolas. Este estudio mostró que *K. lactis* M3 no es citotóxica para leucocitos de sangre periférica de dorada. Li *et al.*, (2015) reportó que las levaduras del género *Saccharomyces* no fueron citotóxicas para células Caco-2 después de 24 horas de estimulación. Estudios similares fueron obtenidos para *K. lactis* S-3-05 (Ceugniz *et al.*, 2017). Por otra parte, los efectos inmunoestimulatorios e inmunoprotectores de *K. lactis* y *K. marxianus* son elementos para considerar (Kourelis *et al.*, 2010; Maccaferri *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). En este estudio, se alimentó a doradas con *K. lactis* M3 y tuvo un efecto bactericida en moco al día 15 y día 30. Una de las barreras más importantes en peces es el mucus que se encuentra en la piel, ya que

contiene enzimas relacionadas al sistema inmune que ayudan en el control de patógenos (Subramanian *et al.*, 2007) y en este caso, *K. lactis* M3 puede excluir algunos patógenos relacionados con la producción de diferentes compuestos antimicrobianos (Fadda *et al.*, 2017). La relevancia de las propiedades probióticas encontradas en estudio indican que *K. lactis* M3 induce en la suplementación de los peces una alta actividad bactericida contra *V. parahamolyticus*, *V. harveyi* y *V. angillarum*. Interesantemente, la especificidad de niveles de lectinas en mucus incrementa significativamente después de la suplementación con 0.5% de dieta de *K. lactis* M3. Las lectinas son proteínas con ligando de carbohidratos encontrados intra y extracelularmente en el moco de la piel de diversos animales, especialmente de peces. La función principal de las lectinas en animales es el reconocimiento de patógenos, aglutinación, opsonización, activación del complemento y fagocitosis (Vasta *et al.*, 2011). Por otra parte, este incremento en lectina Concanavalina A (Con A) podría estar relacionada con la alta actividad bactericida en moco en los peces alimentados con *K. lactis* M3. En línea con estos resultados, otros estudios han demostrado que las dietas con levaduras pueden potenciar la actividad bactericida en peces (Reyes-Becerril *et al.*, 2017).

Las levaduras con propiedades probióticas pueden promover la activación de macrófagos y otras células como parte de su efecto de actividad inmunoestimulante, los cuáles producen citocinas e inducción de enzimas relacionadas a la actividad inmune (Vohra *et al.*, 2016). Los parámetros inmunológicos son importantes en el estatus de la salud de los peces. La actividad fagocítica induce la producción de especies reactivas de oxígeno y enzimas, tales como el óxido nítrico y peroxidasas, respectivamente. El óxido nítrico es un agente antimicrobiano contra patógenos (Nablo y Chen, 2001) y la actividad de mieloperoxidasa es crucial para la generación del bactericida HOCl a partir de H₂O₂ potenciando la actividad inmune en mucosas y ayudando en el balance REDOX (Reyes-Becerril *et al.*, 2017). En este estudio, se observaron altos valores de óxido nítrico y actividad peroxidasa y fueron observados como resultados de la

administración de *K. lactis* M3. Maccaferri *et al.*, 2012 reportaron que *K. marxianus* estimula la respuesta inmune en experimentos *in vitro* usando células Caco-2 y células mononucleares de sangre periférica a partir de humanos. En células dendríticas de humanos, *K. marxianus* moduló la respuesta inmune y podría controlar la inflamación excesiva (Smith *et al.*, 2016). En un experimento *in vivo* realizado en pollos, Wang *et al.*, (2017) demostraron que *K. marxianus* incrementó exponencialmente los niveles de lisozima e IgG en suero a dosis de 1.0 g/kg. Por otra parte, Kourelis *et al.*, (2010) encontraron que *K. lactis* 630 indujo el reclutamiento de células polimorfonucleares, la actividad fagocítica y la producción de citocinas en un modelo de ratón. Además, algunos autores reportaron que los ratones alimentados con *K. lactis* tuvieron una alta producción de IgA y la expresión de TLR en intestino delgado. Aunque ninguna cepa de *K. lactis* ha sido previamente estudiada como probiótico en peces, es claro que la entrega oral de *K. lactis* M3 podría considerarse como una alternativa para combatir enfermedades bacterianas e incrementar la respuesta inmune humoral en granjas acuícolas.

8.5 *In vitro*: β -glucano obtenido a partir de *K. lactis* M3 en leucocitos de dorada.

Después de evaluarse la dieta con la levadura *K. lactis* M3 se hizo la extracción de glucano. Los leucocitos extraídos a partir de riñón cefálico de doradas que fueron estimulados en dieta oral por 20 días en dos concentraciones: 125 y 250 mg diarios; así como un reto bacteriano a los leucocitos con dos bacterias patógenas: *V. parahaemolyticus* y *P. damsela*. La viabilidad celular de leucocitos de riñón cefálico estimulados con ambas dosis de β -glucano no se vio afectada en comparación con el grupo control. Autores como Ulvestad *et al.*, 2018 y Petit *et al.*, 2019 estimulan leucocitos y macrófagos respectivamente y no observan daño por la administración de un β -glucano. Además, después de esta estimulación y después del reto bacteriano con ambas bacterias patógenas no se observa daño, indicando que existió un efecto protector. Después, se midieron parámetros de explosión respiratoria y habilidad/capacidad de fagocitosis. En explosión respiratoria, existieron diferencias significativas en ambas dosis antes y

después del reto bacteriano. Ulvestad *et al.*, 2018 observa un incremento similar después de la administración *in vitro* del β -glucano en el parámetro de explosión respiratoria. En relación con la habilidad y capacidad de fagocitosis la habilidad incrementó significativamente antes y después del reto bacteriano. En cuanto a la capacidad de fagocitosis, este parámetro solo muestra tendencia al incremento. García-Beltrán *et al.*, 2018 observa un incremento en la habilidad de fagocitosis después de la administración de un inmunostimulante. Reyes-Becerril *et al.*, 2020 también observa un incremento significativo del porcentaje de fagocitosis después de la estimulación con un β -glucano experimental en leucocitos de bazo de huachinango.

Por otro lado, los niveles de peroxidasa en leucocitos (conocida como mieloperoxidasa) fueron incrementados en la dosis más alta de β -glucano (250 mg) y además se vieron significativamente más alto después de la administración de ambas bacterias patógenas. Con respecto a los nitritos, estos niveles fueron significativamente más altos en el tratamiento con la menor concentración de glucano y se mantuvieron después del reto bacteriano. Este es uno de los principales sub-productos de la explosión respiratoria, lo que indica que la fagocitosis fue activada con un mayor incremento en el tratamiento de 125 mg (García-Beltrán *et al.*, 2018; Fazio *et al.*, 2017).

8.6 *In vitro*: β -glucano de *K. lactis* probado en inmunidad innata entrenada en peces.

De acuerdo a diversos autores, el daño celular puede ser medido con técnicas como la peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas, ya que esto demuestra el daño celular que podría estar ocurriendo a nivel celular. El daño celular fue medido mediante la técnica de peroxidación de lípidos la cuál es medida por el reactivo FOX que mide el grado de hidroxiperoxidación lipídica (Wang *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

Los resultados demuestran que ninguno de los tratamientos muestra daño celular, comparado con el control positivo de daño celular (leucocitos + DMSO) los cuáles se utilizaron con referencia de 100% de daño. Autores como Chen *et al.*,

2019 miden el daño celular con la técnica de TBARS (peroxidación de lípidos utilizando el reactivo ácido tiobarbitúrico) y han demostrado que los β -D-glucanos no causan daño celular incluso utilizando concentraciones mayores a 200 μ g/mL.

En el presente trabajo se midió la capacidad inmunoestimulante de un glucano obtenido a partir de *K. lactis* después de un reto con LPS. Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran la capacidad de proteger la viabilidad celular, aún después del reto con LPS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chen *et al.*, 2019 cuando prueba un polisacárido obtenido a partir de una fruta endémica de China y lo prueba sobre una línea celular de macrófagos (RAW264.7) y demuestra el potencial pro-inflamatorio después de 12 horas de estimulación. Por otro lado, el potencial inflamatorio de los β -glucanos ha sido evaluado de manera inespecífica e incluso se han evaluado como entrenadores de la memoria inmunológica en combinación con LPS (Sukumuran *et al.*, 2010; Brown, 2009; Netea *et al.*, 2016).

Por otro lado, se midió la fagocitosis y la explosión respiratoria en los leucocitos tratados con el β -D-glucano experimental (β -D-KIM3). Aunque no existieron diferencias significativas en la explosión respiratoria, en fagocitosis se observó un incremento significativo en la dosis más alta del β -D-KIM3. La fagocitosis es un proceso clave para el inicio de la inmunidad innata. En estímulos con β -D-glucanos a leucocitos de riñón cefálico de peces se ha observado un incremento significativo después 4, 8 y 12 horas de estimulación (Soltanian *et al.*, 2007; Kiron *et al.*, 2016).

La producción de óxido nítrico y la actividad de mieloperoxidasa están relacionadas al sistema inmune innato. En este experimento se observó un incremento significativo después de 12 horas de la inmunoestimulación en la actividad de mieloperoxidasa. Esta enzima es clave, ya que juega un rol clave en los efectos bactericidas, como se ha reportado en leucocitos de riñón cefálico de pez estimulados con β -D-glucanos a las 8 horas de inmunoestimulación (Pietretti *et al.*, 2013). Los niveles de óxido nítrico no mostraron diferencias significativas

antes y después del reto con LPS. Estos niveles están relacionados a su producción cuando la fagocitosis es mediada por las especies reactivas de nitrógeno, sin embargo, la fagocitosis observada en este estudio pudo estar mediada por especies dependientes de oxígeno y otros mecanismos independientes (enzimas proteolíticas) (Reyes-Becerril *et al.*, 2018).

9. CONCLUSIONES

La levadura *K. lactis* M3 mostró características atractivas que le confieren uso como probiótico en peces, debido a sus propiedades de autoagregación, hidrofobicidad, resistencia a pH ácido, sales biliares, crecimiento en concentraciones altas de sal y adhesión a intestino. Por otro lado, es interesante también las propiedades antioxidantes que presentó, aunque no son tan altas como el compuesto comercial puro, si presentó mayor capacidad antioxidante que otras bacterias y levaduras evaluadas como probióticas. La levadura no mostró citotoxicidad para leucocitos de dorada.

La administración de *Kluyveromyces lactis* M3 en la dorada (*Sparus aurata* L.) incrementa la viabilidad de células sanguíneas después de un reto bacteriano y la actividad bactericida en moco contra cepas del género *Vibrio*.

El receptor tipo lectina inductor de macrófagos del huachinango (*Lutjanus peru*): MINCLE fue identificado, caracterizado y se sobreexpresó junto con genes de la cascada de señalización de glucano en leucocitos estimulados con glucanos de levadura.

El β -glucano de *K. lactis* M3 (β G-KIM3) estimula la fagocitosis y promueve la protección ante un reto bacteriano a nivel en leucocitos de riñón cefálico de dorada (*Sparus aurata* L.).

10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Aziz M., A.E. Eissa, M. Hanna, M.A. Okada. 2013. Identifying some pathogenic *Vibrio/Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *Int. J. Vet. Sci. Med.* (1) 87–95. doi: 10.1016/j.ijvsm.2013.10.004.
- Akramienė, D., A. Kondrotas, J. Didžiapetrienė, E. Kėvelaitis. 2007. Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina*, 43(8), 597.
- Alam, M. J., S. Miyoshi, S. Shinoda. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather in the Seto Inland Sea, Japan. *J. Environ. Microbiol.* 5, 706–710.
- Alexander, J. B., G. A. Ingram. 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 249-279.
- Alipour, M., K. Issazadeh, J. Soleimani. 2014. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from seawater and sediment samples in the southern coast of the Caspian Sea. *Comp. Clin. Path.* 23, 129–133.
- Andlid T., R. Vazquez-Juarez, L. Gustafsson. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol Mar Biol Biotech.* 7(2) 115-26.
- Angulo C., M. Maldonado, K. Delgado, M. Reyes-Becerril. 2017. *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 71 (2017) 18–27. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.020.
- Angulo M., M. Reyes-Becerril, R. Cepeda-Palacios, D. Tovar-Ramírez, M.Á. Esteban, C. Angulo. 2019. Probiotic effects of marine *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (103) 2339–2352. doi:10.1007/s00253-019-09621-5.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, T. Kumamoto, A. Takashima. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol. Chem.* 275(26), 20157-20167.
- Armstrong, P. B., J. P. Quigley. 1999. α 2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 23(4-5), 375-390.
- Asoudeh-Fard A., A. Barzegari, A. Dehnad, S. Bastani, A. Golchin, Y. Omid. 2017. *Lactobacillus plantarum* induces apoptosis in oral cancer KB cells through upregulation of PTEN and downregulation of MAPK signalling pathways, *BiolImpacts.* (7) 93–198. doi:10.15171/bi.2017.22.
- Austin, B., D. Austin. 2007. *Bacterial Fish Pathogens; Diseases of Farmed and Wild Fish.* Praxis Publishing, Chichester, UK.

- Balcázar J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J.L. Muzquiz, O. Girones. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish, *Aquaculture*. (278) 188–191. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2008.03.014.
- Barreto-Bergter, E., R. T. Figueiredo. 2014. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect MI*. 4, 145.
- Bellon-Fontaine N.M., J. Rault, C.J. van Oss. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (7) 47–53. doi:10.1016/0927-7765(96)01272-6.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem*. (239) 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- Bordas M.A., M.C. Balebona, I. Zorrilla, J.J. Borrego, M.A. Moriñigo, Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.), *Appl. Environ. Microbiol*. 62 (1996) 3650–3654.
- Brand-Williams W., M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. 1995. *LWT - Food Sci. Technol*. (28) 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Brányik T., A. Vicente, R. Oliveira, J. Teixeira. 2004. Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng*. (88) 84–93. doi:10.1002/bit.20217.
- Broberg, C. A., T. J. Calder, K. Orth. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect*.13, 992–1001.
- Brown, G. D., S. Gordon. 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell. Microbiol*. 7(4), 471-479.
- Burdette, D. L., M. L. Yarbrough, A. Orvedahl, C. J. Gilpin, K. Orth. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 105, 12497–12502.
- Camilli, G., G. Tabouret, J. Quintin. 2018. The complexity of fungal β -glucan in health and disease: effects on the mononuclear phagocyte system. *Front. Immunol*. 9, 673.
- Caruffo M., N.C. Navarrete, O.A. Salgado, N.B. Faúndez, M.C. Gajardo, C.G. Feijóo, A. Reyes-Jara, K. García, P. Navarrete. 2016. Protective yeasts control *V. anguillarum* pathogenicity and modulate the innate immune response of challenged Zebrafish (*Danio rerio*) larvae, *Front. Cell. Infect. Microbiol*. (6) 127. doi:10.3389/fcimb.2016.00127.

Ceugniz A., F. Coucheney, P. Jacques, G. Daube, V. Delcenserie, D. Drider, Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies, Res. Microbiol. 168 (2017) 575–582. doi: 10.1016/J.RESMIC.2017.03.004.

Ceugniz A., M. Tourret, E. Dussert, F. Coucheney, B. Deracinois, P. Jacques, C. Flahaut, E. Heuson, D. Drider, J. Behra-Miellet. 2017. Interactions between *Kluyveromyces marxianus* from cheese origin and the intestinal symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*: Impressive antioxidative effects, LWT - Food Sci. Technol. (81) 281–290. doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.056.

Chan G. C. F., Chan, W. K., & Sze, D. M. Y. (2009). The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology*, 2(1), 25.

Chan, G. C. F., W. K. Chan, D. M. Y. Sze. 2009. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2(1), 25.

Chaves-Pozo E., P. Muñoz, A. López-Muñoz, P. Pelegrín, A. García Ayala, V. Mulero, J. Meseguer. 2005. Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*, *Cell Tissue Res.* (320) 61–68. doi:10.1007/s00441-004-1063-7.

Chethan G. E., J. Garkhal, S. Sircar, Y.P.S. Malik, R. Mukherjee, N.R. Sahoo, R.K. Agarwal, U.K. De. 2017. Immunomodulatory potential of β -glucan as supportive treatment in porcine rotavirus enteritis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (191) 36–43. doi: 10.1016/J.VETIMM.2017.07.012.

Cuesta, A., M. Ángeles Esteban, J. Meseguer. 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Mol. Immunol.* 43, 1275–1285.

Dagbagli S., Y. Goksungur, Optimization of b-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. 2008. *Electron. J. Biotechnol.* (11) 11–12. doi:10.4067/s0717-34582008000400011.

Dalmo, R. A., J. Børgwald. 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immun.* 25 (4), 384-396.

Daniels, N.A., B. Ray. 2000. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary. *JAMA*, 284(12): 1541-1545.

Danilova N., J. Bussmann, K. Jekosch, L. A. Steiner. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* 6, 295–302.

De Marco Castro, E., P.C. Calder, H. M. Roche. 2020. β -1, 3/1, 6-glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions. *Mol. Nutr. Food Res.* 1901071.

Del Re B., B. Sgorbati, M. Miglioli, D. Palenzona. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*, Lett. Appl. Microbiol. (31) 438–442. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x.

Desel C., K. Werninghaus, M. Ritter, K. Jozefowski, J. Wenzel, N. Russkamp, U. Schleicher, D. Christensen, S. Wirtz, C. Kirschning, E.M. Agger, C.P. da Costa, R. Lang. 2013. The Mincle-Activating Adjuvant TDB Induces MyD88-Dependent Th1 and Th17 Responses through IL-1R Signaling. PLoS One. 8e53531.

Devi G., R. Harikrishnan, B.A. Paray, M.K. Al-Sadoon, S.H. Hoseinifar, C. Balasundaram. 2019. Comparative immunostimulatory effect of probiotics and prebiotics in *Channa punctatus* against *Aphanomyces invadans*, Fish Shellfish Immunol. (86) 965–973. doi: 10.1016/J.FSI.2018.12.051.

Dezfuli B. S., L. Giari. 2008. Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. J. Fish Dis. 31(11), 845-852.

Dezfuli, B. S., L. Giari, A. Lui, S. Squerzanti, G. Castaldelli, A. P. Shinn, M. Lorenzoni. 2012. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) expression in the intestine of *Salmo trutta trutta* naturally infected with an acanthocephalan. *Parasites & vectors*, 5(1), 198.

Dos M., S.F. de Lima, K.M.S. de Souza, W.W.C. Albuquerque, J.A.C. Teixeira, M.T.H. Cavalcanti, A.L.F. Porto. 2017. *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties, Microb. Pathog. (110) 670–677. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.010.

Dujon B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, P. Wincker, J.-L. Souciet. 2004. Genome evolution in yeasts, Nature. (430) 35–44. doi:10.1038/nature02579.

Elazab M. F. A., Y. Inoue, H. Kamei, H. Horiuchi, S. Furusawa, 2017. Zymosan A enhances humoral immune responses to soluble protein in chickens. J Vet Med Sci. 16-0636.

Ellis A.E., 1977. The leucocytes of fish: a review. J. Fish Biol. 11, 453–491.

Fadda M.E., V. Mossa, M. Deplano, M.B. Pisano, S. Cosentino. 2017. *In vitro* screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.020.

FAO/OMS. 2001. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.

Fast M.D., N. W. Ross, A. Mustafa, D. E. Sims, S. C. Johnson, G. A. Conboy, D. J. Speare, G. Johnson, J. F. Burka. 2002. Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. Dis. Aquat. Organ. 52, 57–68.

- Fazio, A., R. Cerezuela, M. R. Panuccio, A. Cuesta, M.A. Esteban. 2017. *In vitro* effects of Italian *Lavandula multifida* L. leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata*) leucocytes and SAF-1 cells. *Fish Shellfish Immunol*, 66, 334-344.
- Fernandez-Pacheco Rodríguez P., M. Arévalo-Villena, I. Zaparoli Rosa, A. Briones Pérez. 2018. Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach, *Food Res. Int.* (112) 143–151. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.06.008.
- Fillatreau S., A. Six, S. Magadan, R. Castro, J. O. Sunyer, P. Boudinot. 2013. The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish. *Front. Immunol.* 4, 28.
- Folch J., M. Lees, G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* (226) 497–509.
- Forlenza M., I. R. Fink, G. Raes, G. F. Wiegertjes. 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1246–1255.
- Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, T. Mukai, T. Ueho. 1953. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.* 4, 299–304.
- Galinari É., J. Almeida-Lima, G.R. Macedo, H.C. Mantovani, H.A.O. Rocha. 2018. Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall α -d-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus*, *Int. J. Biol. Macromol.* (109) 837–846. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.053.
- Gantner B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine*, 197(9), 1107-1117.
- García-Beltrán J.M., C. Espinosa, F.A. Guardiola, M.Á. Esteban, Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 64 (2017) 426–436. doi: 10.1016/J.FSI.2017.03.042.
- García-Beltrán, J. M., C. Espinosa, F. Guardiola, M.A. Esteban. 2018. *In vitro* effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol*, 79, 1-10.
- Gatesoupe FJ. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquacult.* 267(1-4) 20-30.
- Gdoura, M., H. Sellami, H. Nasfi, R. Trabelsi, S. Mansour, T. Attia, M. Siala. 2016. Molecular Detection of the Three Major Pathogenic *Vibrio* Species from Seafood Products and Sediments in Tunisia Using Real-Time PCR. *J Food Prot.*, 79(12), 2086-2094.
- Geissler, B. 2012. Bacterial toxin effector-membrane targeting: outside in, then back again. *Front. Cell Infect. Microbiol.*2:75.

Gilliland S.E., T.E. Staley, L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct, J. Dairy Sci. (67) 3045–3051. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(84)81670-7.

Gobi N., B. Vaseeharan, J.-C. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam, A. Iswarya. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*, Fish Shellfish Immunol. (74) 501–508. doi: 10.1016/J.FSI.2017.12.066.

Goodridge H. S., D. M. Underhill. 2008. Fungal recognition by TLR2 and Dectin-1. In Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. 87-109. Springer, Berlin, Heidelberg.

Goodridge, H. S., A. J. Wolf, D. M. Underhill. 2009. β -glucan recognition by the innate immune system. Immunol. Rev. 230(1), 38-50.

Guardiola F.A., A. Cuesta, E. Abellán, J. Meseguer, M.A. Esteban, Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish, Fish Shellfish Immunol. 40 (2014) 24–31. doi: 10.1016/J.FSI.2014.06.018.

Guluarte C., M. Reyes-Becerril, D. Gonzalez-Silvera, A. Cuesta, C. Angulo, M. Á. Esteban. 2019. Probiotic properties and fatty acid composition of the yeast *Kluyveromyces lactis* M3. In vivo immunomodulatory activities in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Shellfish Immunol. 94, 389-397.

Gut A. M., T. Vasiljevic, T. Yeager, O.N. Donkor. 2019. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties, J. Funct. Foods. (58) 56–66. doi: 10.1016/J.JFF.2019.04.046.

Gutierrez West, C. K., S. L. Klein, C. R. Lovell. 2013. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. Appl. Environ. Microbiol.79, 2247–2252.

Haider, M., Dambuza, I. M., Asamaphan, P., Stappers, M., Reid, D., Yamasaki, S., Erwig, L. P. (2019). The pattern recognition receptors *dectin-2*, *mincle*, and *FcR γ* impact the dynamics of phagocytosis of *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, and *Mucor* species. *PLoS one*. 14(8).

Halliwell B., J.M.C. Gutteridge. 1985. Free radicals in biology and medicine, FEBS letters. doi.org/10.1080/09553009014552071.

Han, B., K. Baruah, E. Cox, D. Vanrompay, P. Bossier. 2020. Structure-Functional Activity Relationship of β -Glucans from the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Front Immunol*. 11, 658.

Hervio-Heath, D., R. R. Colwell, A. Derrien, A. Robert-Pillot, J. M. Fournier, M. Pommepuy. 2002. Occurrence of pathogenic *Vibrio* in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.*92, 1123–1135.

Hiyoshi, H., T. Kodama, K. Saito, K. Gotoh, S. Matsuda., Y. Akeda. 2011. Vop V, an F-actin binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus* induced enterotoxicity. *Cell Host Microbe* 10, 401–409.

Ikeda Y., Y. Adachi, K. I. Ishibashi, N. Miura, N. Ohno, N. 2005. Activation of toll-like receptor-mediated NF- κ B by zymosan-derived water-soluble fraction: possible contribution of endotoxin-like substances. *Immunopharm Immunot* 27(2), 285-298.

Inoue T., T. Moritomo, Y. Tamura, S. Mamiya, H. Fujino, T. Nakanishi. 2002. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry, *Fish Shellfish Immunol.* (13) 379–390. doi: 10.1006/FSIM.2002.0413.

Iwabuchi K., I. Nagaoka. 2002. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(4), 1454-1464.

Ji K., N.Y. Jang, Y.T. Kim. 2015. Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *J. Microbiol. Biotechnol.* (25) 1568–1577. doi:10.4014/jmb.1501.01077.

Johansson P., Y. Corripio-Miyar, T. Wang, B. Collet, C.J. Secombes, J. Zou. 2012. Characterisation and expression analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologue of the human dendritic cell marker CD208/lysosomal associated membrane protein 3. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 402–413.

Kalantari, P., Y. Morales, E. A. Miller, L. D. Jaramillo, H. E. Ponichtera, M. A. Wuethrich, M. J. Stadecker. 2018. CD209a synergizes with Dectin-2 and Mincle to drive severe Th17 cell-mediated schistosome egg-induced immunopathology. *Cell Rep.* 22(5), 1288-1300.

Kanjan, P., N. M. Sahasrabudhe, B. J. de Haan, P. de Vos. 2017. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *J. Funct. Foods.* 37, 433-440.

Kaushik J.K., A. Kumar, R.K. Duary, A.K. Mohanty, S. Grover, V.K. Batish. 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*, *PLoS One.* (4) e8099. doi: 10.1371/journal.pone.0008099.

Kaysner, C. A., A. DePaola. 2004. *Vibrio*. *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 9. Arlington, VA: U.S. FDA.

Kim, H. S., J. T. Hong, Y. Kim, S. B. Han. 2011. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. *Immune Netw.* 11(4), 191-195.

Kleinewietfeld M., D. A. Hafler. 2013. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 25, 305–312.

Kos B., J. Šušković, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece, S. Matošić. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* (94) 981–987. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01915. x.

- Kourelis A., C. Kotzamanidis, E. Litopoulou-Tzanetaki, J. Papaconstantinou, N. Tzanetakis, M. Yiangou, Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. 2010. *J. Appl. Microbiol.* (109) 260–271. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04651. x.
- Krachler, A. M., H. Ham, K. Orth. 2012. Turnabout is fair play: use of the bacterial multivalent adhesion molecule 7 as an antimicrobial agent. *Virulence*3, 68–71.
- Krachler, A. M., K. Orth. 2011. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands. *J. Biol. Chem.* 286, 38939–38947.
- Kumar, B. K., V. K. Deekshit, J. R. M. Raj, P. Rai, B. M. Shivanagowda, I. Karunasagar, I. Karunasagar. 2014. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Aquac.* 433, 247-251.
- Kumar, H., Y. Kumagai, T. Tsuchida, P. A. Koenig, T. Satoh, Z. Guo, T. Kawai. 2009. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal β -glucan. *J. Immunol.* 183 (12), 8061-8067.
- Kumura H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka, K. Shimazaki. 2004. Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications, *J. Dairy Sci.* (87) 4050–4056. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(04)73546-8.
- Legentil, L., F. Paris, C. Ballet, S. Trouvelot, X. Daire, V. Vetvicka, V. Ferrières. 2015. Molecular interactions of β -(1→ 3)-glucans with their receptors. *Molecules*, 20(6), 9745-9766.
- Leung M. Y. K., C. Liu, J. C. M. Koon, K. P. Fung. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.* 105(2), 101-114.
- Li Y., F.A. Sadiq, T. Liu, J. Chen, G. He. 2015. Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*, *J. Funct. Foods.* (16) 278–288. doi: 10.1016/j.jff.2015.04.043.
- Lie O., O. Evensen, A. Sorensen, E. Froyssadal. 1989. Study on lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Organ.* 6, 1–5.
- Liu B., X. Gong, S. Chang, Y. Yang, M. Song, D. Duan, L. Wang, Q. Ma, J. Wu. 2009. Disruption of the OCH1 and MNN1 genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*, *J. Biotechnol.* (143) 95–102. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.06.016.
- Liu, J., J. Tang, X. Li, Q. Yan, J. Ma, Z. Jiang. 2019. Curdlan (*Alcaligenes faecalis*) (1→ 3)- β -d-Glucan Oligosaccharides Drive M1 Phenotype Polarization in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages via Activation of MAPKs and NF- κ B Pathways. *Molecules.* 24(23), 4251.

- Lohith K., K.A. Anu-Appaiah. 2018. Antagonistic effect of *Saccharomyces cerevisiae* KTP and *Issatchenkia occidentalis* ApC on hyphal development and adhesion of *Candida albicans*, *Med. Mycol.* (56) 1023–1032. doi:10.1093/mmy/myx156.
- Lugo-Villarino G., K. M. Balla, D. L. Stachura, K. Bañuelos, M. B. Werneck, D. Traver. 2010. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *PNAS.* 107(36), 15850-15855.
- M. Suutari, S. Laakso. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation, *Crit. Rev. Microbiol.* (20) 285–328. doi:10.3109/10408419409113560.
- Maccaferri S., A. Klinder, P. Brigidi, P. Cavina, A. Costabile, Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 956–964. doi:10.1128/AEM.06385-11.
- Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151.
- Maity P., I. K. Sen, P. K. Maji, S. Paloi, K. S. P. Devi, K. Acharya, S.S. Islam. 2015. Structural, immunological, and antioxidant studies of β -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. *Carbohydrate polymers*, 123, 350-358.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *Lancet.* 361, 743–749.
- Martinez C.A., M.E. Loureiro, M.A. Oliva, M. Maestri. 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress, *Plant Sci.* (160) 505–515.
- Matsumoto M., T. Tanaka, T. Kaisho, H. Sanjo, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, A. Nancy. 1999. A Novel LPS-Inducible C-Type Lectin Is a Transcriptional Target of NF-IL-6 in Macrophages, *J. Immunol.* 163(9), 5039-5048.
- McCarter L. 1999. The Multiple Identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *JMMB*, 1(1): 51-57.
- McDole J. R., L. W. Wheeler, K.G. McDonald, B. Wang, V. Konjufca, K. A. Knoop, M. J. Miller. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483(7389), 345-349.
- McGuckin M. A., S. K. Lindén, P. Sutton, T. H. Florin. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265-278.
- Mcintosh, M., B. A. Stone, V. A. Stanisich. 2005. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Appl Microbiol Biot.* 68 (2), 163-173.

- McLaughlin, J. B., A. DePaola, C. A. Bopp, K. A. Martinek, N. P. Napolilli, C. G. Allison, J. P. Middaugh. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N Engl J Med*, 353(14), 1463-1470.
- Mejía-Barajas J., R. Montoya-Pérez, S. Manzo-Avalos, C. Cortés-Rojo, H. Riveros-Rosas, C. Cervantes, A. Saavedra-Molina. 2018. Fatty acid addition and thermotolerance of *Kluyveromyces marxianus*, *FEMS Microbiol. Lett.* 365. 2018. doi:10.1093/femsle/fny043.
- Miyake Y., S. Yamasaki. 2020. Immune recognition of pathogen-derived glycolipids through Mincle. *Lectin in Host Defense Against Microbial Infections*. 31-56. Springer, Singapore.
- Mohanty D., S. Panda, S. Kumar, P. Ray. 2019. *In vitro* evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica*, *Microb. Pathog.* (126) 212–217. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.014.
- Morrison W.R., L.M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid Res.* (5) 600–8.
- Nablo B.J., TY Chen, MH Schoenfisch. 2001. Sol-gel derived nitric-oxide releasing materials that reduce bacterial adhesion. *J Am Chem Soc.* (3) 9712-9713. doi:10.1021/ja0165077.
- Nakao M., M. Tsujikura, S. Ichiki, T. K. Vo, T. Somamoto. 2011. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1296–1308.
- Nandi A. K., S. Samanta, S. Maity, I. K. Sen, S. Khatua, K. S. P. Devi, S.S. Islam. 2014. Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. *Carbohydrate polymers*, 99, 774-782.
- Navarrete P., D. Tovar-Ramírez. 2014. Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. *Sustainable aquaculture techniques*, 1.
- Negi, S., D. K. Das, S. Pahari, S. Nadeem, N. J. Agrewala. 2019. Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory. *Front. Immunol.* 10.
- Nelapati, S., K. Nelapati, B. K. Chinnam. 2012. *Vibrio parahaemolyticus*-An emerging foodborne pathogen-A Review. *Vet. World.* 5, 48–62.
- Neumann N.F., D. Fagan, M. Belosevic. 1995. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages, *Dev. Comp. Immunol.* (19) 473–482. doi:10.1016/0145-305(95)00032-O.
- Newton, A., M. Kendall, D. J. Vugia, O. L. Henao, B. E. Mahon. 2012. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin. Infect. Dis.*, 54(suppl_5), S391-S395.

- Nikolakopoulou, C., J. A. Willment, G. D. Brown. 2020. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Lectin in Host Defense Against Microbial Infections*. 1-30. Springer, Singapore.
- Nishibuchi, M. 2006. The biology of *Vibrios*: molecular identification. *Am. Soc. Microbiol.* 4, 44–64.
- Oriol Sunyer J., L. Tort. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (45) 333–345. doi:10.1016/0165-2427(94)05430-Z.
- Ortuno J., A. Cuesta, A. Rodriguez, M.Á. Esteban, J. Meseguer. 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol.* 85(1-2) 41-50.
- Palaksha, K. J., G. W. Shin, Y. R. Kim, T. S. Jung. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immun.* 24(4), 479-488.
- Paranjpye, R., O. S. Hamel, A. Stojanovski, M. Liermann. 2012. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8631–8638.
- Park S.C., M.H. Hwang, Y.H. Kim, J.C. Kim, J.C. Song, K.W. Lee, K.S. Jeong, M.H. Rhee, K.S. Kim, T.W. Kim. 2006. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources, *World J. Microbiol. Biotechnol.* (22) 35–37. doi:10.1007/s11274-005-4856-2.
- Park, K. S., T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, K. Okada, T. Iida. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 72, 6659–6665.
- Pazhani, G. P., S. K. Bhowmik, S. Ghosh, S. Guin, S. Dutta, K. Rajendran. 2014. Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:2815.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, S. Gordon. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 123–128.
- Penney, J., Y. Lu, B. Pan, Y. Feng, C. Walk, J. Li. 2019. Pure yeast beta-glucan and two types of yeast cell wall extracts enhance cell migration in porcine intestine model. *J. Funct. Foods.* 59, 129-137.
- Petit, J., R. T. Wheeler, E. V. Carter, C. A. Ferreira de Oliveira, M. Forlenza, G. F. Wiegertjes. 2019. Studies into β -glucan recognition in fish suggests a key role for the C-type lectin pathway. *Front Immunol.* 10, 280.
- Pierrard, M.A., K. Roland, P. Kestemont, M. Dieu, M. Raes, F. Silvestre. 2012. Fish peripheral blood mononuclear cells preparation for future monitoring applications. *Anal. Biochem.* 426(2), 153–165.

- Plato, A., S. E. Hardison, G.D. Brown. 2015. Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Semin Immunopathol.* 37-(2) 97-106). Springer Berlin Heidelberg.
- Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholera* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1528–1533.
- Qadri, F., N. R. Chowdhury, Y. Takeda, G. B. Nair. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* seafood safety and associations with higher organisms. *Oceans Health Pathog. Mar. Environ.* 277–295.
- Quade M.J., J.A. Roth. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (58) 239–48.
- R. Hari Krishnan, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS. 2011. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish Shellfish Immunol.* 30(3) 964-71.
- Raimondi S., D. Uccelletti, A. Amaretti, A. Leonardi, C. Palleschi, M. Rossi. 2010. Secretion of *Kluyveromyces lactis* Cu/Zn SOD: strategies for enhanced production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (86) 871–878. doi:10.1007/s00253-009-2353-5.
- Raja R. A., R. Sridhar, C. Balachandran, A. Palanisammi, S. Ramesh, K. Nagarajan. 2017. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 67, 368-381.
- Reyes-Becerril M., C. Guluarte, D. Ceballos-Francisco, C. Angulo, M.Á. Esteban. 2017. Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish Shellfish Immunol.* (64) 165–175. doi: 10.1016/j.fsi.2017.03.027.
- Reyes-Becerril M., F. Ascencio, V. Gracia-Lopez, M.E. Macias, M.C. Roa, M.Á. Esteban. 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) 1169–80. doi:10.1007/s10695-014-9913-z.
- Reyes-Becerril M., M.Á. Esteban, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, Polyamine determination in different strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* by high pressure liquid chromatography. 2011. *Food Chem.* (127) 1862–1865. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.006.
- Reyes-Becerril M., E. Alamillo, S. Rosales-Mendoza, F. Ascencio, M. A. Esteban, C. Angulo. 2017. Molecular characterization and expression analyses of toll like receptor-5 induced by *Vibrio parahaemolyticus* antigens in Pacific red snapper. *Fish Shellfish Immunol.* 68, 180-189.
- Reyes-Becerril M., M. Maldonado-García, C. Guluarte, A. León-Gallo, S. Rosales-Mendoza, F. Ascencio, C. Angulo. 2016. Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus*

lysate on humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 310-321.

Rice, P.J., J. L. Kelley, G. Kogan, H. E. Ensley, J. H. Kalbfleisch, I. W. Browder, D. L. Williams. 2002. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for 1,3- β -D-glucans. *J Leukoc Biol* 72: 140–146.

Ringø, E., R. E. Olsen, J. G. Vecino, S. Wadsworth, S. K. Song. 2012. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J Mar Sci Res Dev*, 2(1), 104.

Roberts, R.J. 2001. *Fish Pathology*. W.B. Saunders, London, U.K

Robertsen, B., G. Rørstad, R. Engstad, J. Raa. 1990. Enhancement of non - specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.* 13(5), 391-400.

Ross, G. D., V. Větvička, J. Yan, Y. Xia, J. Větvičková. 1999. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology*, 42(1-3), 61-74.

Ryan, K.J.; C.G. Ray. 2004. *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). New York: McGraw Hill.

Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S. H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, T. Kinjo. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 2007; 8:39–46.

Sakhtah H., J. Behler, A. Ali-Reynolds, T.B. Causey, S. Vainauskas, C.H. Taron. 2019. A novel regulated hybrid promoter that permits auto-induction of heterologous protein expression in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00542-19. doi:10.1128/AEM.00542-19.

Salinas I., D. Parra. 2015. Mucosal health in aquaculture.

Salinas I., Y.A. Zhang, J.O. Sunyer. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35(12), 1346-1365.

Salomon, D., H. Gonzalez, B. L. Updegraff, K. Orth. 2013. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *PLoS ONE.* 8:61086.

Saurabh, S., P. K. Sahoo. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult. Res.* 39, 223–239.

Sawabe, T., Y. Ogura, Y. Matsumura, F. Gao, A. K. M. Amin, S. Mino, M. Satomi. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritoni* sp. nov. *Front Microbiol.* 4, 414.

Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish shellfish immunol.* 19(4), 293-306.

- Shao Y., C. Li, W. Zhang, W. Xu, X. Duan, Y. Li, Q. Qiu, C. Jin. 2016. Cloning and comparative analysis the proximal promoter activities of arginase and agmatinase genes in *Apostichopus japonicus*, *Dev. Comp. Immunol.* (65) 299–308. doi: 10.1016/J.DCI.2016.08.001.
- Shao Y., H. Chen, M. Lv, C. Li, W. Zhang, Y. Li, X. Zhao, Y. Bao. 2017. A novel TNFAIP8 gene mediates l-arginine metabolism in *Apostichopus japonicus*, *Fish Shellfish Immunol.* (69) 26–34. doi: 10.1016/J.FSI.2017.08.004.
- Shao Y., Z. Wang, Z. Lv, C. Li, W. Zhang, Y. Li, X. Duan. 2016. NF- κ B/Rel, not STAT5, regulates nitric oxide synthase transcription in *Apostichopus japonicus*, *Dev. Comp. Immunol.* (61) 42–47. doi: 10.1016/J.DCI.2016.03.019.
- Smith I.M., A. Baker, J.E. Christensen, T. Boekhout, H. Frøkiær, N. Arneborg, L. Jespersen. 2016. *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces boulardii* induce distinct levels of dendritic cell cytokine secretion and significantly different T cell responses *in vitro*, *PLoS One.* (11) e0167410. doi: 10.1371/journal.pone.0167410.
- Söldner C. A., A.H.C. Horn, H. Sticht, Interaction of Glycolipids with the Macrophage Surface Receptor Mincle – a Systematic Molecular Dynamics Study, *Sci. Rep.* 8 (2018) 5374.
- Sorger D., G. Daum. 2003. Triacylglycerol biosynthesis in yeast, *Appl Microbiol Biotechnol.* (61) 289-299. doi: 10.1007/s00253-002-1212-4.
- Spohner S.C., V. Schaum, H. Quitmann, P. Czermak. 2016. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology, *J. Biotechnol.* (222) 104–116. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023.
- Subramanian S., S.L. MacKinnon, N.W. Ross, A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 148 (2007) 256–263. doi: 10.1016/J.CBPB.2007.06.003.
- Takemura AF, D. M. Chien, M. F. Polz. 2014. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from genus to the population level. *Front Microbiol.* 5:38.
- Thompson, I. J., P. C. Oyston, D. E. Williamson. 2010. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(3), 339-352.
- Tripathi M.K., S.A. Karim. 2010. Effect of individual and mixed live yeast culture feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial crude protein synthesis in lambs, *Anim. Feed Sci. Technol.* (155) 163–171. doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2009.11.007.
- Tsikitis, V. L., N. A. Morin, E. O. Harrington, J. E. Albina, J. S. Reichner. 2004. The lectin-like domain of complement receptor 3 protects endothelial barrier function from activated neutrophils. *The Journal of Immunology*, 173(2), 1284-1291.

- Underhill D. M., H. S. Goodridge. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol.* 2007; 28: 66–73.
- Underhill DM. 2003. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res.* 9(3):176-180. doi:10.1179/096805103125001586.
- Ulvestad, J. S., J. Kumari, T. Seternes, H. Chi, R.A. Dalmo, 2018. Studies on the effects of LPS, β -glucan and metabolic inhibitors on the respiratory burst and gene expression in Atlantic salmon macrophages. *Journal of fish diseases*, 41(7), 1117-1127.
- Vasta G.R., M. Nita-Lazar, B. Giomarelli, H. Ahmed, S. Du, M. Cammarata, N. Parrinello, M. A. Bianchet, L. M. Amzel. 2011. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptive immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1388–1399.
- Velasco-de-Andrés, M., C. Català, S. Casadó-Llombart, I. Simões, O. Zaragoza, E. Carreras, F. Lozano. 2020. The lymphocyte scavenger receptor CD5 plays a nonredundant role in fungal infection. *Cell Mol Immunol.* 1-3.
- Velazquez-Carriles, C., M. E. Macias-Rodríguez, G. G. Carbajal-Arizaga, J. Silva-Jara, C. Angulo, M. Reyes-Becerril, 2018. Immobilizing yeast β -glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response in fish leukocytes. *Fish & shellfish immunology*, 82, 504-513.
- Vohra A., P. Syal, A. Madan. 2016. Probiotic yeasts in livestock sector, *Anim. Feed Sci. Technol.* (219) 31–47. doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2016.05.019.
- Von Asmuth, E. J. U., J. G. Maessen, C. J. Van der Linden, W. A. Buurman. 1990. Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Interleukin 6 in a Zymosan-Induced Shock Model. *Scandinavian journal of immunology*, 32(4), 313-319.
- Vono, M., C. S. Eberhardt, E. Mohr, F. Auderset, D. Christensen, M. Schmolke, B. Mastelic-Gavillet. 2018. Overcoming the neonatal limitations of inducing germinal centers through liposome-based adjuvants including C-type lectin agonists trehalose dibehenate or curdlan. *Front. Immunol.* 9, 381.
- Vuddhakul, V., A. Chowdhury, V. Laohaprerththisan, P. Pungrasamee, N. Patararungrong, P. Thianmontri. 2000. Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2685–2689.
- Wang X. W., J. X. Wang. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev Comp Immunol* 2013; 39:27–38.
- Wang Y., Y. Wu, Y. Wang, H. Xu, X. Mei, D. Yu, Y. Wang, W. Li. 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria, *Nutrients.* (9) 521. doi:10.3390/nu9050521.
- Weis, K.E., R. M. Hammond, R. Hutchinson, C. G. M. Blackmore. 2011. *Vibrio* illness in Florida, 1998–2007. *Epidemiol Infect* 139, 591–598.

Willment, J. A., A. S. Marshall, D. M. Reid, D. L. Williams, S. Y. Wong, S. Gordon, G. D. Brown. 2005. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* 2005; 35:1539–1547.

Yang, Z.-Q., X. A. Jiao, X. H. Zhou, G. X. Cao, W. M. Fang, R.X. Gu. 2008. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. *IJMM* 125, 279–285.

Zhang Y.A., I. Salinas, J. Li, D. Parra, S. Bjork., Z. Xu, S. E. LaPatra, J. Bartholomew, J. O. Sunyer. 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827–835.

Zhang, L., K. Orth, K. 2013. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* Infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 70–77.

Zhang, Q., X. Dong, B. Chen, Y. Zhang, Y. Zu, W. Li. 2016. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Dev Comp Immunol*, 55, 159-168.

Zheng, Y., Q. Wu, K. Wu, J. Zhang, W. Guo, K. Wu. 2014. Virulence associated gene detection and ERIC-PCR typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from foods in four Southern Chinese provinces. *Acta Microbiol. Sinica* 54, 14–23.

Zimmerman J. W., J. Linderth, P. A. Fish, G. P. Palace, T. T. Stevenson, D. E. DeMong. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem* 273;22014-22020, 1998.

Zoccola E., S. Kellie, A.C. Barnes. 2017. Immune transcriptome reveals the mincle C-type lectin receptor acts as a partial replacement for TLR4 in lipopolysaccharide-mediated inflammatory response in barramundi (*Lates calcarifer*), *Mol. Immunol.* 83, 33–45.

Zuo Z., B. Shang, Y. Shao, W. Li, J. Sun. 2019. Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*, *Fish Shellfish Immunol.* (86) 160–168. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.003.